



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

***Seguimiento Molecular del Injerto en Pacientes Pediátricos en Protocolo de  
Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas***

**T E S I S**

**que para obtener el título de:**

**Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

**P R E S E N T A**

**MAURICIO ESTRADA GARCÍA**

**ASESORA**

**Dra. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ**

**CO-ASESORAS**

**M. en C. TANIA ANGELES FLORIANO**

**Q.F.B. LAURA GRICELDA MARTÍNEZ MÉNDEZ**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Seguimiento molecular del injerto en pacientes pediátricos en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Que presenta el pasante: Mauricio Estrada García

Con número de cuenta: 307013310 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Diciembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/mmgm\*

## **Dedicatoria**

A mis padres

Por haberme apoyado en todo momento de mi vida, respaldarme en cada una de mis decisiones y sobre todo, por brindarme su amor incondicional que me ayuda a seguir adelante.

A mi familia

A mi hermano Javier, que aunque siempre parece estar molestando es el primero en preocuparse por mí y me ha demostrado que todo lo que yo quiera se puede conseguir. Mis abuelitos, en especial a mi abuelito Alberto, quien me inculco desde niño lo importante que es el estudio y la disciplina que se debe llegar a tener.

A la UNAM

Porque simplemente es un orgullo ser egresado de esta gran institución reconocida a nivel mundial, que además de brindarme conocimiento, me formo como un futuro profesionalista.

Mi facultad, donde se han formado grandes estudiantes y que me dio la oportunidad de adquirir conocimientos y vivencias únicas al lado de mis amigos Guido, Michel, Laura, Coquito, Xo y Larissa, quienes siempre me apoyaron e hicieron las cosas más sencillas, al igual que Fanny quien siempre creyó en mí y se ha convertido en una persona muy especial para mí.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez

Que me abrió las puertas gracias a la Dra. Briceida, quien me permitió conocer cómo es que se trabaja en un hospital tan renombrado, al Químico Israel y a la Q.F.B. Laura por estar al pendiente de la evolución de mi proyecto, a todos en el laboratorio de biología molecular, a Mary y Fer que siempre me brindaron su apoyo, pero sobretodo a Tania quien además de convertirse en una buena amiga siempre se mantuvo a mi lado durante todo este camino.

A mis amigos

Gallardo, George, Yuriria que a pesar de distanciarnos, siempre sé que puedo contar con ellos, y que sin duda representan algo muy importante para mí.

## INDICE

<b>I. Introducción</b>	14
<b>II. Marco Teórico</b>	17
<b>2.1 Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas</b>	17
<b>2.2 Antecedentes históricos del TCPH</b>	17
<b>2.3 Función del TCPH</b>	20
<b>2.4 Tipos de trasplante</b>	20
2.4.1 <i>Autólogo (Autotrasplante)</i>	20
2.4.2 <i>Alogénico (Alotrasplantes)</i>	21
2.4.3 <i>Singénico (Isotrasplante)</i>	21
<b>2.5 Fuentes de CPHs</b>	22
2.5.1 <i>Médula ósea</i>	22
2.5.2 <i>Sangre periférica</i>	23
2.5.3 <i>Cordón umbilical</i>	24
<b>2.6 Régimen de acondicionamiento</b>	25
2.6.1 <i>Regímenes mieloablativos</i>	25
2.6.2 <i>Regímenes que emplean irradiación corporal total (ICT)</i>	26
<b>2.7 Indicaciones de TCPHs:</b>	31
2.7.1 <i>LLA</i>	31
2.7.2 <i>LMA</i>	32
2.7.3 <i>LGC</i>	32
2.7.4 <i>Linfoma Hodgkin y no Hodgkin</i>	33
2.7.5 <i>Tumores Sólidos</i>	34
2.7.6 <i>Neuroblastoma</i>	34
2.7.7 <i>Sarcoma de Ewing</i>	35
2.7.8 <i>Tumores cerebrales</i>	36
2.7.9 <i>Inmunodeficiencias</i>	36

<b>2.8 Complicaciones tempranas del TCPHS</b>	<b>37</b>
2.8.1 <i>Infecciones</i>	37
2.8.2 <i>CMV</i>	38
2.8.3 <i>VEB</i>	39
2.8.4 <i>Virus BK</i>	39
2.8.5 EICH (Factores de riesgo)	40
2.8.5.1 <i>EICH aguda</i>	42
<b>2.9 Complicaciones tardías del TCPHS</b>	<b>44</b>
2.9.1 <i>GVDH crónica (factores de riesgo)</i>	44
<b>2.10 Mortalidad asociada al TCPHS</b>	<b>45</b>
<b>2.11 Injerto</b>	<b>46</b>
<b>2.12 Establecimiento del injerto del donador</b>	<b>47</b>
<b>2.13 Tipos de Quimerismo</b>	<b>51</b>
<b>2.14 Quimerismo y Tolerancia</b>	<b>52</b>
<b>2.15 Técnicas de monitoreo del injerto en el post trasplante (seguimiento)</b>	<b>57</b>
2.15.1 <i>Descripción de las técnicas más utilizadas</i>	59
2.15.2 <i>Descripción de Microsatélites</i>	61
2.15.3 <i>Descripción de los alelos</i>	61
2.15.4 <i>Alelos Informativos (características para la elección)</i>	64
2.15.5 <i>Evaluación del porcentaje (área vs altura, descripción de fórmulas)</i>	66

<b>2.16 Recomendaciones internaciones para el seguimiento molecula del injerto ASHI</b>	68
<b>2.17 Evaluación del quimerismo en sangre total y en diferentes poblaciones celulares</b>	68
<b>2.18 Importancia del seguimiento del injerto (quimerismo)</b>	70
<b>III. Justificación</b>	71
<b>IV. Hipótesis</b>	72
<b>V. Objetivos</b>	73
5.1 <i>Objetivo general</i>	73
5.2 <i>Objetivos Particulares</i>	73
<b>VI. Planteamiento del problema</b>	74
<b>VII. Material(es) y Método(s)</b>	75
<b>VIII. Resultados</b>	79
<b>IX. Discusión de los resultados</b>	91
<b>X. Conclusión (es)</b>	97
<b>XI. Referencias</b>	98

## Índice de Tablas.

Tabla No. 1	Factores de exclusión para donación de sangre de cordón umbilical	23
Tabla No. 2	Identificación de ICT	26
Tabla No. 3	Regímenes de acondicionamiento que incluyen ICT	27
Tabla No. 4	Regímenes de quimioterapia a dosis altas	28
Tabla No. 5	Esquema de acondicionamiento de intensidad reducida	30
Tabla No. 6	Indicaciones de TCPH en Linfomas Hodgkin y no Hodgkin, de acuerdo con el EBMT	34
Tabla No. 7	Principales fármacos utilizados como tratamiento de la EICH	40
Tabla No. 8	Gradación clínica de la EICH	43
Tabla No. 9	Tipos de quimerismo en el receptor	52
Tabla No. 10	Técnicas de estudio del quimerismo	58
Tabla No. 11	Marcadores STR comúnmente utilizados para la evaluación del quimerismo	61
Tabla No. 12	Requisitos de un marcador genético para el estudio del quimerismo	62
Tabla No. 13	Sistemas de detección de STR	62
Tabla No. 14	Loci, localización cromosómica, marcadores y alelos incluidos en cada uno de los marcadores	63
Tabla No. 15	Pacientes, género y diagnóstico por el cual se realiza el trasplante	79
Tabla No. 16	Cálculos del quimerismo	87

## Índice de imágenes

Imagen No. 1 Infecciones frecuentes en TCPH	38
Imagen No. 2 Reconstitución de células inmunológica respecto al tiempo	48
Imagen No. 3 Regulación de células T/ protocolo basado en quimerismo hematopoyético para la inducción de la tolerancia del trasplante	56
Imagen No. 4 Fórmulas de tipo I y tipo II para calcular el quimerismo	67
Imagen No. 5 Fórmulas para calcular el porcentaje de quimerismo en trasplante de doble unidad de cordón umbilical	78
Imagen No. 6 Electroferograma identificando a los marcadores genéticos, intensidad de fluorescencia y alelos presentes	80
Imagen No. 7 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina del paciente pre-trasplante de CPH	81
Imagen No. 8 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina del donador	82
Imagen No. 9 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina del receptor Post-trasplante	83
Imagen No.10 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina, control positivo	84
Imagen No. 11 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina, control negativo	85
Imagen No. 12 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina, escalera alélica	86

## Índice de figuras

Figura No. 1 Seguimiento porcentual del injerto, neutrófilos y linfocitos post-trasplante de CPHs. Noviembre del 2015 a diciembre del 2015	88
Figura No. 2 Evaluación del número de copias del virus BK en orina y plasma, CMV en sangre periférica y plasma, VEB en sangre periférica y plasma. Noviembre del 2015 a diciembre del 2015	89
Figura No. 3 Supervivencia global	89
Figura No. 4 Promedio de porcentajes de quimerismo	90

## **Glosario de abreviaturas**

AAG	Anemia Aplásica Grave
AIR	Acondicionamiento de Intensidad Reducida
ALWP	Acute Leukemia Working Party
BCNU	Carmustina
BFM	Berlin-Frankfurt-Munster Group
Bu	Busulfán
CD	Células Dendríticas
Células NK	Células Natural Killer
CFM	Ciclofosfamida
CH	Células hematopoyéticas
CMV	Citomegalovirus
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
DHL	Deshidrogenasa Lactica
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EBMT	European Bone Marrow Transplant
EICH	Enfermedad de Injerto Contra Huésped
FISH	Hibridación in situ Fluorescente
G-CSF	Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos
GVD	Injerto Contra Enfermedad
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
ICL	Injerto Contra Leucemia
IL	Interleucina

LGC	Leucemia Granulocítica Crónica
LH	Linfoma Hodgkin
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LNH	Linfoma no Hodgkin
MO	Médula Ósea
NB	Neuroblastoma
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBSCs	Movilización de Células Progenitoras Hematopoyéticas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QC	Quimerismo Completo
QM	Quimerismo Mixto
QT	Quimioterapia
RCT	Radiación Corporal Total
RFLP	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
RNA	Ácido Ribonucleico
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
SE	Sarcoma de Edwin
SNC	Sistema Nervioso Central
SOSH	Síndrome Oclusivo Sinusoidal Hepático
SP	Sangre Periférica

STR	Repeticiones Cortas en Tandem
TCPH	Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas
TCR	Receptor de Células T
TCR	Receptor de células T
TMO	Trasplante de Médula Ósea
TSA	Antígenos Específicos de Tejido
VBK	Poliomavirus
VEB	Virus de Epstein Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## Resumen

En recientes años el número de niños con enfermedades hemato-oncológicas se han incrementado. El tratamiento habitual para este tipo de padecimientos ha sido la quimioterapia, siendo un método efectivo en la mayoría de los casos, sin embargo no en todos los pacientes funciona. Por ello el Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPHs) es considerado una gran opción de tratamiento disminuyendo la mortalidad en los pacientes pediátricos con enfermedades hemato-oncológicas. Uno de los puntos clave en el TCPHs ha sido el mantenimiento del injerto, es decir, la presencia de las células progenitoras donadas. La monitorización del injerto, también conocido como quimerismo, a través de técnicas moleculares, ofrece una herramienta de gran utilidad clínica, ya que la detección temprana de la pérdida del injerto o disminución del quimerismo permite implementar acciones de recuperación que permitan reestablecer el injerto. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, una de las principales enfermedades que padecen los pacientes son las leucemias, por ello la implementación de técnicas que permitan monitorizar el injerto después de un TCPHs es de gran importancia. Por lo anterior se realizó un estudio con 22 pacientes pediátricos en protocolo de TCPHs, se realizaron perfiles genéticos del donador y del receptor previo al trasplante, a través de secuencias cortas repetidas en tándem (STR), identificando alelos informativos de estos STR se calculó el porcentaje de quimerismo de cada uno de estos pacientes basado en la técnica propuesta por Scharf en 1995, utilizando las formulas descritas por Thiede en 1999, se monitoreo el porcentaje de quimerismo en sangre periférica posterior al TCPHs, donde se observó una supervivencia a los seis meses por debajo del 50%, valores estadísticos obtenidos de la curva de supervivencia Kaplan Meier. El uso de técnicas moleculares como la PCR múltiple y la electroforesis capilar, utilizando STRs como marcadores genéticos, permite llevar a cabo el seguimiento molecular del injerto con una buena sensibilidad y en corto tiempo, permitiendo al médico tomar decisiones oportunas en los casos de disminución del porcentaje de quimerismo.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), es una terapia relativamente nueva, útil en el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas y no hematológicas propias de la infancia (1).

Estudios en 1959 en modelos de ratón llevaron al reconocimiento de que células vivas de médula ósea (MO) podían ser trasplantadas de un animal a otro. En la actualidad se ha incrementado la aceptación del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) para el tratamiento de enfermedades genéticas como aquellas que afectan la función del eritrocito (talasemia y enfermedad de células falciformes), función de los granulocitos (agranulocitosis y enfermedad granulomatosa crónica), función plaquetaria (Síndrome de Wiskott Aldrich y megacariocitosis congénita) y errores innatos del metabolismo (2).

La primera fuente tisular para la obtención de las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) fue la MO, el TCPH fue llamado persistentemente trasplante de médula ósea (TMO); sin embargo, después de un largo tiempo, el término resultó inadecuado cuando esas células se obtuvieron de otras fuentes, como sangre periférica (SP) y cordón umbilical (CU). Con el avance del conocimiento y la purificación de diversos tipos de células madre, ese campo terapéutico creció y se denomina actualmente terapia celular (3).

Los trasplantes hematopoyéticos pueden dividirse para su estudio de acuerdo a la relación del donador con el receptor, si las células progenitoras son obtenidos de un hermano gemelo univitelino (homocigoto), HLA idénticos se denominan trasplantes singénicos.

En los casos en los que el donador es un hermano consanguíneo que ha heredado ambos haplotipos del HLA (Antígeno Leucocitario Humano) idénticos a los del receptor, el trasplante se denomina alogénico (HLA idéntico de donador relacionado). Este modelo es ideal, sin embargo la posibilidad de encontrar un hermano HLA idéntico está en proporción al número de hermanos y no es mayor al 20%, en algunos casos el donador puede ser un familiar no compatible o parcialmente histocompatible (alogénicos parcialmente compatibles).

En ocasiones esta incompatibilidad se ha tratado de disminuir realizando una depleción selectiva de linfocitos T del donador a lo que ha denominado trasplante haploidéntico. Por último, cuando el mismo receptor de los progenitores hematopoyéticos es el donador, a este tipo de trasplante se conoce como autólogo (4).

Después de realizado el trasplante se cuantifica la relación de células donador-receptor expresado en un porcentaje (quimerismo). De acuerdo a la cantidad de material biológico de un organismo presente en otro genéticamente diferente, el quimerismo puede ser mínimo (microquimerismo), parcial o total (5).

El microquimerismo se define como la presencia en un individuo de una pequeña población de células o de ácidos nucleicos de otro individuo genéticamente diferente.

El quimerismo es parcial o mixto cuando en la médula ósea coexisten células hematopoyéticas (CH) tanto del donador como del receptor y es completo o total cuando todas las CH (100%) son del donador, alojadas en la cavidad medular y el cuerpo del receptor.

El quimerismo también puede ser accidental o inducido; el quimerismo accidental, se puede ejemplificar como el intercambio de material genético de la madre al feto, mientras que el quimerismo inducido o iatrogénico, puede ser representado por el TCH y de órganos sólidos (5).

Son varios los métodos para investigar la presencia de células completas o de ácidos nucleicos genéticamente ajenos en un humano. Con la técnica de FISH (hibridación in situ fluorescente) es posible identificar células masculinas en una mujer o viceversa, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitiendo amplificar e identificar secuencias específicas de los cromosomas X ó Y, o bien microsatélites de los cromosomas que son altamente específicos para cada individuo (6).

Las secuencias de tipo microsatélite (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats), muy abundantes en los genomas de eucariotas y algunos procariontes, están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Cada secuencia STR se define por el tipo de unidad repetida (lo más frecuente mono, di, tri o tetra, aunque

también penta o hexa nucleótidos) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus). Su frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies (7).

Los STR son secuencias altamente variables entre individuos. Esta variación se manifiesta normalmente con diferencias en la longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Las diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del DNA (7).

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas**

El trasplante hematopoyético, también denominado TCPH, es una terapia relativamente nueva, útil en el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas y no hematológicas propias de la infancia. Los avances en los trasplantes han ocurrido en los últimos años y han permitido lograr una tasa de respuesta de la enfermedad en 50-90% de los casos según la patología; sin embargo, hoy en día aún se observan complicaciones que pueden poner en peligro la vida del paciente o deteriorar su calidad de vida. Con los avances en el diagnóstico y tratamiento de los tumores hematológicos, no hematológicos y tumores sólidos, se ha incrementado la supervivencia para los pacientes pediátricos, que ha mejorado considerablemente en los últimos años; sin embargo, existe un grupo de pacientes en los que la supervivencia libre de enfermedad ha permanecido baja pese a los adelantos terapéuticos (8).

### **2.2 Antecedentes históricos del TCPH**

Jacobo de la Vorágine en su "Leyenda Dorada", escrita en el siglo XIII, refiere que los Santos Cosme y Damián, trasplantaron una pierna completa procedente de un etíope muerto a un devoto miembro de la iglesia primitiva cuya propia pierna padecía un tumor maligno. En el siglo XVI, Tagliacocci introdujo el trasplante de piel (9).

En 1987, la OMS reconoció la necesidad de desarrollar pautas para el trasplante de órganos y la Asamblea Mundial de la Salud aprobó la Resolución 40.13 que instaba al estudio de los aspectos legales y éticos relacionados con esta delicada intervención médica. En este sentido el 13 de julio de 1983, se aprobó la ley número 41 que rige en nuestro país para la donación de órganos (10).

Dada la importancia de establecer una normativa legal acerca del trasplante de órganos es prioritario que las legislaciones traten a fondo este procedimiento, para que garanticen el respeto a los derechos del donante y del receptor, reconocidos como pacientes en la Declaración sobre Trasplantes Humanos de 1987 y que se cumpla con los aspectos éticos del trasplante (11).

La transfusión de sangre logro ser comprendida a partir de 1901 cuando Lansteiner descubrió el sistema ABO. En 1902, con el perfeccionamiento de la conexión quirúrgica entre dos estructuras vasculares por Alexis Carrell, se resolvió uno de los principales problemas técnicos y en 1958 con el descubrimiento por Van Roux del sistema HLA donde el organismo reconoce como distintos los tejidos de otro individuo, a pesar de pertenecer a la misma especie y es responsable del fenómeno del rechazo (16).

Un hecho importante en la historia de los trasplantes lo constituyó, en 1954, el primer trasplante renal exitoso en gemelos monocigóticos realizado en el "Peter Bent Brigham Hospital". En aquella época, comenzaron las pruebas de diversas combinaciones de drogas inmunosupresoras, iniciándose una serie de trasplantes de órganos. En 1963 Hardy realizó el primer trasplante pulmonar y Starzl los primeros hepáticos, en 1967 Barnard lo hizo con el corazón (8).

La historia del TCPH inicia con el concepto propuesto por Arthur Pappenheim en el siglo XIX, de la existencia de una célula precursora de la que se originan todas las células hematopoyéticas. Los trabajos realizados por Lorenz en 1951, mostraron que era posible evitar la muerte de ratones sometidos a dosis letales de radiación, mediante la administración de células de MO de un ratón de la misma cepa, y en 1956 se demostró que esto era debido a la colonización de la MO del ratón receptor por las CPH del donador (2).

Los primeros TCPH en humanos fueron realizados por E. Donnall Thomas en 1957, quien realizó 6 trasplantes a pacientes con diversas patologías. Las CPH fueron obtenidas de costillas de cadáveres, costillas resecadas de pacientes durante cirugía y mediante la aspiración de crestas ilíacas de pacientes y de donadores sanos. Los resultados fueron pobres, ya que sólo se logró un injerto transitorio en 2 de los casos, sin embargo esta primera experiencia demostró que es posible administrar cantidades relativamente grandes de MO por vía intravenosa sin toxicidad (13).

En 1959, Mathé logró llevar a cabo el primer trasplante alogénico, aunque el paciente falleció por múltiples complicaciones de lo que ahora conocemos como enfermedad injerto contra hospedero (EICH) crónica. En la década de los años 60's, Mathé y Thomas intentaron infructuosamente realizar trasplantes alogénicos en pacientes con leucemia aguda usando radiación corporal total (RCT), con dosis de 400- 600cGy.

Posteriormente, estudios en perros mostraron que se requerían dosis superiores a 800cGy para lograr una inmunosupresión suficiente, que permitiera que la MO alogénica se injertara (30).

Un descubrimiento crítico en el desarrollo del trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas fue el reconocimiento del complejo principal de histocompatibilidad en humanos, descrito por Dausset y Payne. Este descubrimiento hizo posible la selección de donadores compatibles, que permitieran un injerto duradero sin el riesgo de una EICH letal, y permitió además que en 1968, los grupos de Minneapolis y Milwaukee, en forma simultánea, llevaran a cabo los primeros trasplantes exitosos al utilizar MO alogénica de un donador HLA compatible, en niños con inmunodeficiencia grave (14).

En marzo de 1969, el grupo de Seattle llevó a cabo con éxito, el primer trasplante HLA compatible en un paciente leucémico, empleando RCT y ciclofosfamida (CFM) como esquema de acondicionamiento. Este mismo grupo publicó en 1972 los primeros 4 casos de anemia aplásica grave (AAG), tratados con trasplante de MO obtenida de donadores HLA idénticos, en los que se empleó CFM como única terapia de acondicionamiento, logrando que 2 de ellos fueran sobrevivientes a largo plazo. Estos estudios demostraron que los pacientes con AAG pueden ser trasplantados exitosamente, y que aquellos con leucemia aguda de mal pronóstico pueden ser curados con TCPH utilizando RCT y CFM (15).

En México, la historia de los trasplantes de CPH puede dividirse en 2 etapas. La primera inicia en el año de 1980 cuando el Dr. Ricardo Sosa y sus colaboradores llevaron a cabo el primer TCPH en el Instituto Nacional de la Nutrición, en la Ciudad de México. La segunda etapa comenzó a partir de 1995, con el entrenamiento en el extranjero de médicos mexicanos para la realización del TCPH (3).

Una causa que influyó en el desarrollo de los programas de TCPH fue la evolución de los conocimientos en esta área. Se sustituyó el uso de CPH de médula ósea por CPH de sangre periférica, se simplificaron los métodos para llevar a cabo los trasplantes, y se iniciaron los alotrasplantes con esquemas de acondicionamiento no mieloablativos (3).

## 2.3 Función del TCPH

Los TCPH de igual manera cuentan con dos finalidades:

- Sustituir la hematopoyesis del paciente, por ser insuficiente, total o parcialmente defectuosa.
- Permitir la administración de un tratamiento antineoplásico intenso con dosis muy elevadas de quimioterapia o radioterapia. En este caso, el TCPH es realmente un recurso de rescate que contrarresta la mielosupresión grave y, es potencialmente mortal del tratamiento antineoplásico (8).

