



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

T E S I S

**EVALUACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T Y
SU VALOR PRONÓSTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
SOMETIDOS A TCPH**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

DRA. MARIA FERNANDA HIDALGO MARTÍNEZ

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ FELIX GAYTÁN MORALES
ASESOR METODOLÓGICO: Q.C.ISRAEL PARRA ORTEGA**



Ciudad de México, Febrero 2019



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.

DRA REBECA GOMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO

DR. JOSÉ FELIX GAYTÁN MORALES
JEFE DE SERVICIO UNIDAD DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS

DR. IVÁN CASTORENA VILLA.
MÉDICO ADSCRITO A LA UNIDAD DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS.

Q.C ISRAEL PARRA ORTEGA
JEFE DE LABORATORIO CLÍNICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GOMEZ

ÍNDICE

	Página
a. Resumen	4
b. Antecedentes	5
c. Planteamiento del problema	15
d. Justificación	15
e. Objetivos	15
f. Hipótesis	16
g. Material y métodos	16
h. Plan de análisis de los datos	19
i. Consideraciones éticas	20
j. Resultados	21
k. Discusión	22
l. Conclusión	24
m. Limitantes del estudio	25
n. Cronograma de actividades	26
o. Bibliografía	27
o. Anexos	31

RESUMEN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un tratamiento establecido para los niños con leucemias en los cuales la quimioterapia no remite la enfermedad. Se ha descrito el efecto injerto contra leucemia (EICL) que contribuye a la eliminación de células neoplásicas al momento del trasplante, o bien, aquellas que pudieran generarse posteriormente. Este fenómeno está mediado por linfocitos T, principalmente. Paralelamente, se tiene el efecto adverso de enfermedad injerto contra huésped (EICH), también mediada por linfocitos T, y que dicha patología puede ser mortal, o bien, crónica, impactando en la reconstitución hematológica e inmunológica del paciente pediátrico.

Los linfocitos T son células del sistema inmune generados a partir de precursores hematopoyéticos que migran de la médula ósea al timo y del timo emigran linfocitos T naïve a la periferia como CD4+ y CD8+. Éstos se encargarán de repoblar órganos linfoides secundarios que ante una infección viral, bacteriana, o presencia de células tumorales tendrán la capacidad de activarse, proliferar y tener una respuesta efectora. De acuerdo al fenotipo se puede determinar la frecuencia y número absoluto de las mismas a diferentes tiempos post-TCPH.

Por ello, es importante conocer el perfil de los linfocitos T y su asociación con el estado clínico para que el médico tratante realice una integración de los resultados, signos y síntomas y tome decisiones terapéuticas teniendo como blanco la leucemia, la presencia de EICH agudo o crónico, así como la susceptibilidad a los padecimientos infecciosos.

ANTECEDENTES:

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es una alternativa terapéutica de enfermedades de elevada mortalidad, y se ha convertido en un tratamiento potencialmente curativo para muchas de las neoplasias onco-hematológicas y de los trastornos no malignos como: las hemoglobinopatías congénitas, aplasias medulares e inmunodeficiencias primarias. El TCPH es el tratamiento establecido para los niños con leucemias en los cuales la remisión de la enfermedad no ha sido posible con los esquemas de quimioterapia habituales. El TCPH que se realiza es de origen alogénico en el 85% de los casos, lo que conlleva a un tratamiento inmunosupresor prolongado, condicionando un alto riesgo de complicaciones infecciosas y recaídas. Se ha descrito también el efecto injerto contra leucemia (EICL) que contribuye a la eliminación de células neoplásicas al momento del trasplante, o bien, aquellas que pudieran generarse posteriormente.⁽¹⁻²⁾ Las células del sistema inmune tienen un origen común en una célula progenitora hematopoyética (CPH), localizada en la médula ósea, a partir de la cual la diferenciación da lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas. Las CPH se caracterizan principalmente por dos capacidades: 1) autorrenovación y 2) diferenciación en diversas células hematopoyéticas. Éstas pierden la capacidad de autorrenovación y adquieren la capacidad de multiplicarse y diferenciarse, dando lugar, a su vez, a las células precursoras que tienen características específicas de cada linaje celular. Por lo tanto, siempre que existan las condiciones adecuadas para las CPH, puede alcanzarse una reconstitución inmunológica y hematológica completa y eficiente.⁽³⁻⁴⁾

Según el donador, existen dos modalidades de TCPH: autólogo y alogénico. Sin embargo se debe considerar la compatibilidad de HLA, de lo cual derivan los TCPH de tres tipos: a) HLA genotípicamente idéntico (familiar), b) HLA fenotípicamente idéntico (familiar o no familiar) y c) HLA no idéntico.⁽⁵⁻⁸⁾

Las principales indicaciones son las siguientes:

- Enfermedades neoplásicas (hematológicas y tumores sólidos) que no remiten con tratamiento a base de quimioterapia a dosis tolerables, pero que puedan ser curadas con tratamientos mieloablativos (con alta toxicidad medular) y la infusión de CPH para reconstituir y restablecer la hematopoyesis normal.

En los TCPH alogénicos existe participación del sistema inmunológico con actividad antitumoral considerando la eliminación de las clonas leucémicas remanentes. El acondicionamiento previo consiste en quimioterapia con o sin radioterapia a dosis más mieloablativas a lo normal.

- Enfermedades no neoplásicas (aplasias medulares, hemoglobinopatías congénitas, inmunodeficiencias y otros errores congénitos) en las que, la médula ósea no es funcionante, o bien, ésta no es capaz de producir ciertos elementos celulares sanguíneos en número y función adecuados por defectos genéticos.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un tratamiento establecido para niños con leucemia, de acuerdo con las indicaciones mencionadas previamente; sin embargo, realizar este proceso requiere de un equilibrio inmunológico en el cual se deben controlar las diversas interacciones de las células T y NK (Natural Killer), para minimizar los efectos de la enfermedad aguda de injerto contra huésped (EICH) e infecciones, principalmente virales, así como el proceso de injerto contra leucemia. Por ello, se han propuesto varios biomarcadores clínicos para predecir y evaluar la EICH sin embargo esta patología sigue siendo de interés para el área clínica y básica porque se requiere de una respuesta inmunológica compleja. ^(1,8)

Los periodos prolongados de inmunosupresión ocasionados por el régimen de acondicionamiento así como el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospeder, resultan en el desarrollo de infecciones serias, las cuales representan una de las dos causas más frecuentes de mortalidad posterior al trasplante alogénico. Diversas evidencias sugieren que después de someterse a un TCPH la recuperación de linfocitos alogénicos en sangre periférica se asocia con un mejor pronóstico y que un recuento bajo de los mismos a los 30 días post trasplante predice un peor pronóstico. Las células T CD4+ y CD8+ tienen un papel importante en la fase efectora cuando interactúan con las células NK para mediar la producción de agentes inflamatorios y la destrucción celular por citotoxicidad. ⁽¹⁰⁾

La recuperación de las células inmunes innatas generalmente toma semanas a meses, sin embargo, la reconstitución completa de la inmunidad adaptativa suele retrasarse de meses a años. Este retraso dependerá de las características del trasplante, llegando a tardar hasta años para obtener un número adecuado de células linfoides con una

funcionalidad óptima pues la reconstitución inmunológica cualitativa tiene un periodo muy largo de recuperación lo cual afecta la capacidad de respuesta ante los agentes infecciosos oportunistas, lo cual aumenta el riesgo de EICH y la posibilidad de recaída en la leucemia.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

La reconstitución del sistema inmune principalmente del componente celular es de vital importancia ya que después de la quimioterapia y radioterapia pretrasplante, toda la hematopoyesis normal del receptor, así como los componentes del sistema inmune celular y humoral son afectadas gravemente. Dentro de los mecanismos de defensa se encuentra la participación de los linfocitos T, principalmente en el control de infecciones por bacterias, virus, protozoos y hongos y mediante la regulación de la producción de anticuerpos específicos por los linfocitos B.⁽¹³⁻¹⁵⁾

