

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES**

DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA

**"CUANTIFICACION DE LINFOCITOS "T" $\gamma\delta$ EN PACIENTES
CANDIDATOS A TRANSPLANTE AUTOLOGO DE CELULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS"**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN

HEMATOLOGIA

P R E S E N T A:

DR. MAURICIO ALEJANDRO GARCIA VAZQUEZ



**ASESOR DE TESIS
DR. JORGE VELA OJEDA**

MEXICO, D.F.

2007



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.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL



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

DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA

TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE HEMATÓLOGOO QUE PRESENTA

DR. MAURICIO ALEJANDRO GARCÍA VÁZQUEZ

Residente del Tercer año de Hematología

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Especialidades “DR Antonio Fraga Mouret” CMN “La Raza”

**CUANTIFICACION DE LINFOCITOS “T” $\gamma\delta$ EN
PACIENTES CANDIDATOS A TRANSPLANTE AUTOLOGO
DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS**

ASESOR DE TESIS: DR. JORGE VELA OJEDA

Dr. Jesús Arenas Osuna

Jefe de la División de Educación e Investigación Médica

Dr. Jorge Vela Ojeda

Jefe del Departamento Clínico de Hematología

Dr. Mauricio Alejandro García Vázquez

Residente del 4to Año de Hematología

Número definitivo de protocolo: 2006-3501-93

AGRADECIMIENTOS:

Es difícil agradecer a una sola persona o algunas cuantas, cuando la gente que vive a tu alrededor, la gente que desea tu superación y aun la que desea verte derrotado influyen enormemente en tu superación profesional. Pese a ello no sería justo dejar de agradecer a aquellas personas especiales que han llegado a influir en mi persona, en mi carácter y toma de decisiones para llegar a concluir este reto y los que me depara el futuro.

Lo máspreciado en mi vida siempre será mi María, quien aún siendo una dulce nena ha logrado junto su Mami (ENA) ser el motor que impulsa mis deseos de superación y que seguramente seguirán ofreciéndome el apoyo para los retos venideros. A ellas y a su querida familia quienes día a día me otorgan inmensa comprensión y cariño.

Por supuesto que mi familia será siempre importante para contar con una estabilidad emocional y económica, indudablemente agradezco a mis padres y hermanos que siempre se encuentran a mi lado, otorgándome un consejo, apoyo o afecto.

Muchos son los Maestros que han sido parte importante en mi carrera profesional y para mi es grato reconocer a ellos que solo por vocación otorgan sus conocimientos y con el deseo quizá, de que el alumno supere al Maestro, por esto agradezco infinitamente a muchos pero en especial al Dr Vela, Dr Garcia Chávez, Dra Sánchez y Dra Padilla de quienes he recibido no solo sino también muestras de afecto.

A mis amigos y a los compañeros de trabajo, ya que sin ellos sin duda, esta Tesis quedaría inconclusa. Finalmente a mis pacientes quienes han sido mis libros tanto más que los impresos.

INDICE

I. Antecedentes	4-11
II. Material y Métodos	12-16
III. Resultados	17-34
IV. Discusión	35-37
V. Conclusión	38
V. Bibliografía	39-40
VII. Anexos	41-43

García Mauricio., Vela Ojeda Jorge., García Chavez Jaime. Cuantificación de Linfocitos “T” $\gamma\delta$ en pacientes candidatos a Trasplante Autólogo de Células Progenitoras Hematopoyéticas.

Objetivo: Cuantificar el número de células T $\gamma\delta$ en pacientes con diversas neoplasias Hematológicas previo al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) autólogo.

Material y Métodos: Se incluyeron 18 pacientes con diferentes neoplasias hematológicas, aceptados para TCPH autólogo. Todos los pacientes recibieron FEC-G como terapia de movilización previo al trasplante. Se realizaron mediciones en sangre periférica, así como en las 2 cosechas obtenidas al día 4to y 5to de la movilización, cuantificando las células nucleares totales, linfocitos totales, linfocitos CD3 y linfocitos T $\gamma\delta$. Se utilizó un Citómetro de Flujo con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-TCR $\gamma\delta$.

Resultados: Se analizaron 72 muestras por Citometría de Flujo, obteniéndose una media de CN al día 5to de movilización en sangre periférica de $23.25 \times 10^6/L$ y una media de linfocitos T $\gamma\delta$ de $63.98 \times 10^6/L$, con $p=0.0000002$ y $p= 0.013$. Igualmente se observó un aumento en la cifras de linfocitos T $\gamma\delta$ en comparación con la cifra basal en las bolsas de las cosechas de $2.9 \times 10^6/Kg$ en la bolsa 1 y de $3.2 \times 10^6/Kg$ en la bolsa 2, sin obtener p significativa cuando se comparo la cifra obtenida entre la bolsa 1 y 2.

Conclusión: El número de células mononucleares y los Linfocitos T $\gamma\delta$, aumentan en cantidad posterior al uso de FEC-G tanto en sangre periférica, como en las bolsas de las cosechas en pacientes que serán sometidos a TCPH en modalidad autóloga.

Palabras clave: Linfocitos T $\gamma\delta$, FEC-G, Trasplante de Células Progenitoras.

García Mauricio., Vela Ojeda Jorge., García Chavez Jaime. Quantification of lymphocyte's "T" $\gamma\delta$ in patient candidates for Autologous Stem Cell Transplantation.

Objective: Quantifies the number of cells T $\gamma\delta$ in patients with diverse Hematology's neoplasias before the Autologous Stem Cell Transplantation. (TCSA)

Materials and Methods: Eighteen patients were included with different hematology's neoplasias accepted for TCSA. All the patients received FEC-G as therapy of mobilization before the transplant. Measurements were realized in peripheral blood, as well as in 2 crops obtained a day 4^{to} and 5^{to} of the mobilization, quantifying the nuclear total cells (CN), lymphocyte's total, lymphocyte's CD3 and lymphocyte's "T" $\gamma\delta$. A Citómetro of Flow was in use with antibodies monoclonales anti-CD3 and anti-TCR $\gamma\delta$.

Results: Seventy two samples were analyzed by Citometría of Flow, CN's average being obtained a day 5^{to} of mobilization in peripheral blood of $23.25 \times 10^6/L$ and one average of lymphocyte's "T" $\gamma\delta$ of $63.98 \times 10^6/L$, with $p=0.0000002$ and $p = 0.013$. Equally an increase was observed in you code of lymphocyte's "T" $\gamma\delta$ in comparison with the number basal in the bags of the crops of $2.9 \times 10^6/Kg$ in the bag one and of $3.2 \times 10^6/Kg$ in the bag two, without obtaining p significant when I compare the number obtained among the bag one and two.

Conclusion: The number of mononuclear's cells and the lymphocyte's "T" $\gamma\delta$, they increase in quantity later to FEC-G's use so much in peripheral blood, like in the bags of the crops in patients who will be submitted to TCSA.

ANTECEDENTES

El trasplante de células Hematopoyéticas es definitivamente, una arma terapéutica en el tratamiento de las patologías benignas y malignas, así como en patologías no hematológicas (tumores sólidos, colagenopatías e inmunodeficiencias).

En el caso de las patologías Onco-Hematológicas, si el Trasplante se realiza en una fase temprana de la enfermedad, la frecuencia de curación puede oscilar entre un 50-60%. Sin embargo en el 20-40% de los pacientes, la enfermedad reaparece a pesar del trasplante. En estos casos las opciones terapéuticas en nuestro medio son escasas, contando con pocas opciones, inclusive para aquellos pacientes que se encuentran en Centros de Salud o Instituciones en donde se cuenta con la infraestructura completa. Las pocas opciones terapéuticas se reducen a tratamientos experimentales, un segundo trasplante ahora en modalidad alogénico (para hacer uso del efecto de injerto contra tumor), aunque este con un potencial efecto tóxico y alta morbi-mortalidad y finalmente la medicina molecular que se enfoca al uso de blancos terapéuticos que inhiben una vía o impiden la duplicación del DNA, entre otros mecanismos. Sin embargo todos estos últimos son medicamentos costosos y de difícil adquisición para la mayoría de los pacientes.