## 2.4 Tipos de trasplante

### 2.4.1 Autólogo (Autotrasplante)

En este tipo de trasplante se usan las propias células madre del paciente. Las células madre se obtienen de la médula o de sangre periférica, y luego se congelan. Luego de administrar quimioterapia y/o radioterapia intensiva al paciente para tratar la enfermedad, las células descongeladas se vuelven a introducir al paciente. El objetivo principal del autotrasplante es hacer posible que el paciente reciba dosis altas de quimioterapia con o sin radiación, las que de otro modo serían demasiado tóxicas para tolerarse debido al daño serio que el tratamiento causaría en la médula. Las dosis muy altas a veces pueden resolver el problema de la resistencia de la enfermedad a las dosis normales de quimioterapia. El autotrasplante requiere que la persona tenga una cantidad suficiente de células madre sanas en la médula o sangre periférica (16).

Un auto TPH posee varias ventajas respecto a un trasplante alogénico: no requiere de donante HLA compatible, carece de complicaciones de EICH, los períodos de convalecencia son más cortos y la reconstitución inmunológica es más rápida. Su principal desventaja es que posee tasas de recaída más altas, debido a la ausencia de reacción injerto contra leucemia (ICL). Según información aportada por los registros de ALWP (por sus siglas en inglés de Acute Leukemia Working Party) en 2.100 pacientes auto trasplantados, la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global a los 5 años es de 43% y 51% respectivamente. Estos resultados son mucho mejores que los

obtenidos en pacientes no trasplantados, pero hay sesgos que dificultan la interpretación precisa de los datos (17).

#### *2.4.2 Alogénico (Alotrasplantes)*

En este tipo de trasplante se usan las células madre de un donante. Las células madre donadas pueden provenir de un donante emparentado o de un donante no emparentado. Los hermanos tienen mayor probabilidad de tener un tipo de tejido compatible con el del paciente, porque en este caso el paciente y el hermano donante recibieron sus genes de los mismos padres. Sin embargo, los hermanos no siempre tienen tipos de tejido estrechamente compatibles (35).

Antes de recibir un alotrasplante estándar, los pacientes reciben dosis altas de quimioterapia y a veces radioterapia. A este tratamiento se le llama “régimen de acondicionamiento” o “régimen de preparación”, el cual destruye las células cancerosas, inhibe el sistema inmunitario del paciente y, por lo tanto, el sistema inmunitario no puede atacar las células madre trasplantadas del donante.

Un beneficio crucial del trasplante alogénico es la generación del efecto injerto contra enfermedad (GVD, por sus siglas en inglés), que puede ser aún más importante que la terapia intensiva administrada para destruir las células cancerosas. Este efecto es el resultado de que el sistema inmunitario del donante “reconozca” las células cancerosas del paciente y las elimine (16).

El trasplante alogénico posee un enorme impacto en la supervivencia de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), observándose mejores resultados en pacientes de alto riesgo, si se compara con quimioterapia estándar. Según los registros del EBMT (European Bone Marrow Transplant) los pacientes con donante HLA compatible obtienen supervivencias globales del orden del 60-65% a los 5 años (17).

#### *2.4.3 Singénico (Isotrasplante)*

Este término se usa para denominar un alotrasplante en el que el donante y el receptor son gemelos con una estructura genética idéntica y con el mismo tipo de tejido. Con este tipo de trasplante, las células del donante no son rechazadas y los tejidos del receptor no son atacados por las células inmunitarias del donante y tampoco se

necesitan tratamientos para prevenir el rechazo del injerto ni la EICH. Sin embargo, no produce el efecto beneficioso GVD. Además, al igual que con los autotrasplantes, hay más probabilidad de una recaída de la enfermedad en el paciente en comparación con otros tipos de donantes. Algunos de los pacientes logran una remisión a largo plazo gracias a los efectos del régimen de acondicionamiento y a la infusión de células madre normales (16).

## **2.5 Fuentes de CPHs**

### *2.5.1 Médula ósea*

Antes de que una persona sea aceptada como donante de médula ósea, necesitará un examen físico completo y una evaluación para confirmar que las cantidades de células sanguíneas se encuentran dentro de los límites normales. La sangre del donante se analiza para asegurarse de que no estén presentes los virus de la hepatitis ni del VIH. Se realizan pruebas para detectar otros virus que puedan estar presentes. Sin embargo, un resultado positivo en una o más de las pruebas no impide necesariamente que la persona sea donante (18).

La donación de médula ósea es un procedimiento quirúrgico que se realiza en un quirófano con anestesia. Los médicos a cargo del trasplante utilizan una aguja hueca especial unida a una jeringa para extraer médula desde el borde superior del hueso ilíaco.

Es extraído varias pintas de médula (una pinta es igual a 470 mililitros). El donante generalmente permanece en el hospital durante aproximadamente seis u ocho horas. Durante este tiempo, el donante se recupera tanto de la anestesia como del dolor agudo en los lugares de introducción de la aguja.

La médula recolectada se pasa a través de una serie de filtros para retirar fragmentos de hueso o tejido, y luego se recolecta en una bolsa de plástico, desde la que se puede infundir en la vena del receptor. Si es necesario, las células recolectadas de médula pueden congelarse y almacenarse para uso posterior (16). Sin embargo, no todos los candidatos a donación de M.O. son contemplados para el procedimiento como se muestra en la tabla No. 1 (18).

**Tabla No. 1 Factores de exclusión para donación de sangre de cordón umbilical.**

<b>Historia de exposición o infección previa con hepatitis o VIH.</b>
<b>Complicaciones durante el parto o cesárea o historia previa de nacimiento de alto riesgo.</b>
<b>Embarazo gemelar.</b>
<b>Problemas placentarios o del cordón umbilical</b>
<b>Producto de bajo peso.</b>
<b>Problemas durante el procesamiento de las muestras.</b>
<b>Cantidad insuficiente de células CD34+.</b>
<b>Resultados positivos para infección.</b>
<b>Otros problemas.</b>

**Nota: todos los factores mencionados previamente varían de acuerdo al padecimiento y la persona (18).**

### *2.5.2 Sangre periférica*

Actualmente la fuente más común de CPH para un trasplante es la sangre periférica. Las células madre son productoras de células que se liberan de la médula ósea a sangre periférica. El uso de movilizadores de células progenitoras hematopoyéticas (PBSCs) elimina la necesidad de administrar anestesia general o raquídea cuando las células madre se recolectan de la médula. También evita las molestias que se producen por unos pocos días en el lugar donde se introducen las agujas en el hueso ilíaco para obtener las células de médula (16).

A fin de obtener suficientes células madre de la sangre periférica para un trasplante, normalmente se administra a un donante un factor de crecimiento que estimula la producción de glóbulos blancos, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), para facilitar que más células madre productoras de sangre pasen de la médula a sangre periférica. En algunos casos, cuando se usan las

propias células madre del paciente, estas se movilizan mediante una combinación de G-CSF y quimioterapia para tratar la enfermedad subyacente (16).

Una vez que las células se movilizan, se recolectan del torrente sanguíneo mediante un proceso llamado “aféresis”. Para la aféresis se introduce una aguja en la vena del donante, por lo general en el brazo. La sangre del donante se hace circular a través de una máquina de aféresis, la cual separa la sangre en cuatro componentes: glóbulos rojos, plasma, glóbulos blancos y plaquetas. La fracción de glóbulos blancos es recolectada debido a que contiene las células progenitoras, mientras que los otros componentes de la sangre son devueltos al donante (o al paciente) (16).

### *2.5.3 Cordón umbilical*

La sangre del cordón umbilical y de la placenta contiene células madre. Esta sangre se puede recolectar después del nacimiento de un bebé; la sangre recolectada se llama “unidad de sangre de cordón umbilical”. Durante el parto, la atención se centra en la madre y el bebé. Inmediatamente después del nacimiento del bebé, se coloca una pinza en el cordón umbilical. La sangre del cordón umbilical y de la placenta se recolecta antes o después de la expulsión de la placenta, dependiendo del procedimiento en el hospital. La sangre se recolecta en una bolsa estéril; esta bolsa de sangre es la unidad de sangre del cordón umbilical. Se le asigna a la sangre recolectada un número de identificación y se almacena temporalmente. La unidad de sangre del cordón umbilical se transporta a un banco de sangre de cordón umbilical para análisis, congelación y almacenamiento a largo plazo.

La cantidad de células necesarias para ofrecerle al paciente la mejor probabilidad de un injerto exitoso y la supervivencia después del trasplante se basa en el peso del paciente. La unidad de sangre de cordón umbilical debe tener una cantidad suficiente de células madre según la talla del receptor. Debido a la pequeña cantidad de células progenitoras en una unidad de sangre de cordón umbilical se injertan más lentamente que las células madre de la médula o de la sangre periférica, mientras tanto los pacientes corren riesgos de contraer infecciones potencialmente mortales (16).

## 2.6 Régimen de acondicionamiento

Dependiendo el tipo de padecimiento y de otros factores, se pueden administrar regímenes de acondicionamiento de dosis altas. El tratamiento puede consistir sólo en fármacos de quimioterapia (por ejemplo, busulfán y ciclofosfamida), o quimioterapia administrada en combinación con radioterapia en todo el cuerpo. Ciertos regímenes de acondicionamiento pueden tener efectos secundarios únicos, y los miembros del equipo de trasplante hablarán sobre éstos con el paciente antes de comenzar la terapia de acondicionamiento (16).

El régimen de acondicionamiento ideal deberá ser aquel que a una dosis máxima tolerable por el receptor, no repercuta en una mayor toxicidad para el procedimiento y además deberá ser bien tolerado por el paciente. Existen innumerables esquemas de acondicionamiento sin que se haya demostrado una mayor eficiencia entre un esquema y otro. Tradicionalmente se agrupan en aquellos que emplean únicamente quimioterapia o la combinación de quimioterapia y radioterapia. Así mismo, también se pueden agrupar en aquellos esquemas que son mieloablativos y los que no lo son (no mieloablativos), estos últimos a su vez pueden dividirse en los que utilizan inmunosupresión sin mielotoxicidad y aquellos en los que se provoca inmunosupresión con mielotoxicidad (19).

### *2.6.1 Regímenes mieloablativos*

Son utilizados en prácticamente todos los centros donde se realiza TCH. Estos regímenes fueron inicialmente administrados escalando las dosis de radiación o de los agentes de quimioterapia empleados hasta la máxima dosis tolerada. El diseño de los mismos ha sido desde sus inicios en parte casi empírico, y las drogas o la combinación utilizada, no debe tener toxicidad sobrepuesta para evitar mayor daño al receptor (19).

### *2.6.2 Regímenes que emplean irradiación corporal total (ICT)*

La ICT a dosis supraletales en combinación con quimioterapia (QT) forma parte del régimen de acondicionamiento de los TCH en enfermedades hematológicas en un

40%-50% de los TCH autólogos y en el 50%-60% de los TCH alogénicos. En los inicios de los años 70's, se publicaron los primeros casos de regímenes que empleaban ICT en pacientes con leucemia aguda, inicialmente proporcionando una dosis única, utilizando para el procedimiento una bomba de cobalto 60. Actualmente, con la finalidad de que esta terapia sea más tolerable y menos tóxica para el receptor, la ICT se puede administrar de forma fraccionada o hiperfraccionada. Una de las ventajas de incluir ICT es que la radiación no respeta barreras físicas como la hematoencefálica, asegurando así la destrucción celular en todas las regiones del cuerpo (19).

En la tabla 2 se ejemplifican los tipos de dosis utilizadas para la ICT, incluyendo días y dosis de irradiación acumuladas durante el procedimiento.

La dosis máxima tolerada de ICT es de 15Gy, dosis por arriba de esta cifra generalmente llega a ser tóxica sobre todo a nivel pulmonar, de hecho, la toxicidad pulmonar y cardíaca han sido las principales limitantes de la dosis de la ICT.

Con el objeto de limitar hasta donde sea posible la toxicidad a nivel de órganos y reducir el daño, se han empleado protectores de plomo, sobre todo para evitar el daño a nivel pulmonar, cuando se utilizan dosis de 8-9Gy. De igual manera como se observa en la tabla número 3 la ICT puede combinarse con otro tipo de medicamentos quimioterapéuticos para favorecer las condiciones del paciente antes del trasplante (19).

**Tabla No. 2 Identificación de ICT.**

	<b>DÍAS</b>	<b>DOSIS TOTAL</b>
<b>Dosis única</b>	1 Sólo día	2-8Gy
<b>Dosis fraccionada</b>	3 días	10-14Gy
<b>Dosis hiperfraccionada</b>	4 días	14-15Gy

**Nota: Tipos de dosis en la ICT (19).**

**Tabla No. 3 Regímenes de acondicionamiento que incluye ICT.**

RÉGIMEN	DOSIS TOTAL	DOSIS DIARIA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y DURACIÓN	DÍAS
CY/ICT Ciclofosfamida Irradiación corporal total	120 mg/kg 12-14.4 Gy	60 mg/kg 2-2.4Gy (2 x día)	IV en 1h	-6, -5 -3,-2,-1
ICT/VP16 Irradiación corporal total Etopósido	12.13.2 Gy 60 mg/kg	2-2.5Gy (2 x día) 60 mg/kg	IV en 2h	-7,-6,-5,-4 -3
ICT/VP/CY Ciclofosfamida Etopósido Irradiación corporal total	120 mg/kg 30-60 mg/kg 12.13.75 Gy	60 mg/kg 30-60 mg/kg 2-2.25Gy (2 x día)	IV en 1h IV en 2h	-6,-5 -4 -3,-2,-1
ICT/TT/CY/GAT Irradiación corporal total Tiotepa Ciclofosfamida Globulina antitumoral	13.75 Gy 10 mg/kg 120 mg/kg 120 mg/kg	1.25Gy (3 x día) 5 mg/kg 60 mg/kg 30 mg/kg	IV en 2h IV en 1h IV en 6h	-9,-8,-7,-6 -5,-4 -3,-2 -5,-4,-3,-2
AC/ICT Citarabina Irradiación corporal total	36 gr/m <sup>2</sup> 12 Gy	3 gr/m <sup>2</sup> 2Gy (2 x día)	IV c/12h en 2h	-9,-8,-7,-6,-5,-4 -3,-2,-1

**Nota: Combinaciones y dosis requerida para cada uno de los acondicionamientos (19).**

Actualmente se desconoce cuál es el mejor esquema de ICT, combinándose con ciclofosfamida (Cy) generalmente a dosis de 60mg/kg, aunque también se ha combinado con etopósidos (VP-16), con dosis altas de citarabina, o con melfalán como se observa en la tabla número 4, todos ellos con buenos resultados, sin embargo el régimen más empleado ha sido ICT-CY.

Dosis mayores a 15Gy se han asociado a menos incidencia de rechazo de injerto o recaída; sin embargo la toxicidad extrahematológica, sobre todo pulmonar y cardiaca, ha sido mayor. Dosis menores 6Gy se asocian a un mayor riesgo de falla de injerto y a recaída de la enfermedad. Tomando en cuenta, como ya se ha señalado, que la dosis máxima de ICT es de 15Gy, en los últimos años se han empleado anticuerpos

monoclonales radiomarcados, lo que ha permitido dirigir en forma más exacta la radiación a las células tumorales sin aumentar la toxicidad a otros órganos (19).

**Tabla No. 4 Regímenes de quimioterapia a dosis altas.**

RÉGIMEN QT	DOSIS TOTAL	DOSIS DIARIA	VIA DE ADMINISTRACIÓN Y DURACIÓN	DÍAS
<b>BU/CY (Santos)</b>				
Busulfán	16mg/kg	4mg/kg	VO cada 6h	-6,-5
Ciclofosfamida	200mg/kg	50mg/kg	IV en 1h	-3,-2,-1
<b>BU/CY (Tutschka)</b>				
Busulfán	16mg/kg	4mg/kg	VO cada 6h	-7,-6,-5,-4
Ciclofosfamida	120mg/kg	60mg/kg	IV en 1h	-3
<b>CY/GAT</b>				
Ciclofosfamida	200mg/kg	50mg/kg	IV en 1h	-5,-4,-3,-2
Globulina antitumoral	90mg/kg	30mg/kg	IV en 8h	-5,-4,-3
<b>Melfalán</b>	100-200mg/m <sup>2</sup>	100-200mg/m <sup>2</sup>	IV en 1h	-1
<b>BU/MEL</b>				
Busulfán	16mg/kg	4mg/kg	VO c/6h	-5,-4,-3,-2
Melfalán	140mg/m <sup>2</sup>	140mg/m <sup>2</sup>	IV en 1h	-1
<b>BEAM</b>				
BCNU	300mg/m <sup>2</sup>	300mg/m <sup>2</sup>	IV en 2h	-6
Etopósido	400-800mg/m <sup>2</sup>	100-200mg/m <sup>2</sup>	IV en 2h	-5,-4,-3,-2
Citarabina	800-1600mg/m <sup>2</sup>	200-400mg/m <sup>2</sup>	IV en 2h	-5,-4,-3,-2
Melfalán	140mg/m <sup>2</sup>	140mg/m <sup>2</sup>	IV en 1h	-1

**Regímenes de acondicionamiento que incluyen ICT y sus distintas combinaciones con medicamentos quimioterapéuticos (19).**

Las principales ventajas de los regímenes de acondicionamiento en donde se emplea ICT son: menos toxicidad, mayor facilidad de administración, bajo costo y además se puede justificar el empleo, después del TCPH, de radiación a sitios con enfermedad (19).

Al igual que los esquemas que utilizan ICT, estos regímenes se administran días antes de la infusión de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH). La elección de los fármacos utilizados se basa en su acción biológica y en no sobreponer su toxicidad. La combinación de fármacos más empleada ha sido la de busulfán (Bu)(16mg/kg) ms Cy (200mg/kg ó 120mg/kg), esquemas empleados en leucemias agudas, crónicas, síndromes mielodisplásicos entre otros. Se han publicado una gran cantidad de

estudios en donde se compara ICT contra BuCy en donde no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a supervivencia libre de enfermedad, mortalidad relacionada a trasplante, supervivencia global, riesgo para enfermedad injerto contra huésped aguda o crónica.

De manera tradicional el régimen de acondicionamiento utilizado para padecimientos como el Linfoma no Hodgkin o la enfermedad de Hodgkin en el caso del TCH autólogo, ha sido la combinación de Cy, carmustina (BCNU), etopósido y melfalán o citarabina. De hecho, en un estudio del Grupo Español, los mejores resultados se obtuvieron con el uso de QT en comparación con QT+ICT, y de entre los esquemas basados en QT, los regímenes BEAM ofrecieron mejores resultados en cuanto a la estimación de la supervivencia global (58%), en comparación con CVB (40%) o con Cy-ICT (31%). Hoy en día, continúa considerándose que en este tipo de padecimientos el uso de dosis altas de quimioterapia y TCH autólogo es el tratamiento de elección, sobre todo cuando el linfoma ha recaído y las células tumorales son sensibles a la QT (19).

En general, dentro de los esquemas de acondicionamiento, los fármacos más empleados han sido busulfán, melfalán, etopósido, carboplatino, cisplatino, tiotepa, BCNU, ICT, ciclofosfamida y fludarabina, estos últimos tres también utilizados como inmunosupresores.

**Tabla No. 5 Esquema de acondicionamiento de intensidad reducida.**

RÉGIMEN	DOSIS TOTAL	DOSIS DIARIA	VIA DE ADMINISTRACIÓN Y DURACIÓN	DÍAS
<b>ICT/FLUDARABINA</b> Irradiación corporal total Fludarabina	2Gy 90mg/m <sup>2</sup>	2Gy 30mg/m <sup>2</sup>	IV en 30 min	0 -4,-3,-2
<b>FLUDARA/BU/GAT</b> Fludarabina Busulfán GAT	180mg/m <sup>2</sup> 8mg/kg 40mg/kg	30mg/m <sup>2</sup> 4mg/kg 10mg/kg	IV en 30min VO c/6h IV en 8-10h	-10 a -5 -6,-5 -4,-3,-2,-1
<b>FLUDARA/BUSULFAN</b> Fludarabina Busulfán	150mg/m <sup>2</sup> 10mg/kg	30mg/m <sup>2</sup> 1mg/m <sup>2</sup>	IV en 30min VO c/6h (total 10 dosis)	-9 a -5 -6,-5,-4 (4,4,2 dosis)
<b>FLUDARA/MELFALAN</b> Fludarabina Melfalán	150mg/m <sup>2</sup> 140mg/m <sup>2</sup>	30mg/m <sup>2</sup> 70mg/m <sup>2</sup>	IV en 30min IV en 15min	-8 a -4 -3,-2

Estos tipos de esquemas de acondicionamiento son dirigidos a personas de edad avanzada, donde administrar un acondicionamiento podría resultar contraproducente (19).

El régimen de acondicionamiento que se describe en la tabla número 5 está dirigido a pacientes de edad avanzada (mayores de 55 años), con historia de un TCH previo o en pacientes que presentan patología asociada que imposibilita el administrar dosis altas de agentes citotóxicos(19).

Los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) se han definido de la siguiente forma:

- La mielosupresión deberá ser reversible (usualmente en un tiempo de 28 días).
- El estado de quimerismo mixto deberá ser alcanzado en una proporción importante de pacientes al momento de la primera evaluación posterior al TCH.
- Tasa baja de toxicidad no hematológica.

De manera general todos los regímenes de intensidad reducida siguen una misma línea, que es administrar una potente inmunosupresión para que la celularidad del donador sea capaz de “hacerse de un espacio” en la médula ósea del huésped. Para que el efecto injerto contra tumor (EICT) pueda establecerse se requiere de células inmunocompetentes por parte del donador, así mismo, también se requiere de tiempo

suficiente para producir una efectiva respuesta antileucémica. Esta inmunosupresión promueve un QM que a su vez proporciona un estado de tolerancia inmunológica bidireccional entre el huésped y el receptor (19).

## **2.7 Indicaciones de TCPHs:**

Las neoplasias hematológicas forman un grupo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas, determinando el estado de diferenciación de la transformación celular el fenotipo de la enfermedad (20).

### *2.7.1 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)*

La LLA puede ser curada con quimioterapia de primera línea en aproximadamente 80% de los casos. El grupo BFM (Berlin-Frankfurt-Munster Group) reporta una supervivencia libre de evento de 75.9% a 8 años, en los pacientes incluidos en su estudio. Resultados similares han sido descritos por diferentes grupos internacionales, como el grupo del Hospital St. Jude. Después de una recaída tardía a MO o extramedular aislada, la supervivencia libre de evento es de 35% a 44%, cuando se emplea quimioterapia convencional, y este porcentaje es significativamente menor si la recaída ocurre durante el tratamiento o en los primeros 6 meses de haberlo terminado de manera efectiva (20).

El trasplante autólogo no ha demostrado mejores resultados que los esquemas intensos de quimioterapia, en pacientes con LLA de alto riesgo en remisión. Este procedimiento podría tener la ventaja de que no produce EICH, sin embargo la respuesta que se puede alcanzar es sumamente limitada, pues aun cuando el paciente se encuentre en remisión medular "completa" antes del trasplante, existe plena evidencia del gran riesgo de injertar células leucémicas en el hospedero y la tasa de recaídas es muy alta.

El papel del trasplante alogénico para pacientes pediátricos con LLA ha sido un tema de discusión, particularmente en primera remisión, pero si ha mostrado beneficio en pacientes con recaídas tempranas.

El donador relacionado constituye la mejor fuente de CPH, de tal manera que cuando se planea un TCPH, lo primero es investigar a los hermanos del paciente. La fuente de CPH puede ser médula ósea o sangre periférica de donador previamente estimulado. Sin embargo, sólo es posible encontrar un hermano HLA compatible en menos del 20% de los casos que requieren TCPH (20).

