



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**“Medición de citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyésis como factor pronóstico, en pacientes pediátricos con leucemias agudas sometidos a trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas de donador relacionado”**

**Tesis:**

Que opta por el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta.  
  
Jose Felix Gaytan Morales

  
Tutor Principal:

Dra. Elisa Dorantes Acosta  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Ciudad Universitaria, Ciudad de México 2021  
Junio



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.

# TITULO

“Medición de citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyésis como factor pronóstico, en pacientes pediátricos con leucemias agudas sometidos a trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas de donador relacionado”

---

Investigador Principal:

Dr. José Félix Gaytán Morales<sup>1</sup>

Investigador Asociado:

M. en C. Abigail<sup>1</sup>

Investigador Asociado

Dr. Alberto Olaya Vargas<sup>2</sup>

TUTORA

Doctora en Ciencias Médicas

Dra. Elisa María Dorantes Acosta<sup>1</sup>

**Hospital Infantil de México Federico Gómez**

Departamento de Hemato-oncología y Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas<sup>1</sup>

Jefe del servicio del programa de Trasplante de células progenitoras del Instituto Nacional de Pediatría<sup>2</sup>

## Introducción y marco teórico

### 1.1 INTRODUCCION

El trasplante de células progenitoras como forma de tratamiento, comenzó a estudiarse científicamente a finales de la segunda guerra mundial. Las células madre son muy sensibles a las lesiones por radiación; por ello, la lesión medular era un efecto secundario importante y potencialmente mortal de la exposición a la bomba atómica o de accidentes en la industria de las armas nucleares. A fines de la década de los 40s, los estudios de trasplante de médula ósea como medio de tratamiento para combatientes o civiles expuestos a la radiación, fueron fomentados debido a la preocupación de la comisión de Energía atómica por la propagación de la tecnología y las armas nucleares. <sup>1</sup>

El trasplante de células hematopoyéticas se considera hoy en día la primera línea de terapia para muchas enfermedades oncológicas y hematológicas que ponen en peligro la vida; es un técnica que puede restablecer la función medular de los pacientes que sufrieron una lesión grave en dicho sitio, y consistente en la infusión de los progenitores hematopoyéticos en la sangre periférica, aunque dichas células circulan en poca cantidad, se puede tratar al donante con agentes que originan una mayor liberación de éstas, tal como el factor estimulador de colonias granulocíticas, y recolectarlas mediante un proceso de aféresis; además de la MO y la SP, otras fuentes de obtención de CPH es a partir de sangre fetal, que puede recuperarse de la placenta y del cordón umbilical después del parto; o células de hígado fetal, donde hay que disgregar el material hepático obtenido de fetos procedentes de abortos espontáneos de 16 a 24 semanas, se separa el tejido conectivo, lisa los eritrocitos y separa las células mononucleares, colectarlas, lavarlas y mantenerlas en congelación. Algunos datos sugieren realizar este procedimiento con el hígado fetal antes de la semana 18 de gestación, ya que después de ésta comienzan a desarrollarse los linfocitos que causan la enfermedad injerto contra huésped (ECIH) <sup>2,3,4.</sup>

## TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Las células progenitoras que dan lugar a las células hematopoyéticas, son conocidas como células progenitoras hematopoyéticas, se les llama de esta manera debido a que tienen la capacidad de auto-renovarse, dividirse y diferenciarse en una variedad de células hematopoyéticas especializadas. Por esta razón, son las responsables de la producción de millones de células sanguíneas cada día, para así mantener la homeostasis. Este es el principio del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, lo cual fue corroborado con estudios básicos y clínicos que demostraron que estas células pueden reparar el daño o pérdida de componentes del sistema hematopoyético e inmunológico.<sup>5,6,7</sup>

Uno de los principales problemas en la investigación de las células progenitoras hematopoyéticas ha sido su identificación, debido a que estas células se parecen y comportan como un sub-población de glóbulos blancos en cuanto a la morfología. Hoy en día, esta identificación se realiza con ayuda de marcadores de superficie ya que las CPH no expresan marcadores de linaje y son CD 34+.

## FUENTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Las células progenitoras hematopoyéticas residen principalmente en médula ósea pero pueden circular en sangre periférica, así como también en sangre de cordón umbilical o en médula ósea.

**Progenitor de Médula ósea:** En el adulto esta es la principal fuente de células progenitoras, incluyendo progenitoras endoteliales que pueden contribuir a la revascularización y a las células mesenquimales, que pueden diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblastos.

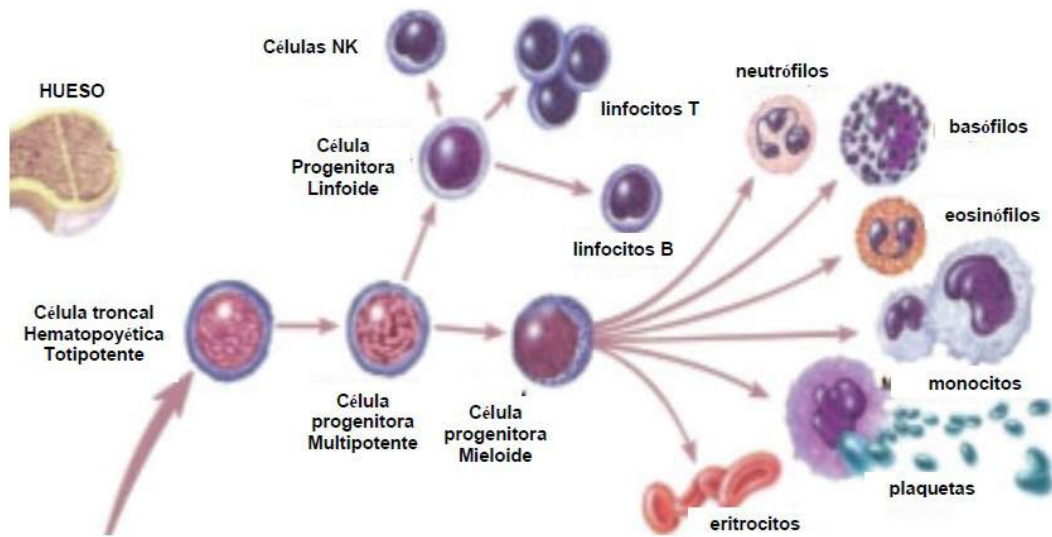
**Progenitoras de cordón umbilical:** El conocimiento que las células del CU tienen características de crecimiento, capaces de producir una población a largo plazo de células hematopoyéticas, llevó a la idea de obtener células de la placenta y de la vena umbilical después del parto para el trasplante alogénico. El primer trasplante

allogénico exitosos, se realizó en 1989, para tratar un niño con anemia de Fanconi y se usó como donante su hermana HLA idéntica<sup>8</sup>