Debido a lo anterior es imprescindible el conocimiento exacto de los mecanismos involucrados con el Trasplante de células progenitoras Hematopoyéticas, ya que es importante resaltar que durante este trasplante no solo se infunden al pacientes células “STEM CELL”, las cuales son importantes para el implante hematopoyético, sino que además administramos otro tipo de células que también pueden ser trascendentes en la obtención de la curación de la enfermedad, dentro de estas células se encuentran las llamadas T reguladoras y hasta ahora no se han estudiado en forma amplia, en relación a su concentración en la cosecha obtenida y su función una vez transfundidas. Otro tipo de células que pueden llegar a aislarse durante la cosecha de células pluripotenciales, son células neoplásicas que pueden también jugar un papel importante en la recaída de la enfermedad. Debido a lo anterior es imprescindible el conocimiento de la función y su posible participación de las

células transfundidas durante el trasplante, una de tantas células son los Linfocitos T $\gamma\delta$, por lo que será prioritario su conocimiento desde la Linfopoyesis.

Dentro de la linfopoyesis existen órganos linfoides primarios y órganos linfoides secundarios, en los cuales se lleva a cabo la proliferación y diferenciación de los linfocitos. Es ya bien conocido que dicha linfopoyesis se desarrolla desde la vida prenatal en el saco vitelino, hígado, bazo y médula ósea, para que finalmente en la vida adulta se produzca exclusivamente en las epífisis de los huesos largos y en algunos huesos planos como costillas, esternón, así como vértebras y pelvis. También es conocido que la diferenciación y capacitación de los linfocitos dependerá de la extirpe histológica, formándose inicialmente todos (“B” y “T”) en la médula ósea y luego dependiendo de la extirpe pasan a Timo ó permanecen en Médula ósea para su capacitación, adquisición de su reordenamiento del receptor de superficie (BCR o TCR) y los procesos de selección positiva y negativa, culminando la presentación antigénica en los órganos linfoides secundarios. En los linfocitos “B”, todo esto se lleva a cabo en la Médula ósea (equivalente de la Bursa de Fabricio en aves), mientras que los linfocitos “T” es necesario su paso a través del timo para la adquisición de TCR, CD3, CD4 y CD8 según el caso, y además someterse a una selección positiva y selección negativa, con la finalidad de desencadenar una respuesta inmunitaria contra antígenos extraños y por otra parte eliminar las clonas reactivas contra antígenos propios, esto último se le ha llamado Tolerancia central. Los órganos linfoides secundarios son indispensables tanto en linfocitos T y B para la presentación antigénica de epítomos extraños y es ahí donde también se puede llevar a cabo una respuesta inmunitaria mediante la expresión de una clona en contra de un antígeno específico⁽¹⁾.

En relación a las células T, es bien conocido sus diferencias que las pueden clasificar de acuerdo a criterios morfológicos, de actividad, de patrón de secreción de citocinas y también de acuerdo a los receptores expresados en su superficie de membrana.

Morfológicamente hay 2 variedades de linfocitos circulantes:

- a) Linfocitos pequeños, carecen de gránulos y presentan un cociente Núcleo:Citoplasma elevado y constituyen el 95% de los linfocitos circulantes de células. TH(T “Helper”) y el 50% de LTC (Linfocitos T Citotóxicos).
- b) Linfocitos grandes, presentan menor cociente N:C, contienen gránulos azuròfilos intracitoplasmáticos y son denominados Linfocitos Grandes Granulares (LGG) y menos del 5% corresponden a los TH y en un 50% pertenecen a los LTC.

De acuerdo a los receptores de membrana las células T en reposo en un 95% expresan receptores alfa/beta (α/β) y pueden adoptar cualquiera de las 2 morfologías ya mencionadas, otra subpoblación de linfocitos T expresa receptores gamma/ delta ($\gamma\delta$), y presenta aspecto de LGG. Estas células T $\gamma\delta$, rara vez se encuentran en los nódulos linfáticos y bazo, en contraste abundan especialmente en los epitelios mucosos como intestino, lengua, piel, esófago, traquea, pulmones, epitelio genital y constituyen solo una pequeña parte de las células T en sangre periférica. En tejidos intraepiteliales de ratón se ha demostrado la presencia de CD8 en estas células linfoides, a diferencia de las circulantes que no expresan este marcador. Se ha demostrado que la presencia de estas células CD8+ $\gamma\delta$ representan un repertorio de receptores de células T dirigido fundamentalmente contra determinados antígenos bacterianos ó virales, por lo que se considera que estas células juegan un papel importante en la protección de las superficies mucosas de los organismos⁽¹⁾.

Los linfocitos T, presentan un mecanismo de reconocimiento antigénico distinto de los linfocitos B. En el caso de los linfocitos T, el antígeno endógeno o exógeno es primero degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (CPA). Posteriormente, sus determinantes antigénicos procesados son expuestos en la superficie de la CPA, en el seno de una molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC de clase I o de clase II). El linfocito T, a través de su receptor clonotípico, únicamente reconoce al antígeno cuando éste se encuentra presente en la membrana de la célula presentadora de antígeno⁽¹⁾.

Asociados a las dos cadenas polipeptídicas polimórficas (alfa y beta o gamma y delta) que constituyen las dos variantes del TCR, se encuentra un grupo de moléculas monomórficas de membrana llamadas colectivamente CD3, formando así el complejo TCR/CD3. Cuando tiene lugar el reconocimiento antigénico entre el TCR y la molécula MHC que porta el antígeno, se desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma de la célula T, dando así lugar al proceso de activación ⁽¹⁾.

Así pues se han descrito dos tipos de linfocitos T $\gamma\delta$

a) Células T $\gamma\delta$ que expresan la región $V\gamma9+ V\delta2+$ del TCR y representa la mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ de sangre periférica. Esta variedad juega un papel muy importante en la defensa contra los patógenos intracelulares y malignidades hematológicas. Se ha demostrado en estudios “in Vitro” que estas células activadas son capaces de destruir líneas celulares de Linfoma y Mieloma. Se han encontrado también con alta frecuencia en pacientes con LMA post-transplantados libres de enfermedad.

b) Células T $V\delta1+$ residen principalmente en tejidos epiteliales, donde pueden actuar como 1^{ra} línea de defensa contra infecciones y enfermedades malignas.

La atracción de los leucocitos a los tejidos, es un paso esencial para el desarrollo de una respuesta, estando controlado este proceso por sus quimiocinas y receptores específicos. Las células T $V\gamma9 V\delta2+$ expresan un amplio rango de receptores de quimiocinas CC, incluyendo CCR1 y CCR5.

Se ha demostrado que algunos tipos de especies bacterianas como *Micoplasma* y *Micobacterium bovis*, inducen la expresión de células T $\gamma\delta$ en respuesta a INF, en presencia de IL-2 y Células accesorias. La infección por CMV en pacientes con trasplante Renal induce fuerte respuesta de Clonas $V\delta 1+$, $V \delta 3+$ y $V \delta 5+$ contra las células infectadas con CMV.

Ligandos bien definidos del TCRs de células T $\gamma\delta$ son un grupo de moléculas bien definidas y propias que son capaces de indicar estrés celular e incluyen CD1, MIC-A ò B y F1- ATP sintetasa. Esta enzima se expresa en la superficie de células tumorales y promueve el reconocimiento celular

por células T $\gamma\delta$ en forma dependiente de otra proteína, APOLIPOPROTEINA A-1. Además de esta, otros 2 antígenos mitocondriales HPS-60 y CL se ha encontrado que son estimulantes de células T $\gamma\delta$. La Mitocondria en su aparente origen microbiano, se ha considerado como posible origen de antígenos para células T $\gamma\delta$, en contraste MHC-1 "T22" es un ligando bien establecido para células T $\gamma\delta$.