### *2.7.2 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)*

El pronóstico de la LMA en niños ha mejorado significativamente en las últimas 2 décadas. Con el uso de quimioterapia intensa, actualmente es posible obtener remisión completa de la enfermedad en 80% a 90% de los casos, y 30% a 70% pueden ser curados si reciben quimioterapia de mantenimiento. El trasplante de donador relacionado en primera remisión permite alcanzar supervivencia prolongada en 45% a 64% de los casos, por lo que representa una muy buena opción para aquellos pacientes con LMA de alto riesgo, cuyas tasas de supervivencia sin TCPH son inferiores a estas cifras (8).

### *2.7.3 Leucemia Granulocítica Crónica (LGC)*

De los trastornos mieloproliferativos, la LGC es la variante más común en niños, aunque representa sólo 1% a 3% de todas las leucemias que se presentan a esta edad. La incidencia estimada de en pacientes pediátricos se ha reportado en menos de uno en 100,000 y es menos común en niños menores de 2 años comparados con otros grupos de edad.

Las características clínicas moleculares, citogenéticas, morfológicas de esta enfermedad en los niños, son similares a las del adulto.

Al igual que en adultos, el TCPH alogénico se ha considerado principalmente para aquellos pacientes con LGC. Debe tenerse en cuenta que aun cuando se tenga un donador relacionado y a pesar de su potencial curativo, hay factores y riesgos para el procedimiento en este tipo de niños, por lo que cada paciente debe ser seleccionado adecuadamente. En un estudio, se evaluaron 314 niños con LGC entre 1985 y 2011, la supervivencia global y la supervivencia libre de evento a 3 años fueron de 66% y 55%,

respectivamente, y en el análisis multivariado los pacientes mostraron tener mejores resultados cuando eran trasplantados en fase crónica o crisis blástica, aunque hay que destacar que más de un tercio de los pacientes en fase aguda o crisis blástica estaban vivos y libres de enfermedad a 3 años. La supervivencia libre de evento fue aún mejor en aquellos pacientes pediátricos que se trasplantaron en los primeros 6 meses del diagnóstico, estos resultados difieren de lo reportado en adultos en donde se ha visto que se tienen mejores resultados, si los pacientes se trasplantan en los 12 meses que siguen al diagnóstico (21).

#### *2.7.4 Linfoma Hodgkin y no Hodgkin*

El pronóstico para niños y adolescentes con Linfomas de Hodgkin (LH) y no Hodgkin (LNH) es en general bueno. No así en aquellos pacientes con enfermedad avanzada, en los que fallan a la primera línea de tratamiento con quimioterapia y radioterapia o en quienes presentan enfermedad recurrente, particularmente si se trata de recaídas tempranas. Estos casos pueden verse beneficiados y tener una supervivencia libre de enfermedad prolongada con un trasplante autólogo. Este procedimiento se ha preferido históricamente sobre el trasplante alogénico, debido a la mayor facilidad para realizarlo y a las complicaciones inmunológicas que se presentan en el trasplante alogénico.

En los últimos años, la introducción de los regímenes de baja intensidad y la disminución de la muerte relacionada al trasplante han permitido revalorar el trasplante alogénico en etapas avanzadas, considerando el efecto injerto contra tumor. En LNH, los factores de riesgo que predicen una mejor supervivencia son el tipo histológicos y el estado de la enfermedad. En el LH, el nivel de DHL (Deshidrogenasa Láctica) pre-trasplante representa un marcador de alto riesgo, siendo la supervivencia libre de evento de 42% y 0% en pacientes con DHL normal o alta, respectivamente. La tabla número seis muestra las indicaciones del TCPH en linfomas de acuerdo con el Grupo Europeo de Trasplante de Médula Ósea (EBMT) (20).

**Tabla No. 6 Indicaciones de TCPH en Linfomas Hodgkin y no Hodgkin, de acuerdo con el EBMT.**

Enfermedad	Condición	Donador compatible	Disparidad de 1 antígeno	Disparidad $\geq$ 1 antígeno	Trasplante autólogo.
Linfoma no Hodgkin	1 <sup>a</sup> remisión	No recomendado	No recomendado	No recomendado	No recomendado
	1 <sup>a</sup> remisión alto riesgo	Opción clínica	Opción clínica	No recomendado	Opción clínica
	2 <sup>da</sup> remisión	Indicado	Indicado	Opción clínica	Opción clínica
Linfoma de Hodgkin	1 <sup>a</sup> remisión	No recomendado	No recomendado	No recomendado	No recomendado
	Recaída, 2 <sup>da</sup> remisión	Opción clínica	En desarrollo	No recomendado	Indicado

**Recomendación en el trasplante de acuerdo al HLA (21).**

### 2.7.5 Tumores Sólidos

El trasplante autólogo de MO es un método en el cual se otorgan altas dosis de terapia citorreductiva a pacientes con cáncer. Muchos de los investigadores han demostrado una curva de dosis-respuesta para tumores. La toxicidad hematológica con frecuencia limita la intensidad de muchos de los regímenes quimioterapéuticos disponibles, para el tratamiento en este tipo de enfermedades (8).

### 2.7.6 Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es un tumor de las células de la cresta neural, que dan origen al sistema nervioso simpático. Tiene una incidencia anual de aproximadamente 8 casos por millón de niños en los Estados Unidos. Los pacientes con tumor completamente localizado o aquellos con diseminación a tejidos adyacentes o a ganglios linfáticos, tienen un excelente pronóstico cuando se tratan con resección quirúrgica con o sin quimioterapia (8).

Los pacientes menores de un año de edad al diagnóstico y con estadios I, II o IV, también tienen un excelente pronóstico. El 40% a 60% de pacientes con estadio III que tienen marcadores biológicos favorables como una sola copia de N-myc e hiperdiploidía, pueden también ser curados con terapia convencional, dependiendo en parte de la posibilidad de resección quirúrgica. Desafortunadamente, entre una tercera parte y la mitad de los neuroblastomas son estadios IV en niños mayores de un año de edad.

Dentro de las estrategias investigadas en la última década se encuentra la terapia con muy altas dosis quimioterapia, la cual ha surgido como una esperanza, ya que tanto el porcentaje como la calidad de la respuesta pueden mejorar al incrementar las dosis de algunos de los agentes antineoplásicos, administrados solos o en combinación.

Esta modalidad de terapia intensa con múltiples agentes ha permitido el desarrollo del trasplante autólogo de MO, y más aún el desarrollo de la terapia de soporte, el paratrasplante autólogo, ha permitido escalar las dosis de terapia citotóxica contra NB, lo que ha resultado en una supervivencia libre de enfermedad de 25% a 50% a 2 años, que es superior a la obtenida con quimioterapia convencional (8).

#### *2.7.7 Sarcoma de Ewing (SE)*

El sarcoma de Ewing es un tumor maligno primario de hueso, que se presenta en niños y adolescentes. Los pacientes con enfermedad multifocal o recaída temprana o múltiple, tienen muy mal pronóstico a pesar del uso de cirugía, quimioterapia y radioterapia (8).

La introducción de terapia multimodal en la última parte de la década de los 60's y principios de los 70's, mejoró el pronóstico. Sin embargo, los pacientes con enfermedad metastásica al diagnóstico, enfermedad localizada, pero extensa o con tumores irresecables del tronco, seguían siendo de alto riesgo de falla al tratamiento y pocos de estos casos podían ser curados. La mayoría respondía inicialmente al tratamiento, pero eventualmente sufría recaída, principalmente en pulmón, hueso o MO y moría con enfermedad diseminada. Los tratamientos mieloablativos con rescate con MO fueron

usados por varios investigadores, para mejorar el pobre pronóstico de los pacientes con SE que presentaban estas características (8).

### *2.7.8 Tumores cerebrales*

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son un grupo heterogéneo de neoplasias, que representa 16% a 20% de todas las neoplasias en los pacientes pediátricos, siendo únicamente rebasados en frecuencia por la LLA en este grupo de edad. La sobrevida a 5 años en pacientes con tumores del SNC, es de aproximadamente 50%. Los tumores más frecuentes son los astrocitomas de bajo grado y los tumores embrionarios como meduloblastoma. Los tumores cerebrales malignos en los niños tienen un mal pronóstico. La sobrevida libre de enfermedad se encuentra entre 40% y 60%, para los tumores más frecuentes (meduloblastoma y ependimomas).

Los pacientes con gliomas de alto grado que progresan después de una terapia inicial tienen un pronóstico muy malo, con una supervivencia media de 7 meses. Gianone y Wolff llevaron a cabo un estudio con 16 pacientes con gliomas del SNC con progresión, previamente tratados con radiación máxima y quimioterapia. Los pacientes entraron a un estudio de fase II con altas dosis de etopósido, seguidas de TCPH autólogo. Tres pacientes (19%) experimentaron respuesta tumoral. Los pacientes respondedores fueron tratados con 2 ciclos más, de altas dosis de etopósido. La media de sobrevida para los 16 pacientes fue de 4 meses, con 3 respondedores que vivieron 9, 10 y 54 meses pos trasplante. Estos resultados correlacionan con los resultados obtenidos cuando se emplean dosis estándar de etopósido. La severa mielosupresión asociada con este régimen y su modesta actividad sugiere que esta alternativa no es eficiente. Deben realizarse más estudios con etopósido solo o en combinación con otros agentes citotóxicos (22).

### *2.7.9 Inmunodeficiencias*

La inmunodeficiencia severa combinada (SCID) es una alteración en la diferenciación de los linfocitos T. La incidencia estimada es de 1 en 75,000 nacimientos. Algunos

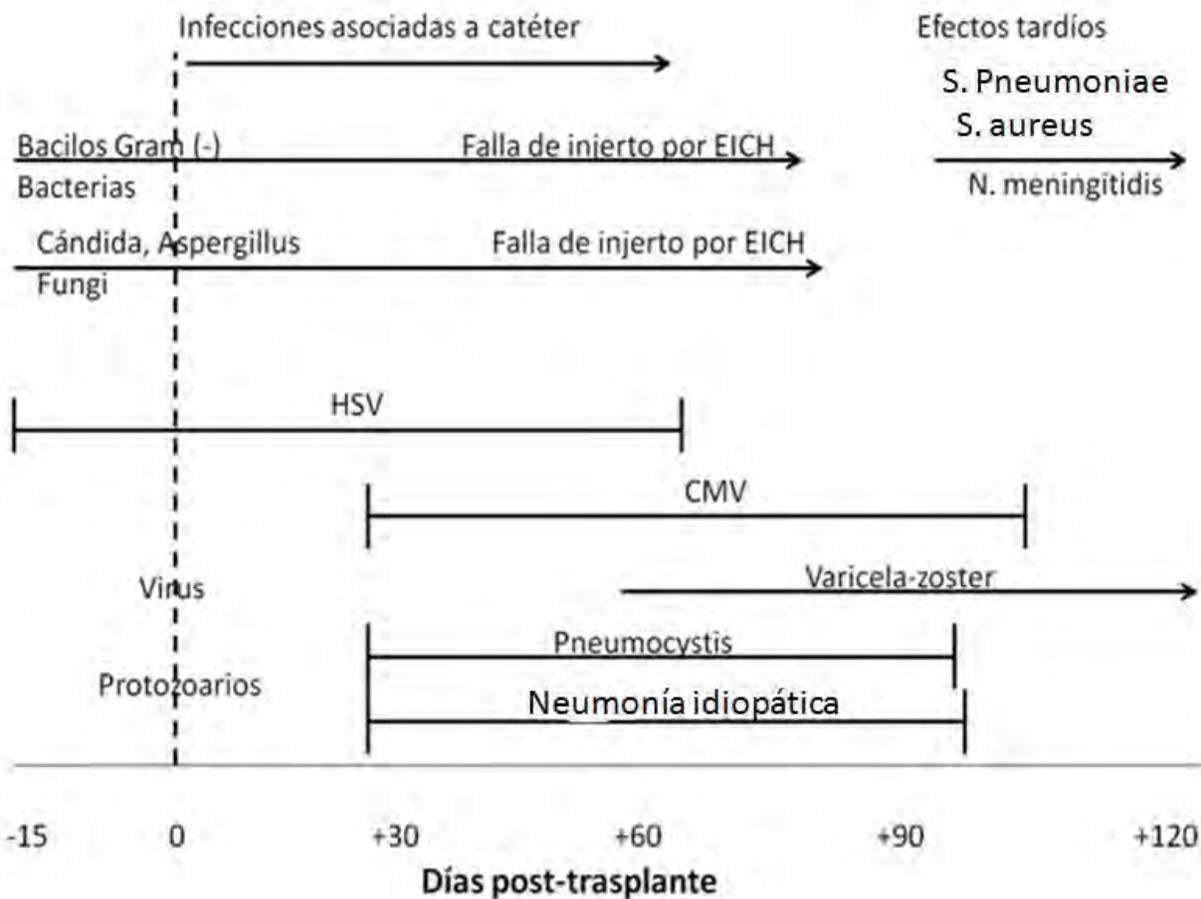
investigadores catalogan otras inmunodeficiencias de células T en el grupo de SCID, como por ejemplo la deficiencia de proteína ZAP 70, deficiencia CD3 $\gamma$ , deficiencia en la expresión de HLA clase II, deficiencia de ligasa IV, entre otros. Esta patología es una emergencia pediátrica, y se necesita un tratamiento inmediato desde que el diagnóstico es confirmado. El tratamiento de elección es el trasplante alogénico, el cual provee la recuperación en aproximadamente 90% de la línea celular deficiente, cuando se lleva a cabo el procedimiento poco después del diagnóstico (22).

## **2.8 Complicaciones tempranas del TCPHS**

### *2.8.1 Infecciones*

Las infecciones durante el período de neutropenia, inmediatamente después del TCPH son prácticamente constantes. Las infecciones tardías son menos frecuentes, pero responsables de gran morbilidad y mortalidad. Las de tipo bacteriano pueden ser ocasionadas por cualquier germen, aunque predominan los Gram positivos como *S. pneumoniae*. Las infecciones micóticas tardías son mucho menos frecuentes que en la época de neutropenia; la etiología más común es por *Cándida*. Las enfermedades virales son habituales complicaciones tardías y se asocian continuamente a la EICH. Uno de los que mayor importancia posee es el citomegalovirus (CMV). Su presencia, en los pacientes con TCHP, ocasiona pancitopenia, fiebre, hepatitis, pancreatitis, artralgias, neumonitis intersticial, encefalitis y, de gran trascendencia, incremento en la frecuencia e intensidad de la EICH. La sobrevida de los pacientes trasplantados disminuye a causa de esta infección. También es posible encontrar el *virus de Epstein-Barr* (VEB) y BK en menor frecuencia que CMV como se observa en la imagen 1 (29).

**Imagen No. 1 Infecciones frecuentes en TCPH.**



**Nota:** Evolución de las infecciones comunes presentes en el TCPH del día -15 pre-trasplante a partir del régimen de acondicionamiento al +120 post-trasplante. HSV= Virus de herpes simple, CMV= Citomegalovirus (19).

### 2.8.2 CMV

CMV es un parásito humano muy bien adaptado, por lo que la prevalencia de infección es muy elevada en la población general. En individuos inmunocompetentes, la infección suele cursar de manera asintomática o con sintomatología leve. Tras la primo infección, el virus pasa a un estado de latencia de por vida, pudiendo aparecer infecciones recurrentes (reactivaciones y reinfecciones) en determinadas situaciones. En inmunodeprimidos, pacientes trasplantados, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o en infección congénita se comporta como un patógeno oportunista, causando enfermedad y secuelas graves e incluso la muerte (23).

### 2.8.3 VEB

El VEB es miembro de la familia de los gamma herpes virus, estos se replican en las células linfoides y algunos son capaces de replicarse en epitelios o en fibroblastos (24). La infección del VEB se inicia cuando, después de tener contacto con las secreciones de una persona portadora del virus, se infecta el epitelio de la orofaringe o los linfocitos B que se encuentran localizados en el epitelio de las criptas amigdalinas de la persona receptora. En las etapas tempranas de la infección, el virus Epstein Barr infecta linfocitos pequeños que pasan por las cercanías de las criptas amigdalinas, en dichas células el virus se mantiene de manera latente. Como consecuencia de la infección latente se desencadenará una respuesta celular muy activa, produciéndose de esta manera un signo característico de la infección primaria: linfocitosis atípica en sangre periférica; la cual tiene como consecuencia una disminución en la cantidad de células infectadas por el virus durante los meses siguientes y permanecerá así de por vida. En cuanto a la respuesta humoral: se promueve la formación de anticuerpos dirigidos contra las células infectadas por el VEB, estos se conocen como anticuerpos heterófilos, y son un grupo heterogéneo que se compone predominantemente de IgM (25).

La presentación usual de la mononucleosis es una triada de fiebre, faringitis y adenopatías, este cuadro es precedido de un período prodrómico de síntomas inespecíficos, pero lo más frecuente es que sea precedido por un cuadro gripal (26).

### 2.8.4 Virus BK

El poliomavirus, junto con el papilomavirus, pertenece a la familia de los papovavirus. El virus BK (VBK) pertenece a la familia de los poliomavirus junto con otros poliomavirus detectados en la especie humana. Son virus pequeños, desnudos, de 42 nm de diámetro, provistos de cápside de simetría icosaédrica que alberga en su interior un genoma con doble cadena circular de ADN con más de 5.000 pares de nucleótidos. El VBK se asocia con dos complicaciones en receptores de trasplante; la nefropatía asociada a poliomavirus BK (NAPBK) en trasplante renal y la cistitis hemorrágica en trasplante de médula ósea. En contraste con el VBK, aunque el virus JC reside en el

uroepitelio y normalmente se reactiva, rara vez produce nefropatía, y se asocia con cuadros de encefalitis y leucoencefalopatía multifocal (56).

La fuente de infección es exclusivamente humana, no está probado que un animal actúe como reservorio, y la vía de transmisión puede ser fecal-oral, respiratoria, transplacentaria y a través de tejidos donados. Durante la fase virémica, el virus infecta los tejidos, urotelio, tejido linfoide y cerebro, produciendo una infección lítica latente. Después de la transmisión viral natural durante la infancia, el VBK permanece en el tracto urinario con reactivaciones intermitentes y niveles bajos de patogenicidad en 5-10% de los adultos inmunocompetentes. En individuos inmunocomprometidos la frecuencia del VBK aumenta al 20-60% y son frecuentes mayores virurias (28).

#### 2.8.5 EICH (Factores de riesgo)

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) es la primera causa de morbilidad y mortalidad en los receptores de células hematopoyéticas. En estos pacientes, la piel es la afectada con más frecuencia. Las lesiones cutáneas suelen preceder a las sistémicas y son las más precoces. Con frecuencia, son el signo de presentación, tanto en las formas agudas como en las crónicas, de ahí la importancia de que el dermatólogo se familiarice con las manifestaciones cutáneas de esta enfermedad, dado el aumento que han experimentado los trasplantes hematopoyéticos en nuestro país en los últimos años (22)

La EICH es la expresión del reconocimiento como extraños a los antígenos de histocompatibilidad (HLA) de los tejidos del receptor por el sistema inmunitario procedente del donante. El resultado es la agresión de distintos órganos diana del paciente por parte de una serie de células efectoras estimuladas del injerto (linfocitos T citotóxicos, células NK), con diversas citocinas (IL-2, TNF). Los principales factores de riesgo para el desarrollo de EICH se reflejan a continuación (30).

#### Factores de riesgo para el desarrollo de EICH

##### Dependientes de donante

- Donante no emparentado

- Donante parcialmente incompatible

- Donante con alosensibilización previa (trasfusiones, embarazos)
- Donante mujer (para receptor varón)
- Donante de mayor edad
- Donante CMV positivo
- Dependientes del paciente (receptor)
  - Paciente de mayor edad
  - Paciente CMV positivo
  - Paciente esplenectomizado (factor de riesgo para la EICH crónica)
- Dependientes del procedimiento
  - Acondicionamiento más intensivo
  - Profilaxis de EICH menos intensiva
  - Ausencia de profilaxis antibacteriana
- Dependientes del injerto (inóculo)
  - Empleo de progenitores de sangre periférica (factor de riesgo para la EICH crónica)
  - Mayor cantidad de linfocitos T (CD3+)
  - Menor cantidad de células progenitoras (CD34+)
- Dependientes de las complicaciones
  - Antecedentes de EICH aguda (factor de riesgo para la EICH crónica)
  - Infección (viral, bacteriana, etc.) (29)

La EICH requiere un abordaje multidisciplinario, con la colaboración de distintos servicios: hematología, dermatología, oftalmología, estomatología, rehabilitación, gastroenterología, entre otros. A continuación (Tabla numero 7) se presentan los Principales fármacos empleados en la profilaxis y el tratamiento sistémico de la EICH.

**Tabla No. 7 Principales fármacos utilizados como tratamiento de la EICH.**

	Inhibidores de la calcineuria.	Antimetabolitos	Corticoide s	Rapamicina	Anticuerpos monoclonales o policlonales/globulinas.	Otras
<b>Inmunosupresores</b>	Ciclosporina A Tacrolimus	Metotrexato. Mycophenolate mofetil. Azathioprine.	--	Sirolimus	Anti-CD25. Anti-CD20. Anti-CD52. Anti-CD3. Globulina antilinfocítica. Inmunoglobulinas policlonales.	Talidomina, ciclofosfamida.
<b>Adyuvantes</b>	Retinoides	Psoralenos	Pilocarpina	Ácido ursodesoxicólico.	--	--
	EICH cutánea	EICH cutánea	Síndrome seco	EICH hepática	--	--

**EICH= Enfermedad de Injerto Contra Huésped (31).**

### 2.8.5.1 EICH aguda

Su incidencia oscila entre el 5 y el 80% de los TCH alogénicos, en función de los factores de riesgo mencionados, entre otros. Los órganos diana de la EICH aguda son básicamente la piel, el hígado y el aparato digestivo como se observa en la tabla 8. En cada caso, se pueden ver afectados uno o varios de ellos con mayor o menor intensidad. Suele iniciarse entre los días +10 y +50, aunque pueden observarse casos de inicio precoz y tardío. La EICH aguda de presentación precoz a menudo tiene un curso agresivo y grave. En raras ocasiones puede presentarse un síndrome hiperagudo en la primera semana post-trasplante, que parece estar más relacionada con la producción de un gran número de citocinas que con el injerto en sí, y cursa con una inflamación generalizada grave, fiebre alta, hepatitis, retención de líquidos, aumento de la permeabilidad vascular y shock (31).