Se ha demostrado que el CU de recién nacidos tanto a término como pre-término, contiene un número determinado de progenitores hematopoyéticos inmaduros y comprometidos, capaces de producir el implante en niños y adultos; pero su volumen es limitado, lo que hace que el número total de células madre sea pequeño y la recuperación hematológica lenta. Inicialmente se usó solo en niños, por la menor dosis celular necesaria, pero actualmente se está utilizando con éxito en adultos.<sup>9</sup>

**Progenitoras de sangre periférica:** Actualmente se prefiere utilizar células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, ya que el injerto (sobre todo el de plaquetas) es más rápido y, en teoría, existe menor contaminación de células tumorales. Además, se ha demostrado que el utilizar células obtenidas por aféresis reduce la toxicidad del trasplante. La primera observación de que se podían encontrar células progenitoras en torrente sanguíneo fue en pacientes que se recuperaban de la quimioterapia, esto condujo a la idea de que estas células podían ser forzadas a salir de la MO y ya en torrente sanguíneo, podrían ser recolectadas por un proceso de aféresis para ser usadas en el trasplante. Existen diferentes agentes capaces de movilizar células progenitoras, todos con diferente cinética y eficiencia. En la actualidad el G-CSF es el movilizador de células progenitoras hematopoyéticas más

utilizado en la clínica con base en el potencial, la previsibilidad y la seguridad <sup>10</sup>.



**Figura 1.** Diferenciación de células troncales hematopoyéticas a células progenitoras, las cuales darán origen a distintas células maduras.

Actualmente en la mayoría de los centros de atención pediátrica en el mundo, dedicados a pacientes con necesidad de resolver enfermedades oncológicas, hematológicas, deficiencias inmunológicas y reumatológicas, utilizan como modalidad terapéutica el Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH), tratamiento que requiere de un equipo multidisciplinario, y de una infraestructura capaz de dar soporte a cada programa, y que incluya todas las herramientas necesarias para cada una de las etapas del trasplante: estudio del receptor, estudio del donador y seguimiento del Injerto. En todo el proceso se realizan varias mediciones, iniciando con la determinación de la dosis de células mononucleares, la enumeración y dosis de las células CD34 (+) que se infundirán al paciente cuya dosis depende de la toma del injerto, posteriormente se realizan citometrías hemáticas para monitoreo del requerimiento transfusional y en espera de datos hematológicos que nos indiquen recuperación en la hematopoyesis.

Durante todas las etapas en la evolución del TCPH, está descrito que el éxito del trasplante no solo depende de la cantidad de células CD 34 (+) infundidas, sino también del estado del estroma en la médula ósea, y de las células contenidas en este microambiente responsables de la producción de sustancias químicas que favorezcan el reestablecimiento de la hematopoyesis. Así como esta demostrada la existencia de sustancias inhibitoras y

que se producen principalmente como resultado de procesos inflamatorios consecuentes a complicaciones sobretodos secundarias a la quimioterapia de condicionamiento. Sin embargo, actualmente solo las cuentas de Neutrófilos nos dan la pauta de seguimiento temprano para el injerto.

Desde el descubrimiento de la recuperación de la hematopoyesis en ratones a los que se les había aplicado una dosis sub letal de radioterapia, usando rescates con células progenitoras hematopoyéticas, ha sido esencial la búsqueda de la expansión de estas células, para mejorar los resultados del trasplante Hematopoyético.<sup>11</sup>

Como consecuencia de estas investigaciones, se han encontrado múltiples factores, que cuales intervienen en los procesos de proliferación, diferenciación y maduración celular, que en conjunto es la hematopoyesis.

## **MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS**

Como ya se mencionó, hoy en día la sangre periférica movilizada es la principal fuente de células progenitoras hematopoyéticas, tanto en trasplantes autólogos como en alogénicos, pero debido a que la cantidad de células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica es muy poca (menos del 0.1% de las células nucleadas), se emplean diferentes métodos, entre ellos el uso de citocinas recombinantes que inducen la salida d éstas de la médula ósea al torrente sanguíneo, para así, por medio de un proceso llamado de aféresis, poder colectarlas para su posterior infusión en el paciente. La movilización es un proceso iniciado por estrés que induce la activación de los neutrófilos y de los osteoclastos ya sea inducidos por la quimioterapia o /y por repetida estimulación con citocinas como el factor estimulador de colonias granulocíticas, resultando esto en la disociación de uniones membranales de las células progenitoras con el estroma, la proliferación de células progenitoras y la activación y/o degradación de moléculas de adhesión<sup>12</sup>

El mecanismo por el cual el G-CSF moviliza las CPH cd34+ de MO hasta la SP, involucra una serie de pasos: primero, aumento en la proliferación de las CPH, seguido del egreso de la MO. El aumento en la proliferación se ha demostrado con citocinas como GM-CSF,



que incrementan transitoriamente adhesividad de las CPH cd34+ al estroma de la médula ósea, lo cual aumenta el estímulo proliferativo. La salida de las CPH de MO a sangre periférica es un proceso que abarca varios mecanismos. Una de las hipótesis es la alteración de las interacciones de las progenitoras con el estroma de la médula ósea. Los análisis de las células mononucleares de sangre periférica movilizadas con factor estimulador de colonias granulocíticas revelan disminución de la expresión de la integrina VLA-4 (very late antigen 4) que normalmente se une firmemente a su ligando VCAM-1 y a un fragmento de fibronectina de la matriz extracelular. Otra molécula en la que se observa una marcada disminución es el LFA-1 (leucocyte functional antigen 1) y sus ligandos. Estas moléculas se expresan en la mayoría de las CPH y participan en la unión de éstas al estroma medular que expresan sus ligandos, VCAM-1, ICAM-1 e ICAM-2 para LFA-1. El G-CSF puede iniciar la movilización a través de los neutrófilos, mediante la secreción de gelatinasa B, rompiendo moléculas de la matriz extracelular y debilitando las interacciones adhesivas entre las células progenitoras y las células del estroma.<sup>13</sup>