La estructura de esta proteína en complejo con TCR $\gamma\delta$ (denominado TCR-G8), muestra que al menos este TCR usa residuos codificados de línea germinal de su cadena δ región 3 determinante de complementariedad (CDR3) para unirse a "T22", y la relativa posición de TCR y MHC son diferentes de aquellos TCR $\alpha\beta$ y su péptido-ligando MHC.

Algo importante a mencionar es que existen estudios los cuales demuestran que los linfocitos T $\gamma\delta$ V δ 2+ activados tienen función de Célula Presentadora de Antígenos, aun que este estudio solo se enfocó a este subtipo de células y hace falta determinar si todas las variedades de linfocitos T $\gamma\delta$ tienen la misma capacidad de CPA o solo es esta variedad⁽²⁾.

Otros estudios muestran que los monocitos cosechados de ratones deficientes en linfocitos T $\gamma\delta$, fueron defectuosos en su maduración, sugiriendo que los linfocitos T $\gamma\delta$ promueven la diferenciación Monocito-Macrófago⁽³⁾.

También se ha observado que los linfocitos T $\gamma\delta$ son efectivas en la eliminación de células infectadas por el Virus EB, esto en pacientes con enfermedades linfoproliferativas postransplante de médula ósea⁽⁴⁾.

Estudios recientes in vitro e in vivo, han mostrado que compuestos aminobifosfonatos, como pamidronato, zoledronato, muestra homología estructural con el ligando TCR $\gamma\delta$, induciendo activación y proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ circulantes dependientes de IL-2. Ante esta evidencia se ha planteado que la expansión selectiva de los linfocitos T $\gamma\delta$ contribuyen al efecto antitumoral documentado en estas drogas. Con relación a este efecto, el subtipo V γ 9+ CD4- CD8- es eficientemente expandida en sangre periférica, en presencia de zoledronato⁽⁵⁾.

Ligandos propios de TCR $\gamma\delta$ son un grupo de moléculas propias que incluyen CD1, MIC-A ò B y F1-ATP sintetasa, expresándose este último en la superficie de células tumorales, promoviendo el reconocimiento celular por los linfocitos T $\gamma\delta$. F1-ATPasa es un antígeno mitocondrial, que junto con las proteínas HSP-60 y los fosfolípidos Cardiolipinas se han considerado que estimulan los linfocitos T $\gamma\delta$. Así mismo Receptores de células NK y TLR han sido reportados en estas células. El receptor NKG2D es un receptor activo para células NK y funciona como receptor coestimulador en la activación de linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T $\alpha\beta$ CD8+.

El subtipo de linfocito T $V\gamma9+ V\delta2+$ son parcialmente activadas solo por el NKG2D y la activación vía de este receptor induce la expresión de TNF- α y liberación de gránulos citolíticos, pero no la producción de INF- γ , induciendo la expresión de DAP 10 como mediador de la señalización de NKG2D.

Su actividad antitumoral de los linfocitos T $\gamma\delta$ se ha demostrado, ya que pueden infiltrar tumores sólidos y exhibir una actividad selectiva lítica contra una variedad tumoral. Tanto los linfocitos T $\gamma\delta$ residentes como circulantes, expresan un distinto patrón de receptores de citocina, el cual potencialmente les permite extravasarse y migrar hacia la matriz extracelular y atacar el sitio tumoral en respuesta al estímulo. Esto lo hace por medio de moléculas de adhesión (N-CAM), la cual puede contribuir tanto para la regulación, como para la extravasación y la recirculación de los Linfocitos Infiltrantes Tumorales (LITs) $\gamma\delta$ residentes⁽⁶⁾.

Los linfocitos T $V\delta2+$ circulantes expresan la Glucoproteína transmembrana tipo II NKR1A (Receptor de células Natural Killer Proteína 1A), que contiene un dominio de lectina tipo C, el cual puede funcionar como una molécula de adhesión y les permite migrar a través de las células endoteliales en ausencia de estímulo quimiotáctico, sugiriendo que esta molécula NKR1A juegan un papel primordial en el potencial de la actividad antineoplásica de las CT $\gamma\delta$. Esta expresión es regulada por IL-12⁽⁶⁾.

En la respuesta antitumoral los linfocitos T $\gamma\delta$ despliegan en especial los V δ 2+, reconocen ligandos naturales. El reconocimiento es mediado por TCR y no requiere proceso antigénico y presentación por el MHC, lo cual les otorga una ventaja en comparación con los linfocitos T alfa/beta, los cuales a través de receptores CD4 y CD8 interactúan con el sistema HLA II y I respectivamente.

Los linfocitos T V $\gamma\delta$ 1+ reconocen moléculas MHC-I, MIC-A y MIC-B a través de receptor NKG2D, los cuales son antígenos que responden a la proteína del Choque por células epiteliales intestinales y tumores epiteliales como Cáncer de Colon, Pulmón y Riñón⁽⁷⁾.

Citotoxicidad mediada por perforina ha sido reportada por células V δ 2 y V δ 1+ con aumento en la expresión de FAS-Lig, seguido del rearrreglo del TCR y por tanto son capaces de matar células tumorales sensibles a FAS-Lig⁽⁸⁾.

Factores de crecimiento Hematopoyético en la movilización de Células STEM CELL:

En 1988 se informó por primera vez que posterior al uso de Factor Estimulante de Colonias Granulocítico (FEC-G) y de Granulocitos-Macrofagos (FEC-GM), se incrementaban la cantidad de células hematopoyéticas en la sangre periférica, después de 4-5 días. Durante la movilización de células CD34 + en el TCHP son utilizadas citocinas o antineoplásicos (Ciclofosfamida) que mediante reacciones de estrés favorecen rompimiento de las moléculas de adhesión de la matriz extracelular con los receptores de superficie celular, sin embargo durante esta movilización, no solamente se encuentran células CD34+, si no también muchas otras células mononucleares que pueden complicar o favorecer la evolución de un paciente transplantado de médula ósea, inclusive es factible que se cosechen células neoplásicas del mismo paciente en el caso de TCHP en modalidad autólogo. El reconocimiento, la determinación y su probable separación puede ser útil como terapia contra el cáncer⁽⁹⁾.

Un gran espectro de células se movilizan a la sangre periférica incluyendo células madre hematopoyéticas primitivas, progenitores de la serie megacariocítica, eritroide y mieloide, así como neutrófilos maduros. No existen estudios que analicen las características de la movilización de las células del tipo T $\gamma\delta$. Tampoco se conoce hasta ahora la cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ que contiene el producto de la movilización.

El FEC-G es el factor de crecimiento más utilizado para la movilización, sin embargo, otros factores de crecimiento también han mostrado su efectividad como: FEC-GM, Stem Cell factor, ligando de FLT-3, Interleucina-1, Interleucina-3 e Interleucina 11 y 12. La dosis más utilizada del FEC-G es de 5-10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$.

MATERIAL Y METODOS

En el Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, en el área de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas junto con el Laboratorio de Hematología Especial, se incluyeron 18 pacientes con patologías Hematológicas. El objetivo de este estudio fue el de Cuantificar el número de células T $\gamma\delta$ en pacientes con diversas neoplasias Hematológicas previo al Transplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas en modalidad autólogo.

Los pasos mediante los cuales se procesaron las muestras fue el siguiente:

1. Se obtuvieron muestras (3-5ml) a partir de:

- Sangre de vena periférica como muestra basal previo a la movilización de CTP
- Sangre de vena periférica de las unidades a criopreservar en el 5^{to} día de movilización o segundo día de cosecha.
- Sangre de las bolsas de cosecha obtenidas mediante aféresis al día 4^{to} y 5^{to} de la movilización.