**Tabla No. 8 Gradación clínica de la EICH.**

A. Grado de afección por órganos de la EICH aguda.					
Hígado	+	Bilirrubina 2-3 mg/dl	--		
	++	Bilirrubina 3, 1-6 mg/dl	--		
	+++	Bilirrubina 6, 1-15 mg/dl	--		
	++++	Bilirrubina > 15mg/dl	--		
Digestivo	+	Diarrea > 500ml o > 30ml/kg/día o EICH proximal.	--		
	++	Diarrea >1.000ml o > 60ml/kg/día	--		
	+++	Diarrea >1.500ml o >90ml/kg/día	--		
	++++	Diarrea >2.000 ml/día o dolor abdominal, cólico	--		
Piel	+	Eritema maculopapular <25% de la superficie corporal.	--		
	++	Eritema maculopapular 25-50% de la superficie corporal.	--		
	+++	>50% o eritrodermia	--		
	++++	Eritrodermia generalizada con vesículas y/o descamación.	--		
B. Índice de gravedad de la EICH aguda (IBMTR)					
Índice	Piel (grado)		Hígado (grado)	Digestivo	
A	+		0	0	
B	++	o	+ /+++	o	+ /+++
C	+++	o	+++	o	+++
D	++++	o	++++	o	++++
C. Gradación clínica de la EICH aguda (Glucksberg)					
Grado	Piel (grado)		Hígado (grado)	Digestivo (grado)	
I	+ /+++	y	0	y	0
II	+ /+++ /+++	y	+	y/o	+
III	++ /+++	y	++ /+++	y/o	++ /+++
IV	++ /+++ /++++	y	++ /+++ /++++	y/o	++ /+++ /++++
D. Gradación clínica de la EICH crónica					
Grado	Afección				
Limitada	Cutánea localizada y/o hepática (salvo formas histológicamente avanzadas)				
Extensa	Resto				

**EICH: enfermedad injerto contra huésped (4).**

El grado de afección es muy variable. Se distinguen 4 grados, en función del tipo de afección y la extensión, que se correlacionan con el pronóstico: Grado I. Eritema maculopapuloso que afecta a menos del 25% de la superficie cutánea. Tiene poca

influencia sobre la supervivencia. Grado II. Eritema maculopapuloso que afecta a una superficie del 25-50%. Grado III. Afección mayor del 50%, que incluye la presencia de eritrodermia. Los pacientes con grados II y III tienen un pronóstico intermedio. Grado IV. El pronóstico de este grupo de pacientes a menudo es fatal, la mortalidad (80-100%), debido a la afección extracutánea grave de la EICH y la mayor susceptibilidad a las infecciones debido a la inmunosupresión. Si el paciente no fallece, la enfermedad progresa a una EICH crónica en casi todos los casos (32)

No hay criterios absolutos para el diagnóstico de EICH aguda ante un paciente trasplantado de MO con erupción cutánea, y mucho menos si la erupción aparece tras un TCPH autólogo, ya que en estos casos las manifestaciones cutáneas de la EICH crónica son menos típicas. La cronología del trasplante y la presencia de afección extracutánea puede ayudar a apoyar el diagnóstico de EICH aguda, así como la aparición de la erupción en el momento de la recuperación de la MO, es decir, uno o dos días antes de la recuperación linfocítica. El eritema periungueal y/o auricular y el dolor a la presión en las palmas y las plantas son otros datos que deben considerarse (32).

## **2.9 Complicaciones tardías del TCPHs**

### *2.9.1 EICH crónica (factores de riesgo)*

Su incidencia oscila entre el 30 y el 80% de los TH alogénicos, en función de los factores de riesgo. El riesgo de desarrollar EICH crónica aumenta con la gravedad de la EICH aguda. Suelen afectarse varios de los múltiples órganos diana posibles, aunque cada uno de ellos con mayor o menor gravedad. A menudo el cuadro clínico es indistinguible de ciertas entidades autoinmunes. El mayor pico de incidencia del primer brote está en torno al día +180; sin embargo, la EICH crónica puede aparecer en cualquier momento desde el día +70 hasta años después del trasplante. Su aparición puede ser de novo –sin EICH aguda previa (30%)– o puede estar precedida de EICH aguda, ya sea tras un período de latencia variable (forma latente) (36%) o sin solución

de continuidad (32%). En estos casos, cuando cede el eritema de la fase aguda aparecen pápulas violáceas, liquenoides (forma progresiva). A veces las fases aguda y crónica se superponen: fases tardías del exantema agudo pueden coincidir con signos de EICH crónica en otros órganos; asimismo, pueden coexistir erupciones de la fase aguda, características desde el punto de vista clínico e histopatológico, con lesiones orales liquenoides. Una forma de comienzo de la EICH crónica es la erupción de máculas hiperpigmentadas con una descamación fina, que recuerda a la piel de leopardo; en la serie de Peñas apareció en el 59% (10 de 17) de los pacientes. Hay 2 tipos de lesiones de EICH crónica: liquenoides, más frecuentes y precoces, y esclerodermiformes, que son tardías. Hay casos en que ambas son concomitantes o sucesivas, pero lo más frecuente es que ambos procesos se presenten de manera independiente. Pueden aparecer espontáneamente o ser desencadenados por determinados factores, como la radiación ultravioleta, los traumas físicos o las infecciones por herpes zoster o borrelias (33).

## **2.10 Mortalidad asociada al TCPHs**

Se han establecido riesgos para el TCPH en relación con:

- Toxicidad por el régimen de acondicionamiento con citotóxicos y/o irradiación (vasculitis, mucositis, síndrome oclusivo sinusoidal hepático (SOSH), bronquiolitis obliterante, anemia microangiopática)
- Toxicidad por ciclosporina (insuficiencia renal, hipertensión, hirsutismo, crisis convulsivas, hiperplasia gingival)
- EICH aguda y/o crónica
- Falla de injerto
- Inmunosupresión secundaria
- Infecciones graves bacterianas, virales, micóticas y parasitarias
- Efectos tardíos: Talla baja, múltiples deficiencias endocrinas, (insuficiencia gonadal, hipotiroidismo) cardiomiopatía, leucoencefalopatía, osteonecrosis, cataratas, cáncer secundario a radioterapia y agentes alquilantes.

La mortalidad temprana puede ser del 20% dependiendo del acondicionamiento, la enfermedad y el estado del paciente. En el TCPH autólogo se eliminan los riesgos por EICH y el tratamiento inmunosupresor, sin embargo continúan los riesgos por el régimen de acondicionamiento, falla de injerto y aumenta la posibilidad de recaída. El TCPH tiene un costo elevado y una morbimortalidad elevada, por esta razón se requiere la estimación del costo beneficio en comparación con otros tratamientos. Debe realizarse el TCPH sí sólo este ofrece la oportunidad de curación para una enfermedad mortal, cuando existe otro tratamiento que ofrece la misma oportunidad de curación, con menor riesgo se debe evitar el TCPH (33).

### **2.11 Injerto**

Después de un régimen de acondicionamiento de 7-10 días se transfunde la médula ósea, o células progenitoras del donador por vía sistémica. Durante las 2-4 semanas siguientes hasta que se logre el injerto estos pacientes deber recibir tratamiento intensivo de soporte con paquete globular, plaquetas y antibióticos de amplio espectro como profilaxis o tratamiento de infecciones bacterianas, así como profilaxis con Aciclovir por el alto riesgo de infecciones virales (8).

En el congreso en Génova, se establecieron los siguientes criterios que pueden servir como guía para los centros de TCPH.

1. Se recomienda que los donadores sean movilizados con FEC-G a dosis de 10 mcgr/kg/día e iniciar la leucoféresis al día siguiente de la 4<sup>a</sup> dosis.
2. La leucoféresis debe realizarse en un separador de células de flujo continuo usando vena periférica y procesar arriba de 15 L de sangre por leucoféresis
3. Una dosis mínima de 2-3 x 10<sup>6</sup> células CD34+ por Kg de peso del receptor (no todas las células expresan CD34+, existen variedad de células en estas recolecciones)se considera como adecuada. Si se obtiene un número insuficiente de células CD34 en la primer leucoféresis una dosis posterior de FEC-G debe ser administrada y una segunda aféresis se realiza al día siguiente.
4. Las células tallo de sangre periférica se deben dar sin criopreservar siempre que sea posible.

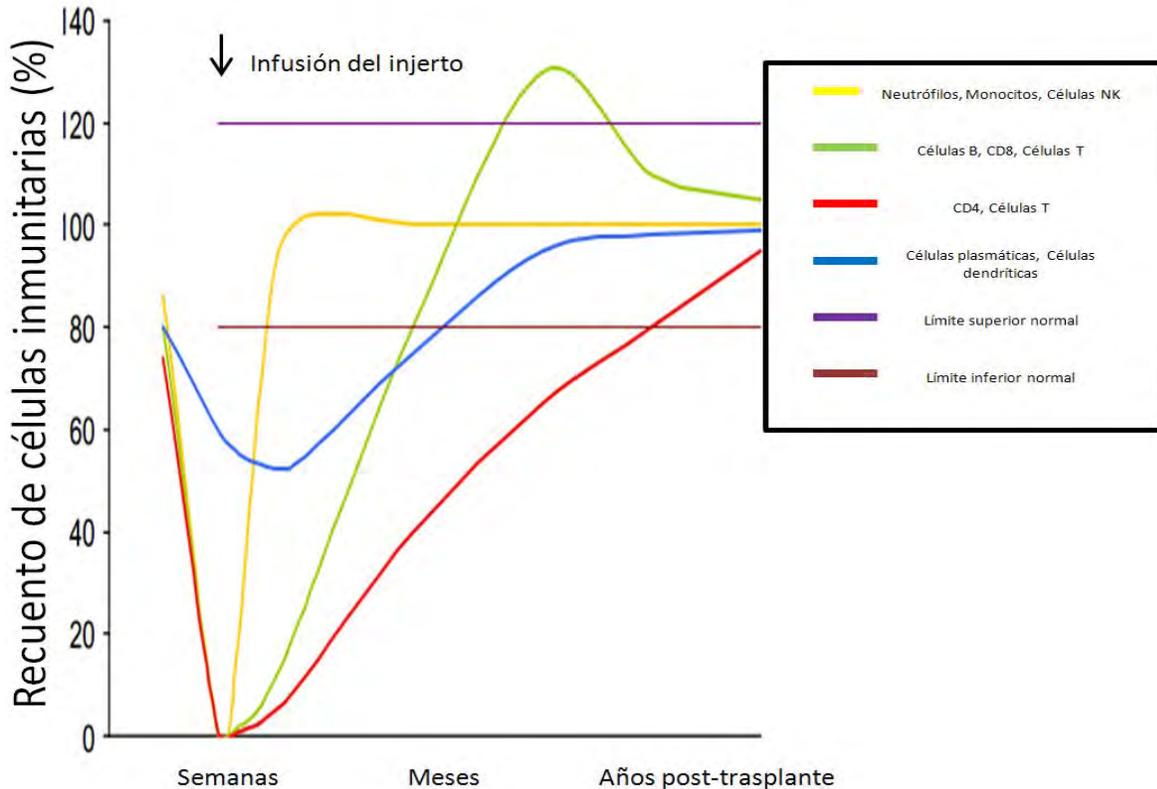
5. Los receptores deber recibir el régimen de acondicionamiento y la profilaxis para EICH que se utiliza habitualmente para TCPH en ese centro de trasplante. El día de trasplante (día 0) en el caso de infusiones repetitivas será el día en el injerto debe de administrarse.
6. Se debe realizar el seguimiento tanto del donador como del receptor y reportarse a un registro internacional (8).

El procedimiento de leucoféresis y el acceso venoso central que frecuentemente es necesario, no están libres de riesgos. Se presenta en raras ocasiones hipocalcemia sintomática por la administración de citrato como un anticoagulante extracorpóreo e hipotensión reversible, la oclusión del catéter e infecciones relacionadas con el catéter pueden observarse con mayor frecuencia (60 y 14% respectivamente) la movilización incrementa el riesgo de trombosis (8).

### **2.12 Establecimiento del injerto del donador (quimerismo)**

Después del acondicionamiento mieloablativo, los receptores del TCPH suelen experimentar un período de profunda pancitopenia que abarca de días a semanas, dependiendo de la fuente donante. La rapidez de la recuperación de neutrófilos varía de acuerdo al tipo de injerto: el tiempo de recuperación aproximado es de 2 semanas con injertos de sangre periférica movilizadas con Factores Estimulantes de Colonias de Granulocitos (G-CSF), 3 semanas con injertos de médula ósea, y 4 semanas con injertos de sangre del cordón umbilical. Neutrófilos, monocitos, y células NK son las primeras en restablecerse seguidos por las plaquetas y la recuperación de glóbulos rojos, que a su vez son seguidos por células B y la recuperación de células T como se muestra en la siguiente imagen (34).

**Imagen No. 2 Reconstitución de células inmunológicas respecto al tiempo.**



**Nota.** Los recuentos de células inmunes aproximados (expresados como porcentaje de los recuentos normales) pre y post-TCPH mieloablatoivo. El valor entre los límites inferiores y superiores normales se producen tarde después del trasplante mieloablatoivo y no mieloablatoivo, células receptoras persisten después del trasplante no mieloablatoivo durante varias semanas o meses (en presencia de EICH) o prolongada (en ausencia de EICH) (34).

Al mismo tiempo, el régimen mieloablatoivo daña la superficie de las mucosas y por lo tanto la proliferación de patógenos comensales se encuentran en torrente sanguíneo, cuando normalmente habitan en el tracto gastrointestinal. Como resultado, las complicaciones infecciosas en el período inmediatamente posterior al trasplante suelen presentarse como neutropenia febril, con la gravedad del riesgo relacionado con la profundidad y la duración de la neutropenia y el grado de daño inducido de la mucosa (34).

Los receptores de trasplantes alogénicos no mieloablativo muestran gran heterogeneidad en la profundidad y duración de pancitopenias. En los regímenes con mielosupresión mínima y mínima toxicidad de la mucosa, el riesgo de infección en el período inmediatamente posterior al trasplante se reduce. De hecho, los regímenes basados en TBI a dosis baja y fludarabina a veces se pueden realizar de forma ambulatoria.

Aunque el grado de mielosupresión es menor después de regímenes no mieloablativos, la profundidad y el alcance de la depresión de linfocitos tiende a ser similar, con períodos prolongados de incompetencia observada en los receptores de ambos regímenes mielosupresores y no mieloablativo. Esto es porque el injerto de células progenitoras hematopoyéticas alogénicas requiere una inmunosupresión importante del receptor para evitar el rechazo del injerto, incluso en el contexto de la compatibilidad HLA. Con algunos regímenes, la erradicación completa esencialmente de linfocitos receptores se lleva a cabo por el propio régimen de preparación. Sin embargo, con otros regímenes, el agotamiento de los linfocitos receptores se produce más gradualmente a través del uso de infusiones de leucocitos del donante después del trasplante. En ambos casos, la gran mayoría de los receptores de CPH experimentan agotamiento casi total de linfocitos, y por lo tanto deben someterse a la reconstitución linfoide mediante linfocitos maduros y progenitores linfoides contenidos en el injerto. Todos los destinatarios de CPH alogénicos también deben recibir algún tipo de inmunosupresión para prevenir la EICH, limitando aún más la competencia inmunológica (34).

A diferencia de la recuperación de otros linajes hematopoyéticos, que normalmente se produce en el transcurso de semanas después del TCPH, la recuperación de linfocitos es un proceso prolongado. El restablecimiento de la inmunocompetencia requiere por lo menos de varios meses, y algunos pacientes continúan mostrando déficits inmunitarios durante varios años después del trasplante. En general, las células NK son el primer subconjunto de linfocitos para recuperar, seguido por las células T CD8 +, que a menudo alcanzan niveles supranormales dentro de 2-8 meses después del trasplante.

Posteriormente se recuperan las células B y en última instancia las células T CD4<sup>+</sup>. El ritmo y la magnitud de la recuperación de cada subconjunto de linfocitos es altamente dependiente de varios factores, que en última instancia determinan el grado, extensión y duración de la incompetencia inmune experimentada por el receptor (34)

La regeneración de los linfocitos en los seres humanos es un proceso ineficiente, que implica principalmente dos vías distintas. En la primera vía, los linfocitos se generan a partir de progenitores de médula ósea linfoides, entonces recapitulando la ontogenia y la generación de un sistema inmunitario ingenuo, similar a la encontrada en un niño recién nacido. Las células NK se recuperan exclusivamente por esta vía. La recuperación total de los recuentos de células NK se logra típicamente dentro de 1 a 2 meses. Las células B también se regeneran principalmente a partir de células progenitoras linfoides, representando evidencia de ello la aparición de subconjuntos de células B primitivos como el precursor de células B de reconstitución inmunitaria. A diferencia de la recuperación de las células NK, sin embargo, la linfopoyesis de células B es altamente dependiente de un microambiente de la médula especializado denominado el "equivalente bursal", que es susceptible al daño por el régimen de preparación y es exquisitamente sensible a los efectos tóxicos del tratamiento para combatir la EICH. De hecho, los pacientes que experimentan incluso un episodio limitado de EICH sensible a esteroides disminuyen significativamente la reconstitución de las células B en largo plazo, en comparación con los pacientes que no experimentan EICH. Aunque los datos recientes han demostrado que las células B maduras también pueden contribuir a la reconstitución de células B a través de la expansión homeostática, esta vía parece ser menor en comparación con la vía antes mencionada para la regeneración de células B.

La restauración inmunitaria humoral después del TCPH tiene que llevarse a cabo no sólo de las células B vírgenes, sino de un grupo de células B de memoria también. Estas últimas se producen como resultado de la exposición del medio ambiente o a base de la vacuna a los patógenos comunes y también requiere la ayuda de células T CD4<sup>+</sup>. Por lo tanto, incluso los destinatarios del trasplante que no experimentan EICH

y que demuestran la recuperación del número total de células B dentro de los 6 meses después del trasplante no deben ser considerados recuperados por completo. Durante al menos 1 año después del trasplante, esencialmente todos los receptores de CPH permanecen predispuestos a las infecciones causadas por bacterias y virus encapsulados, contra los cuales los anticuerpos neutralizantes proporcionan una primera línea de defensa (34).

### **2.13 Tipos de Quimerismo**

El concepto de quimerismo en medicina se remonta a los orígenes de los trasplantes de órganos: un paciente trasplantado se convierte en una quimera porque posee órganos de dos seres vivos genéticamente diferentes. Como la quimera de Arezzo, con partes de diferentes animales vivos, el paciente trasplantado vive con partes de por lo menos dos diferentes seres vivos: donador y receptor; sin embargo, no sólo los pacientes trasplantados de órganos son quimeras; hay situaciones en las que el quimerismo puede explicar el origen de una enfermedad (3).

El quimerismo se clasifica de la siguiente manera de acuerdo al porcentaje de células, tanto del donador como del receptor.

- Quimerismo total o completo (QC): todas las células hematopoyéticas detectadas proceden del donante. Esto quiere decir que las células del donante expresan un 100% dentro del receptor.
- Quimerismo mixto (QM): coexisten células hematopoyéticas del donante con células hematopoyéticas del receptor. Menos del 95% de células del donador en el receptor.
- Quimerismo dividido o disociado: células mieloides y linfoides tienen un origen distinto entre sí (Ej. Linfocitos del donante y macrófagos del receptor).
- Microquimerismo: existe menos del 1% de células del donante (8)

**Tabla No. 9 Tipos de quimerismo en el receptor.**

Quimerismo	Definición	Implicaciones	Comentarios
<b>Quimerismo completo (QC)</b>	Solo existe DNA del donador post-trasplante.	Se realiza seguimiento para detectar recurrencia de células autólogas durante periodos posteriores.	Se recomiendan intervalos cortos durante el injerto en las enfermedades malignas y no malignas, por ejemplo, semanalmente.
<b>Quimerismo mixto (QM)</b>	El DNA del donador y del receptor son detectables post-trasplante en el receptor.	Seguimiento cercano para reconocer cambios dinámicos.	Investigaciones semanales durante el injerto incluyendo las células T y las células NK.
<b>Quimerismo split</b>	Las células del receptor corresponden a un linaje específico y las células del donador a otro linaje post-trasplante.	Análisis de las células T y quimerismo de células NK puede ayudar a guiar la terapia adicional para evitar el rechazo del injerto.	Los análisis semanales se llevan a cabo durante los primeros 200 días.
<b>Recuperación autóloga</b>	Solo existen células del receptor post-trasplante.	Reacondicionamiento y segundo trasplante probablemente necesario.	

**Nota: Ninguno de estos tipos de quimerismo se encuentra asociado a una enfermedad específica (61)**

## 2.14 Quimerismo y Tolerancia

Durante el desarrollo de los linfocitos en los órganos linfoides primarios, y debido a la reordenación aleatoria de genes que codifican al antígeno del receptor, surgen muchos precursores aloespecificos de células T y células B. Puesto que tales células podrían causar una patología autoinmune devastadora, los mecanismos naturales implicados

en la inducción de la auto-tolerancia juegan un papel crucial en la supervivencia. (64). Auto-tolerancia se define como un estado en el que se ha impedido el ataque autoinmune o bien ha sido desviado hacia respuestas no perjudiciales. Esto permite el desarrollo de la inmunidad protectora y por lo tanto es muy específico. Parece muy atractivo el poder manipular los mecanismos involucrados en la auto-tolerancia con el fin de impedir el rechazo de aloinjertos. Si se tiene éxito, esto permitiría la supervivencia indefinida de los injertos (36).

Un ejemplo claro de esta llamada tolerancia son los linfocitos inmaduros en niños que se desarrollaron en presencia de los antígenos del donante (aprendiendo a ser tolerantes). Sin embargo, en los adultos, la situación es más complicada ya que, además del desarrollo de linfocitos, células preexistentes maduras específicas del donante también tendrían que volverse tolerantes. Para evitar este problema, varios laboratorios decidieron agotar la reserva de células T maduras en su experimentación con animales (52). Estos grupos experimentaron por primera vez este enfoque a través de la eliminación de todas las células hematopoyéticas. Los ratones receptores fueron irradiados letalmente o fueron tratados con fármacos citotóxicos, reconstituidos con médula ósea del donante, e injertados con su piel. Estas estrategias invariablemente llevaron al aumento de la supervivencia del homo- y xenoinjertos. Más recientemente, Ildstad y Sachs en 1984 definitivamente validaron estas observaciones al inducir a largo plazo la supervivencia de injertos de piel alogénicos y xenogénicos utilizando un enfoque comparable. Resultados similares fueron obtenidos en la rata con trasplante cardíaco e injertos de piel (37).

Las células hematopoyéticas del receptor inducen tolerancia de las células T del donador mediante inducción de la apoptosis y la anergia. Para hacer frente a la cuestión de cómo las células de origen hematopoyético inducen la tolerancia, los investigadores necesitaron un medio para identificar los precursores de células T específicas para un antígeno dado. En 1987 Kappler demostró que prácticamente todas las células T que expresan el TCR (Receptor de Células T) variable de segmento

V $\beta$ 17a, que representa hasta el 15% del repertorio de células T de ratón en ciertas cepas, reconoció al MHC de clase II molécula I-E (38).

Dado que no habían desarrollado un anticuerpo contra el dominio V $\beta$ , ahora se podían analizar los mecanismos implicados en la tolerancia de las células T con I-E. La I-E se encuentra expresada en las células precursoras de los ratones, donde V $\beta$ 17a + T fueron eliminados en una etapa inmadura durante el desarrollo del timo (38). Al año siguiente, los mismos autores caracterizan este mecanismo y además mostraron que la delección clonal requiere la expresión negativa del ligando de selección por las células del timo de origen hematopoyético (38). Existen muchos otros ejemplos de delección clonal de las células T que expresan segmentos dados (TCR V $\beta$ ) por superantígenos endógenos o exógenos que ya han sido publicados (36;39).

MacDonald mostró que la expresión del superantígeno en células del bazo en neonatos conducen a la supresión de las células T intratímica del superantígeno-reactivo.

En conjunto, los datos mostraron que las células dendríticas (CD), y potencialmente otras células de origen hematopoyético, contribuyen a la inducción de tolerancia por la eliminación de los timocitos en desarrollo. El uso de regímenes de acondicionamiento que agotan totalmente las células T huésped antes del trasplante de médula ósea se propone principalmente para el mantenimiento de la tolerancia.

También existe la supresión periférica que se basa esencialmente en dos tipos de mecanismos (57): la muerte celular inducida por activación, un proceso Fas-dependiente que se puede promover por IL-2 y que conduce a la apoptosis de las células T activadas cuando se volvieron a estimular con altas dosis de antígeno (41;37); y la muerte celular pasiva o la muerte "por descuido", un proceso Fas-independiente que puede prevenirse mediante la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-XL y que conduce a la apoptosis de las células T cuando se estimulan con una baja dosis de antígeno y / o en ausencia de señales co-estimuladoras (42;43;44).