### **Hematopoyesis:**

La producción de células sanguíneas –hematopoyesis- es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (ejemplo, eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, en donde una intrincada red de células estromales y sus productos, regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras. Alteraciones en la hematopoyesis pueden conducir a situaciones de sobreproducción de células hematopoyéticas (como las leucemias), o una producción deficiente de las mismas (como la anemia aplásica). El estudio de la hematopoyesis tiene implicaciones, no solo de tipo biológico, sino en el campo de la hematología clínica y de la medicina regenerativa.<sup>14</sup>

Diariamente se producen en nuestro organismo cantidades extraordinarias de células sanguíneas. Por ejemplo, en un adulto de 70 kg de peso, se producen  $2 \times 10^{11}$  eritrocitos,  $2 \times 10^{11}$  plaquetas y  $7 \times 10^{10}$  granulocitos.<sup>15</sup> Lo anterior compensa la pérdida diaria de dichas células de tal manera que, en condiciones normales, los niveles en circulación de eritrocitos, leucocitos y plaquetas se mantienen constantes. El proceso a través del cual se generan las células de la sangre se denomina hematopoyesis y ocurre bajo condiciones muy específicas en el interior del hueso, en la médula ósea.<sup>16</sup> La hematopoyesis es un proceso extraordinariamente complejo en el que intervienen una gran variedad de tipos celulares y el cual es regulado por diversos factores. Hoy en día, y gracias al avance en

diversos campos de la biología –como la inmunología, la genética molecular, el cultivo celular, la microscopía electrónica y la bioquímica, por nombrar algunos- se ha logrado obtener un panorama muy amplio y detallado de este proceso.

## **ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO**

El sistema hematopoyético puede ser dividido con base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que de él se generan. De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimentos.

El primer compartimiento corresponde a las células más primitivas, llamadas células troncales hematopoyéticas (CTH). Estas células tienen dos características funcionales que las distinguen: son capaces de auto-renovarse (al dividirse, por lo menos una de las células hijas conserva las propiedades de la célula madre) y son multipotenciales (pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos). Las CTH corresponden al 0.01% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea, por lo que su estudio puede verse limitado desde el punto de vista práctico. Sin embargo, gracias a los estudios realizados hasta ahora sabemos que estas células tienen una morfología linfoblastoide, las cuales expresan antígenos como CD34, CD90, CD117 y CD133, y que carecen de la expresión de antígenos de linajes específicos, como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD38, CD45, CD57, CD71, Glicoforina A, etc.<sup>17</sup> Las CTH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). Las CPH constituyen el segundo compartimiento del sistema hematopoyético, el cual corresponde a <0.5% del total de células de la médula ósea; comparten ciertas características inmunofenotípicas con las CTH, como la expresión del antígeno CD34, sin embargo, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje al que pertenecen.<sup>18</sup> Las CPH dan lugar a células precursoras reconocibles por su morfología (tercer compartimiento), las cuales, a pesar de ser inmaduras, pueden ser identificadas en frotis de médula ósea a través de microscopía de luz. Las células precursoras constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar, generan a las células sanguíneas circulantes (cuarto compartimiento).

### **Progenitores Megacariocíticos**

En relación a los progenitores megacariocíticos, una clasificación jerárquica ha sido desarrollada con base en sus potenciales de proliferación y la expresión de c-mpl

(el receptor de trombopoyetina) en su superficie. Los progenitores más tempranos son definidos como células formadoras de brotes megacariocíticos (meg-BFC) y son capaces de formar colonias de alrededor de 100 células, después de 21 días de cultivo. Estos meg-BFC dan lugar a células formadoras de colonias de megacariocitos (meg-CFC) que representan a los progenitores tardíos, capaces de formar pequeñas colonias después de 12 días de cultivo. Estos meg-CFC a lo largo de 5 a 7 días, tienen diversas endomitosis (replicación del ADN sin división nuclear), que conducen a la formación de precursores poliploides denominados megacariocitos inmaduros, quienes una vez que desarrollan un citoplasma maduro dan lugar a megacariocitos maduros, que eventualmente darán lugar a las plaquetas. A lo largo de todo el proceso de diferenciación Megacariocítica, el elemento regulador clave es la trombopoyetina, ya que promueve el crecimiento de los meg-CFC, incrementando sustancialmente la tasa de endocitosis y estimulando la diferenciación a megacariocitos maduros. Algunas otras citocinas involucradas

con este proceso son IL-3, IL-6 e IL-11.

### **Progenitores Granulo-Monocíticos**

Los progenitores mieloides por su parte incluyen unidades formadoras de colonias granulomonocíticas (del inglés CFU-GM), que a su vez dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (del inglés CFU-G) y unidades formadoras de colonias monocíticas (del inglés CFU-M). Una vez encaminadas en la vía de diferenciación, las CFUG dan lugar a mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos y células maduras (eosinófilos, neutrófilos y basófilos). Mientras que las CFU-M dan lugar a monoblastos, promonocitos, monocitos, y finalmente macrófagos. A lo largo de toda la ruta de diferenciación, las células de linaje mieloides son reguladas por un amplio número de citocinas entre las que se encuentran: el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF), la interleucina-3 (IL-3), IL-6 y el factor de células seminales (SCF), entre muchas otras. Los factores estimuladores de colonias son capaces de inducir la sobrevivencia y proliferación de células progenitoras hematopoyéticas, conduciéndolas hacia linajes específicos (macrofágico, megacariocítico, neutrofilico), dependiendo de la combinación de factores empleados. De esta forma, por ejemplo, el G-CSF tiene un efecto más específico para la diferenciación a linaje granulocítico, en donde, además de inducir la diferenciación, incrementa la funcionalidad de las células maduras.