En la etapa postrasplante se llega a producir un ligero aumento en la producción de anticuerpos esto puede ser debido a la transferencia de: a) Linfocitos B inmunes del donante; b) Células presentadoras de antígeno del donante sensibilizadas, c) Linfocitos T inmunes del donante que cooperan con cualquiera de los linfocitos B antígeno-específicos del donante o del receptor.⁽¹³⁻¹⁵⁾

La inmunidad celular es el tipo de defensa del hospedero mediado por los linfocitos T y sirve de mecanismo de defensa contra los patógenos intra y extracelulares, La función de los linfocitos T efectoros CD4+ es reclutar y activar a los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) y otros leucocitos para eliminar a los microorganismos intra y extracelulares y ayudar a los linfocitos B a producir anticuerpos. Los Linfocitos T CD4+ son cruciales en la eliminación de patógenos por medio de los fagocitos mientras que los linfocitos efectoros CD 8+ son responsables de la erradicación de los patógenos como virus que infectan y replican de todas las células. La inmunidad celular se refiere al proceso de lisis de los patógenos mediado por los fagocitos y estimulados por los linfocitos CD4+. Algunos linfocitos CD4+ activan a otras células como los eosinófilos, para que destruyan tipos particulares de microorganismos. Aunque estas funciones no estaban descritas en el modelo original de inmunidad celular son funciones importantes de los linfocitos efectoros, principalmente en el mantenimiento de la integridad del paciente.⁽¹⁶⁾

Los factores de riesgo asociados al TCPH pueden desencadenar condiciones graves y potencialmente mortales cuando no son ponderadas de manera correcta (la mortalidad

relacionada con el trasplante). La reconstitución inmunológica del hospedero y el equilibrio de los componentes efectores es de vital importancia para el clínico. El proceso de TCPH tiene algunas situaciones que deben considerarse de manera puntual, tal es el caso de la enfermedad injerto contra hospedero (EICH) que es la principal causa de morbimortalidad posterior al trasplante alogénico, es un síndrome clínico derivado de la acción de las células inmunocompetentes del donador contra los tejidos del receptor. Fue descrito inicialmente en modelos experimentales en murinos como una enfermedad secundaria en la cual se había sometido a unos ratones a diferentes esquemas de radiación y posteriormente se transfundían con células esplénicas normales de otro individuo lo que ocasionaba una serie de manifestaciones a nivel intestinal, hepático y en piel. La incidencia de EICH grados II a IV es de 40%, pero puede variar desde 10% a 80% según los factores de riesgo. ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Los pacientes con un seguimiento a largo plazo del TCPH que son sometidos esquemas de condicionamiento que contemplan quimioterapia a altas dosis y radioterapia corporal total, llegan a tener complicaciones que pueden ocurrir en los primeros año o inclusive años más tarde. Dentro de las complicaciones más graves, sin duda se encuentran las infecciones recurrentes y la EICH, pero hay otras que deben considerarse en estos pacientes para realizar un diagnóstico temprano, ya que impactan en la morbilidad y mortalidad relacionadas con el TCPH. Las complicaciones se pueden dividir en agudas y crónicas, entre las cuales se encuentran complicaciones hemáticas, cardiovasculares, gastrointestinales, hepáticas, pancreáticas, renales, metabólicas, neurológicas y pulmonares, cuyo tratamiento depende de cada caso. ^(17,19)

Recientemente, la fisiopatología de la EICH aguda ha sido descrita como un proceso de tres pasos en donde la participación de las células T donantes es fundamental. Éstos pasos consisten en:

- 1) El efecto de la radiación pretrasplante / régimen de acondicionamiento de quimioterapia, el cual produce daño en el tejido del receptor, incluyendo ruptura de la barrera epitelial intestinal y la liberación de citocinas inflamatorias.
- 2) La activación de células presentadoras de antígeno, liberación y amplificación de factores inflamatorios.
- 3) Activación y expansión de las células T del donador.

Para el inicio de la EICH en el TCPH se ha descrito que existe una serie de eventos en los que el daño tisular inicial conduce a la liberación de lipopolisacáridos que ejercen una regulación positiva de citocinas inflamatorias, así como la activación de células presentadoras de antígeno (CPA) y la activación de linfocitos citotóxicos T del donante (LTD), lo que conduce finalmente a daño epitelial por las células T activadas y citosinas, favoreciendo un aumento de la permeabilidad intestinal y la liberación de citocinas inflamatorias. Este modelo de EICH representa la base conceptual para los estudios diseñados para reducir la liberación de las citocinas proinflamatorias y el uso del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Los datos clínicos han apoyado este modelo con evidencia de aumento de los niveles de lipopolisacáridos y TNF- α en los receptores de trasplante.

Sin embargo, en los diferentes modelos descritos se tienen muchas limitaciones pues no explican de manera detallada o crítica todos los eventos que ocurren en un paciente posterior al TCPH de tipo alogénico, además de que no se describen los mecanismos reguladoras que pueden limitar la extensión o gravedad de la EICH y del EICL.

Los mecanismos efectores en la EICL y de la EICH se basan principalmente en la compatibilidad de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) en donde la EICL representa una forma de respuesta aloinmune contra el antígeno menor de histocompatibilidad (miHLA).

La base para la mejor diferenciación y clasificación entre EICL y EICH es la observación clínica, pues en la EICH se representa un estado más generalizado de la inflamación, con el daño tisular con liberación de citocinas inflamatorias. Por el contrario, la EICH de tipo crónico se presenta más como una respuesta humoral específica contra antígenos de los tejidos epiteliales y células hematopoyéticas.

Los principales órganos afectados en la EICH son la piel, hígado e intestino, siendo las manifestaciones más comunes a nivel cutáneo, las cuales se caracterizan por un exantema maculopapular eritematoso generalizado. El exantema puede ser asintomático, pruriginoso o doloroso, y de predominio en las zonas expuestas, como palmas y plantas, así como retroauricular y periorbitario. La ictericia progresiva es una de las manifestaciones hepáticas más frecuentes. A nivel intestinal, se puede manifestar como náusea, anorexia, dolor, sialorrea. En casos graves puede existir un daño significativo en

la mucosa, con falla de la función intestinal que causa enteropatía perdedora de proteínas con hipoalbuminemia, sangrado de tubo digestivo o íleo. Todas estas afectaciones secundarias pueden comprometer la vida del paciente y generar complicaciones en el manejo del injerto dentro de los primeros 6 meses del trasplante, por lo cual es indispensable para el clínico contar con una serie de pruebas de laboratorio que permitan predecir la EICH y así se puedan considerar las diferentes alternativas reguladoras y terapéuticas. ⁽¹⁸⁾

En el período postrasplante inmediato, la reconstitución del sistema inmune comienza con las células B, en donde las células medulares expresan el antígeno temprano CD10. Los primeros 12 meses posterior al trasplante las células B se caracterizan por expresar CD1c+, CD5+, CD23+ y CD38+, así como IgM+. Cuando no existe la presencia de EICH, las células periféricas que expresan CD19+ y CD20+, regresando a la normalidad después de 3-6 meses postrasplante, en los pacientes sometidos a trasplantes autólogos la recuperación es más rápida, dado el aumento de células T auxiliaoras CD4+/CD45RO+. ⁽¹⁹⁻²³⁾

La baja presencia de células T cooperadoras para la estimulación de las células B, resulta en un inconveniente para el cambio de clase de inmunoglobulina de IgM a IgG, después de la exposición antigénica. ⁽²¹⁾ En general, la recuperación inmunológica depende de un número de factores y se produce más rápidamente en los trasplantes en los cuales la fuente de obtención de células CD34+ es sangre periférica comparado con una obtención directa de médula ósea, esto es porque en la movilización de células en sangre periférica se obtiene 10 veces más células T y B y existe un aumento importante de células CD4+, así como una relación CD4/CD8 más alta que en las recolecciones directas de médula ósea. ⁽²²⁾

Derivado de las variaciones mencionadas del sistema inmune, los pacientes cursan con diferentes infecciones en el periodo postrasplante. Esto ocasiona que existan predisposiciones a infecciones en diferentes periodos esquematizados en 3 fases, que comienza desde el día 0 del trasplante. ⁽¹⁵⁾