2. Se cuantificó las células nucleadas en el analizador automático para biometría hemática Cell Dyn 3000 ($\times 10^6$ /ml).

3. Se ajustó la cantidad de células nucleadas a 1×10^6 /100 ul de PBS a partir de la cual se tomaron alícuotas de 100ul para ser depositadas en tubos Falcon.

5. Posteriormente se determinó la cantidad de células positivas para CD3 y T $\gamma\delta$.

Dado que el porcentaje de células T $\gamma\delta$ es bajo, se adquirió 1 millón de eventos para evaluar la cantidad de células T $\gamma\delta$.

PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR CÉLULAS CON DIFERENTES MARCADORES DE SUPERFICIE EN MUESTRAS DE COSECHA y SANGRE PERIFERICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES:

1. Cuenta de Células nucleadas..

- a. Se obtuvo la cuenta de células nucleadas ($1 \times 10^9/L$) en el equipo Cell Dyn 3000.
- b. Se realizó ajuste de la concentración de células nucleadas a 1×10^6 cels/100 μ L en sangre periférica de acuerdo con la fórmula:

$$C1V1 = C2V2; \text{ para obtener } V2 = (C1V1)/C2$$

Donde:

- C1 = Concentración de células nucleadas contadas con el equipo Cell Dyn 3000
- V1 = Volumen inicial de la alícuota de células
- C2 = Concentración final de células a la que se quiere llegar.
- V2 = Volumen final al que se afora

2. Determinación de los diferentes marcadores de superficie de las células mononucleares por citometría de flujo en el FACScan.

Calibración del citómetro de flujo.: El equipo Se calibra utilizando las perlas calibradoras y el programa de “FACSCComp” para obtener las condiciones óptimas de este en los voltajes de los tubos fotomultiplicadores, compensación de fluorescencia y sensibilidad. Para lograr esto se coloca en el tubo 1:1 mL de amortiguador de fosfatos más una gota de perlas sin teñir y en el tubo 2:3mL de amortiguador de fosfatos, una gota de perlas sin teñir, una gota de perlas teñidas con Isotiocianato de Fluoresceína y una gota de perlas teñidas con Ficoeritrina.

4. Preparación de las muestras para el análisis.

Tinción: Se coloca en un tubo Falcon 1.5×10^6 células mononucleares viables en 100 μ L de amortiguador de fosfatos, se adiciona 20 μ L de anticuerpo marcado con Isotiocianato de fluoresceína ò Ficoeritrina. Se mezcla e incuba durante 20 minutos a 40oC en la oscuridad, transcurrido el tiempo se adiciona 1mL de solución de lisis (1:10) y se mezcla e incuba durante 20 min a 4 oC en la oscuridad; un a vez transcurrido el tiempo se centrifuga 300 x g durante otros 5 min, transcurrido el tiempo se elimina el sobrenadante y se adiciona 0.8mL de amortiguador de fosfatos más 0.2mL de paraformaldehido al 1% en solución salina isotónica. Se resuspende en vortex a baja velocidad y finalmente con el tubo a esas condiciones se adquirieren los datos.

5. Adquisición de datos.

Se adquieren en el programa de “Cell Quest Pro” versión 3.2.1 “ Apple System” 7.6.1, 1×10^6 eventos y se selecciona una región, esto se hace con el tubo marcado como control de isotipo (autofluorescencia).

- Se adquiere toda la población celular y se selecciona la región linfoide CD3 + ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes

en una gráfica de puntos “dot plot” en la escala logarítmica 10(1), tanto para el eje de las abscisas (FL2 PerCP) como para el eje de las ordenadas (FL3 PE) , colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo en un porcentaje mínimo de 99.4%, ya que el porcentaje de células T $\gamma\delta$ es muy bajo.

6. Obtención en cifras absolutas de los resultados obtenidos

Una vez obtenidos los porcentajes correspondientes de CD3 asociado a PerCP y T $\gamma\delta$ asociado a PE, así como el número absoluto de las células nucleadas totales (Leucocitos) y el porcentaje de los linfocitos, de todas las muestras analizadas, se procedió al cálculo de dichas células obtenidas en porcentajes, convirtiéndolas en números absolutos de acuerdo al porcentaje de linfocitos CD3 positivos, mediante la siguiente fórmula:

- Cifras Absolutas =
$$\frac{\% \text{ de Células obtenidas}}{100}$$

7. Calculo del número final de células T $\gamma\delta$

Con los datos obtenidos se procede al cálculo del número de linfocitos T $\gamma\delta$ expresado $\times 10^6/\text{Kg}$ en las bolsas de las cosechas y $\times 10^6/\text{L}$ en las muestras de sangre periférica, mediante la siguiente fórmula:

- $LT \gamma\delta(\text{cosecha}) = \frac{\text{CN}(\text{leucocitos}) * \text{CD3} * T\gamma\delta * \text{Volumen de la cosecha obtenida}}{\quad}$

Peso del paciente (Kg)

- $LT \gamma\delta (\text{Sangre periférica}) = CN (\text{leucocitos}) * CD3 * T\gamma\delta$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño del Estudio, es transversal, observacional, estudio piloto, original, descriptivo. El análisis estadístico incluyó la realización de la media geométrica, la desviación estándar y los errores de la desviación estándar de los resultados obtenidos tanto de las muestras de sangre periférica como de las bolsas de cosechas. Una vez obtenido estos resultados se procedió al cálculo de la “**T pareada**”, con obtención de Intervalos de Confianza al 95% y una **p** estadísticamente significativa menor de 0.05. Finalmente se realizó un análisis de “**Correlación de Pearson**” entre las muestras de las cosechas obtenidas mediante aféresis al día 4to y 5to de movilización.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 72 muestras, de 18 pacientes que ingresaron al estudio, de estas 72 muestras, 36 fueron de sangre periférica, (18 muestras basales y 18 muestras al día 5to de la movilización), las otras 36 se obtuvieron de las cosechas obtenidas al día 4to y 5to de la movilización (18 y 18 respectivamente). De los 18 pacientes que ingresaron al estudio 11 pacientes correspondían al género Masculino y 7 al género Femenino. Las edades de los pacientes comprenden desde los 17 hasta los 65 años con una media de 39 años. Se incluyeron al estudio 2 pacientes con Mieloma Múltiple, 2 con Linfoma de Hodking, uno con Histiocitosis de células de Langerhans, un paciente con Leucemia Aguda Mieloide y 12 con Linfoma No Hodking. El estado de la enfermedad previo a la movilización y trasplante era en 18 pacientes con remisión completa y un solo paciente con una remisión parcial. La media del peso de los pacientes fue de 65 Kg y el promedio del volumen obtenido de la primera y segunda cosecha fue de 60 y 59ml respectivamente. Tabla 1.

Tabla 1. Características de los 18 pacientes.

SEXO	EDAD	NEOPLASIA HEMATOLOGICA	CARACTERISTICAS DE LA ENFERMEDAD	ESTADO DE LA ENFERMEDAD PREVIO AL TRASPLANTE
F	58	MM	EC-III A	RC
F	35	LNH	CG EC-II B	RC
M	51	MM	EC-III B	RC
M	23	LH	CM EC-II A	RC
M	17	LNH	ANAPLASICO EC-III B	RC
F	32	LNH	SINONASAL "T" PERIFERICO	RC
M	58	LNH	BURKIT-LIKE EC-III B	RC
M	65	LNH	FOLICULAR GII EC-IV B	RC
F	26	LNH	ANAPLASICO "T" EC-IV B	RP
F	33	LNH	LNH ANAPLASICO "T" EC-III B	RC
M	17	LNH	LINFOBLASTICO	RC
M	25	LMA	M2 FAB	RC
M	19	HISTIOCITOSIS	LANGERHANS	RC
M	55	LNH	CG	RC
F	45	LNH	CG	RC
M	59	LNH	CG IV-B	RC
F	49	LNH	CG	RC
M	35	LH	INTERFOLICULAR EC-IV B	RC

LNH= linfoma no Hodgkin, MM=Mieloma Múltiple, LH= Linfoma de Hodgking, LAM= Leucemia Aguda Mieloide,
EC= Estadio Clínico, CG=Células Grandes, CM= Celularidad Mixta, RC= Remisión Completa, RP= Remisión Parcial.