Aunado a lo anterior, se sabe que citocinas como el SCF y el Flt-3L por si solos son capaces de estimular el crecimiento de células troncales y progenitoras Hematopoyéticas, así como de los linajes linfoides y mieloides, aunque tienden a tener un mayor efecto cuando actúan en combinación con otros factores de crecimiento, como GM-CSF, IL-3, IL-6, G-CSF, TPO y EPO. Cabe mencionar que además de las citocinas estimuladoras de la mielopoyesis existe también un número considerable de citocinas que la inhiben, tal y como sucede con el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante-  $\beta$

(TGF- $\beta$ ), la proteína inflamatoria de macrófagos- 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) y los interferones (IFN), entre otras. Estas moléculas son capaces de disminuir los niveles de células troncales y progenitoras hematopoyéticas mediante la inhibición de su proliferación; dicha inhibición puede ocurrir de manera directa -por inducir la disminución de la expresión de receptores de moléculas estimuladoras o a través del efecto sinérgico entre dos o más factores, causando un efecto supresor en la proliferación y formación de colonias hematopoyéticas.

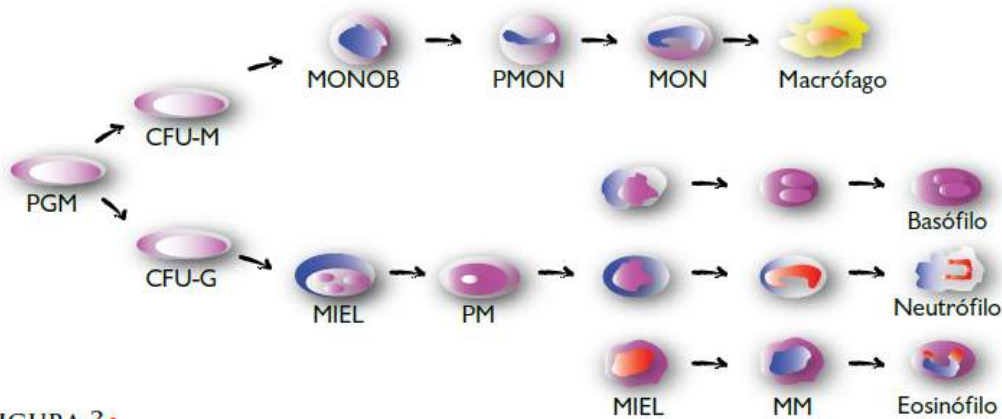


FIGURA 3 •

*Diferenciación Mieloide. Los progenitores gránulo-monocito o Unidades Formadoras de Colonias Gránulo-monocíticas (CFU-GM), dan lugar Unidades Formadoras de colonias Granuloíticas (CFU-G) y Unidades Formadoras de Colonias Mielocíticas (CFU-M). Una vez encaminadas en la vía de diferenciación las CFU-G dan lugar a mieloblastos (MIEL), promielocitos (PM), mielocitos (MIEL), metamielocitos (MM) y células maduras (basófilos, neutrófilos y eosinófilos). Mientras que las CFU-M dan lugar a monoblastos (MONOB), promonocitos (PMON), monocitos (MON), y finalmente macrófagos.*

## INTERLEUCINAS

Las citocinas son una familia única de factores de crecimiento. Se secretan principalmente por los leucocitos, las citocinas estimulan tanto la inmunidad humoral como la inmunidad celular, así como también la activación de células fagocíticas. Las citocinas que son secretadas por los linfocitos se llaman **linfocinas**, mientras que las que son secretadas por los monocitos o los macrófagos se llaman **monocinas**. Una gran familia de citocinas es producida por varias células del organismo. Muchas de las linfocinas también tienen el nombre de **interleucinas (ILs)**, debido a que estas no son solamente secretadas por

leucocitos sino son capaces también de afectar respuestas celulares en los mismos leucocitos. Específicamente, las interleucinas son factores de crecimiento dirigidas a células de origen hematopoyético.

Tabla 1. Principales citocinas relacionadas con la hematopoyesis.

<b>Citocina</b>	<b>Efecto Biológico</b>	<b>Célula Productora principal</b>
<b>IL1</b>	<b>Junto la IL3 co-estimula células primitivas</b>	<b>Linfocitos T, Macrófagos</b>
<b>IL 2</b>	<b>Estimula factor de crecimiento de linfocitos T y linfocitos B.</b>	<b>Linfocitos T</b>
<b>IL5</b>	<b>Estimulación de colonias de eosinófilos</b>	<b>Linfocitos TH2</b>
<b>IL 6</b>	<b>Producción de inmunoglobulinas, producción de plaquetas</b>	<b>Fibroblastos, células T</b>
<b>IL 11</b>	<b>Estimula células B</b>	<b>Fibroblastos de la médula</b>
<b>GM CSF</b>	<b>Estimula colonia de granulocitos</b>	<b>Fibroblastos, células endoteliales y monocitos</b>
<b>TPO</b>	<b>Megacariopoyesis</b>	<b>Células endoteliales, megacariocitos</b>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>Inflamación, induce apoptosis</b>	<b>Linfocitos T y B, macrófagos</b>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Inmunomodulación antiproliferativa</b>	<b>Linfocitos T, células NK</b>

## LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS

La leucemia linfoblástica aguda es el padecimiento maligno más frecuente a nivel mundial entre los 0 y 18 años de edad. En México y el resto del mundo, la máxima expresión está entre los 3 y 7 años de edad.<sup>3</sup> Sin duda en los extremos de la edad pediátrica también se presenta esta enfermedad. Este grupo de enfermedades se observa una tasa alta de supervivencia prolongada, la cual se traduce en curación en 75% de estos niños. Dentro de este contexto, es necesario destacar que estos resultados se observan siempre partiendo de la base de que la piedra angular del éxito para alcanzarlos es precisamente con la quimioterapia.<sup>19</sup> Por supuesto no hay que olvidar que para la adjudicación de un tratamiento en particular, se requiere identificar los factores de riesgo para poder ofrecerles a estos niños una quimioterapia óptima.

El problema que es necesario plantear es cómo resolver los casos de aquellos niños que llegan a presentar una segunda recaída. En términos específicos, del 70 a 80% de los pacientes con LLA se mantienen en una primera remisión con cualquiera de los diferentes esquemas terapéuticos actuales. A pesar de este éxito, cuando estos mismos pacientes recaen, la tasa de supervivencia baja de manera significativa aunque utilicen esquema intensos.