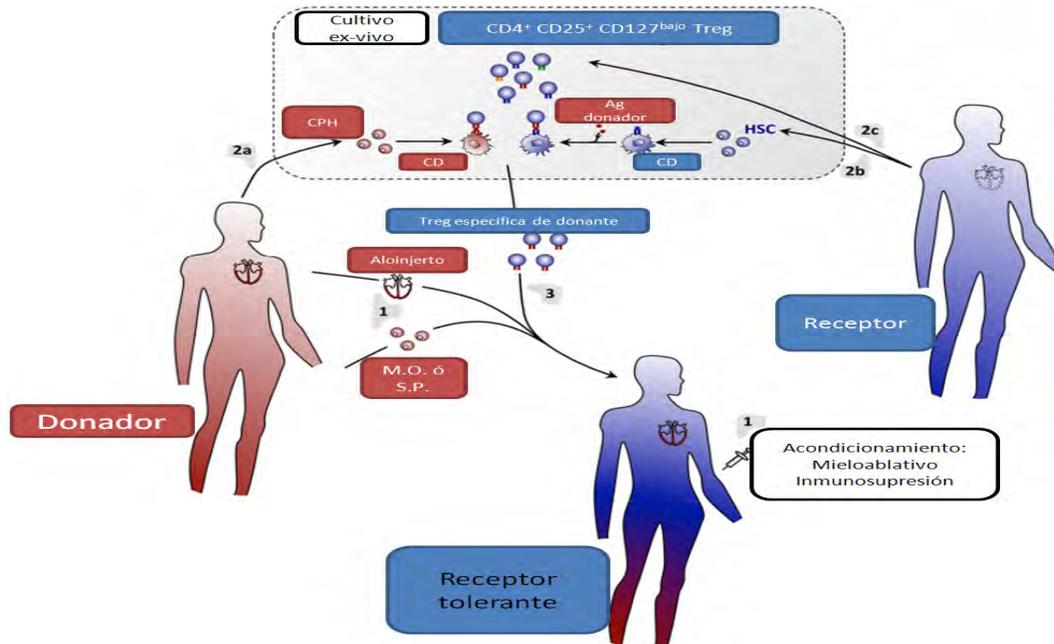
De igual manera se demostró que, además de CD, otras poblaciones de células hematopoyéticas tales como células B tienen la capacidad de eliminar precursores alo-específicos desde el compartimento periférico de células T (45).

Finalmente, las células hematopoyéticas pueden también causar la tolerancia de células T mediante la inducción de un estado no sensible llamado anergia clonal (23;48;25). Combinados, los informes citados muestran claramente que las células de origen hematopoyético pueden inducir tolerancia "pasiva" (es decir, apoptosis y la anergia).

Los mecanismos pasivos no son suficientes para controlar totalmente la auto-reactividad. Los individuos que portan un gen Foxp3 mutado desarrollan el síndrome de inmuno disfunción autoinmune, rápidamente letal, ligada al cromosoma X (IPEX). Esto se explica por el hecho de que Foxp3 se requiere para la programación de una población de linfocitos T CD4 + reguladoras (Treg) que inhiben y / o desvían la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, principalmente las dirigidas contra antígenos propios (48;47).

El trasplante de Anlagen tímico alogénico (es decir, el grupo inicial de células embrionarias pluripotentes que se desarrolla en el timo) en ratones induce tolerancia mediada por Treg a injertos de piel posteriores del mismo donante, mostrando de nuevo que las células epiteliales del timo pueden seleccionar antígeno Treg específico. Sin embargo, la capacidad para desencadenar la diferenciación de Treg en el timo no es una propiedad restringida de las células epiteliales como se ha informado, también las CD están involucradas en este proceso (49;50). Por otra parte, la inducción de la diferenciación de Treg por CD también se ha informado en los órganos linfoides como se muestra en la imagen número 3.

**Imagen No. 3 Regulación de células T/ protocolo basado en quimerismo hematopoyético para la inducción de la tolerancia del trasplante.**



El aloinjerto (por ejemplo, el corazón) es trasplantado con la infusión concomitante de M.O. o S.P. de los donantes en el huésped acondicionado. El rechazo de los injertos será temporalmente prevenido mediante un régimen inmunosupresor (52).

La tolerancia en quimerismo mixto implica tanto mecanismos centrales como periféricos. Después de un trasplante de médula ósea, las células madre del donante migran y proliferan en los diferentes compartimientos.

Es importante destacar que los dos conjuntos de células T anti-donantes, es decir, los que tienen especificidad directa anti-donante y aquellos con indirecta especificidad anti-donante, se pueden hacer tolerante en el timo. Por lo tanto, el quimerismo se aprovecha de la tolerancia central, una forma robusta de la tolerancia de una manera similar a cómo el sistema inmune ha evolucionado para eliminar la mayor parte de las respuestas. (52)

Sin embargo, es poco probable que todos los antígenos del donante alcancen el timo para inducir tolerancia central.

Los primeros experimentos que demuestran delección central en quimerismo utilizan combinaciones de ratón donante-receptor que difieren en MHC de clase II en la

expresión de I-E, lo que permite el seguimiento de las células T reactivas superantígeno que expresan ciertas familias V $\beta$ . De esta manera, se ha demostrado que las células T maduras donantes reactivas se eliminan centralmente poco después de la inducción del quimerismo (52).

Por lo tanto, aunque el quimerismo puede inducir tolerancia hacia células hematopoyéticas, las células de la médula ósea no expresan todos los antígenos específicos de tejido (TSA) significando que la tolerancia hacia el injerto de piel podría no lograrse en muchos casos. De hecho, alo-antígenos específicos de la piel han sido identificados como objetivos para la tolerancia inducida en el paciente.

La tolerancia a la división no es el resultado único de células T aloreactivas que reconocen antígenos específicos de la piel (52).

### **2.15 Técnicas de monitoreo del injerto en el post trasplante (seguimiento)**

En la actualidad, las técnicas de estudio del quimerismo como se muestran en la tabla número 10 se han ido incrementando. Hoy en día las técnicas basadas en el análisis del ADN se han constituido en la principal herramienta para el estudio del quimerismo. Si bien el Southern blot era la técnica más empleada, ésta ha sido sustituida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, también han ido cambiando los distintos tipos de polimorfismos de ADN utilizados para distinguir al donante del paciente (6).

**Tabla No. 10 Técnicas de estudio del quimerismo**

Técnica	Ventajas	Desventajas	Sensibilidad (%)	Aplicabilidad	Valores de referencia
RFLP	Muy informativo	Tiempo consumido, trabajo intensivo.	5-10	Alta	24-27
Citogenética		Tiempo consumido.	5	Baja	20-21
Fenotipo células rojas	Simple y precisa	Alta latencia.	1-5	Alta	22-23
X/Y FISH	Pocos falsos positivos, gran número de células, alta sensibilidad.	Está restringida en trasplantes con pacientes del mismo sexo.	0.1-0.001	Baja	28-33
Fluorescencia basada en STR-PCR	Rápida, alta sensibilidad en la cuantificación.	Moderada sensibilidad.	1-5	Muy alta	44-47
STR en subpoblaciones	Muy alta sensibilidad.	Económicamente cara, trabajo intensivo.	0.1-0.001	Muy alta	17, 59
PCR - tiempo real	Altamente sensible, rápido	Falsos positivos en resultados basados en SNP, cromosoma específica (alta especificidad PCR-Y).	0.001-0.0001	Mediana-Alta	49-50, 54-56
<b>FISH= Hibridación insitu-fluorecente; RFLP=Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción STR= Repeticiones Cortas en Tandem</b>					

La Tabla No. 10 muestra las principales técnicas de análisis del quimerismo, la información que proporcionan, los problemas que implican cada una de ellas, la sensibilidad y que tan recomendable es usarla en la técnica de quimerismo (53).

### 2.15.1 Descripción de las técnicas más utilizadas

#### *FISH*

La hibridación *in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. La detección *in situ* provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas que es crucial para dilucidar la organización y función génica, por lo que el método de hibridación *in situ* se ha convertido en una técnica importante en diversos campos, incluyendo diagnóstico de rearrreglos cromosómicos, detección de infecciones virales y análisis de la función génica durante el desarrollo embrionario. La hibridación *in situ* toma como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos, la cual puede ser DNA y/o RNA, a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina-timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una cadena, tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato. La secuencia es leída de 5' a 3'(54).

#### *STR*

Los STR (short tandem repeat) son secuencias muy polimórficas, con una alta frecuencia de distribución en el genoma humano (un STR cada seis kilobases) (56). Según el número de nucleótidos de la unidad de repetición se pueden distinguir cuatro tipos de STR: diméricos, triméricos, tetraméricos y pentaméricos. Los STR tetraméricos son los más frecuentes y los que preferentemente se utilizan para el estudio del quimerismo (56).

Para un correcto estudio del quimerismo, los marcadores utilizados deben ser capaces de distinguir el ADN de dos individuos emparentados, esto es ser informativos, y la técnica empleada debe poder detectar material genético de ambos aun cuando la cantidad de uno de ellos esté muy poco representada en la muestra biológica, es decir ha de ser suficientemente sensible (5).

El cumplimiento de estos dos conceptos es crucial para una correcta clasificación de los pacientes en cuanto a su “estado quimérico”. La sensibilidad obtenida va a depender de la técnica utilizada para el estudio, aunque existen otros factores que también pueden influir. En general, la PCR es la técnica de mayor sensibilidad y, por tanto, la recomendada para el análisis del quimerismo (5).

Son secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (55).

Los STR presentan las características que ha de tener todo marcador genético susceptible de ser utilizado en el análisis del quimerismo; por otra parte, el pequeño tamaño de las secuencias hace que todas ellas se puedan detectar mediante PCR y, en muchos casos, incluso es posible el estudio simultáneo de varios *loci* STR mediante la PCR multiplex. (55)

A parte de los aspectos técnicos que condicionan la sensibilidad del análisis quimerismo hematopoyético mediante PCR/STR, existen dos aspectos prácticos que pueden ayudar a optimizarlo. Por un lado, la obtención de muestras de forma secuencial y en intervalos de tiempo cortos y, por otro, el análisis del quimerismo en subpoblaciones celulares separadas.

En 1995, Socie sugirió que el conocimiento del patrón del quimerismo y su cinética tras el trasplante (77), realizando el análisis en varias líneas celulares y de forma secuencial, permite monitorizar estrechamente la dinámica del implante hematopoyético y detectar precozmente la recidiva leucémica tras el trasplante.

Mediante la separación de subpoblaciones celulares, la sensibilidad de la PCR puede aumentar al focalizar el estudio en las líneas celulares de interés clínico, reduciendo de esta manera los resultados irrelevantes. (55;47).

### 2.15.2 Descripción de Microsatélites

A continuación se presentan los STR utilizados comúnmente para la evaluación del quimerismo.

**Tabla No. 11 Marcadores STR comúnmente utilizados para la evaluación del quimerismo.**

STR	Cromosoma	Tamaño (pares de bases)
D8S1179	8	--
D21S11	21q11.2-q21	--
CSF1PO	5q33.3-34	281-317
D3S1358	3p	114-142
TH01	11p15.5	169-189
D13S317	13q22-31	206-234
D16S539	16q24-qter	234-274
D2S1338	2q35-37.1	--
D19S433	19q12-13.1	--
vWA	12p12-pter	157-197
TPOX	2p23-2per	218-242
D18S51	18q21.3	--
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X:107    Y:113
D5S818	5Q21-31	135-171
FGA	4q28	219-267

Se pueden utilizar otros microsatélites; lo importante es escoger los más polimórficos para que permitan discriminar mejor entre el paciente y el donante (56).

Para que un marcador genético sea útil en el estudio del quimerismo hemopoyético debe cumplir una serie de requisitos que se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla No. 12 Requisitos de un marcador genético para el estudio del quimerismo.**

<b>Patrón de herencia bien establecido</b>
<b>Alto grado de polimorfismo</b>
<b>Alto grado de heterocigosidad</b>
<b>Fácil detección y reproductibilidad</b>
<b>Posibilidad de detección a partir de un material escaso</b>

Los elementos antes mencionados son indispensables para que se puedan considerar marcadores genéticos (56).

En la tabla que se muestra a continuación se resumen los sistemas más utilizados para el análisis de STRs tras su amplificación mediante PCR.

**Tabla No. 13 Sistemas de detección de STR.**

<b>Tinción con bromuro de etidio + fotografía mediante transiluminación UV1</b>
<b>Tinción con nitrato de plata</b>
<b>Incorporación de nucleótidos radiactivos a la PCR</b>
<b>Utilización de cebadores marcados con fluorocromos</b>
<b>Electroforesis capilar</b>
<b>Quimioluminiscencia</b>

**Nota:** La utilización de cebadores marcados y posterior detección de fluorescencia mediante electroforesis capilar es uno de los métodos más rápidos, fiables y de fácil realización. Además, permiten realizar un análisis cuantitativo (56).

### **2.15.3 Descripción de los alelos**

Los alelos son las distintas formas alternativas que puede presentar un gen. Si para un mismo locus existen más de dos alelos, juntos constituyen lo que denominamos serie alélica y hablamos de que existe un fenómeno de alelismo múltiple. A los diferentes alelos se los denomina también factores antagónicos. Los seres humanos representan un sistema bialélico basado en la herencia mendeliana la cual indica que cada individuo

contiene dos alelos para cada carácter, uno heredado del padre y otro de la madre (57).

Se analizan 16 loci que se amplifican simultáneamente en un solo tubo y analizados en una sola inyección o línea de gel. Los loci amplificados dentro del kit se encuentran dentro de los siguientes cromosomas.

**Tabla No. 14 Loci, localización cromosómica, marcadores y alelos incluidos en cada uno de los marcadores.**

Loci asignado	Localización Cromosómica	Alelos incluidos	Marcador
D8S1179	8	8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19	6-FAM™
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	3p	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	VIC <sup>R</sup>
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 21, 28	
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 27	
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET <sup>R</sup>
D5s818	5Q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 21, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

**Nota: Aquí se muestran los loci utilizados, la localización dentro del cromosoma que ocupan, los alelos incluidos de cada cromosoma y el fluorocromo utilizado.**

#### **2.15.4 Alelos Informativos (características para la elección)**

Un locus STR informativo es uno para el cual al menos un alelo receptor tiene un número diferente de repeticiones que el alelo (s) donante. Debido a que el receptor y el donante a menudo se relacionan, comparten muchos alelos. Por lo tanto, múltiples loci STR necesitan ser probados para identificar uno o más *loci* informativos. La amplificación simultánea de múltiples loci en un solo tubo de reacción facilita la identificación de este loci informativo (57).

Aunque algunos *loci* son técnicamente informativos, podrían no ser óptimos para la determinación de quimerismo mixto, sobre todo debido a la existencia de bandas de tartamudeo que aparecen predominantemente como dos picos menores al lado de los principales picos de alelos. Los picos menores son aquellos que se muestran en repetición más pequeña o más grande que el pico principal del alelo.

La principal explicación planteada para estos picos en tartamudeo, es que probablemente son problemas que transcurrieron durante la amplificación de PCR, lo que resulta en un pico que es una repetición más pequeña o más grande que el pico principal del alelo. La existencia de picos tartamudeo influye directamente en la elección de los loci informativos para el análisis de injerto (58).

En un estado de recaída, el porcentaje de DNA receptor es de menor de 5% y 10%, lo cual equivale al mismo tamaño que un pico típico en tartamudeo. Por lo tanto es necesario utilizar el siguiente criterio para elegir el mejor locus: el alelo-destinatario específico debe ser al menos 2 repeticiones más grande o más pequeño que el alelo del donante más próximo (58).

Cuando se selecciona un locus informativo, el método STR-PCR se puede utilizar para evaluar cualitativamente el injerto. En el método cuantitativo para el análisis del injerto son usados cebadores marcados con fluorescencia para la amplificación por PCR, detectando loci VNTR y STR era descrito por primera vez en 1995 por Scharf. Un área de pico eléctrica para cada fragmento marcado en el extremo detectado es directamente proporcional al número de moléculas de DNA presentes.

Es importante simular una QM después del trasplante o en un estado en recaída, mezclando 2 muestras de ADN diferentes que muestran receptor y donador en diversas relaciones de entre 0% y 100% usando la misma cantidad total de 5ng de ADN para preparar las curvas de calibración de reconstrucción de amplificación. Esta simulación es realizada debido a que los alelos más cortos pueden amplificar más eficientemente que los alelos más largos, a menudo no es posible utilizar una simple estimación visual de la intensidad de pico para determinar con precisión el grado de quimerismo mixto. Además, es fundamental para determinar la cuantificación del injerto debido al potencial para la amplificación preferencial en mezclas de alelos (59).

Estos efectos de amplificación preferentes dependen de una variedad de factores:

- la cantidad de ADN o enzima utilizada,
- la eficiencia inherente del sistema de amplificación, y
- el número y la diferencia de tamaño relativo de los alelos presentes en la muestra.

Se ha encontrado que las curvas estándar reconstituidas para una muestra pueden variar entre los diferentes marcadores. Además, las diferentes muestras de donantes o receptores pueden producir diferentes curvas de calibración para el mismo marcador. Por lo tanto, es muy importante establecer las curvas de calibración de reconstrucción individuales para cada marcador en cada pareja donante-receptor (59).

Dado que las células que recaen son originalmente de la médula ósea en lugar de partir de células de sangre periférica, también se sugiere utilizar el DNA de células de la médula ósea para examinar la condición de injerto. De hecho, en 1998, Bader presentó datos de trasplante de médula ósea en el que el DNA del receptor solamente fue detectado en 2 de 7 pacientes en muestras médula ósea, pero ninguno en sangre periférica. Además de esto, en un intervalo de tiempo más largo el seguimiento de estos pacientes después del TCPH alogénico es una limitación importante en la sensibilidad de los ensayos estadísticos. En consecuencia, es mejor investigar los pacientes a intervalos de tiempo cortos (53).

Con un control frecuente, la detección de quimerismo mixto puede alertar a los médicos si el paciente se encuentra con un alto riesgo de recaída y permitir la intervención temprana con un tratamiento rápido usando la inmunosupresión o linfocitos del donante (terapia de infusión), o incluso un segundo TCPH (53).

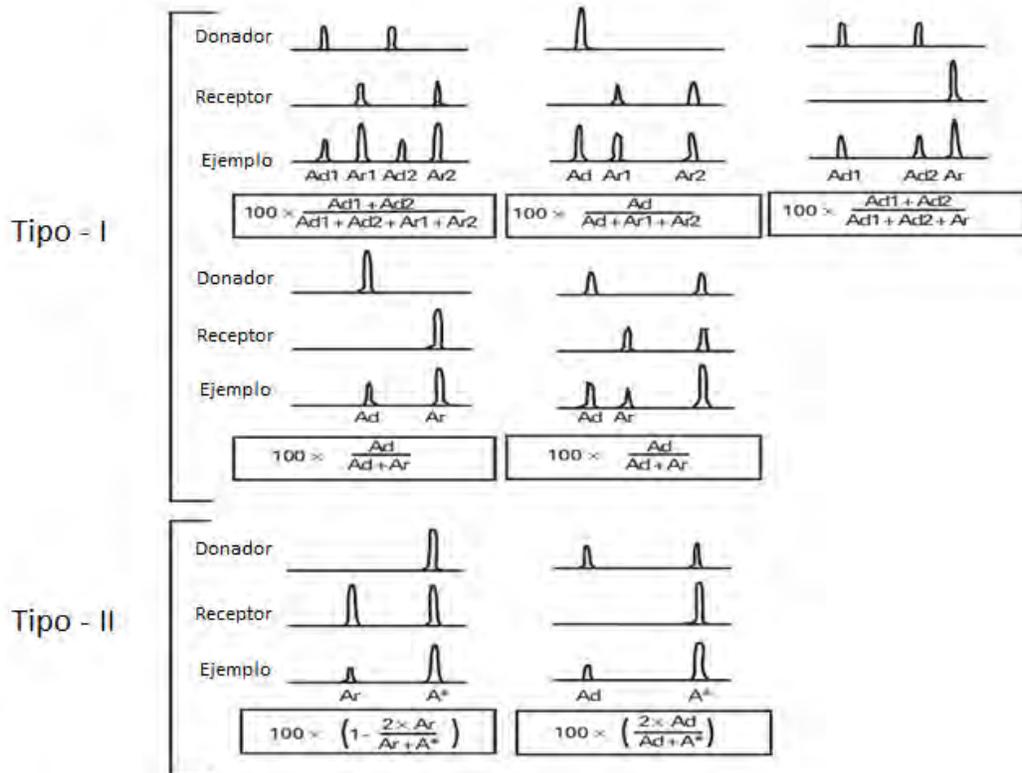
Aunque muchos métodos se han utilizado para el análisis de injerto, la amplificación por PCR de STR loci es la mejor opción para muchos laboratorios clínicos, ya que es informativo, cuantitativo, relativamente rápido, y sensible (53).

#### **2.15.5 Evaluación del porcentaje (área vs altura, descripción de fórmulas)**

Después de la electroforesis capilar del producto de la amplificación del DNA, los porcentajes de quimerismo se calculan a partir de las áreas o las alturas de los picos observados de los marcadores informativos.

Primero se deben identificar las longitudes de los alelos receptores y donantes de todos los marcadores en el DNA aislado antes del trasplante. Todos los marcadores son anotados por sus longitudes alélicas. Las posiciones relativas de los dos alelos donantes y receptores de un marcador dado determinan su idoneidad para el cálculo quimerismo. Todas las posibilidades se agruparon en tres tipos de distribución de alelos como se muestra en la siguiente figura (56).

### Imagen No. 4 Fórmulas de tipo I y tipo II para calcular el quimerismo



**Nota:** Existen tres tipos de fórmulas para el cálculo del quimerismo. Las de tipo 1 involucran a aquellas donde no se comparte ningún alelo entre el donador y el receptor. Las de tipo 2 son aquellas donde se comparte solo un alelo entre el donador y el receptor. También existen las de tipo 3, sin embargo estas fórmulas comparten los dos alelos, impidiendo llevarse a cabo la cuantificación en este último tipo de fórmulas (38).

En el TIPO I no comparten ningún alelo entre el donante y el receptor y se utilizan para calcular los valores de quimerismo. Las cinco combinaciones posibles se muestran en la figura anterior, donde el porcentaje de quimerismo se calcula dividiendo las áreas o las alturas del pico del alelo donante (s) (Ad) por la suma de las áreas o alturas de los picos de los donantes (Ad) y de los receptores (AR).

En el tipo II se comparte solo un alelo y el otro no; sin embargo, es posible realizar la cuantificación del quimerismo. Solo existen dos combinaciones posibles que se mostraron en la imagen anterior, además de las fórmulas como se calculara este quimerismo.

El TIPO-III comparte todos los alelos entre el donante y el receptor, es por ello que no se brinda información acerca del injerto y es imposible utilizar datos de este tipo de marcadores para el cálculo del quimerismo (56).

## **2.16 Recomendaciones internacionales para el seguimiento molecular del injerto ASHI**

Un grupo internacional de expertos en enfermedades infecciosas, HCT, y la salud pública trabajaron juntos para elaborar este documento con 4 objetivos en mente: (1) para resumir los datos actuales disponibles en el campo, (2) para proporcionar recomendaciones basadas en la evidencia con respecto a la prevención de complicaciones infecciosas entre los pacientes HCT, (3) para servir como referencia para los profesionales de la salud en todo el mundo que se ocupan de los receptores HCT, y (4) para servir como una referencia para los receptores de HCT y sus cuidadores no médicos. En la actualización de estas directrices, el Comité trató de resumir los datos actualmente disponibles y presentarlos de forma más concisa, con el objetivo de demostrar que la medicina basada en evidencia es una herramienta útil. (56).