El esquema de movilización utilizado fue el de Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas en el 100% de los pacientes a dosis de 10 µg/Kg de peso del paciente por 5 días.

Cabe mencionar que hasta la fecha se han trasplantado 16 pacientes, aun sin trasplantar 2 de ellos y de los 16 pacientes trasplantados 15 de estos lograron un injerto completo o parcial y uno de ellos aun se encuentra con mielosupresión postquimioterapia de acondicionamiento y pendiente el injerto, otro más se encuentra en el día 192 postrasplante,

aun con citopenias (Anemia y Trombocitopenia) y con probable Síndrome Mielodisplásico secundario, este último paciente recibió una dosis total de CD34 de: $2.1 \times 10^6/\text{Kg}$. Es importante mencionar que los 14 pacientes restantes, obtuvieron prácticamente una cifra normal en los parámetros de la biometría hemática, demostrándose en los seguimientos otorgados en la consulta externa. El promedio de días necesarios para el injerto de neutrófilos, plaquetas y reticulocitos es de 17, 18 y 18 días respectivamente, sin embargo cabe mencionar que el injerto retrasado en algunos pacientes pueda haberse debido a la misma enfermedad hematológica, a la reserva médular previo al trasplante y a los diferentes esquemas de quimioterapia otorgados de acuerdo a la patología, así como la edad y las enfermedades comórbidas. También será importante destacar que en 5 de los 16 pacientes trasplantados fue necesario el uso FEC-G durante el periodo postrasplante, en este caso como apoyo para disminuir el periodo de neutropenia severa y favorecer el injerto. Por otra parte de los 16 pacientes trasplantados y analizados, un solo paciente ha fallecido y la causa de la defunción no estuvo relacionada al trasplante. Uno más se encuentra aún en el periodo postrasplante, 3 pacientes han presentado recaída de su enfermedad y 11 se encuentran en remisión completa.

El promedio de Células Nucleadas (CN-Leucocitos) en sangre periférica previo a la movilización con FEC-G fue de $5.9 \times 10^6/\text{L}$ y posterior a la movilización al día 5to de $23.25 \times 10^6/\text{L}$ (Muestra llamada como previa). Así mismo se obtuvo una cantidad de células CD34 positivas en las dos cosechas obtenidas en forma variable de acuerdo al paciente y la enfermedad de base. No se observó alguna relación entre la cifra de células CD34 positivas infundidas y los días de injerto para las distintas series, como son: neutrófilos, plaquetas y reticulocitos. Ya que si bien algunos pacientes obtuvieron una cifra de CD34 en el límite de $2 \times 10^6/\text{Kg}$, otros obtuvieron una cifra mayor de 3 e incluso $4 \times 10^6/\text{Kg}$ y la fecha del injerto posterior al trasplante fue mayor a 15 días. Tabla 2

Tabla 2. Cantidad de Células CD34 positivas obtenidas en las 2 cosechas y los días posteriores al injerto de neutrófilos, plaquetas y reticulocitos.

PACIENTE	Células CD34 Cosechadas. x10 ⁶ /Kg	Injerto	Injerto	Injerto
		NT	PLT	RETIS
1	2.7	20	20	20
2	2.2	18	18	19
3	2.04	20	24	20
4	2.7	17	12	17
5	3.2	13	11	16
6	2.5	13	9	16
7	2	19	21	22
8	2.1	37	40	45
9	3	12	14	16
10	2.1	12	20	11
11	2.49	ST	ST	ST
12	4.14	19	20	22
13	3.46	17	15	15
14	3.13	16	14	14
15	5.16	19	19	19
16	2.3	13	15	18
17	5	ST	ST	ST
18	3	ST	ST	ST
PROMEDIO	2.956	17.667	18.133	19.333
DS	0.956759236	6.114	7.3569	7.7059

*ST= sin trasplante

Se determinó así mismo el promedio de linfocitos totales, porcentaje de CD3, porcentaje de células T $\gamma\delta$ y cifras absolutas de linfocitos T $\gamma\delta$. En el 100% de los pacientes se observó un aumento en la cifra basal de leucocitos (CN) en comparación a la basal. En relación a la cifra de linfocitos totales expresada para este análisis en forma de porcentajes, se observó que no existió un aumento estadísticamente significativo en relación a las cifras basales con respecto a la cifra en el día 5to de movilización e inclusive se observa que el porcentaje de linfocitos totales disminuye en

comparación a la cifra basal. Por otra parte se obtuvo una media de 6.3% y 8.8% en el porcentaje de células T $\gamma\delta$ en relación a la cifra de sangre periférica basal y la muestra de sangre periférica al día 5to de la movilización. Se obtuvo también un 20.5% y un 63.9% de linfocitos T $\gamma\delta$ entre la cifra basal y la cifra al día 5to de la movilización. Cuadro 1

Cuadro 1. Resultados de la Media, Desviación Estándar y Error Estándar de las muestras de sangre periférica basal y al día 5to de la movilización.

		Media	N	Desviación Estándar	Error Estándar
Par 1	BASAL CÉLULAS NUCLEADAS	5.9000	18	2.7962	.6591
	PREVIA CÉLULAS NUCLEADAS	23.2500	18	9.2988	2.1917
Par 2	BASAL LINFOCITOS EN %	33.9444	18	14.8263	3.4946
	PREVIA LINFOCITOS EN %	7.7778	18	3.2640	.7693
Par 3	BASAL LINFOCITOS CD3 EN %	5.9317	18	3.5151	.8285
	PREVIA LINFOCITOS CD3 EN %	3.2322	18	2.0856	.4916
Par 4	BASAL LINFOCITOS T $\gamma\delta$ EN %	6.3500	18	3.5151	.8285
	PREVIA LINFOCITOS T $\gamma\delta$ EN %	8.8122	18	5.6670	1.3357
Par 5	BASAL RESULTADOS DE T $\gamma\delta$ x10 ⁶ /Kg.	20.5078	18	18.9914	4.4763
	PREVIA RESULTADOS DE T $\gamma\delta$ x10 ⁶ /Kg.	63.9856	18	64.9434	15.3073