Aun cuando los resultados en las series iniciales no fueron tan prometedores por diferentes grupos de investigadores dedicados a esta área de la medicina, no se tardó en documentar éxitos definitivos que mostraron que el TCPH constituye un procedimiento terapéutico definitivo para una serie de neoplasias y padecimientos benignos que han mejorado las expectativas de supervivencia de niños con estos procesos mórbidos. Dentro de los más importantes resultados favorables que el paso del tiempo ha consolidado están los del trasplante de células progenitoras en leucemias linfoblástica agudas. Es indiscutible que cuando se habla de TCPH en LLA se parte de la base de que el paciente se encuentre en remisión hemática completa, definido como la ausencia de datos clínicos y de laboratorio de enfermedad, en ningún sitio de la economía del hospedador. Esto debe estar fuertemente sustentando con estudios por aparatos y sistemas y por un estudio en médula ósea, determinando la ausencia de linfoblastos por citología y citometría de flujo, así como un líquido cefalorraquídeo sin señales de linfoblastos a través de un estudio de citocentrífuga.

La mayoría de los centros están de acuerdo que son indicaciones iniciales para TCPH pacientes que presenten una leucemia de células con marcador positivo para cromosoma Ph+, hiperleucocitosis al momento del diagnóstico, pacientes menores de un año con la traslocación 11;14, o aquellos pacientes con poca respuesta inicial al tratamiento con quimioterapia. Existen varios estudios multicéntricos que han comparado al TCPH con los esquemas de poliquimioterapia para este grupo de pacientes, y los resultados han mostrado que la supervivencia libre de enfermedad fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que se sometieron a TCPH.

Uno de los factores pronósticos que ha alcanzado una importancia primordial al momento de la decisión de trasplantar a un paciente con LLA es la enfermedad mínima residual al día 14 de la inducción a la remisión.<sup>1</sup>

La leucemia Mieloblástica aguda representa 5 al 10% de las leucemias durante la infancia. A diferencia de la LLA, donde la supervivencia libre de evento reportada por grupos colaborativos es tan alta como del 85%, para la LMA ésta continua siendo pobre. El TCPH ha contribuido en los últimos años a elevar la supervivencia global de los pacientes afectados por esta enfermedad. Las indicaciones precisas para el TCPH en pacientes pediátricos con LMA siguen siendo controvertidas, sin embargo con la clasificación citogenética, aunada a la clasificación de la FAB, cada día se conoce mejor el grupo de pacientes que se verán beneficiados por este procedimiento. Los lineamientos actuales mencionan que cualquier paciente con LMA en remisión completa que no tenga la traslocación 8:22, inversión del cromosoma 16, o pacientes con variedad M3 o M7 más síndrome de Down, y que además cuenten con un hermano compatible, son candidatos a TCPH.

En relación a nuestro estudio en medición de citocinas, hay un reporte de estudio donde incluyeron 6 pacientes adultos con trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (2 pacientes con leucemia mieloide crónica, 1 leucemia mieloide aguda, 1 LNH de células del manto, 1 LNH células periférico, 1 con anemia aplásica) y 1 paciente con trasplante singénico (LLA) fueron evaluados las citocinas (TH 1, TH 2 y TH 17) en los días +30, +60, +100 y +180, con la finalidad de correlacionar el desarrollo clínico de la enfermedad injerto contra huésped, la recaída y la supervivencia global de los pacientes.

Estos autores concluyeron que los niveles de TNF $\alpha$  tiene una papel importante en el desarrollo y severidad de EICH pero no así en el injerto del paciente y que no solo es necesario infundir una buena dosis celular de CD34+ si no que las células sean capaces de responder frente al estímulo policlonal con producción de citocinas de IL2 e IFN $\gamma$  para evitar infecciones por microorganismos oportunistas y pérdida de injerto. Se discute en esta tesis que la hematopoyesis no solo necesita de la célula progenitora sino de otros factores tales como la interacción con otras estirpes celulares así como la producción de citocinas. La diferenciación de las estirpes celulares es dependiente de la producción de citocinas y si esta se encuentra abatida pues está faltando ese estímulo para la diferenciación celular y una segunda explicación para tener falla en el injerto es que existen otras citocinas pueden inhibir la diferenciación celular tales como FNT  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$  y TGF  $\beta$  ya que si se encuentran sobre-expresadas influyen de manera negativa en el establecimiento del injerto.

20

En otro estudio se analizaron comparativamente los niveles de citocinas producidos durante la nefrectomía laparoscópica y abierta de donante vivo para trasplante, como marcadores de agresión tisular dependiendo del tipo de técnica quirúrgica empleada y su influencia sobre el síndrome de isquemia reperfusión y la función el injerto.

Se realizó sobre un modelo de autotrasplante renal (TR) en 30 cerdos divididos en dos grupos de 15 animales cada uno: a un grupo se le practicó nefrectomía abierta y al segundo grupo nefrectomía laparoscópica. Los niveles de IL-2, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral (TNF) fueron significativamente menores durante la nefrectomía laparoscópica: 6,8 $\pm$ 0,6 vs 13,9 $\pm$ 1,1 pg/ml para IL-2, 46,2 $\pm$ 2,3 vs 84,4 $\pm$ 2,5 pg/ml para IL-6, 26,1 $\pm$ 2,4 vs 92,8  $\pm$  12,6 pg/ml para IL-10, y 17,6  $\pm$  2,1 vs 38,5 $\pm$ 4,8 pg/ml para TNF. No existió asociación entre el flujo sanguíneo renal (FSR) y los niveles de citocinas durante la fase de extracción: IL-2 (p= 0,498), IL-6 (p=0,117), IL-10 (p=0,081) y TNF (p=0,644). Sin embargo, existió correlación entre los niveles de IL-10 y el descenso de FSR al final del autoTR: (R<sup>2</sup> 0,48; p= 0,02). **La función inicial del injerto** se correlacionó con el FSR y los niveles de IL-2 durante la nefrectomía (R=0,831, R<sup>2</sup>= 0,691, p= 0,025), y el FSR de reperfusión (R= 0,784, R<sup>2</sup>= 0,614, p<0,0001). La función tardía del injerto se correlacionó con el FSR postTR (R= 0,537, R<sup>2</sup> = 0,289, p= 0,002) y el nivel de IL-2 durante la extracción (R=0,685, R<sup>2</sup>= 0,469, p= 0,015).