Fase I, pre implante. Desde el día 0 hasta el primer mes del trasplante, durante este periodo los pacientes tienen 2 factores de riesgo para la infección principalmente, 1) la neutropenia y 2) la ruptura de la barrera cutáneo-mucosa. Por lo general los periodos de

fiebre que se presentan son de origen bacteriano y en esta etapa es muy difícil identificar oportunamente el agente causal, por lo que el tratamiento debe realizarse de manera empírica. Los agentes que prevalecen son bacterias Gram positivas, sin embargo la presencia de levaduras como *Candida sp* debe considerarse de manera importante en periodos prolongados de neutropenia. En las neutropenias graves debe considerarse de forma importante la presencia de *Aspergillus* y en ocasiones la presencia del virus herpes simple debe ser contemplada como una reactivación. ⁽²⁴⁻²⁵⁾

Fase II, pos-implante. Esta fase es considerada desde el día 30 hasta el día 100 y se caracteriza por una deficiencia en la inmunidad mediado por células; esta etapa puede verse afectada por la presencia de la EICH y es importante considerar una vigilancia puntual de la inmunosupresión por que las reactivaciones de las infecciones por los herpes virus y particularmente el Citomegalovirus son más frecuentes y puede generar cuadros graves de neumonía, hepatitis y colitis, no deben excluirse los cuidados para disminuir los riesgos de las infecciones de los gérmenes gramnegativos, en esta etapa aumenta considerablemente el riesgo de infecciones por *Pneumocystis carinii* y *Aspergillus sp*. ⁽²⁵⁻²⁷⁾

Fase III, o conocida también como Fase tardía y esta se clasifica a partir de los 100 días postrasplante. En esta etapa las infecciones son más frecuentes en los pacientes con trasplante alogénico que sufren de EICH, los pacientes cursan con una afectación en la inmunidad humoral y celular y los pacientes tienen riesgo de sufrir infecciones por CMV, virus varicela-zóster, virus Epstein-Barr, siendo comunes las infecciones de vías respiratorias de etiología viral, además de las infecciones bacterianas por patógenos encapsulados como el *H. influenzae* y el *S. pneumoniae*. ⁽²⁵⁻²⁷⁾

Para la regeneración de linfocitos T postrasplante se deben tener en consideración varios factores entre los que destacan dos mecanismos celulares:

- 1) Células residuales del receptor, posterior al acondicionamiento pretrasplante.
- 2) Número de células T maduras del donador que fueron infundidas posterior al acondicionamiento del receptor.

Las células T del donante participan activamente en la regulación del EICL y del EICH, por tal motivo es indispensable mantener un balance adecuado en la cantidad y actividad de estas células.

La reconstitución de los linfocitos T es un proceso lento que tarda de 24 a 48 meses, teniendo variables importantes para este proceso, dentro de las que destacan las siguientes:

- 1) Edad de paciente o receptor de CPH
- 2) Régimen de acondicionamiento ya sea mieloablativo o no mieloablativo
- 3) Número de células T infundidas al momento del TCPH
- 4) La presencia de EICH agudo o crónico.

La reconstitución de células T se genera a partir de una CPH y de la actividad y participación de las células estromales del timo, posterior a la participación del timo, las células T (vírgenes) migran a órganos periféricos o secundarios para expandirse por estímulos antigénicos y señales homeostáticas que aseguran el abastecimiento de linfocitos T de manera constante en las periferias (Imagen 1).

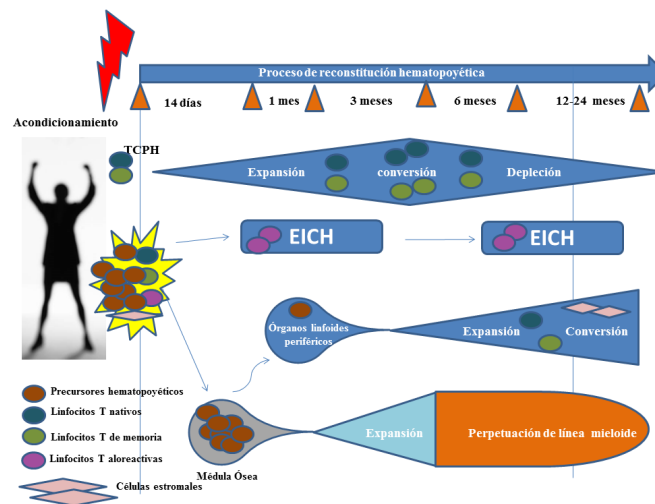


Imagen 1.- Mecanismo de reconstitución de los linfocitos T postrasplante, modificado de Krenger W. Blood: 2011;117: 6768-6776

La regeneración post-trasplante de un compartimento de células T se realiza dos vías, la primera es la timo-independiente y el timo-dependiente. Los linfocitos T circulantes post trasplante provienen de 2 fuentes dentro de ellas están las celular residuales del receptor pues son las células T que sobreviven al acondicionamiento y la otra fuente está formada por las células T maduras del donante, que fueron transfundidas en conjunto con las

células CD34+. La cinética y la expansión de las células T, ya sea temprana o tardía posterior al TCPH puede variar dependiendo la enfermedad de base, el tipo de trasplante, la dosis de células T del donante y la intensidad del acondicionamiento.

La expansión de las células T naturalmente se desencadena por la estimulación por antígenos o mediante una proliferación homeostática en respuesta a un periodo de linfopenia, este último proceso se designa "Expansión periférica homeostática" (HPE) y depende de Interacciones de baja afinidad con auto-péptido / Complejo mayor de histocompatibilidad en conjunto con la exposición a altos niveles de citoquinas. Esta forma de proliferación de células T no afecta a la diversidad de TCR en contraste con el sesgo del repertorio, la eficiencia de la HPE en la restauración de la diversidad del repertorio periférico estará limitada por el repertorio inicial de las células T maduras que sirven de fuente para la expansión. En la ausencia de células T naïve de nueva producción exportadas del Timo, el compartimiento de células T de sangre periférica realiza cambios graduales como resultado de frecuentes interacciones con patógenos, el repertorio TCR humano está progresivamente restringido como consecuencia de las expansiones oligoclonales de antígenos específicos de las células T, que pueden llegar a convertirse en células de memoria.

La vía regenerativa independiente del timo es más eficiente para asegurar inicialmente la competencia inmunitaria requerida para la protección contra infecciones post-trasplante. Las células T resistentes al acondicionamiento del receptor y las células T maduras derivadas de donantes pueden contribuir a la inmunidad adaptativa presente inmediatamente después del trasplante.

La Importancia de la identificación de fenotipo de linfocitos T en la periferia en pacientes sometidos a TCPH se resume de la siguiente manera.

- **Linfocitos T Naïve.** Reconstitución de la población de linfocitos T CD4 y CD8 proveniente principalmente del trasplante, las células alogénicas se injertaron exitosamente.
- **Linfocitos T Activados.** Los linfocitos T están (porque los marcadores de activación duran horas después del primer encuentro antigénico) reconociendo un antígeno (infección viral, fúngica, bacteriana, reconocimiento de células neoplásicas o por reconocimiento alogénico: EICH aguda o crónica).

- **Linfocitos T de Memoria.** Existió una activación previamente y la progenie de esos linfocitos han permanecido en el organismo y puede responder en un segundo reconocimiento del antígeno (infección viral, fúngica, bacteriana, reconocimiento de células neoplásicas o por reconocimiento alogénico: EICH crónico) de manera eficiente en magnitud de proliferación y capacidad efectora (producción de citocinas y citotoxicidad).

La cinética de reconstitución de las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8: naïve, activados y de memoria posterior al TCPH permitirá obtener el perfil celular de subpoblaciones que pudieran asociarse al estado clínico del paciente pediátrico: infecciones, EICH aguda o crónica, injerto contra leucemia, o bien, la caracterización de la cinética de reconstitución de dicha población.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los factores de riesgo asociados al TCPH pueden desencadenar condiciones graves y potencialmente mortales cuando no son ponderadas de manera correcta. La reconstitución inmunológica del receptor y el equilibrio de los componentes efectoros son de vital importancia para el equipo clínico, considerando que la cinética de reconstitución de las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8: *naïve*, activados y de memoria posterior al TCPH permitirá obtener el perfil celular de subpoblaciones que se asocian al estado clínico del paciente pediátrico: infecciones, EICH aguda o crónica, injerto contra leucemia, o bien, la caracterización de la cinética de reconstitución de dichas poblaciones. Por lo que la pregunta de investigación del presente trabajo es: ¿Cuál es la cinética de reconstitución de las subpoblaciones: *naïve*, activados, efectoros, TCM y TEM de linfocitos T en sangre periférica posterior al TCPH en pacientes pediátricos?