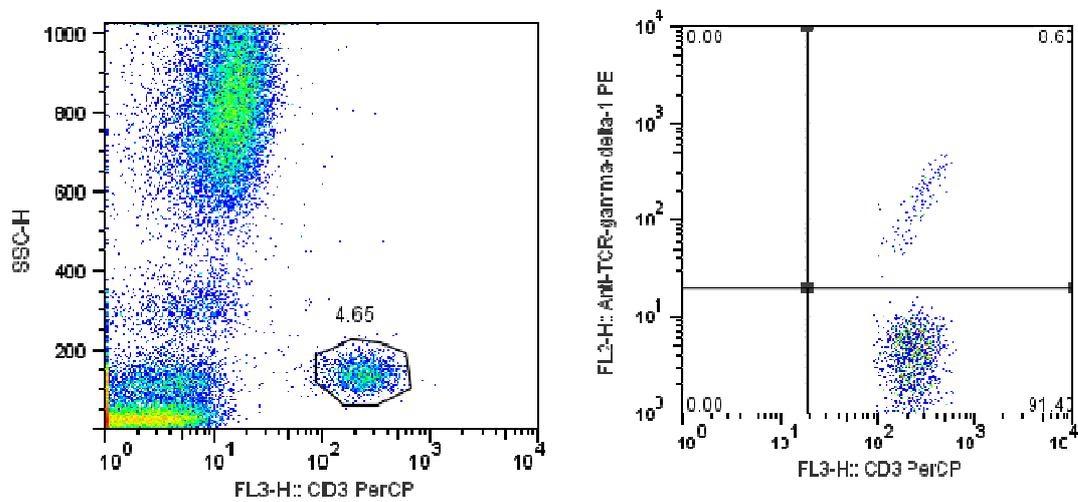
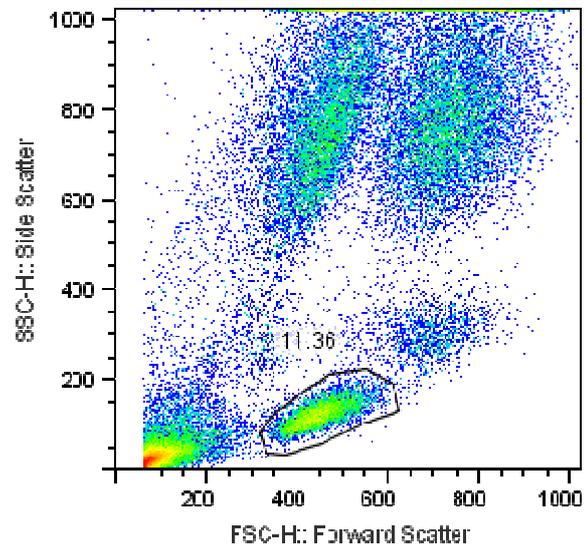
Cuando se determinó mediante el análisis estadístico la significancia mediante la prueba **T pareada**, se encontró que las variables que mostraron una p menor de 0.05 fueron la cifra de leucocitos totales (CN), la cifra de linfocitos totales, el porcentaje de linfocitos CD3 positivos y la cifra expresada en números absolutos de linfocitos de T $\gamma\delta$. Cuadro 2

Cuadro 2. Resultados de la T pareada en muestras basales de sangre periférica en comparación con las muestras de sangre periférica al día 5to de la movilización

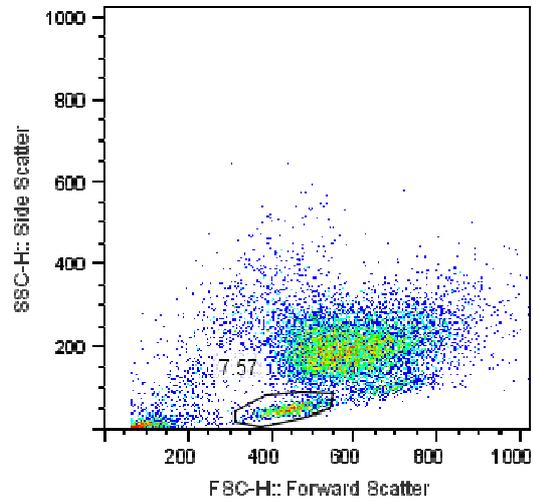
		DIFERENCIAS PAREADAS					T	DF	P
		MEDIA	DS	Error D S MEDIA	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%				
					BAJO	ALTO			
Par 1	BASALCN - PREVCN	-17.350	8.6931	2.0490	-21.673	-13.027	-8.468	17	.0000002
Par 2	BASALLIN - PREVLINF	26.166	15.8421	3.7340	18.288	34.044	7.008	17	.0000002
Par 3	BASALCD3 - PREVCD3	2.6994	4.6908	1.1056	.3668	5.0321	2.442	17	.026
Par 4	BASALGD - PREVGD	-2.4622	4.9972	1.1778	-4.9472	2.281	-2.090	17	.052
Par 5	BASRESU - PREVRES	-43.477	66.4549	15.663	-76.525	-10.430	-2.776	17	.013

Basal CN= Muestra Basal de células nucleadas, PREVCN= muestra de sangre periférica al día 5to de movilización de las células nucleadas, BASALLINF: muestra basal de linfocitos, PREVLINF= muestra previa de linfocitos absolutos, BASALCD3=muestra basal de linfocitos CD3, PREVCD3=Muestra previa de Linfocitos CD3, BASALGD= muestra basal de Linfocitos T $\gamma\delta$ en porcentaje, PREVIAGD= muestra previa de Linfocitos T $\gamma\delta$ en porcentaje, BASRESUL= Muestra basal de Linfocitos T $\gamma\delta$ expresado $\times 10^6$ /Kg, PREVRES= Muestra previa de linfocitos T $\gamma\delta$ expresados $\times 10^6$ /Kg.

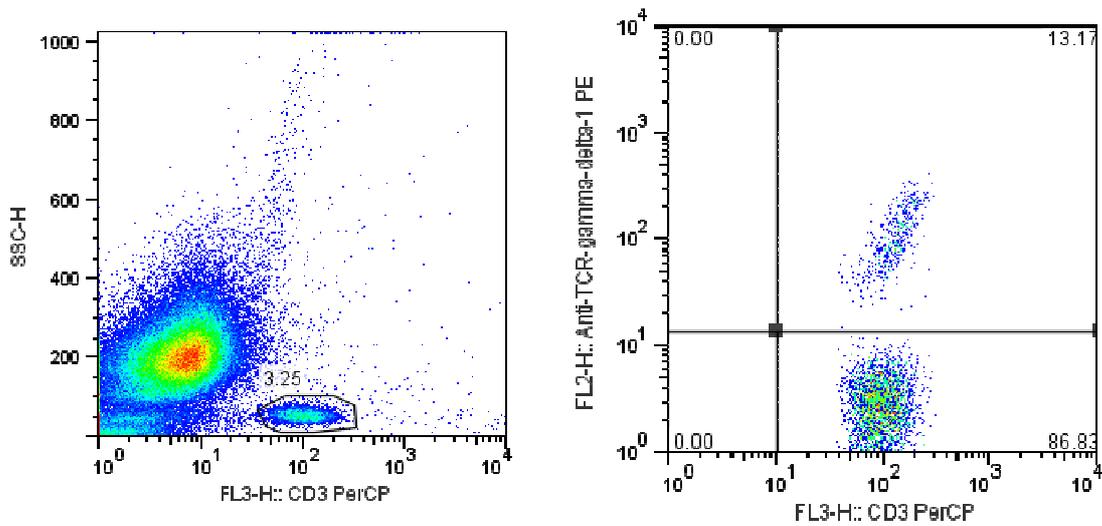
Análisis de Citometría de Flujo de un paciente en una muestra de sangre periférica (muestra basal sin movilización con FEC-G), el área marcada corresponde a la región de los linfocitos. Datos expresados en porcentajes.



Muestras basales de sangre periférica del mismo paciente en donde se observa los porcentajes de linfocitos T CD3 (dibujo izquierdo) y porcentaje de linfocitos T gamma/delta (derecha).