Como conclusión los niveles de citocinas fueron significativamente superiores en los animales sometidos a nefrectomía abierta que a nefrectomía laparoscópica. Los valores altos de FSR durante la extracción y el TR, y los niveles elevados de IL-10 durante el TR, mejoraron la función del injerto en el postTR inmediato. Valores de FSR bajos y niveles elevados de IL-2 durante la extracción afectaron negativamente a la función del injerto durante la primera semana postrasplante.<sup>21</sup>



Pratt <sup>22</sup> reportó 153 pacientes que recibieron un TCPH. Se midieron interleucinas al día 7 y 28. Pacientes con niveles bajos de IL 15 (menor a 30.6ng/L) tuvieron 2.7 más veces riesgo de presentar una EICH crónica vs pacientes con IL15 mayor a esta cifra. Estos pacientes con niveles bajos no presentaron mayor recaída y el número de infecciones por paciente no fue significativo vs pacientes con niveles altos.

Cabe mencionar que hasta el momento, el único valor que tenemos para evaluar si se tiene injerto o no, es por medio de la cuenta de neutrófilos, que debe ser mayor de 500 NT en 3 días consecutivos y sin estimulación de factor de granulocitos. Y posterior a este pues necesario mandar la muestra para corroborar si hay injerto por medio del quimerismo.

Por lo que consideramos importante saber si antes de que se tenga el recuento de 500NT por 3 días, conocer y mediar las citocinas involucradas en los pacientes que si injertan vs lo que no injerta, y así poder tomar acciones para la evolución de estos pacientes.

## **1.2 Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los niveles de las citocinas promotoras e inhibitoras de la hematopoyésis en los pacientes pediátricos con leucemias agudas sometidos a TCPH de donador relacionado en forma basal, en el día de la infusión y hasta los datos de injerto celular?

## **1.3 Planteamiento del problema:**

La frecuencia de la falla del Injerto en el Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, es del 25-40% aproximadamente. Esta variación se debe a las diferentes fuentes de las células progenitoras, el método de condicionamiento, y la terapia inmunosupresora utilizada, situación que se refleja en la supervivencia de este grupo de pacientes. No existe hasta el momento, un método cuantitativo por el cual se monitoriza la evolución de las Células Progenitoras Hematopoyéticas infundidas.

#### **1.4 Justificación:**

Conocer los valores de las citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyesis en forma basal antes del régimen de condicionamiento y en la infusión celular dando un seguimiento de estos factores, nos permitirá actuar de manera anticipada a una falla del injerto, así como predecir la adecuada evolución, aún antes de los datos hematológicos que indican éxito del trasplante.

#### **1.5 Objetivo General:**

Medir los niveles de citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyesis en forma basal, en el tiempo de infusión y durante la evolución hasta tener datos de injerto del trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.

##### **1.5.1 Objetivos Específicos:**

-Realizar una cinética de niveles de citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyesis en pacientes pediátricos sometidos a TCPH en forma basal, en la infusión y en los días +3, +7, +11, +14, +17 y +21 posterior a la infusión.

-Comparar los niveles de citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyesis en pacientes pediátricos sometidos a TCPH en forma basal, en la infusión y en los días +3, +7, +11, +14, +17 y +21 posterior a la infusión.

## **1.6 Hipótesis:**

Los niveles de citocinas inhibidoras de la hematopoyesis serán estadísticamente mayores que los niveles de las citocinas promotoras de la hematopoyesis en pacientes pediátricos sometidos a TCPH en forma basal, en la infusión y en los días +3, +7, +11, +14, +17 y +21 posterior a la infusión.

## **2: Características de los pacientes**

### 2.1 Criterios de Inclusión:

- Pacientes con indicación de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas
  - 2.1.1 Enfermedades Oncológicas

### 2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes que fallezcan antes de que se demuestre injerto.

### 2.3 Criterio de eliminación

- Cuando sea retirado el consentimiento informado para participar en este estudio.

## METODOLOGIA

### **Diseño del estudio**

Se planea un estudio cohorte que incluirá a todos los pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de la Unidad de Trasplante del HIMFG de marzo 2012 al 30 enero 2014 en el que realizaremos la medición del panel de citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyesis en muestras de sangre periférica de los pacientes con leucemias agudas sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Las muestras de sangre periférica serán tomadas de la siguiente forma; una medición basal antes de la quimioterapia de condicionamiento para el trasplante., después monitorizaremos el comportamiento de los niveles de las citocinas al día 0, +3, +7, +11, +14, +17 y +21.

Se calculará el incremento o decremento a partir del delta de cambio.

La toma de muestra será en sangre periférica distribuida de la siguiente forma:

3mL en EDTA y 3mL de suero.

La sangre con EDTA se utilizara para la medición de las citocinas por PCR en tiempo real y el suero para medición de la trombopoyetina y eritropoyetina por quimioluminiscencia en el equipo i1000 de ABBOT.

El paciente post-transplantado se mantendrá internado en la Unidad de trasplante de Células Progenitoras hematopoyéticas hasta definir el resultado del trasplante y una vez egresado se dará seguimiento conforme al protocolo de Trasplante.

### **Descripción de los pacientes del proyecto:**

Pacientes pediátricos con leucemias agudas sometidos a trasplante alogénico de donador relacionado, se realizaran los estudios pre trasplante en el paciente y donador de las células progenitoras hematopoyéticas.

### **Tamaño de la muestra**

Se realizara estadística descriptiva, expresando los datos como promedio, desviaciones estándar para variables con distribución normal y medianas con rangos para variables con distribución no paramétrica.