JUSTIFICACIÓN

Es relevante identificar y cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T *naïve*, activados, efectoros y de memoria posterior al TCPH, para que el equipo clínico realice una integración de los resultados, signos y síntomas y otras determinaciones (presencia de infecciones, EICH y pérdida del injerto) para tomar decisiones terapéuticas adecuadas.

OBJETIVOS

General

1. Caracterizar (fenotipo, frecuencia y número absoluto) las subpoblaciones de linfocitos T: *naïve*, activados y de memoria en sangre periférica de los pacientes con leucemia aguda sometidos a TCPH y evaluar si existe relación con el estado clínico (infección, EICH, reconstitución) del paciente.

Particulares

1. Determinar la presencia y fenotipo de los linfocitos T en pacientes con leucemia aguda linfoblástica sometidos a TCPH.
2. Comparar la frecuencia y fenotipo de las células T en pacientes con leucemia aguda sometidos a TCPH y evaluar si existe una asociación con los datos clínicos del paciente.

HIPÓTESIS

La presencia de linfocitos T *naïve*, activados, efectores y de memoria está asociada al estado clínico, entonces, la cinética de dichas subpoblaciones determinadas en sangre periférica estarán asociadas con la presencia de los signos y síntomas clínicos (Infecciones, EICH y pérdida del injerto) en pacientes pediátricos sometidos a TCPH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes pediátricos sometidos a TCPH

Criterios de inclusión

- Pacientes de ambos sexos entre 1 y 18 años de edad que ingresen a la unidad de trasplante para la realización de trasplante de progenitores hematopoyéticos de tipo alogénicos.

Criterios de exclusión

- Pacientes cuyo cuidador primario no acepte participar en el estudio

Criterios de eliminación

- Pacientes que en algún momento deseen salir del protocolo

Diseño del estudio

Se realizara un estudio prospectivo, longitudinal y descriptivo de pacientes con TCPH.

Tamaño de la muestra

La proporción poblacional calculada (utilizando la fórmula de proporciones y el IC al 95%) es 19 pacientes, para lo cual se ha considerado incluir un mínimo de 20 pacientes sometidos a TCPH.

Tipo de muestreo: No probabilístico, por conveniencia

En donde las características de los valores y fórmula utilizada son los siguientes:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 N p q}{p q Z_{\alpha/2}^2 + (N - 1) e^2}$$

$Z_{\alpha/2}$	1.96	Nivel de confianza 95%
N	65/20	Tamaño de la población (65 numero de diagnósticos de leucemia y 20 el numero de TCPH programados por año)
p	0.31	Proporción de individuos que SI poseen la característica de interés
q	0.69	Proporción de individuos que NO poseen la característica de interés
e	0.05	Error máximo tolerable

Tiempos de toma de muestra y realización de pruebas

Se tomaron 1.0 mL de sangre periférica en los pacientes en las semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 40, 48, postrasplante y se realizó cuantificación y fenotipificación de las células T postrasplante mediante citometría de flujo incluyendo los siguientes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD69, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CCR7 y CRTAM.

El fenotipo de las células T se realizó por citometría de flujo utilizando un promedio de 50,000 eventos para la detección, cuantificación y tipificación de las células T.

Variables

Variables independientes:

Subpoblación de linfocitos T: 1) Linfocitos T CD4+ *naïve*, 2) Linfocitos T CD8+ *naïve*, 3) Linfocitos T CD4+ Activados, 4) Linfocitos T CD8+ Activados, 5) Linfocitos T CD4+ de Memoria, 6) Linfocitos T CD8+ de Memoria,

Variables de desenlace intermedio:

Fueron consideradas las siguientes características clínicas de los pacientes: 1) infecciones bacterianas, 2) Infecciones Virales, 3) infecciones fúngicas, 4) presencia de EICH (en los diferentes grados del I al IV).

Variables confusoras:

Se considera el grado de injerto (cuantificación de Quimerismo).

Definición de poblaciones celulares de acuerdo a la expresión de marcadores (CD's)

Población	Definición	Tipo de variable	Método de determinación	Unidades
Linfocitos T CD4 o CD8 naïve	Linfocitos madurados en el timo que no han reconocido un antígeno. Linfocitos que expresen: CD3, CD8 o CD4, CD45RA+ CRTAM- CD45RO- CD69-	Cuantitativa continua	Citometría de flujo	Frecuencia y número absoluto/ml sangre periférica
Linfocitos T CD4 o CD8 Activados	Linfocitos que reconocieron recientemente un Antígeno. Linfocitos que expresen: CD3, CD8 o CD4, CD45RA- CRTAM+ CD45RO+ CD69+, CD62L-	Cuantitativa continua	Citometría de flujo	Frecuencia y número absoluto/ml sangre periférica
Linfocitos T CD4 o CD8 Memoria	Linfocitos progenie de un linfocito activado previamente. Linfocitos que expresen: CD3, CD8 o CD4, CD45RA-, CCR7+/-, CRTAM+ CD45RO+ CD69+, CD62L-	Cuantitativa continua	Citometría de flujo	Frecuencia y número absoluto/ml sangre periférico

PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

- Se utilizó estadística descriptiva con frecuencias absolutas y relativas (porcentajes), así como gráficos en barras.
- Análisis inferencial para establecer la asociación de las variables en estudio, mediante tablas de contingencia.
- Análisis de varianza (ANOVA) para establecer asociaciones con los datos clínicos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se efectuó de acuerdo los lineamientos internacionales de la declaración de Helsinki.

Como incluye investigación en seres humanos, las consideraciones éticas se basarán en lo dispuesto en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y el Código Penal (Título V., artículo 100, fracciones I, II, III y IV) que menciona que la investigación en seres humanos deberá adaptarse a los principios científicos y éticos que justifiquen la investigación, podrá efectuarse sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo, podrá efectuarse sólo cuando exista una razonable seguridad de que no se expone a riesgos ni daños innecesarios al sujeto en experimentación y deberá contar con el consentimiento por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante legal, una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para su salud (H. Congreso de la Unión 84d).

Las consideraciones éticas del estudio en torno al Reglamento de la Ley General de Salud se encontrarán basadas por lo dispuesto en el Título Segundo del Capítulo I, artículo 13, del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, en donde se establece que toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar (H. Congreso de la Unión 1984b) . De acuerdo a lo establecido en el artículo 17 del Título Segundo del Capítulo I, el estudio se considera como una investigación con riesgo mínimo en donde se incluyen aquellos estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios (H. Congreso de la Unión 1984a), entre los que se consideran la extracción de sangre por punción venosa, teniendo el riesgo mínimo para los pacientes en los cuales el padre, tutor o cuidador autoricen su participación.

RESULTADOS

Durante el periodo de febrero 2017 a enero 2018 se capturaron 21 pacientes sometidos a TCPH, de los cuales 8 pertenecen al género masculino y 13 al femenino, con edades entre 1 a 17 años, con una media de 7 años 6 meses y una mediana de 8 años 5 meses, los diagnósticos por lo cual se trasplantaron se describen en la tabla 1.

Para determinar la cinética de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en los 21 pacientes se realizaron 115 mediciones de subpoblación de linfocitos T, teniendo un mínimo de 2 y un máximo de 11 determinaciones por paciente con un promedio de 5.47 determinaciones por paciente.