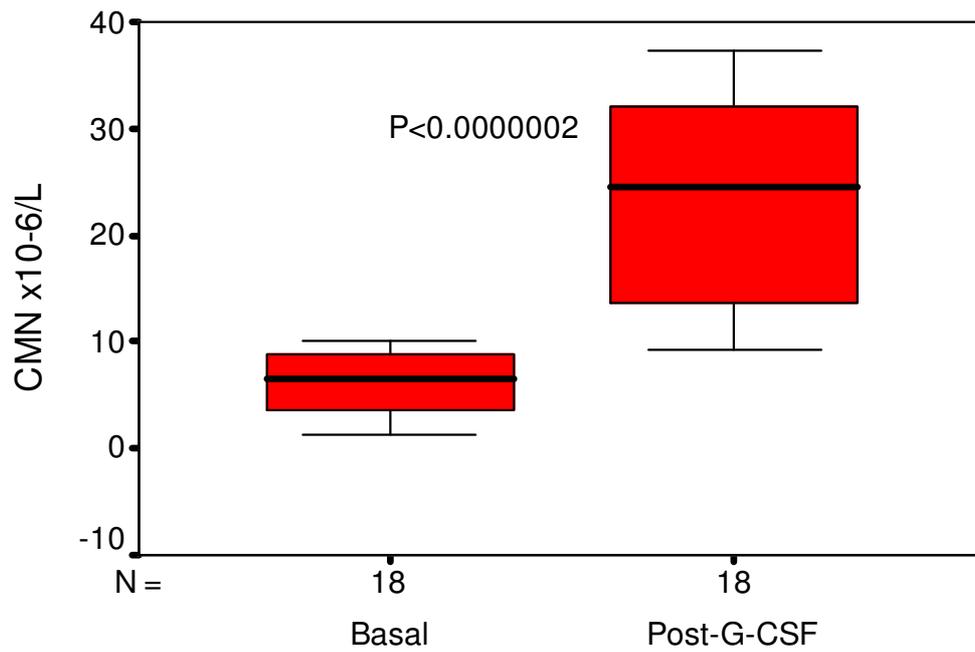


Muestra de sangre periférica del mismo paciente al día 5to de la movilización (el área marcada corresponde al porcentaje de linfocitos)



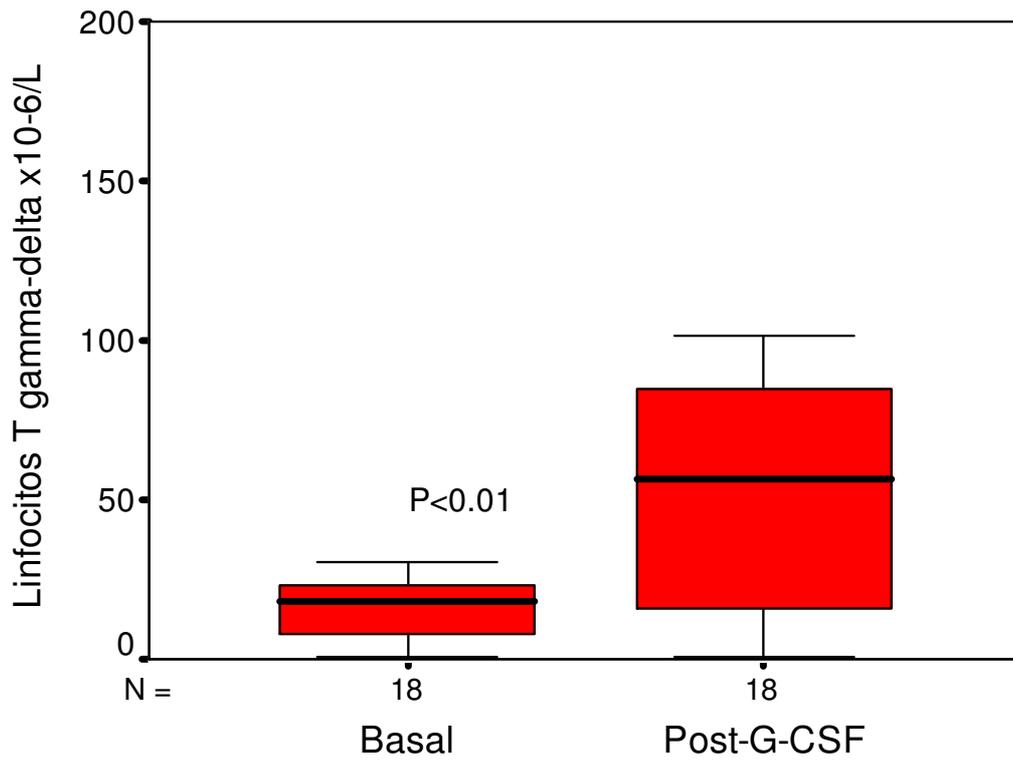
Muestras de sangre periférica del mismo paciente al día 5to de la movilización y donde se observa del lado izquierdo el área de linfocitos CD3 positivos y a la derecha el porcentaje en el cuadrante superior derecho de los linfocitos T gamma/delta (graficas en Dot-Plot)

Movilización células mononucleares por G-CSF



*Muestras de sangre periférica (basal y 5to día de movilización)

Movilización linfocitos T gamma-delta



*Muestras de sangre periférica (basal y 5to día de movilización)

El análisis estadístico de las bolsas de las cosechas obtenidas por el procedimiento de aféresis mostró una media de $173.4 \times 10^6/\text{Kg}$ de CN en la bolsa 1 (Cosecha 1) y de $227.5 \times 10^6/\text{Kg}$ en la bolsa 2 (cosecha 2). En relación al porcentaje de linfocitos CD3 se obtuvo una media de 20.74% para la cosecha 1 y de 16.7% para la cosecha 2; así mismo la media en los porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ se encontró un 9.97% y 9.93% en las cosechas 1 y 2, respectivamente. Finalmente se encontró que la media de la cifra absoluta en linfocitos T $\gamma\delta$ fue de $2.97 \times 10^6/\text{Kg}$ para la cosecha 1 y de $3.25 \times 10^6/\text{Kg}$ para la cosecha 2. Cuadro 3

Cuadro 3. Resultados de la Media, Desviación Estándar y Error estándar de las cosechas 1 y 2 al día 4to y 5to de la movilización

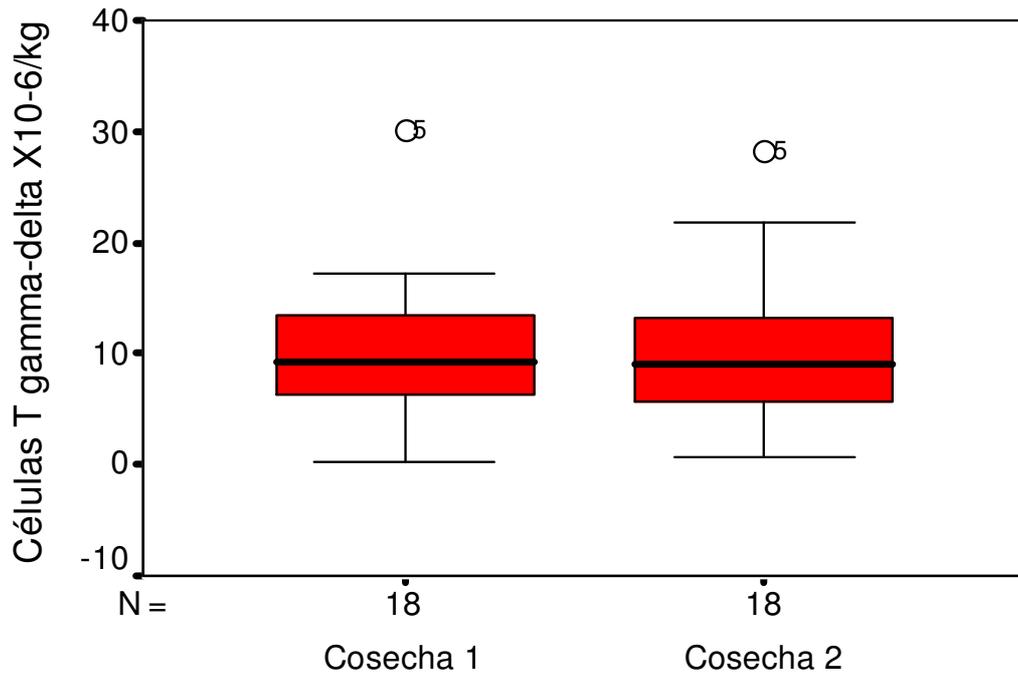
		Media	N	DS	Error DS
Par 1	COSECHA1 CELULAS NUCLEADAS	173.4444	18	82.2065	19.3763
	COSECHA2 CELULAS NUCLEADAS	227.5556	18	81.5679	19.2257
Par 2	COSECHA1 LINFOCITOS ABSOLUTOS	56.1667	18	19.9654	4.7059
	COSECHA2 LINFOCITOS ABSOLUTOS	50.0556	18	14.3505	3.3825
Par 3	COSECHA1 LINFOCITOS CD3 EN %	20.7400	18	11.8342	2.7893
	COSECHA2 LINFOCITOS CD3 EN %	16.7256	18	9.6465	2.2737
Par 4	COSECHA1 LINFOCITOS $\gamma\delta$ EN %	9.9739	18	7.1345	1.6816
	COSECHA2 LINFOCITOS $\gamma\delta$ EN %	9.9356	18	7.1022	1.6740
Par 5	COSECHA1 LINFOCITOS T $\gamma\delta$ $\times 10^6/\text{Kg}$.	2.9789	18	2.4822	0.5851
	COSECHA2 LINFOCITOS T $\gamma\delta$ $\times 10^6/\text{Kg}$.	3.2528	18	2.7680	0.6524