Realizaremos comparación entre los niveles de citocinas hematopoyéticas entre los pacientes con injerto y sin injerto con pruebas paramétricas o no paramétricas si no cumplen los supuestos de normalidad.

$$\frac{((pq+rs)*K)}{(p-q)^2}$$

Para una proporción (r) del 25% de incremento  
o variación en las citocinas  
7 pacientes por grupo

p= frecuencia relativa del resultado en el grupo 1

q=frecuencia relativa de sujetos sin el resultado (1-p)

r=frecuencia relativa del resultado en el grupo 2

s=frecuencia relativa de sujetos sin el resultado (1-r)

Za= dos colas (1.96.).

Zb= Constante

K= Son los valores de Za y Zb sumados y elevados al cuadrado

Poder 90%

### Variables

Se analizarán las siguientes variables: edad, género, método de acondicionamiento, inmunosupresores, toma de injerto por medio de la cuenta de neutrófilos y el quimerismo.

### VARIABLES Y DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION
INDEPENDIENTE				
Edad	El tiempo que ha vivido un ser vivo	El tiempo cronológico desde que el individuo nace hasta el momento	Cuantitativa Razón	Se medirá en años y meses cumplidos

		en que se hace el estudio		
Sexo	Propiedad según la cual pueden clasificarse los organismos de acuerdo con sus funciones reproductivas	El género al que pertenece la población en estudio	Cualitativa Nominal Dicotómica	Masculino  Femenino
Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas	Infusión de células sanguíneas sanas a un paciente con una enfermedad.	Infusión de precursores hematopoyéticos a un receptor que ha sido previamente condicionado para recibir el injerto.	Cualitativa Nominal	Alogénico  No alogénico  Autólogo
Quimerismo		Presencia de células linfo-hematopoyéticas no propias del receptor que aparecen como resultado de un trasplante.	Cualitativa Ordinal	Completo  Parcial  Incompleto
Citocinas promotoras de la hematopoyésis	Interleucinas que promueven la hematopoyesis	Son un grupo de proteínas que son sintetizadas por leucocitos, células endoteliales, células del timo y la médula ósea. Su principal función es regular el sistema inmunitario.	Cuantitativa  Continua	Nanogramos
Citocinas inhibitoras de la hematopoyésis.	Interleucinas que inhiben la hematopoyesis	Son un grupo de proteínas que son sintetizadas por leucocitos, células endoteliales, células del timo y la médula ósea. Su principal función es regular el sistema inmunitario.	Cuantitativa  Continua	Nanogramos

<b>DEPEENDIENTE</b>				
Injerto celular	Es el prendimiento de las células infundidas.	Es la cuenta de neutrófilos mayor de 500 en tres días consecutivos y sin la aplicación de factor estimulante de granulocitos.	Cualitativa Nominal  Dicotómica	Si  No
<b>VARIABLES CONFUSORAS</b>				
Régimen de acondicionamiento	Preparación del paciente para recibir la infusión celular	Procedimiento en el cual se utiliza dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia para destruir las células neoplásicas o alteradas del paciente enfermo. Tiene tres objetivos principales: 1) Crear espacio para las nuevas células a infundirse, 2) Inmunosupresión posterior a la infusión celular y 3) erradicar la enfermedad principal del paciente.	Cualitativa  Ordinal	Intensidad reducida  Convencionales  Alta intensidad
Profilaxis para enfermedad injerto contra huésped	Son medicamentos posteriores al trasplante para evitar una reacción de las células infundidas contra el huésped.	Medicamentos inmunosupresores para prevenir una serie de eventos inmunológicos entre el tejido injertado y el receptor, activados por sus diferencias antigénicas, lo cual produce diversas manifestaciones clínicas inflamatorias y/o fibrosantes desde leves a muy severas, que pueden incluso comprometer la vida del paciente	Cualitativa  Ordinal	Agudo  Crónico



## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

Las muestras se procesaran en las áreas de biología molecular del laboratorio clínico.

### Reactivos:

- 1.- Kit de extracción de DNA marca Roche.
- 2.- kit para la medición de interleucinas marca Roche
- 3.- Kit para la determinación de trombopoyetina y eritropoyetina en suero.

### Material:

- 1.- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- 2.- Micropipetas de 10 a 200 uL
- 3.-Tubos con EDTA de 4mL
- 4.- Tubos sin anticoagulante

### Procedimiento:

Para la medición de las ínter leucinas (Flt3, IL6, L3) y factor de necrosis tumoral se utilizaran 3 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA, se toma una alícuota de 400 µl de sangre total, la muestra restante se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos y se toma una alícuota de 400 µl de plasma. Para la extracción de ADN se utiliza el equipo MagNA Pure Compact®; con un juego de reactivos Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Molecular Diagnostics) utilizando los programas de extracción de ADN a partir de

400 µl de sangre total con un volumen de elusión de 200 µl y el programa de ácidos nucleicos totales a partir de 400 µl de plasma con un volumen de elusión de 100 µl.

Para la detección y cuantificación de las citocinas promotoras e inhibidoras de la hematopoyesis: La mezcla de reacción a un volumen final de 20 µl, utilizando 5.0 µl de ADN extraído de cada una de las muestras. Las mezclas de reacción serán sometidas a un programa de desnaturalización de la muestra y activación de la enzima a una temperatura de 95° C por 10 minutos. Seguido de un programa de 50 ciclos de amplificación por 5 segundos a 95° C, 10 seg. a 60° C, 15 seg. a 72° C. Una curva de desnaturalización para identificar el producto de la PCR derivado del ADN de las citocinas, con un programa de 1 ciclo por 20 segundos a 95° C, 20 seg. a 40° C, 0 seg. a 85° C con un incremento de la temperatura de 0.2° C/seg y en modo de adquisición de fluorescencia continuo. El amplificado es diseñado para tener una temperatura específica de desnaturalización (Tm) de 68 °C. En todos los casos se seguirán las instrucciones del fabricante.

Para los niveles de trombopoyetina y eritropoyetina: se utilizara un ensayo inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscencia en fase solida.

## **CONSIDERACIONES ETICAS**

Este estudio se efectuará de acuerdo a la Declaración de Helsinki del año 2000 y al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

Los investigadores participantes son especialistas en hematooncología con una preparación en Transplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas y por el laboratorio Clínica un especialista con especialidad en Patología Clínica.

La información proporcionada por el paciente y sus familiares será de manejo exclusivo de los investigadores y se mantendrá en reserva en el expediente clínico y formatos de recolección de datos del estudio.