Para analizar la cinética de reconstitución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos (*naïve*, efectores y de memoria tanto CD4+ y CD8+), los pacientes se agruparon de acuerdo a los días postrasplante de la siguiente manera: Grupo 1: de 1 a 45, grupo 2: de 45 a 90, grupo 3: de 91-120, grupo 4 121-a 180, grupo 5: 181 a 240, grupo 6: 241-a 300, grupo 7: 301 a 360 y grupo 8: más de 360. (Gráficos 2 al 4)

El análisis de los linfocitos T activados se realizó comparando dos entidades clínicas de interés: 1) Ausencia de EICH *versus* presencia de EICH y 2) Ausencia de infecciones *versus* presencia de infecciones (Gráficos 7). Se evidenció un aumento de las poblaciones de linfocitos T CD8+ CD45RA+ CD69+ y de los linfocitos T CD8+ CD45RO+ CD69+ en los pacientes que presentaban EICH *versus* pacientes con ausencia de EICH, la diferencia entre estos grupos muestra un valor estadísticamente significativo (Gráficos 5-6). Sin embargo en la comparación del fenotipo de linfocitos T CD8+ CD45RA+ CD69+ CRTAM+ y de los linfocitos T CD8+ CD45RO+ CD69+ CRTAM+ en estas mismas entidades clínicas no se identificó un patrón celular que evidenciara un comportamiento

asociado o presente en EICH y la diferencia no tiene un valor estadístico entre ambos grupos (Gráficos 5-6).

En el caso de la comparación entre Ausencia de infecciones *versus* presencia de infecciones no se evidencio diferencia significativa en los diferentes fenotipos celulares.

DISCUSIÓN

El objetivo del TCPH es el restablecimiento de un sistema inmune efectivo que delimite de manera precisa lo propio de lo de extraño. Si la función inmune antígeno específico es presente, la reconstitución inmune funcional tiene el potencial de disminuir la recaída leucémica y la mortalidad relacionada con el tratamiento (inmunosupresión).

La recuperación de las células T depende de la expansión de células T de memoria, conducida por antígenos alogénicos encontrados en el receptor, seguida de la producción de células T *naïve* en el timo. Los linfocitos T CD4+ se reconstituyen después que los linfocitos T CD8+ y depende mayormente de la generación tímica de células T *naïve* CD4+CD45RA+ posterior al TCPH.

Existen valores de referencia de reconstitución de los grupos celulares posterior al TCPH. Se ha visto que los linfocitos *naïve* T CD4+ alcanzan la reconstitución completa después de los 12 meses del trasplante, con valores $0.25 \times 10^9/L$ a 6 meses cuando se trata de injerto de médula ósea, $0.25 \times 10^9/L$ a 12 meses con fuente de sangre periférica y 8 meses de sangre de cordón umbilical. En cuanto a linfocitos T *naïve* CD8+ se alcanzan niveles de $0.5 \times 10^9/L$ en 9 meses de médula ósea, 24 meses de sangre periférica y 8 meses por sangre de cordón umbilical. Los linfocitos T de memoria se cuantifican en $0.5 \times 10^9/L$ a los

24 meses con donador de sangre periférica y cordón umbilical, y 1 mes si el origen es de médula ósea.

En nuestra muestra de pacientes la reconstitución de linfocitos T naïve CD4+ desde el día 0 hasta 12 meses se encuentra por abajo de $0.6 \times 10^5/L$, mientras que los linfocitos T CD4+ efectores se mantienen por bajo de $0.2 \times 10^5/L$. La cuantificación de células T CD8+ presenta la misma distribución, con $<0.6 \times 10^5/L$ de células naïve y $<0.2 \times 10^5/L$ de memoria; sin diferencias significativas durante un periodo de 12 meses. Esto nos hace inferir que no existe una generación *de novo* de linfocitos postrasplante del donador en el receptor como parte de la reconstitución celular derivada del TCPH.

Dentro de los factores más importantes que afectan la reconstitución inmunológica de las células T se encuentran la presencia de EICH (agudo y crónico) y el tratamiento inmunosupresor. El desarrollo de la EICH aguda se ve influido por: el número de linfocitos T maduros del donador que tienen capacidad aloreactiva infundidos al momento de realizar el TCPH, la discordancia de HLA o la incompatibilidad de género entre donador y receptor, la intensidad del régimen de acondicionamiento aplicado, reactivación de CMV (citomegalovirus) y la fuente celular. La EICH crónica es una respuesta inmune dirigida contra el sistema inmune del receptor, lo cual puede inhibir por sí misma la función de las células T limitando la diversidad de TCR, el desarrollo de células T y produciendo disfunción en la producción de citocinas, generalmente mediante daño de la médula ósea y/o timo, apoptosis y liberación de citocinas. La EICH aguda disminuye sustancialmente la producción tímica y la recuperación de linfocitos T CD4+, así como el repertorio de células T.

Tanto la linfopenia como una gama inadecuada de CD4+ y CD8+, consecuencia de la EICH y del tratamiento inmunosupresor prolongado, condicionan infecciones recurrentes durante al menos 1 año posterior al trasplante con virus latentes.

Está bien establecido que las infecciones siguen siendo la causa más frecuente y significativa de mortalidad y morbilidad posterior al TCPH alogénico. Los linfocitos T son las células efectoras más importantes en el control de complicaciones infecciosas. Una reconstitución inmune temprana de antivirales es esencial para el control de reactivaciones de CMV después del TCPH. La recuperación de células T CD4+ y CD8+ CMV específicos puede ser un marcador de protección contra dichas reactivaciones.

CONCLUSIÓN

En el grupo de pacientes estudiados las subpoblaciones de *linfocitos T (naïve, activados, efectores y de memoria)* posterior al TCPH incrementan de manera significativa después de 12 meses postrasplante, sin evidenciar la generación de linfocitos T de *ново* dentro de los primeros 12 meses.

Las subpoblaciones de *linfocitos T (naïve, activados, efectores y de memoria)* posterior al TCPH en los pacientes con LLA son las más bajas comparadas con el resto de pacientes trasplantados.

La presencia de infecciones en los pacientes sometidos a TCPH, afecta negativamente a las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ postrasplante.

La presencia de EICH en los pacientes sometidos a TCPH, muestra un aumento de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ postrasplante.

Las subpoblaciones de linfocitos T que expresan CD8+ CD45RA+ CD69+ y CD8+ CD45RO+ CD69+, se encuentran presentes en EICH.

LIMITANTES DEL ESTUDIO

- Se tiene como principal limitante el tamaño de la muestra por el número de pacientes incluidos en el protocolo. Y las pérdidas a largo plazo para el seguimiento a un año, considerando que la sobrevida de los pacientes sometidos a TCPH durante el primer año es de 20% a 40%.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha de inicio: (Agosto/2016)	Meses											
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22	23-24
ACTIVIDAD												
Obtención de insumos	X											
Estandarización de técnica		X										
Inclusión de pacientes		X	X	X	X							
Realización de estudios			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de los estudios			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Presentación de resultados				X				X			X	X
Elaboración de manuscritos											X	X
Publicación											X	X

BIBLIOGRAFÍA:

1. Gaytán Morales F. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en pediatría. *Gac Mex Oncol.* 2013;12:174-181.
2. Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22: 195-206
3. Jaime Fagundo JC, Dorticós Balea E, Pavón Morán V, Jauma Rojo AE, Cortina Rosales LD. Aspectos inmunológicos del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2006; 22(3):
4. Benny J. Chen, Xiuyu Cui, Gregory D. Sempowski, Jos Domen, and Nelson J. Chao Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. *Blood.* 2004;103:4344-4352
5. Chao NJ, Liu CX, Rooney B, et al. Nonmyeloablative regimen preserves “niches” allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:249-256.
6. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:191-200
7. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Association between anti-thymocyte globulin (ATG) exposure and CD4+ immune reconstitution predicting overall survival in paediatric haematopoietic cell transplantation: a multicentre retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2015;2: e194-e203.
8. Pérez García M, Olaya Vargas A, Del Campo Martínez A, Gaytán Morales F, y cols. Reconstitución inmunológica en niños receptores de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. *Rev Mex Alerg.* 2012; 21:72-79

9. Krenger W, Blazar BR, Holländer GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*: 2011;117: 6768-6776.
10. Huttunen P, Taskinen M, Siitonen S, Saarinen-Pihkala UM. Impact of very early CD4(+) /CD8(+) T cell counts on the occurrence of acute graft-versus-host disease and NK cell counts on outcome after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:522-528.
11. Eyrich M, Leiler C, Lang P, Schilbach K, Schumm M, Bader P, Greil J, Klingebiel T, et al. prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transp*. 2003 32, 379–390
12. Melenhorst JJ, Tian X, Xu D, et al. Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuations after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2012;97: 867-873.
13. Sugita K, Soiffer RJ, Murray C, Schlossman SF, Ritz J, Morimoto C. The phenotype and reconstitution of immunoregulatory T cell subsets after T cell depleted allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994;57:1465-1473.
14. Roux E, Dumont Girard F, Starobinski M, Siegrist CA, Helg C, Chapuis B, Roosnek E. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood*. 2000; 96: 2299-2303.
15. Thomas ED, Blume K, Forman SJ. Bacterial infections in hematopoietic cell transplantation. *Blackwell Science* 1999:537-54.
16. Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 5º Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. 2004.