## **2.17 Evaluación del quimerismo en sangre total y en diferentes poblaciones celulares**

Tras el acondicionamiento previo al trasplante, receptores de CPH suelen experimentar un período de profundas pancitopenias que abarca de días a semanas, dependiendo de la fuente donante. La rapidez de la recuperación de los neutrófilos varía dependiendo el tipo de injerto: el tiempo de recuperación aproximado es de 2 semanas con injertos de SP movilizada con G-CSF, 3 semanas con injertos de médula, y 4 semanas con injertos de CU.

Neutrófilos, monocitos, y células NK son los primeros en recuperarse seguidos por las plaquetas y glóbulos rojos, seguidos a su vez por células B y células T. Es por ello que resulta importante evaluar el estado de quimerismo de subpoblaciones celulares (28).

Mediante la separación de subpoblaciones celulares, la sensibilidad de la PCR puede aumentar al focalizar el estudio en las líneas celulares de interés clínico, reduciendo de

esta manera los resultados irrelevantes. Dubovsky comunicó que la separación celular permite detectar pequeños cambios del patrón del quimerismo que pueden pasar inadvertidos cuando el quimerismo se analiza en muestras de sangre total. Se han estudiado en una serie de pacientes el quimerismo hematopoyético simultáneamente en muestras de sangre total y en subpoblaciones celulares, obteniendo un incremento considerable de sensibilidad de la PCR/STR con la separación celular. Así, mientras que en cuatro muestras de sangre total se detectaba un quimerismo completo (QC) del donante, el análisis en poblaciones separadas de linfocitos T y de neutrófilos identificó un pequeño porcentaje de linfocitos T del receptor. Además, cuando en dos muestras de sangre total se demostró un QM de pequeña cuantía, el estudio en subpoblaciones celulares objetivó un aumento del porcentaje del componente del receptor a expensas de la fracción linfoide T, mientras que el quimerismo en neutrófilos era completo. Estos resultados enfatizan la utilidad de realizar el estudio del quimerismo hematopoyético en subpoblaciones celulares. Además, el significado clínico del QM puede ser diferente según se detecte en linfocitos T o en neutrófilos (38).

Los dos tipos de trasplante en los que se tiene un mayor interés para la evaluación del quimerismo, por la mayor probabilidad de fallo de implante y de recidiva leucémica respecto a los trasplantes convencionales, son los que se efectúan con eliminación de linfocitos T y con intensidad de acondicionamiento reducida (43).

Diversos estudios demostraron que en los pacientes con la enfermedad en progresión podría ser necesario aumentar la intensidad del régimen de acondicionamiento dada la alta incidencia de mortalidad en los trasplantes de intensidad reducida. Otra alternativa sería administrar quimioterapia sistémica o anticuerpos monoclonales conjugados tras el trasplante, con la finalidad de controlar la actividad de la EICH, evitando una progresión precoz, y así permitir el desarrollo del efecto ICL. Con este tratamiento pre-trasplante asociado al régimen de acondicionamiento se consiguió una reducción significativa de la cifra de leucocitos y permitió alcanzar un implante mieloide completo en ambos casos (43).

## **2.18 Importancia del seguimiento del injerto (quimerismo)**

La importancia del quimerismo radica en su interpretación, es decir, el saber evaluar que porcentajes son los necesarios para considerarlo un rechazo, un quimerismo completo o mixto creciente o decreciente, EICH, entre otros. Brindar el apoyo necesario por medio de otro trasplante, terapia inmunológica o cualquier otro método que contribuya al bienestar del injerto y en general del paciente es el punto vital que se propone el quimerismo (60).

Además de ello, cada uno de los pacientes que se someten a un protocolo de TCHP brinda información de que hacer y qué no hacer cuando un paciente con determinado diagnóstico presenta complicaciones. Por ejemplo, ya se ha demostrado que el quimerismo mixto creciente resulta de muy mal pronóstico para la población infantil, pudiéndose evitar con inmunoterapia preventiva; sin embargo, este tipo de procedimientos resultaría imposible si no contáramos con un porcentaje del injerto (60).

Los pacientes (donador-receptor) se diferencian exclusivamente utilizando el análisis en serie por STR-PCR, dentro de los límites de la sensibilidad (aproximadamente 1%). Los pacientes que no mostraron evidencia de células autólogas en cualquier momento después del trasplante se considera que tienen QC (41). Los pacientes que manifiestan señales débiles autólogas no superior al 1% se definieron como QM decreciente. Los pacientes que mostraron señales autólogas inmediatamente después del trasplante que se redujo de forma espontánea durante el seguimiento fueron clasificados con la disminución de QM. Los pacientes que mostraron un aumento significativo (5% o más) en la proporción de células autólogas entre las evaluaciones secuenciales se definieron como QM creciente. La respuesta se definió como un retorno a CC (24). Es por ello que es importante llegar a conocer todos los parámetros involucrados antes, durante y después del trasplante, por lo que resultaría fundamental contestar la siguiente pregunta, ¿Cuáles son los marcadores moleculares que son utilizados en el seguimiento del injerto y cuál es el método más eficiente para su identificación?.

### **III Justificación**

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPHs) es la alternativa de último recurso sugerida en las enfermedades onco-hematológicas, permitiendo restablecer la hematopoyesis del paciente. Dentro de dichas enfermedades la leucemia es la segunda causa de muerte en la población pediátrica. El seguimiento molecular del injerto posterior al trasplante de CPHs, en sangre periférica y con el uso de microsatélites, representa una herramienta poco invasiva que genera información útil en la toma de decisiones médicas respecto al tratamiento y seguimiento del paciente post trasplante (18).

#### **IV Hipótesis**

Los STRs y la electroforesis capilar permiten el seguimiento del injerto, permitiéndonos relacionar el porcentaje de quimerismo encontrado en pacientes con trasplante de CPHs con el tipo de trasplante y con la supervivencia del paciente.

## **V Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Realizar el seguimiento del injerto en pacientes bajo Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, a través de la cuantificación de quimerismo mediante las técnicas de PCR múltiple y Electroforesis Capilar, con el uso de Microsatélites (STR) como marcadores genéticos proporcionando datos medicamente relevantes.

### **5.2 Objetivos Particulares**

- Determinar el perfil genético tanto del donador como del receptor en una muestra de sangre periférica con la ayuda de la PCR múltiple y la electroforesis capilar, previo al trasplante de CPHs.
- Identificar los marcadores genéticos informativos con ayuda de los electroferogramas para permitir distinguir y cuantificar el porcentaje del injerto presente en la muestra post trasplante.
- Cuantificar el porcentaje de quimerismo al post trasplante cada 7 días durante 3 meses, posteriormente una vez al mes durante un año, previniendo así la recaída del paciente.
- Analizar el porcentaje de quimerismo obtenido y relacionarlo con la reconstitución hematopoyética, así como eventos infecciosos comunes en los trasplantes.

## **VI. Planteamiento del problema**

El cáncer infantil en México se ha incrementado de manera significativa a lo largo de los años, esto representa un reto para la medicina y la obliga a crear nuevos tratamientos que puedan ayudar a combatir este tipo de enfermedades onco-hematológicas. El trasplante de células madre hematopoyéticas se ha llevado a la práctica como tratamiento con prometedores resultados; sin embargo, existe un índice elevado de mortalidad. Es por ello que el seguimiento de estos pacientes mediante técnicas de biología molecular es primordial para prevenir alguna recaída.

## **VII. Material(es) y Método(s)**

### **Pacientes:**

Se estudiaron a 22 pacientes que se integraron al protocolo de TCPH de Noviembre del 2014 al 30 de mayo del 2016. Los pacientes fueron evaluados por el Servicio de Trasplante de Medula ósea además de las diferentes especialidades para cumplir con los criterios de inclusión en el TCPH. Dentro de estos criterios se contempló que todos los pacientes fueran menores de 18 años, padecieran una enfermedad oncohematológica o no hematológica donde el trasplante fuese la mejor alternativa.

A los pacientes postrasplante se les realizó una toma de muestra de 2 mL de sangre periférica en un tubo con EDTA, para realizar el análisis molecular STR.

### **Materiales:**

Tubos eppendorf

Placas para electroforesis capilar

Koller

Micropipetas

### **Insumos y reactivos**

Kit de extracción MagNAPure Compact (ROCHE®).

Agua grado Biología Molecular

AmpFISTR® Identifiler® Direct Primer Set

AmpFISTR® Identifiler® Direct Master Mix

Taq Gold

### **Equipo.**

Secuenciador AppliedBiosystems 3500 Series GeneticAnalyzer

NanoPhotometer™ P-Class IMPLN

Termociclador

Vórtex

## Campana de extracción

### Metodología

- Extracción de DNA (Ácido Desoxirribonucleico)

Se extrajo un volumen total de 100  $\mu\text{L}$  de material genético (DNA), a partir de una alícuota de 400  $\mu\text{L}$  de sangre periférica del paciente, utilizando el kit de extracción MagNAPure Compact (ROCHE®).

- Cuantificación del DNA.

La cuantificación se realizó empleando un espectrofotómetro (NanoPhotometer™ P-Class IMPLEN), el cual determinara la concentración ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) y el grado de pureza mediante una relación de longitudes de onda (260/280) utilizando 3 $\mu\text{L}$  del DNA obtenido en la extracción.

Con base en los resultados obtenidos en la cuantificación se procedió a diluir secuencialmente cada una de las muestras extraídas utilizando agua grado biología molecular (libre de DNAsa), llegando a obtener una concentración final de 0.1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  en un volumen final de 50 $\mu\text{L}$ .

- Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La amplificación se realizó basados en la metodología **AmpF/STR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit**, utilizando un tubo eppendorf de 0.6ml, se mezclaron 5.5  $\mu\text{L}$  de AmpFISTR® Identifiler® Direct Primer Set junto con 10.5  $\mu\text{L}$  AmpFISTR® Identifiler® Direct Master Mix y 0.5  $\mu\text{L}$  de Taq Gold por muestra. En esta mezcla se encuentran ya todos los microsatelites (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 y FGA) así como los fluorocromos (6-FAM™, VIC®, NED™ y PET®). Se homogenizo perfectamente en Vortex y se colocaron 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla en cada uno de los pozos de la placa, agregando inmediatamente después 10  $\mu\text{L}$  de DNA a una concentración de 0.1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  en los pozos que contienen la mezcla de reacción, utilizando agua grado PCR como control negativo mezclando perfectamente.

Una vez preparada la placa se colocó en el termociclador y se eligió el programa ya establecido en el equipo (este programa contempla una incubación inicial a 96° por 15 minutos, desnaturalización a la misma temperatura por 45 segundos, una etapa de alineación que varía de 61-65° C por 45 segundos y la extensión del primer a 72°C por 45 segundos, variando de 30 a 35 ciclos, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos) para ponerlo finalmente en funcionamiento.

- Electroforesis capilar

Se preparó una mezcla de 9.3 µL de Formamida (encargada de desnaturalizar el DNA) y 0.3 µL de Liz 600 (estándar de tamaño) en un tubo eppendorf de 0.6 ml, se homogenizó adecuadamente en Vortex y se colocaron 9 µL en cada uno de los pozos de la placa incluyendo a controles positivos, negativos y la escalera alélica (utilizada para la caracterización precisa de los alelos amplificados, ya que contiene alelos comunes de la población encontrados en cada uno de los microsatélites), de los cuales solo se necesitó 1 µL. Se homogenizó perfectamente e inmediatamente después se colocaron en el secuenciador (AppliedBiosystems 3500 Series GeneticAnalyzer) después de una calibración espectral (elimina autofluorescencia de algunas moléculas estableciendo una base en el espectro) y espacial (recolecta imágenes para establecer una relación entre la señal emitida por cada capilar y la posición que cae y es detectada por la cámara), además de remover las burbujas tanto del buffer de carga, el polímero y la solución de acondicionamiento, se eligió el software correspondiente para analizar los fragmentos del kit.

Se tuvo cuidado en las condiciones externas del equipo, ya que requirió tanto temperatura y voltaje principalmente óptimos. Estos dos factores de llegar a variar en algún momento de la inyección entorpecería la interpretación de los resultados.

El análisis se llevó a cabo en el software Gene Mapper con las especificaciones establecidas del fabricante, mostrándonos resultados cuantitativos visualizados en electroferogramas, logrando compararlos entre ellos e identificar a los alelos informativos para determinar el porcentaje de quimerismo expresado en el paciente.

El porcentaje de quimerismo finalmente se calculó con ayuda de fórmulas ya establecidas en la literatura como se muestran en la imagen No. 4, donde solo se

relacionan ya sea las áreas o las alturas de los picos presentes en los electroferogramas, proporcionando un resultado de forma porcentual.

Las fórmulas utilizadas para calcular el quimerismo fueron descrito por Thiede en 1999, el cual las clasifico con base en los alelos que se compartían, tanto el donador como del receptor representándose a continuación (58).

De igual manera se plantearon fórmulas para calcular el porcentaje de quimerismo en trasplantes con dos unidades de cordón; sin embargo, el resultado debe presentarse por cada unidad de cordón, es decir, se obtendrán dos resultados de un mismo paciente trasplantado.

Estas fórmulas se presentan a continuación (28).

**Imagen No. 5 Formulas para calculas el porcentaje de quimerismo en trasplante de doble unidad de cordón umbilical**

$$\% \text{ Donador cordón 1} = \frac{\text{Cordón 1}}{\text{Cordón 1} + \text{Cordón 2} + \text{Receptor 1} + \text{Receptor 2}} \times 100$$

$$\% \text{ Donador cordón 2} = \frac{\text{Cordón 2}}{\text{Cordón 1} + \text{Cordón 2} + \text{Receptor 1} + \text{Receptor 2}} \times 100$$

**Nota: El porcentaje de quimerismo se cuantifica por cada unidad de cordón umbilical, esto quiere decir que al final se contara con dos resultados de porcentajes de quimerismo, los cuales se reportaran de igual manera (38).**

## VIII. Resultados

Todos los niños que se integraron en el protocolo de trasplante son menores de edad, presentan distintas enfermedades, presentando una mayor prevalencia la LLA como la estadística lo asevera.

En la siguiente tabla se muestran 22 pacientes que fueron incluidos en el protocolo de trasplante, identificando a cada paciente con un número. De igual manera se incluyó su diagnóstico, género, edad, número de eventos contemplados por paciente, régimen de acondicionamiento, tipo de trasplante y el estatus en el que se encuentran.

**Tabla No. 15 Pacientes, género y diagnóstico por el cual se realiza el trasplante.**

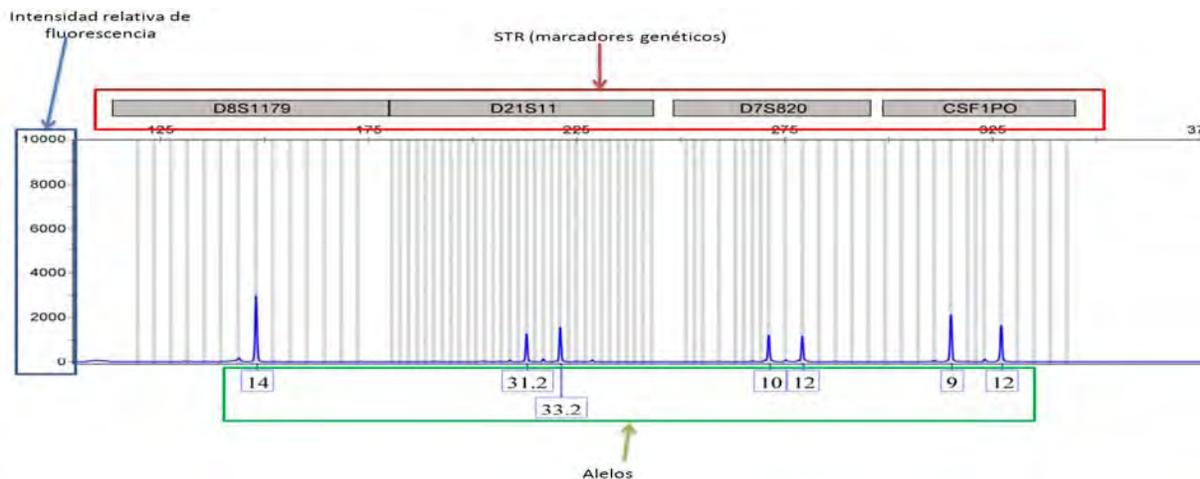
Num. de paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico	Eventos contemplados	Tipo de acondicionamiento	Tipo de trasplante	Estatus
1	15	Masculino	Anemia Aplásica	7	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
2	15	Femenino	LLA	7	Mieloablatoivo	Aféresis	Viva
3	18	Masculino	SX Mielodisplásico	11	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
4	13	Masculino	LLA	9	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
5	10	Femenino	Anemia de Fanconi	18	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
6	4	Masculino	SX Kostmann	4	Mieloablatoivo	Cordón	Vivo
7	1	Femenino	LMA	15	Mieloablatoivo	Aféresis	Viva
8	15	Femenino	LLA	9	Mieloablatoivo	Aféresis	Viva
9	4	Masculino	LLA	4	Mieloablatoivo	Aféresis	Vivo
10	11	Masculino	Adrenoleucodistrofia	5	Mieloablatoivo	Cordón	Defunción
11	16	Masculino	LMA	12	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
12	3	Masculino	LMA	15	Mieloablatoivo	Aféresis	Vivo
13	7	Femenino	LLA	8	Mieloablatoivo	Aféresis	Viva
14	15	Masculino	LLA	3	Mieloablatoivo	Aféresis	Vivo
15	2	Femenino	Mucopolisacaridosis	8	Mieloablatoivo	Cordón	Viva
16	6	Masculino	LMA	4	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
17	16	Masculino	LLA	10	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
18	1	Femenino	LLA	5	Mieloablatoivo	Aféresis	Defunción
19	5	Femenino	LLA	17	Mieloablatoivo	Aféresis	Viva
20	6	Masculino	Trombocitopenia	5	Mieloablatoivo	Cordón	Vivo
21	12	Masculino	LLA	9	Mieloablatoivo	Aféresis	Vivo
22	16	Masculino	LMA	5	Mieloablatoivo	Aféresis	Vivo

**Tabla No. LLA= Leucemia Linfocítica Aguda, LMA= Leucemia Mieloide Aguda.**

Solo en 13 de los 22 pacientes trasplantados se logró identificar un restablecimiento hematopoyético; sin embargo, la rapidez con lo que esto sucedía no era la misma en todo los casos, aun tratándose del mismo tipo de trasplante.

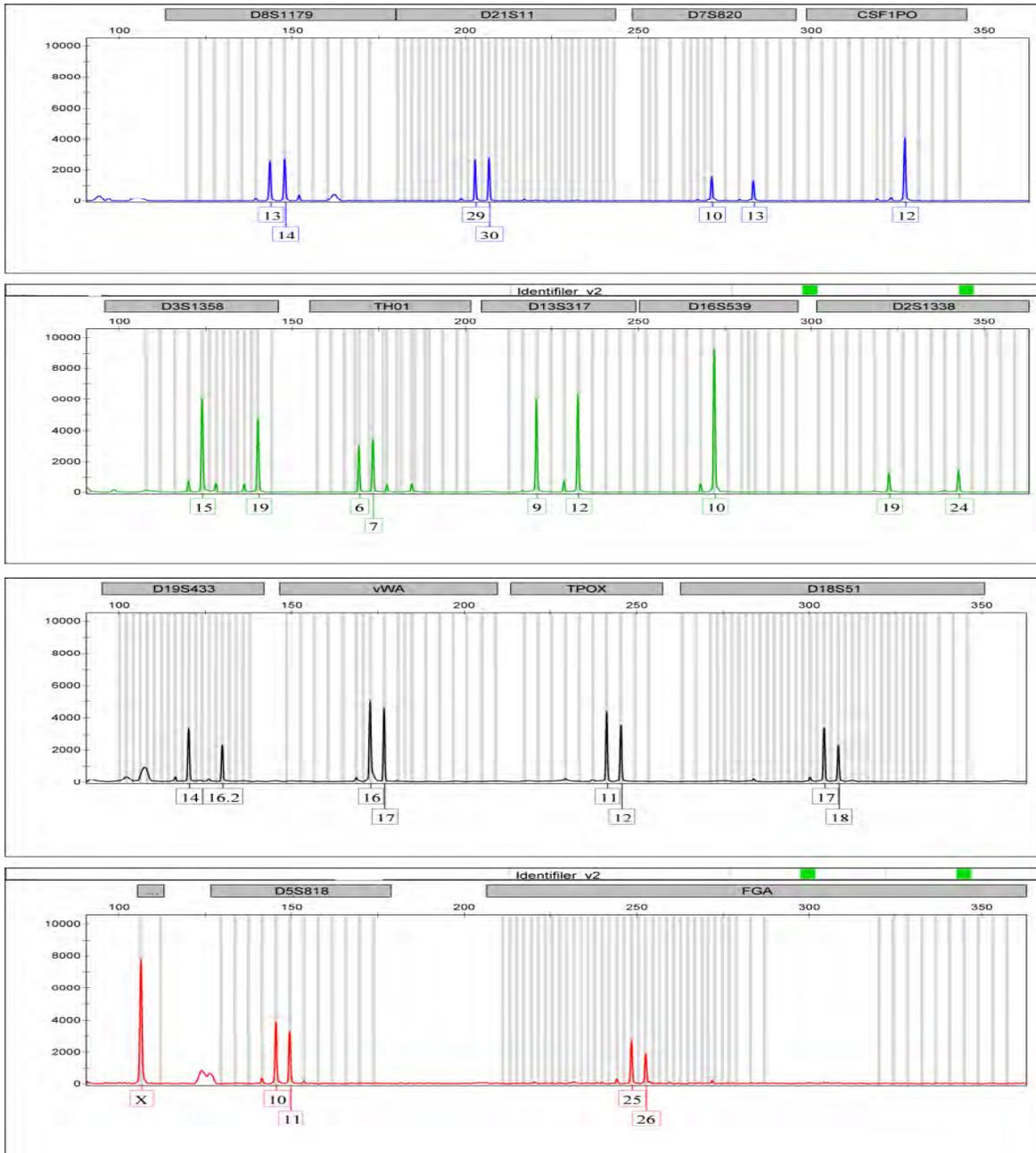
A continuación se ejemplifica a un electroferograma, donde se logró identificar los marcadores genéticos (STR) utilizados, los valores de intensidad relativa de fluorescencia y los alelos presentes. Al identificar cada uno de los puntos anteriores, se pueden comparar electroferogramas, tanto del donador como del receptor, antes del trasplante y del receptor post trasplante, es así como se puede realizar el seguimiento del injerto, calculando posteriormente el porcentaje de quimerismo.