En el estudio sólo participarán los pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado por escrito; los pacientes o sus familiares conservarán copia del mismo y se mantendrá la disponibilidad para atender sus dudas o preguntas en el momento que lo requieran.

El estudio aportará información valiosa, actualmente no disponible sobre la hematopoyesis in vivo en el trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas.

### **CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD**

Los lugares de procesamiento de las muestras serán en las áreas de biología molecular y citometría de flujo del laboratorio clínico. Las muestras de sangre serán recolectadas con las técnicas de asepsia y antisepsia habituales. Los materiales de laboratorio y RPBI utilizados en el proyecto serán adecuadamente procesados para su descontaminación o desecho por oficio y recogidos por el departamento de control de medio ambiente de nuestra institución para su adecuada disposición final.

### **AVANCES**

#### **PACIENTES**

<b>Paciente</b>	<b>Edad</b>	<b>Enfermedad oncológica</b>	<b>Criterio de TCPH</b>	<b>Tipo de TCPH</b>	<b>Parentesco del donador</b>	<b>Edad del donador</b>	<b>peso del donador</b>
1	8	LMA	LMA M4 en 2da RC	ALO	Hermano	3	13.5
2	8	LLA	LLA 2da RC	ALO	Hermano	5	17

3	14	LLA	LLA cr Ph+	ALO	Hermana	14	70
4	16	LMA	LMA 2da RC	ALO	Hermana	18	75
5	15	LLA	LLA 3ra RC	ALO	Hermana	21	50
6	5	LLA	LLA 2da RC	ALO	Hermano	7	22
7	9	LLA	LLA 2da RC	ALO	Hermana	11	33
8	12	LLA	LLA 2da RC	ALO	Hermana	5	15
						<b>Media</b>	<b>Media</b>
						10.5(3-21)	36.9 (13.5-75)

Tabla de datos II

Pac	Dosis cel X 10 <sup>6</sup>	injer t o si o no	Dias que tardó injertar	Resultad quimeris mo	EIC H	Grado EICH	Estado actual		Causa de muerte
							Vivo injertad o	Muerto injertad o	
1	6	Si	14	Completo	no		X		
2	8.5	Si	15	Completo	Si	Grado 1	X		
3	3.5	Si	10	Completo	No		X		

4	2.2	Si	18	Completo	Si	Grado IV		X	Choque séptico/EICH agudo
5	6.9	Si	10	Completo	Si	Grado II		X	Neumonitis intersticial
6	6.4	Si	16	Completo	No			X	Choque cardiogenico
7	6	Si	19	Completo	Si	Grado II	X		
8	2.2	Si	20	Completo	Si	Grado II		X	Choque séptico Neumonía Influenza B
	Media		Media						
	5.2		15.2						
	±		(10-20)						
	2.30								

#### ANALISIS PRELIMINAR

EICH		valor de p
Días de injerto	si no	0.304
Dosis celular	si no	0.945
Neutrófilos al injerto	si no	0.56
Muerte		
Días al injerto	si no	0.616

Num. de  
neutrófilos al  
injerto si no 0.139

Determinación de  
citocinas

Pendiente...

## REFERENCIAS

1. Vela-Ojeda J, Ruiz-Esparza MA, Borbolla-Escoboza JR. 2008. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Ed. Prado. 1a. ed. México. Pp. 73-123, 485-515.
2. Aejaz HM, Aleem AK, Parveen N, Khaja MN, Lakshmi NM, Habibullah CM. 2007.
3. Fine A. 1994. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview. **Can Med Assoc J.** 9:1261-1267.
4. Wiener LS, Steffen-Smith E, Fry T Wayne A. 2007. Hematopoietic stem cell donation in children: A review of the sibling donor experience. **J Psychosoc Oncol.** 25:45-66.
5. Chao NJ, Blume KG. 1990. Bone marrow transplantation. **West J Med.**  
i. 152:46-51.

6. Léger CS, Nevill TJ. 2004. Hematopoietic stem cell transplantation: a primer for the primary care physician. **Can Med Assoc J.** 170:1569-77.
7. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D. 2006. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en México. **Acta Méd Gpo Ángeles.** 4:25-28.
8. Jaime Fagundo JC, Dorticós Balea E, Pavón Morán V, Cortina Rosales L. 2004. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.** 20(2).
9. Rifón JJ. 2009. Trasplante de progenitores hematopoyéticos. **An Sist Navar.** 29:137-152.
10. Cutler C, Antin JH. 2001. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: A review. **Stem Cells.** 19:108-117
11. Scott MA, Gordon MY. In search of the Haematopoietic stem cell. *Br. J Haematol* 1995; 90: 738-43)
12. Devetten M., Armitage JO. 2007. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. **Ann Oncol.** 18:1450-1456.
13. Gyger M, Stuart RK, Perreault C. 2000. Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-colony stimulating factor. **Bone Marrow Transplant.** 26:1-16.
14. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J, Flores-Guzmán P y Chavez-Gonzalez A. 2007. Hematopoiesis. **Cancerología.** 2:95-107.
15. Wintrobe MM. *Clinical Hematology.* 8th ed. Philadelphia Lea Febiger 1981 p 35.
16. Torok-Strob B. Cellular interactions. *Blood* 1988;72:373-385
17. Wognum A, Eaves AC, Thomas TE identification and Isolation of Hematopoietic stem cells. *Arch med Res* 2003;34:461-475.
18. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993;2:137-144.
19. Rivera LR, Conceptos generales del cáncer infantil en México. En: Rivera LR (ed) *Oncología pediátrica. Conceptos básicos y clínicos.* Edición México. Intersistemas 2002;1-14.
20. Gutierrez HA, Determinación de citocinas en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas Instituto

Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Tesis Maestría en Ciencias en Inmunología. 2010

21. Linares Quevedo; Utilidad de las citocinas como marcadores de agresión quirúrgica, en el Síndrome de Isquemia-Reperfusión y en la función postrasplante renal, en un modelo experimental de autotraplante renal laparoscópico versus abierto. Archivos españoles de urología;61:1;feb 2008.
22. Pratt LM. IL15 levels on day 7 after Hematopoietic cell transplantation predict chronic GVHD, BMT 2013