17. Ferrara JLM, Levy R, Chao NJ . Pathophysiologic mechanism of acute graft-vs.-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1999;25:347-356
18. Stephanie JL. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;11:4200-4206
19. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. B cell differentiation following autologous, conventional, or T cell depleted bone marrow transplantation: A recapitulation of normal B cell ontogeny. *Blood* 1990;76:1647-56.
20. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1998;92:1471-1490.
21. Brenner MK, Wimperis JZ, Reittie JE. Recovery of immunoglobulin isotypes following T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1986;64:125-32.
22. Storek J. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:3380-3389.
23. Farag S, Fehniger L. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;10:1935-1947.
24. Booth C, Lawson S, Veys P. The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2013;162:177-190.
25. Baron, F., Labopin, M., Niederwieser, D., Vigouroux, S., et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia*. 2012; 26, 2462–2468.

26. Olkinuora H, von Willebrand E, Kantele JM, et al. The impact of early viral infections and graft-versus-host disease on immune reconstitution following paediatric stem cell transplantation. *Scand J Immunol.* 2011;73:586-593.
27. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24:257-72.
28. Admiraal R, et al. Viral Reactivations and Associated Outcomes in Context of Immune Reconstitution after Pediatric Hematopoietic Cell Transplantation, *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Dec; 140(6):1643-1650.
29. B.G. Park, et al., Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients. *Leuk Res.* 2015 Dec;39(12):1334-41.
30. Chang YJ¹, et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Apr;20(4):440-9.
31. Atilla E¹, Atilla PA¹, Bozdağ SC¹, Demirer T². A review of infectious complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantations. *Infection.* 2017 Aug;45(4):403-411.

ANEXOS

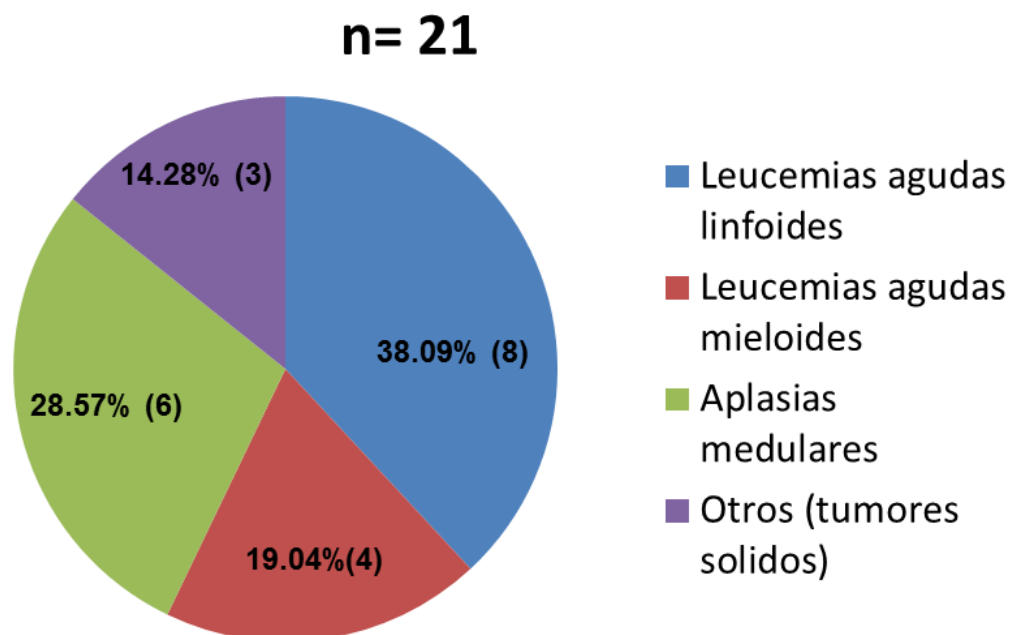


Imagen 1. Distribución de diagnósticos en pacientes incluidos en el estudio.

Datos demográficos	
Masculino	8 (38.09%)
Femenino	13 (61.09%)
Intervalo de edad	1 a 17 años
Media de edad:	7 años 6 meses
Mediana de edad:	8 años 5 meses

Tabla 1. Datos demográficos de pacientes estudiados.

Días de medición postrasplante de las 115 determinaciones

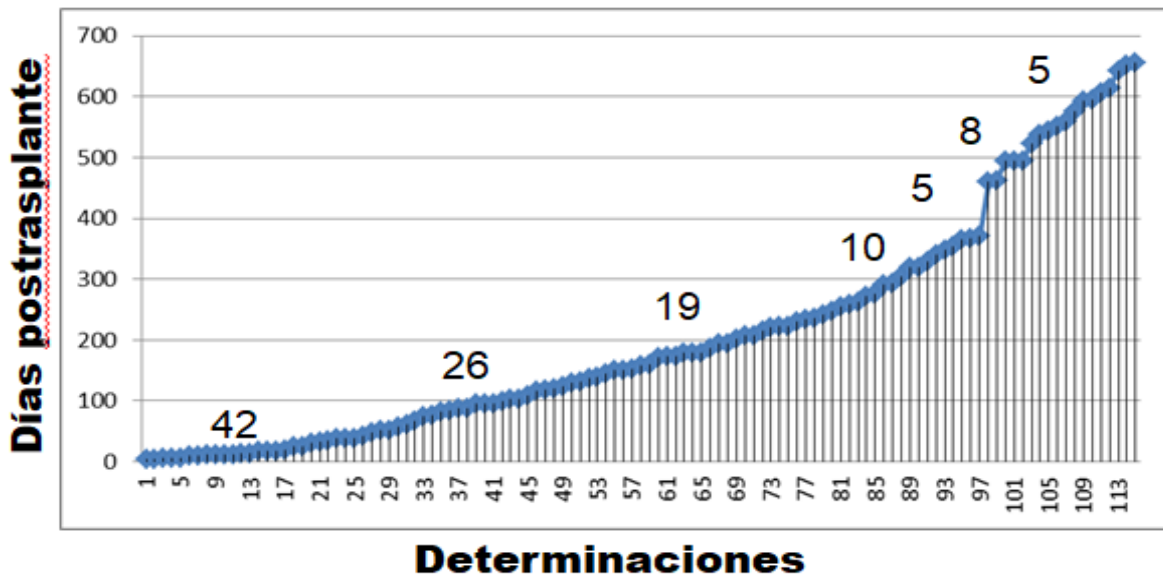


Imagen 2. Determinaciones en sangre periférica de los pacientes, tomadas a partir del día 0 de TCPH.