**Imagen No. 6 Electroferograma identificando a los marcadores genéticos, intensidad de fluorescencia y alelos presentes.**



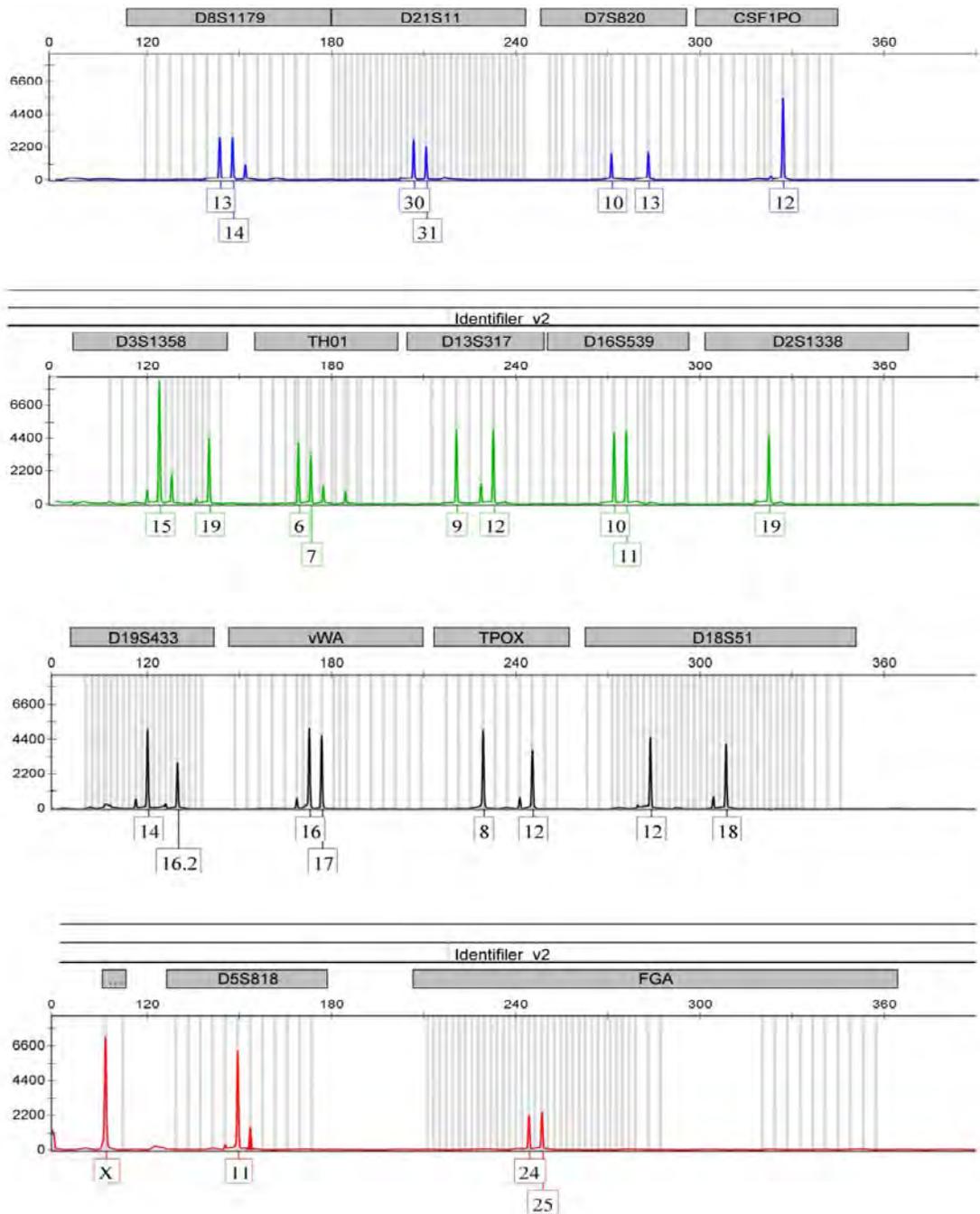
Se compararon los alelos presentes en cada marcador, tanto del donador como del receptor y se visualizan a continuación.

**Imagen No. 7 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina del paciente pre-trasplante de CPH.**



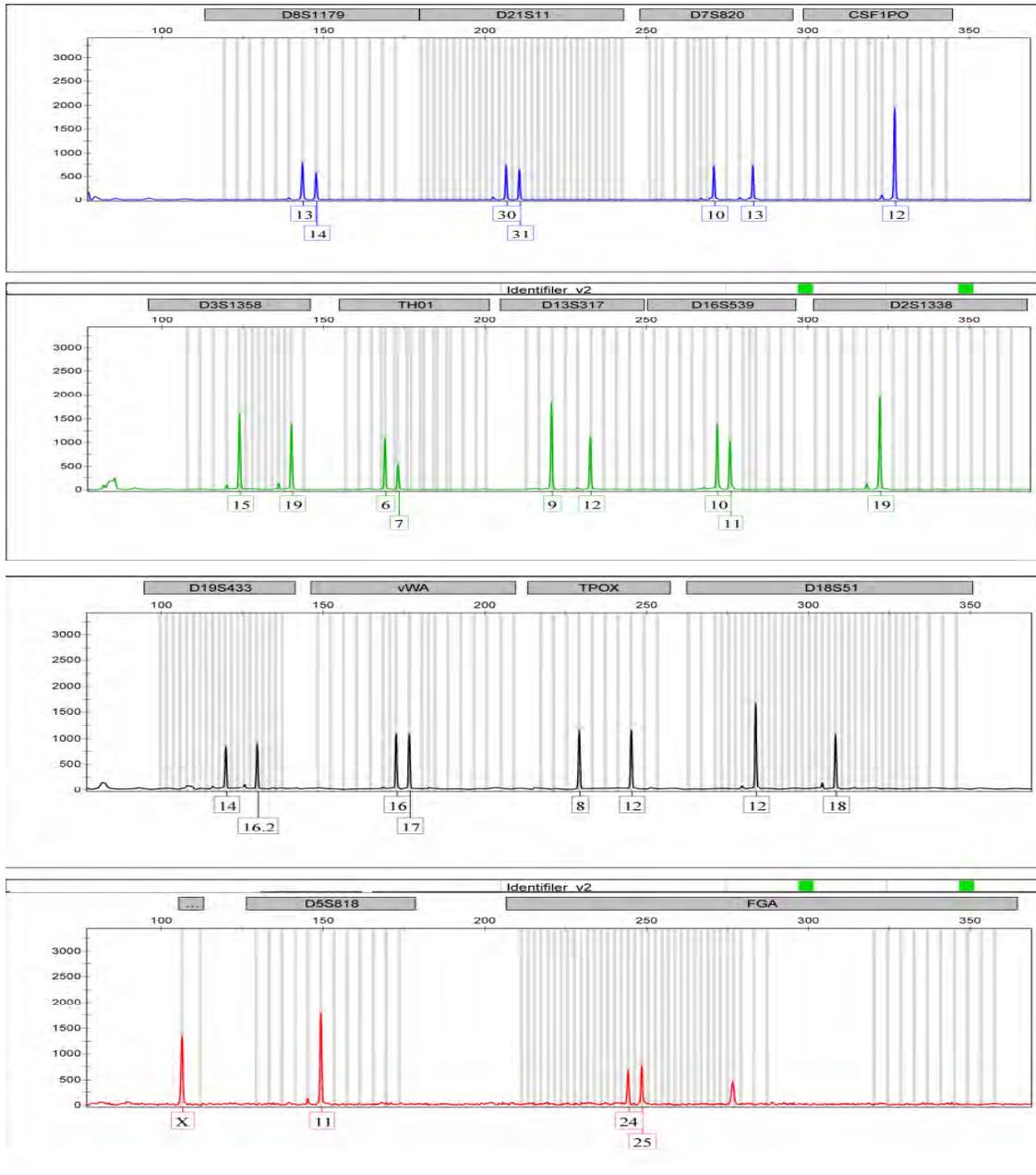
**Nota: Cada uno de los renglones donde se encuentran tanto los marcadores genéticos como los alelos, presentan fluorocromos diferentes.**

**Imagen No. 8 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina del donador.**



**Nota:** Cada uno de los renglones donde se encuentran tanto los marcadores genéticos como los alelos, presentan colores distintos ya que cada uno de ellos contiene un fluorocromo diferente.

**Imagen No. 9 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina del receptor Post-trasplante.**

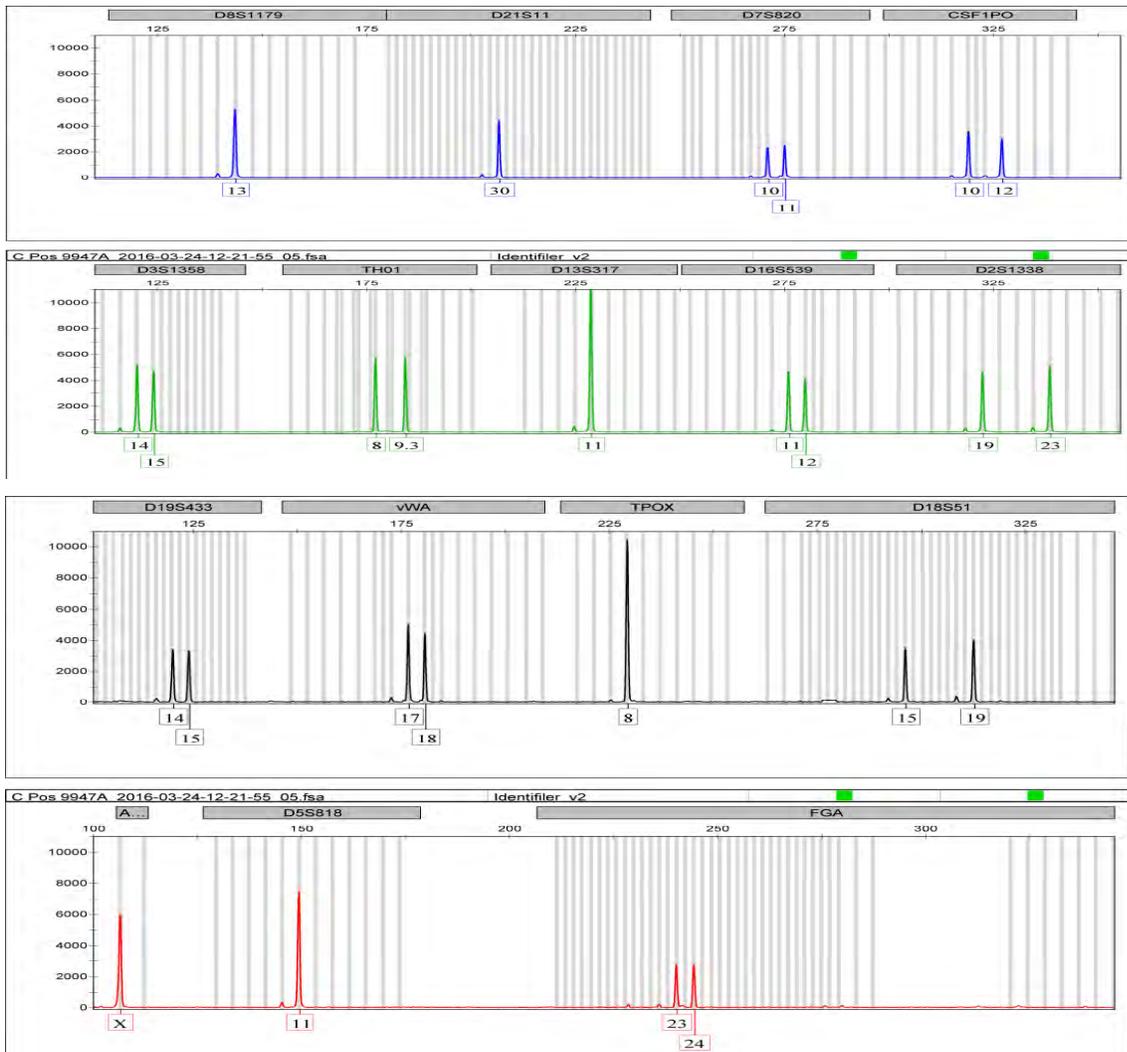


**Nota: Cada uno de los renglones donde se encuentran tanto los marcadores genéticos como los alelos, presentan colores distintos ya que cada uno de ellos contiene un fluorocromo diferente.**

Es fundamental contar con controles dentro de nuestras corridas, ya que sin ellos no podemos garantizar que nuestro trabajo se realiza de manera óptima y brinda

resultados confiables, es por ello que utilizamos tanto control positivos (DNA que contiene a alelos conocidos) como negativo (agua grado biología molecular), además de utilizar la escalera alélica, que nos ayuda a identificar que el equipo esta asignando bien cada uno de los alelos identificados.

**Imagen No. 10 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina, control positivo.**



**Nota: El resultado de los alelos identificados debe coincidir con los reportados en el inserto que corresponde al DNA control.**

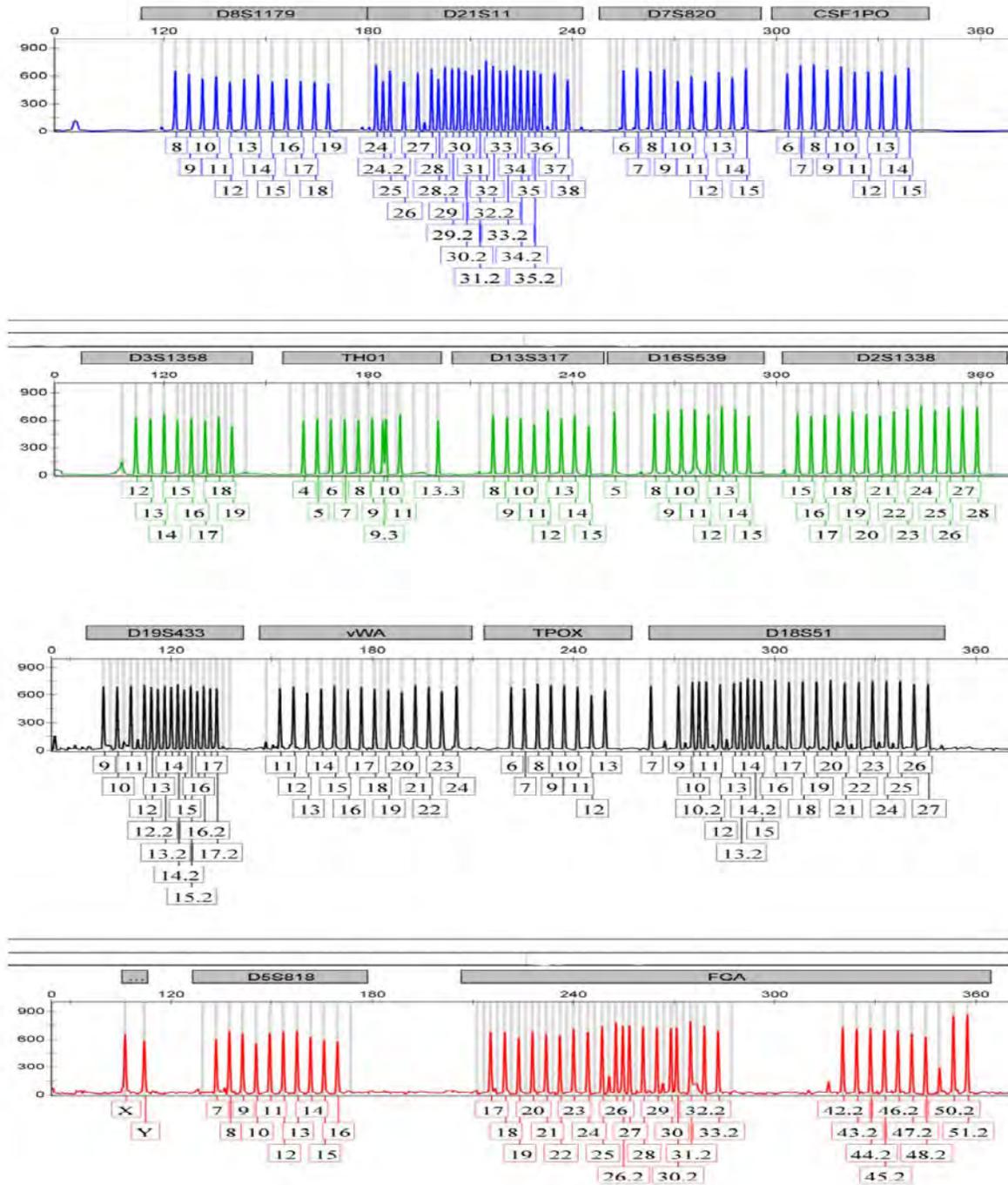
De igual manera se corrobora que no existe alguna interferencia, y que realmente trabajamos con material adecuado, utilizando para ello el control negativo.

**Imagen No. 11 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina, control negativo.**



**Nota:** Utilizándose este control se garantiza que la amplificación y los resultados de la electroforesis capilar realmente corresponden a nuestras muestras problema.

**Imagen No. 12 Electroferograma que contempla los 15 marcadores y amelogenina, escalera alélica.**



**Nota:** Cada uno de los renglones donde se encuentran tanto los marcadores genéticos como los alelos, presentan colores distintos ya que cada uno de ellos contiene un fluorocromo diferente.

Una vez interpretados los electroferogramas se calculó el porcentaje del quimerismo con ayuda de los alelos informativos y sus áreas correspondientes como se observa en la siguiente tabla.

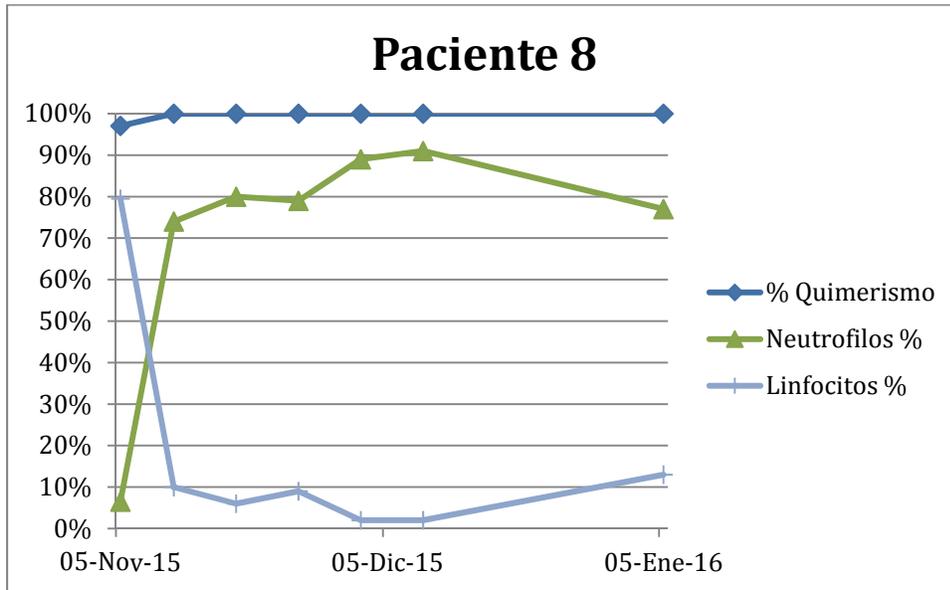
**Tabla No. 16 Cálculos del quimerismo.**

	Alelo	$C*100/A+C$	Área	%Quimerismo
<b>TPOX</b>	8	<b>C</b>	31576	
	11	<b>A</b>	2674	
	12	<b>B</b>	34719	92.19
<b>D18S51</b>	12	<b>C</b>	38534	
	17	<b>A</b>	0	
	18	<b>B</b>	31671	100.00
<b>FGA</b>	24	<b>C</b>	18982	
	25	<b>B</b>	13723	
	26	<b>A</b>	0	100.00

Se calcula por separado el porcentaje de cada uno de los alelos informativos para después promediarlos y reportarlos, anexando la desviación estándar y el coeficiente de variación.

La siguiente figura muestra los porcentajes de quimerismo durante el tiempo que se llevó a cabo el protocolo de trasplante de uno de los pacientes, identificando al porcentaje de quimerismo, linfocitos y neutrófilos. Las muestras requeridas para cada uno de los estudios fueron recabadas el mismo día.

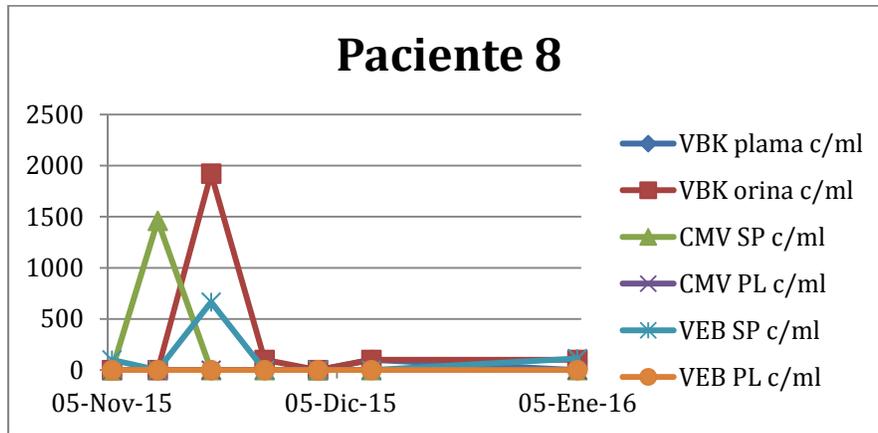
**Figura No. 1 Seguimiento porcentual del injerto, neutrófilos y linfocitos post-trasplante de CPHs. Noviembre del 2015 a diciembre del 2015.**



**Nota: Todos los valores antes señalados se representan de forma porcentual.**

Del mismo modo, existía una alta prevalencia del virus BK, CMV y VEB en todos los pacientes sometidos a algún trasplante, no necesariamente de células progenitoras, sino también de órganos sólidos, por lo cual se graficaron los datos como el ejemplo que se muestra a continuación en la figura 2 de los virus presentes en sangre periférica y orina en algunos casos.

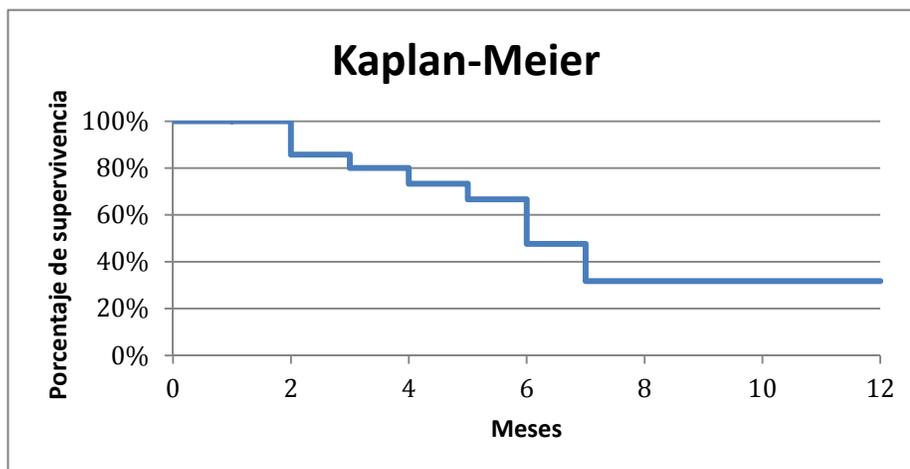
**Figura No. 2 Evaluación del número de copias del virus BK en orina y plasma, CMV en sangre periférica y plasma, VEB en sangre periférica y plasma. Noviembre del 2015 a diciembre del 2015.**



**Nota:** Los datos de la gráfica están representados en copias/mililitro ya sea de sangre u orina.

Se realizó un análisis estadístico de acuerdo al número de datos con los que se contaba, para estimar una supervivencia global de nuestros pacientes en protocolo, con base en lo anterior se utilizó el método de Kaplan-Meier, autores como Terwey T.H. y Tang de igual manera emplearon este método estadístico, proporcionándonos la siguiente tabla.