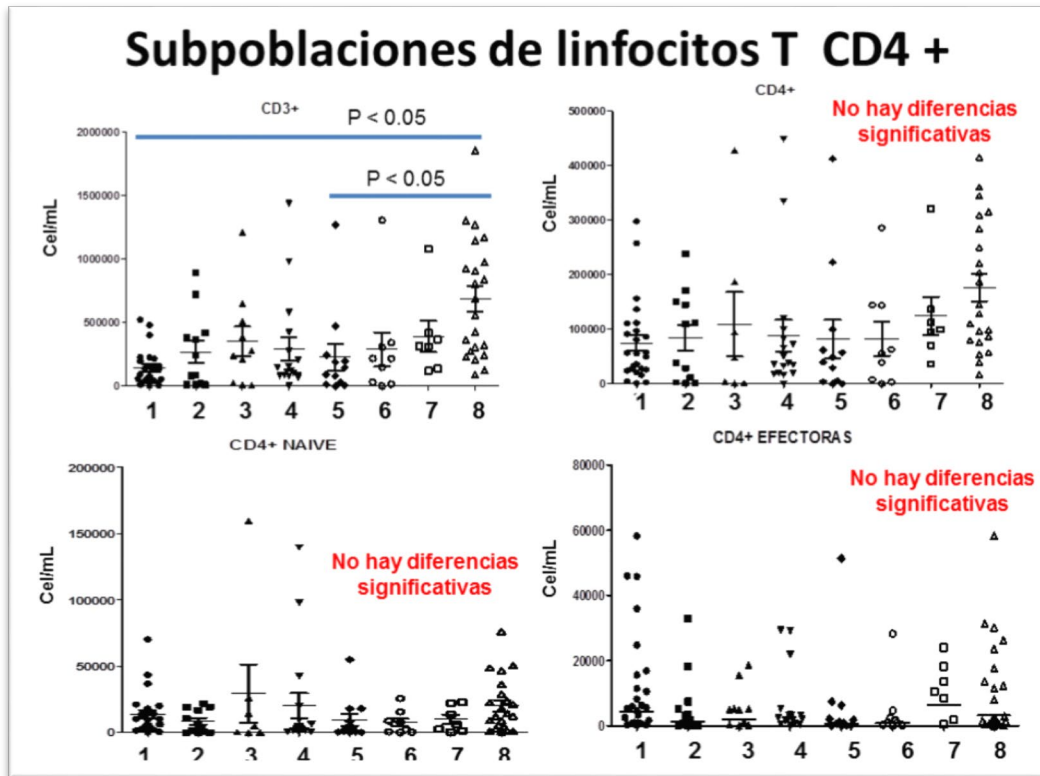


Grafico 1. Se evaluó la cinética de reconstitución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ agrupando a todos los pacientes se agruparon de acuerdo a los días postrasplante: Grupo 1: de 1 a 45, grupo 2: de 45 a 90, grupo 3: de 91-120, grupo 4 121-a 180, grupo 5: 181 a 240, grupo 6: 241-a 300, grupo 7: 301 a 360 y grupo 8: más de 360.

En la sección (A) del gráfico se puede identificar que todas las células que expresan CD3+ (linfocitos T) la sección B corresponde a linfocitos T CD4+, la sección C a Linfocitos T CD4+ *naïve*. Se presenta una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo 1 y el grupo 8 así como entre los grupos 5 y 8, en todas las secciones (A,B,C, y D) se observa un aumento en el número de células en el grupo 8 y en las secciones B,C y D esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Subpoblaciones de linfocitos T CD4 +

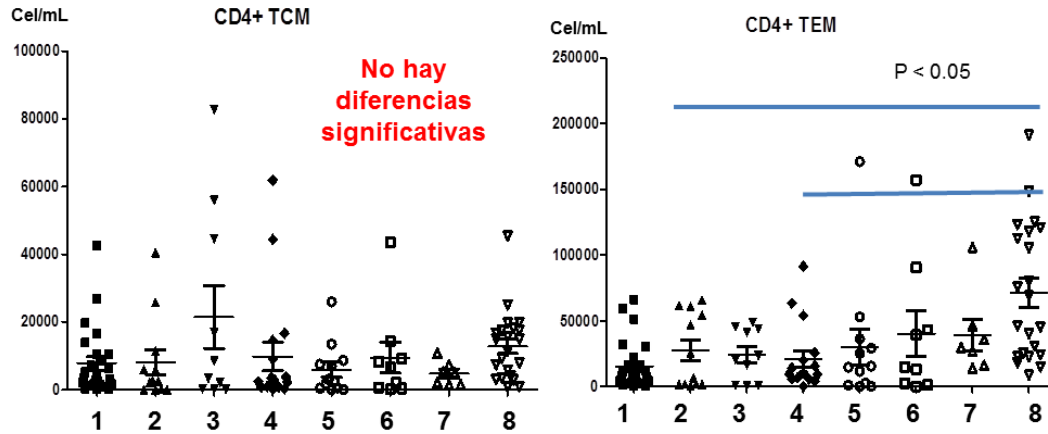


Grafico 2. Se evaluó la cinética de reconstitución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ agrupando a todos los pacientes de acuerdo a los días postrasplante: Grupo 1: de 1 a 45, grupo 2: de 45 a 90, grupo 3: de 91-120, grupo 4 121-a 180, grupo 5: 181 a 240, grupo 6: 241-a 300, grupo 7: 301 a 360 y grupo 8: más de 360.

En la sección (A) del gráfico que corresponde a linfocitos T CD4+ centrales de memoria (TCM) no se observa una cinética de reconstitución y tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos. En la sección B de la gráfica que corresponde a linfocitos T CD4+ efectores de memoria (TEM) tampoco hay una cinética de reconstitución y las diferencias estadísticamente significativas se observan entre los valores del grupo 8 con los grupos 2 y 4, observándose un mayor

Subpoblaciones de linfocitos T CD8 +

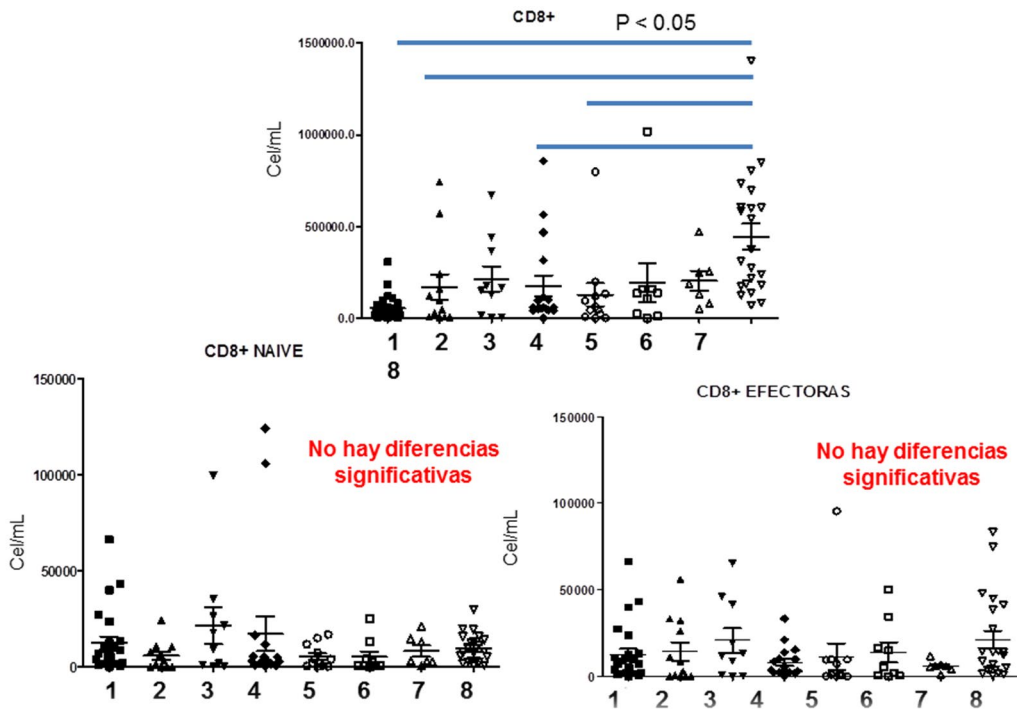


Grafico 3. Se evaluó la cinética de reconstitución de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ agrupando a todos los pacientes de acuerdo a los días postrasplante: Grupo 1: de 1 a 45, grupo 2: de 45 a 90, grupo 3: de 91-120, grupo 4 121-a 180, grupo 5: 181 a 240, grupo 6: 241-a 300, grupo 7: 301 a 360 y grupo 8: más de 360.

En la sección (A) del gráfico que corresponde a linfocitos T CD8+ no se observa una cinética de reconstitución, sin embargo se observa que la mayor cantidad de linfocitos Cd8+ se encuentra en el grupo 8 y existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos *versus* los grupos 1, 2, 4 y 5. En la sección B de la gráfica que corresponde a linfocitos T CD8+ *naïve* tampoco hay una cinética de reconstitución y en la sección C que corresponde a linfocitos T CD8+ efectoras ocurre el mismo caso no existe una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos y no se observa una cinética de reconstitución.

Subpoblaciones de linfocitos T CD8 +

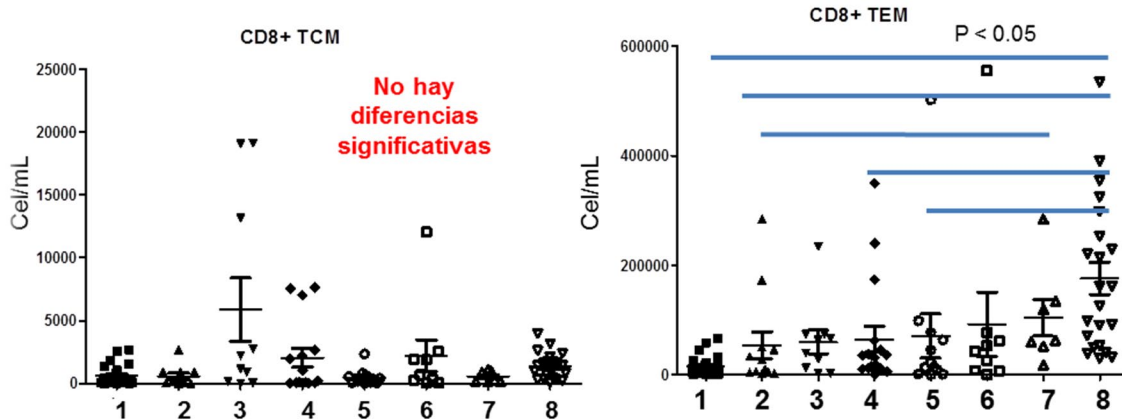


Grafico 4) Se evaluó la cinética de reconstitución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ agrupando a todos los pacientes de acuerdo a los días postrasplante: Grupo 1: de 1 a 45, grupo 2: de 45 a 90, grupo 3: de 91-120, grupo 4 121-a 180, grupo 5: 181 a 240, grupo 6: 241-a 300, grupo 7: 301 a 360 y grupo 8: más de 360.

En la sección (A) del gráfico que corresponde a linfocitos T CD8+ centrales de memoria (TCM) no se observa una cinética de reconstitución y tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos. En la sección B de la gráfica que corresponde a linfocitos T CD8+ efectores de memoria (TEM) tampoco hay una cinética de reconstitución y las diferencias estadísticamente significativas se observan entre el grupo 8 con los grupos 1,2, 4 y 5, observándose un mayor número de células en los pacientes del grupo 8. También se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo 7 y el grupo 2, obteniendo un valor número de células en el grupo 7, en general en la sección B del grafico se observa un ligero aumento de células TEM a partir del grupo 4 sin embargo esta tendencia no tiene un valor con significancia estadística, sigue predominando el mayor número de células en el arupo 8.

Linfocitos T activados en presencia o ausencia de EICH

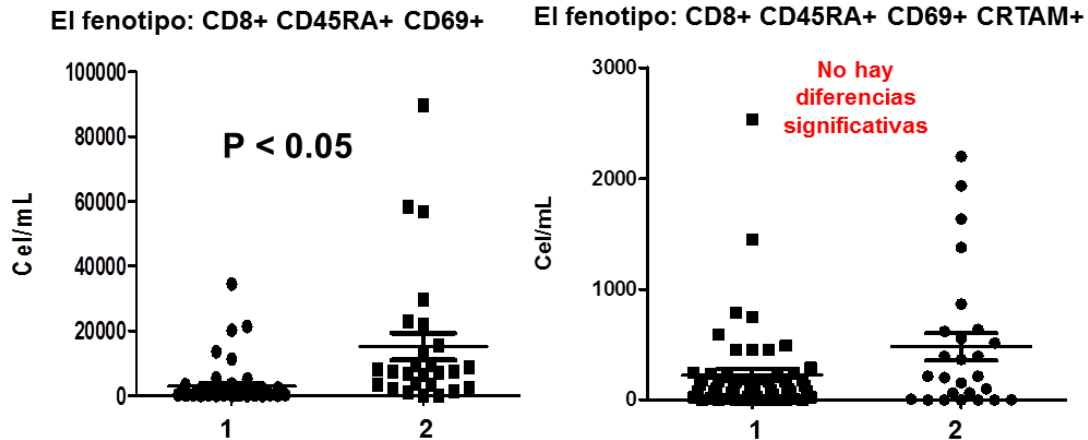


Grafico 5) El fenotipo de los linfocitos T activados se pueden encontrar tanto en la población CD45RA+, que serían los recientemente activados, y en la población de memoria: CD45RO+ por una reactivación. Las moléculas que se expresan post-activación son: CD69 y CRTAM, pudiendo observarse la co-expresión de dichas moléculas. Por tal motivo se evaluó la expresión de CD69 y CRTAM en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en esta grafica se muestran únicamente los valores obtenidos que tienen significancia estadística (linfocitos T CD8+).

En la sección (A) del gráfico que corresponde a la población de linfocitos T CD8+ CD45RA+ CD69+ se evidencia un mayor número de células en los pacientes que presentan EICH *versus* los pacientes con ausencia de EICH, esta diferencia tiene un valor estadísticamente significativo.

En la sección (B) del gráfico que corresponde a la población de linfocitos T CD8+ CD45RA+ CD69+ CRTAM+, se evidencia una distribución heterogénea del número de células que co-expresan CD69+ y CRTAM+, al comparar el número de células en los pacientes que presentan EICH *versus* los pacientes con ausencia de EICH, esta diferencia no muestra un valor estadísticamente significativo.

Linfocitos T activados en presencia o ausencia de EICH

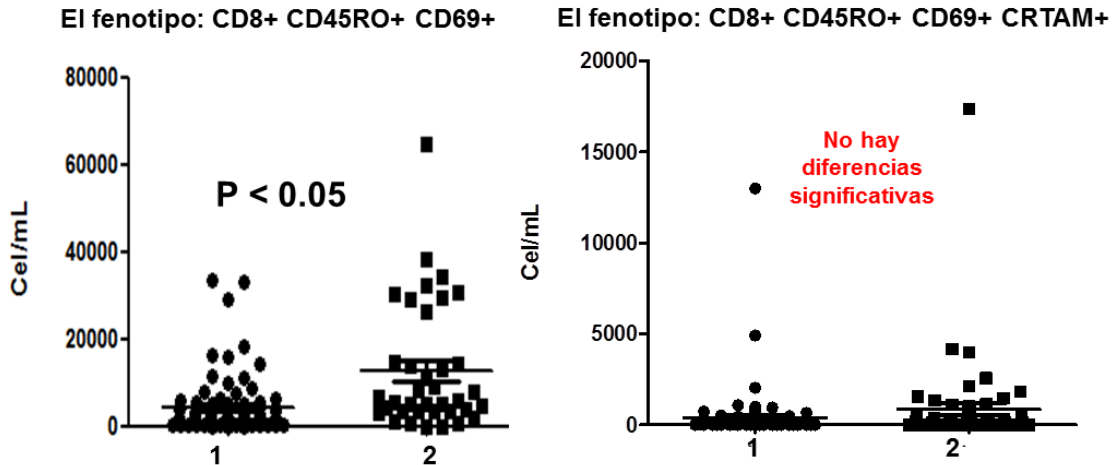


Gráfico 6) En la sección (A) del gráfico que corresponde a la población de linfocitos T CD8+ CD45RO+ CD69+ se evidencia un mayor número de células en los pacientes que presentan EICH *versus* los pacientes con ausencia de EICH, esta diferencia tiene un valor estadísticamente significativo. En la sección (B) del gráfico que corresponde a la población de linfocitos T CD8+ CD45RO+ CD69+ CRTAM+ se evidencia una distribución heterogénea del número de células que co-expresan CD69+ y CRTAM+, al comparar el número de células en los pacientes que presentan EICH *versus* los pacientes con ausencia de EICH, esta diferencia no muestra un valor estadísticamente significativo.