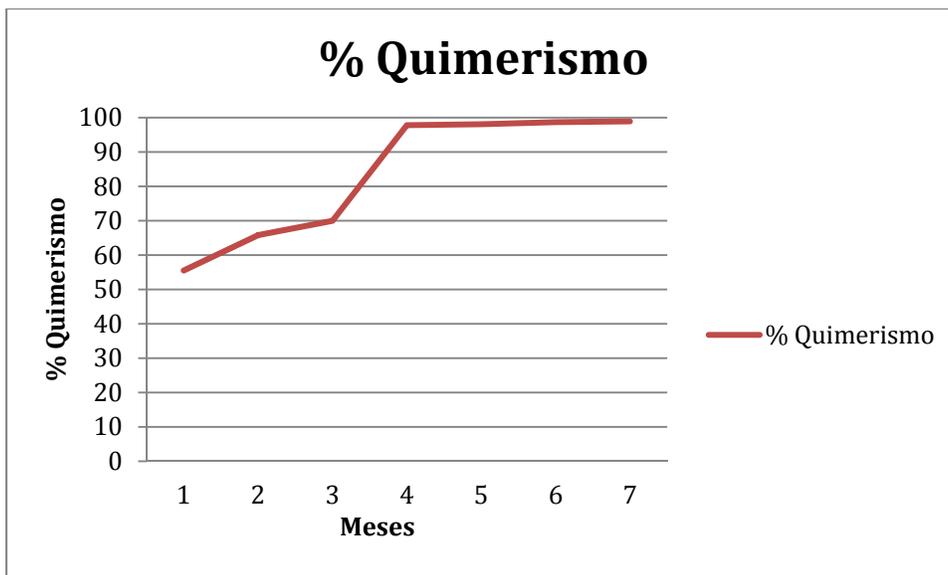
**Figura No. 3 Supervivencia global.**



**Nota:** Es importante mencionar que este método estadístico está diseñado para trabajarse con poblaciones reducidas  $n \leq 30$ .

El porcentaje de quimerismo de todos los pacientes contemplados en el protocolo fueron promediados de forma mensual, obteniendo con ello la figura número 4, donde se observa un claro incremento del porcentaje de quimerismo al paso de los meses.

**Figura No. 4 Promedio de porcentajes de quimerismo.**



**Nota:** Esta grafica corresponde solo a los primeros 7 meses de protocolo en promedio de los pacientes, siendo importante aclarar que no en todos los meses se incluyen a los 22.

## **IX. Discusión de los resultados**

Como se observa en la bibliografía consultada, el seguimiento molecular del injerto dentro de su nuevo nicho hematopoyético es crucial para la toma de decisiones clínicas que involucran directamente al paciente. Por ello resulta fundamental contar con una técnica de estudio óptima, que nos permita identificar y cuantificar el material genético del donador en el receptor. Existe una gran variedad de técnicas como lo son la fenotipificación de eritrocitos, citogenética, FISH, RFLP, STR, amelogenina, PCR en tiempo real, todas ellas tienen como objetivo brindar información útil que permita al médico una oportuna intervención, cada una de ellas con sus ventajas y desventajas.

De las técnicas mencionadas anteriormente los STR son el método frecuentemente utilizado para el seguimiento del quimerismo, ya que otras técnicas son limitadas, por ejemplo FISH y amelogenina, que no pueden ser utilizadas cuando el donador y el receptor son del mismo género, ya que se fundamentan en la búsqueda de alguno de los cromosomas sexuales, evitando diferenciar el origen de cada uno de ellos. (28).

De igual manera los FRLP eran comúnmente utilizados para el seguimiento del injerto, esta técnica expresa varias ventajas frente a la citogenética, una de ellas es que puede distinguir el origen de las células que no se dividen, proporcionando resultados más certeros, además de contar con una población celular más representativa para el estudio, ya que se extrae el material genético de  $1 \times 10^6$  células, mientras que en análisis citogenético solo se evalúan de 20-50 células por muestra, a pesar de ello su sensibilidad no es la ideal para el seguimiento del injerto (61).

La PCR en tiempo real representa otra de las herramientas útiles dentro del seguimiento del quimerismo, sin embargo, esta técnica es de alto costo para las diferentes instituciones, impidiendo que no cualquiera de ellas sea capaz de llevarla a cabo.

Con base en lo anterior los STR resultan ser los marcadores ideales para el seguimiento del injerto, ya que son altamente polimórficos ( $10^6$  STR presentes en todo el genoma), sus repeticiones en tándem (diferencia entre individuos) de 2-6 nucleótidos se encuentran distribuidos por todo el genoma humano permitiendo que exista una alta probabilidad de que estos marcadores específicos presenten diferencias en el número

de repeticiones en las secuencias de nucleótidos, permitiendo una identificación entre los dos genomas. (20).

Existen diversos requisitos necesarios para que un marcador genético pueda ser aceptado en el estudio del quimerismo. Nuestros 15 STR utilizados cumplen con cada uno de los lineamientos establecidos por Suraksha Agrawal y sus colaboradores:

- Patrón de herencia bien establecido.
- Alto grado de polimorfismo.
- Alto grado de heterocigosidad.
- Fácil detección y reproducibilidad.
- Posibilidad de detección a partir de un material escaso.
- Informativos: capacidad de distinguir el ADN de dos individuos emparentados.
- Sensible: capacidad de detectar material genético aun cuando la cantidad de uno de ellos sea mínima (45).

La elección de marcadores informativos se realizó bajo los estándares mencionados en el artículo " Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing" del autor F. Nollet (56), quien junto con sus colaboradores proponen ejemplos de cómo diferenciar a un marcador informativo. En primer lugar y lo más importante, es que el alelo debe estar presente en el donador y ausente en el receptor pre-trasplante, y manifestarse en el electroferograma de la muestra post-trasplante, permitiendo identificar un porcentaje de células del donador dentro del receptor. En segundo lugar, es importante que los alelos a considerar para el cálculo, no se encuentre muy cerca uno de otro, ya que esto puede llegar a entorpecer los datos del área o altura del pico del alelo. También es importante omitir aquellos alelos que presenten stutter o tartamudeo, ya que puede representar un área inexistente que el equipo considera dentro del alelo mismo donde se encuentre (25).

El quimerismo fue cuantificado con base a las ventajas que presentan los STR sobre otros marcadores y estos a su vez resueltos con ayuda de un secuenciador. Es importante tomar en cuenta que el equipo está expuesto durante la electroforesis capilar a variaciones de voltaje y cambio de temperatura principalmente, esto puede

afectar de forma vital nuestro análisis de fragmentos, por lo que resulta indispensable validar antes de realizar un ensayo. Clark menciona que la mayoría, si no es que todos los laboratorios utilizan la altura del pico para realizar los cálculos del quimerismo, a pesar de ello es aceptable utilizar de igual manera las áreas de los picos (28).

Conocer cuál es la mínima cantidad de material genético que puede llegar a interpretar nuestra técnica es vital para el estudio, es por ello que cuando esta se llevó a cabo se realizó un quimerismo artificial, evaluando las muestras pre-trasplante de donador y receptor, realizando una mezcla de estas muestras posteriormente en distintas proporciones seriales (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%). Esto nos permitió identificar que nuestra mínima cantidad detectable correspondía al 3% y fue bajo estos estándares que se trabajaron las muestras de quimerismo en el laboratorio de biología molecular. Cabe mencionar que las diluciones anteriores fueron realizadas con base al artículo " Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing" de F. Nollet, donde de igual manera identifican cual es el porcentaje mínimo que pueden llegar a encontrar en su procedimiento. (7).

El tiempo que duró el protocolo fue el mismo que utilizó Barrios en el artículo "Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia", llevando a cabo el seguimiento del injerto cada semana los primeros tres meses, y después cada mes durante un año, siempre y cuando el paciente permitiera seguir este proceso. De igual manera contempla que después de un año del seguimiento, es posible continuar con este cada 3 meses, con el fin de descartar alguna posibilidad de recaída o enfermedad (7).

Autores como Chen, Nollet y Clark remarcan de forma clara que es importante como mínimo contar con 3 marcadores informativos para el cálculo del quimerismo, siempre y cuando nuestra desviación estándar no sea muy elevada y el coeficiente de variación (CV) no sea mayor a 5, de lo contrario, es necesario incluir otros marcadores. Si no se encuentra alguna alternativa para corregir ese CV mayor a 5, se debe de reportar e indicar ese detalle (20).

Los cálculos para cuantificar el quimerismo se basaron en la imagen número 5 de los resultados, siempre utilizando las fórmulas de tipo uno. Esto fue principalmente porque según Clark es la mejor opción para brindar un seguimiento adecuado al injerto, puesto que no comparten ningún alelo, identificando a la perfección cuales corresponden al donador y al receptor.

Solo tres de nuestros pacientes presentó un doble trasplante de cordón umbilical, y se utilizó la fórmula de la imagen número 6 para cuantificarla, proporcionando dos datos, uno de cada unidad de cordón, tal y como lo mencionó Clark (28).

Resulta vital conocer qué ventajas y desventajas representan el QC y el QM, la mayoría pensaríamos que un QC es la mejor opción post-trasplante de CPH, sin embargo no siempre es así. Tang remarca en uno de sus artículos que la sobrevida libre de enfermedad en el QC y QM creciente, son de buen pronóstico; sin embargo, Bader no llega a las mismas conclusiones que el autor pasado, afirmando que el porcentaje de quimerismo no puede ser usado como factor pronóstico ya que sus estudios retrospectivos no notaron una verdadera correlación. Los factores principales que pueden haber causado los resultados contradictorios en los estudios mencionados son la relativa heterogeneidad en las poblaciones de pacientes que fueron investigados en cada una de las estudios, los regímenes de preparación utilizados y los diferentes métodos empleados para medir el quimerismo. Esta observación es muy importante ya que pone en evidencia la importancia de la evolución del injerto del donante en el tiempo, que puede cambiar independientemente de la enfermedad subyacente debido a la exposición a una variedad de factores que afectan el sistema inmunológico. Por otra parte, el cambio en el porcentaje de células del donante durante el tiempo puede ser una función directa de la recaída y a su vez podría disminuir la capacidad del injerto (62).

Nuestros resultados remarcan, al igual que Bader, que el porcentaje de quimerismo no puede ser utilizado como factor pronóstico de la supervivencia de un paciente, ya que varios de nuestros pacientes estudiados a pesar de obtener el QC fallecieron. De igual manera debemos contemplar que la población estudiada no es la misma, siendo que

en este trabajo se involucró sólo a la población infantil, además de la metodología utilizada (FISH y PCR-STR), obteniendo resultados distintos (62).

Todos los pacientes a los que se les realizó seguimiento de virus oportunistas, obtuvieron como resultado una positividad al virus de BK, esto representa la fuerte persistencia del virus en pacientes trasplantados. Estudios realizados en pacientes de trasplante renal revelaron que más del 80% de los adultos tienen evidencia de infección por virus BK. Inclusive menciona que cargas virales que sobrepasen  $1 \times 10^{12}$  copias/ml en orina carecen de síntomas característicos. Aunque el tipo de trasplante fue diferente es innegable que el virus de BK en particular prevalece en pacientes inmunosuprimidos, considerándose uno de los principales factores a considerar durante un tratamiento de este tipo.

Es importante remarcar que aquellos pacientes que recibieron un régimen de acondicionamiento no mieloablativo, también presentaron la presencia del virus, demostrando con ello que no es necesario alcanzar niveles de inmunosupresión altos para adquirir el virus, y que cualquier acercamiento con él, puede llegar a permitir su replicación en la nefrona (46).

El seguimiento de estos virus es de igual manera importante, ya que al existir una terapia de acondicionamiento previa al TCH, los linfocitos que aún se encuentran dentro del paciente no podrán llevar a cabo su función. Actualmente se ha publicado el libro "PDQ Cancer Information Summaries" en el 2016 donde en su apartado de "Childhood Hematopoietic Cell Transplantation" remarca que la mayoría de las infecciones virales después del trasplante son causadas por citomegalovirus (CMV) tanto en adultos como en niños. Esta afirmación contrasta con nuestros resultados, puesto que CMV no fue el virus comúnmente encontrado en nuestros pacientes.

El análisis estadístico como ya se había mencionado anteriormente se basó principalmente en el método de Kaplan Meier como una buena estimación de la supervivencia general de una población. Este método permite analizar menos de 30 datos, lo que significa una gran ventaja para nuestra población, ya que solo se analizaron 22 pacientes, además de poder interpretar de una manera gráfica los resultados, permitiéndonos asegurar que una larga sobrevida posterior al TCPH no es

factible, ya que como se observa en la figura número 3 la probabilidad de seguir con vida a los 6 meses está por debajo del 50%, mientras que pasados los 7 meses la probabilidad se mantiene por arriba del 30%. Estos números reflejan una corta vida después del trasplante, por lo que es necesario seguir trabajando para poder brindar una esperanza de vida mayor.

## **X. Conclusiones**

- Se muestra que la medición quimerismo utilizando la STR-PCR y la electroforesis capilar post-trasplante es una herramienta valiosa en el seguimiento del injerto, brindando mejores resultados que la citogenética o FISH, contemplándose hoy en día como la técnica más innovadora y accesible que se puede utilizar para el seguimiento molecular.
- Se comprobó que el porcentaje de quimerismo no puede ser utilizado como factor para proporcionar una sobrevida del paciente, ya que no se obtuvieron resultados que apoyaran la opinión de algunos autores que indicaban la aprobación de dicha asociación, sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los de otros autores quienes afirmaban que era imposible que existiera tal correlación.
- Se identificó al virus BK como el principal agente infeccioso que se debe de contemplar en un trasplante de CPH, ya que se encuentra presente en cada uno de los niños que se sometieron al protocolo de trasplante, pudiendo ser causante directa o indirectamente del deceso de algunos pacientes.

## **XI Referencias**

1. Herminia B. (2002). "Epidemiología de las enfermedades hematológicas en el ámbito nacional" Academia Nacional de Medicina de México. pp 2
2. Thomas E.D, Buckner C.D, Storb R. (1972) "Aplastic anemia treated by marrow transplantation". Lancet. pp.284-289.
3. Ruiz AG. (2005) "Historia del trasplante de médula ósea en México". Rev Biomed pp.207-213.
4. Mattsson J, Uzunel M, Remberger M.(2001) "Poor immune reconstitution after four or five major HLA antigens mismatched T cell-depleted allogeneic and autologous stem cell transplantation". Clinical Experimental Immunology, pp. 162-9
5. Thiede C, Florek M, Bornhäuser. (1999) "Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection". Bone Marrow Transplantation, pp. 1055-60
6. Briones J,Urbano-Ispizúa A,Rozman C,Marín P,Carreras E,Rovira. (1996) "Study of haemopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using PCR-STR amplification of short tandem repeats". Ann Hematol, pp. 265-8
7. Fernández F, Urbano A, Aymerich M. (2003) "Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood". Leukemia, pp. 613-20
8. Gaytán F. (2011) Hospital Infantil de México Federico Gómez departamento de oncología pediátrica protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.
9. Pace R. (1997) "Aspectos éticos de los trasplantes de órganos". En: Cuadernos del programa regional de bioética. OPS-OMS 1997; 4: 149-70.

10. Cotton R, Sandler A. (1986) "The regulation of organ procurement and transplantation in the United States". J Leg Med pp. 55-6.
11. XXXIX Asamblea Médica Mundial. "The declaration on human transplantation". Madrid Octubre de 1987.
12. Carrell A. (1980) "Results of the transplantation of the blood vessels, organs and limbs". JAMA pp.16-62.
13. Thomas E.D, Lochte H.L. Jr, Lu W.C. (1957) "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy". N Engl Med. pp.257:491-496.
14. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD. (1968) "Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency". Lancet pp.1366-1369.
15. Albertini R, Joo P, Anderson J. (1968) "Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome". Lancet pp.1364-1346.
16. John W. (2013). "Trasplante de células madre sanguíneas y de médula ósea". Leukemia and Lymphoma Society, fighting blood cancers.
17. Jorge Alfaro L, Néstor G. (2007) "Trasplantes de progenitores hematopoyéticos." Laboratorio de Terapia Celular, Banco de Sangre, Departamento de Medicina, HCUCh.
18. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, (2007) "World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes." Br J Haematol. pp.193- 205.
19. Jorge VO, Miriam AG, José RB. (2008). "Trasplante de Células Hematopoyéticas" Editorial Prado. México. pp. 109-126
20. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R. (2005) "Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: Results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87". J Clin Oncol 23:7942-7950.

21. Manuel L.H. (2003). "Trasplante de células progenitoras. Complicaciones a largo plazo". *Gac Méd Méx* Vol.139, Suplemento No. 2. pp. 5-6
22. Gaytán F. (2013). "Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en Pediatría." *Gaceta Mexicana de Oncología*.
23. Sara SG, Mercedes PR, José María NM. (2014). " Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica" Elsevier España. pp. 1-5.
24. Fica A. (2003) "Síndrome de mononucleosis infecciosa en pacientes adolescentes y adultos". *Revista Chilena de Infectología*. 2003. pp. 235-242
25. Sitki-Green D, Edwards R, Covington M, Rabb-Traub N. (2004) "Biology of Epstein-Barr Virus During Infectious Mononucleosis". *The Journal of Infectious Disease*, pp. 483-92.
26. Angulo A., Arizcuren M., Tiberio López, Oteiza OIaso. (2003) "Clinical and Analytic Characteristics and Complications in Patients with Infectious Mononucleosis Referred from Primary Care to Specialists". *Atención Primaria*. pp. 311.
27. Polo C, Pérez JL, Mielnichuk A. (2004) "Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children". *Clin Microbiol Infect* pp.640
28. Drachemberg CB, Hirsh HH, Ramos E. (2005) "Polyomavirus disease in renal transplantation: Review of Pathological findings and diagnostic methods". *Hum Pathol* pp.36
29. Demko SG. (1996) "Transplantation procedures". Santos GW, editors. *On call in bone marrow transplantation*. New York: Chapman and Hall, pp. 39-51.
30. Atkinson K. (1990) "Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation". *Blood* 75:2459-64.
31. Aractingi S, Chosidow O. (1998) "Cutaneous Graft-versus-host disease". *Arch Dermatol* 134:602-12.

32. Tokime K, Isoda K, Yamanaka K, Mizutani H. (2000) "A case of acute graft-versus host disease following autologous peripheral blood stem cell transplantation". *J Dermatol* 27:446-9.
33. Carmen B, Guadalupe F, Juan Carlos V. (2004). "Enfermedad injerto contra huésped en el trasplante hematopoyético". Hospital Morales Meseguer. Murcia. España. pp. 54-62
34. Tomblyn M. (2009). "Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Global Perspective" *Biol Blood Marrow Transplant* pp.139
35. Barnard C. (1967) "The operation, a human cardiac transplant; an intern report of a successful at Groote School Hospital", Cape Town. *S Afr Med* pp. 1271.
36. MacDonald, H. R., Pedrazzini, T., Schneider, R., Louis, J. A., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1988) "Intrathymic elimination of Mlsa-reactive (V beta 6+) cells during neonatal tolerance induction to Mlsa-encoded antigens". *J. Exp. Med.* 167, 2005–2010.
37. Russell J. H. (1995) "Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses". *Curr. Opin. Immunol.* 7, 382–388
38. Kappler JW, Roehm N, and Murrack P. (1987) "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus". *Cell* 49, 273–280.
39. Luther S. A., and Acha-Orbea, H. (1997) "Mouse mammary tumor virus: immunological interplays between virus and host". *Adv. Immunol.* 65, 139–243.
40. Quirós J, Kattia E. (2009) "Quimerismo genético un nuevo paradigma para la medicina legal". *Medicina Legal de Costa Rica*, vol. 26.
41. Lenardo, M. J. (1991) "Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis". *Nature* 353, 858–861.
42. Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995) "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL". *Immunity* 3, 87–98.
43. Van Parijs L, Ibraghimov A, and Abbas A. K. (1996) "The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance". *Immunity* 4, 321–328.

44. Wekerle T, Kurtz J, Sayegh M, Ito H, Wells A, Bensinger S, Shaffer J, Turka L, and Sykes M. (2001) "Peripheral deletion after bone marrow transplantation with costimulatory blockade has features of both activation-induced cell death and passive cell death". *J. Immunol.* 166, 2311–2316.
45. Fehr T, Wang S, Haspot F, Kurtz, Blaha P, Hogan T, Chittenden M, Wekerle T, and Sykes M. (2008) "Rapid deletional peripheral CD8 T cell tolerance induced by allogeneic bone marrow: role of donor class II MHC and B cells". *J. Immunol.* 181, 4371–4380.
46. Fontenot J. D., and Rudensky A. Y. (2005) "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3". *Nat. Immunol.* 6, 331–337.
47. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, and Nomura T. (2006) "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease". *Immunol. Rev.* 212, 8–27
48. Shevach E. M, DiPaolo R. A, Andersson J, Zhao D. M, Stephens G. L, and Thornton A. M. (2006) "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells". *Immunol. Rev.* 212, 60–73.
49. Watanabe N, Wang Y. H, Lee H. K, Ito T, Wang Y. H, Cao W, and Liu Y. J. (2005) "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus". *Nature* 436, 1181–1185.
50. Proietto A, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A, Steptoe R, Naik S. H, Lahoud M. H, Liu Y, Zheng P, Shortman K, and Wu L. (2008) "Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19869–19874.
51. Xiaowen T. (2014) "Increasing Chimerism Following Allogeneic Stem Cell Transplantations Associated with Longer Survival Time" NIH Public Access. pp 2
52. Pasquet L, Joffre O. (2011). "Hematopoietic chimerism and transplantation tolerance: a role for regulatory T cells". *Frontiers in Immunology* pp.9

53. Bader P. (2005). "How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?" *Bone Marrow Transplantation*. pp.109-110
54. Ishii S, Tago K, Senoo K. (2010) "Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications". *Appl Microbiol Biotechnol* 1281-1292.
55. Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U. (2001) "Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex amplification of short tandem repeat-markers". *Leukemia*, pp. 293-302
56. Nollet F, Billiet J, Selleslag D & Criel A. (2001) "Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing". *Bone Marrow Transplantation*, pp.511–518.
57. Jordan R. Clark. (2014). "Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group". *British Journal of Haematology*. pp.3
58. Van Deerling V.M. & Leonard D.G. (2000) "Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation". *The Journal of Clinical Laboratory Medicine*, 20, 197–225.
59. Kristt, D, Stein, J, Yaniv, I. & Klein, T. (2007) "Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility". *Bone Marrow Transplantation*, 39, 255–268.
60. Benjamín O, Luz Mabel A, Natalia S. (2012). "Seguimiento del periodo inmediato post-autotrasplante de células progenitoras hematopoyéticas."
61. Elodie E, Christophe P. (2014). "Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood transplantation in children: kinetics, predictive factors and impact on post-transplant outcome". Department of Paediatric Haematology-Oncology, APHM, La Timone Hospital, Aix-Marseille University, 2 Etablissement Français

du Sang Alpes Mediterranee, 3 UMR 7268 ADES, ! Aix-Marseille Universite/EFS/CNRS, and 4 Department of Public Health -EA 3279 Research Unit, University Hospital Marseille, Aix-Marseille University, Marseille, France.

62. Fleta A, Gonzalvo L, Cía G. (2006). "Quimerismo: origen e implicaciones médicas." Servicio de medicina interna. Hospital Clínico Universitario Lozano Bleza Vol. 206 Num.7

63. Watzinger F, Lion T. & Steward C. (2006) "The RSD code: proposal for nomenclature of allelic configuration in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation." *Leukemia*, 20, 1448–1452.

64. Regateiro F, Howie D, Cobbold S, Waldmann H. (2011) "TGF-B in transplantation tolerance." NCBI.