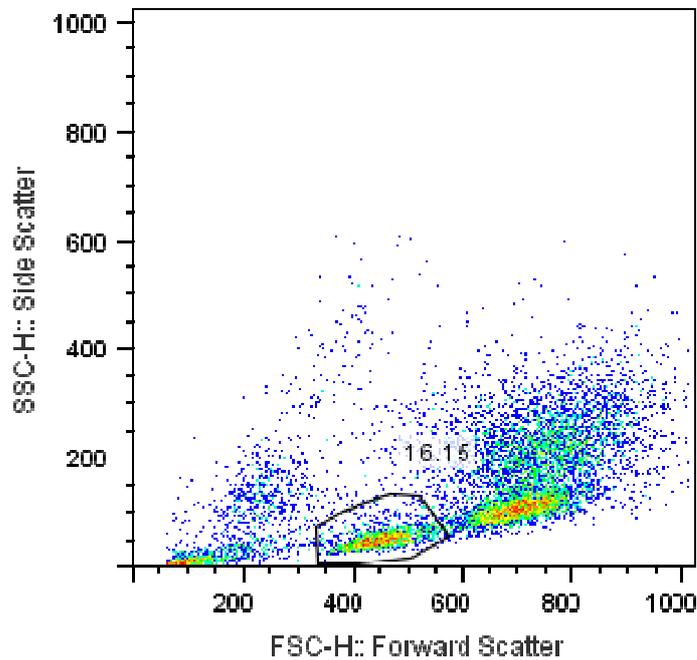
Cuadro 4. Resultados de la “T pareada” en las cosechas 1 y 2 al día 4to y 5to de movilización con FEC-G

	Diferencias pareadas					T	DF	p
	Media	DS	ERROR DS	Intervalo de confianza al 95%				
				Bajo	Alto			
Pair 1 COS1CN - COS2CN	-54.1111	108.7219	25.6260	-108.1773	-.0450	-2.112	17	.050
Pair 2 COS1LINF - COS2LINF	6.1111	18.0974	4.2656	-2.8885	15.1107	1.433	17	.170
Pair 3 COS1CD3 - COS2CD3	4.0144	13.8473	3.2638	-2.8717	10.9005	1.230	17	.235
Pair 4 COS1GD - COS2GD	3.833E-02	1.9982	.4710	-.9553	1.0320	.081	17	.936
Pair 5 COS1RESU - COS2RES	-.2739	2.3695	.5585	-1.4522	.9044	-.490	17	.630

COS1CN= Cosecha 1 células nucleadas, COS2CN= Cosecha 2 células nucleadas, COS1LINF= Cosecha 1 Linfocitos absolutos, COS2LINF= Cosecha 2 Linfocitos absolutos, COS1CD3= Cosecha 1 Linfocitos T CD3 en porcentaje, COS2CD3, Cosecha 2 Linfocitos T CD3 en porcentaje, COS1GD= Cosecha 1 Linfocitos T $\gamma\delta$ en porcentaje, COS2GD= Cosecha 2 de Linfocitos T $\gamma\delta$ en porcentaje, COS1RESU= Cosecha 1 de Linfocitos T $\gamma\delta$ expresado $\times 10^6/\text{Kg}$, COS2RES= Cosecha 2 Linfocitos T $\gamma\delta$ expresados $\times 10^6/\text{Kg}$.

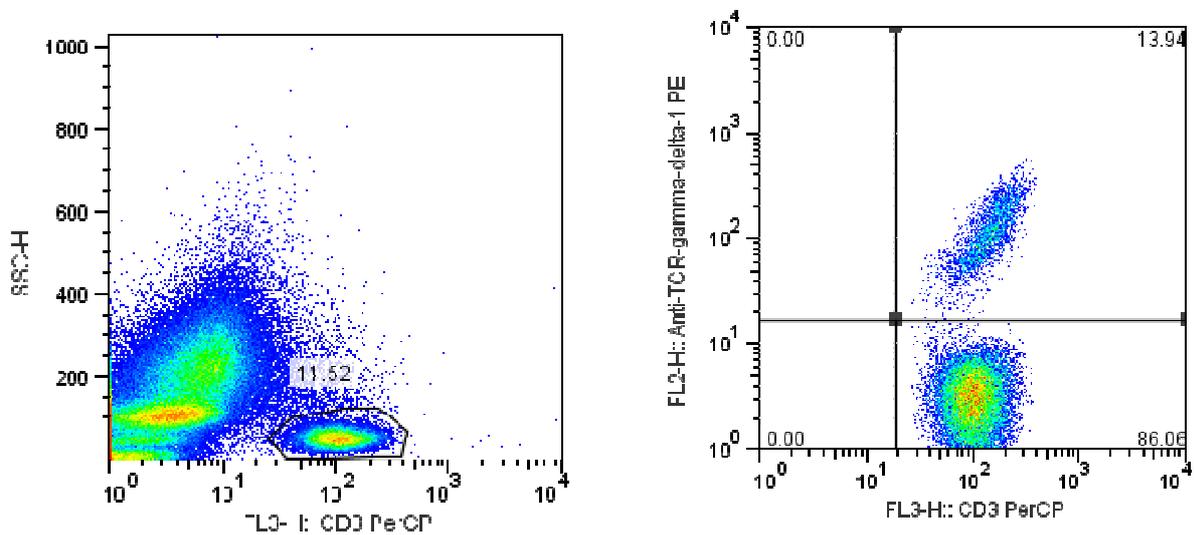
Cifra total de linfocitos T
gamma-delta por cosecha



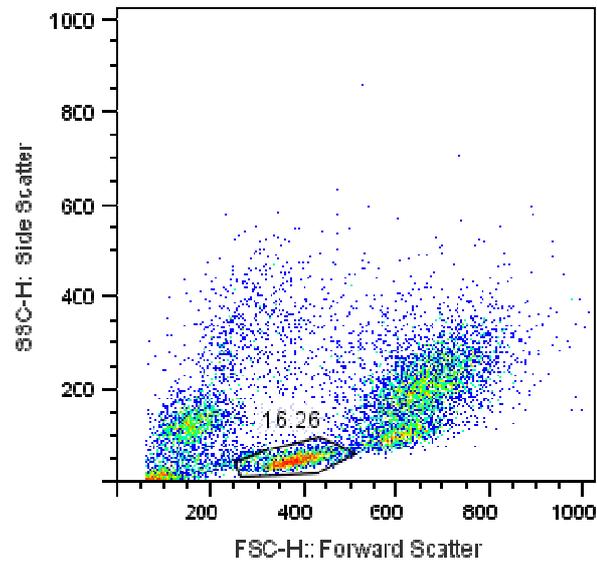


Grafica en Citometría de Flujo Dot-plot, de una muestra de la cosecha 1 al día 4to de la movilización con FEC-G.

El área marcada corresponde al área de los linfocitos.

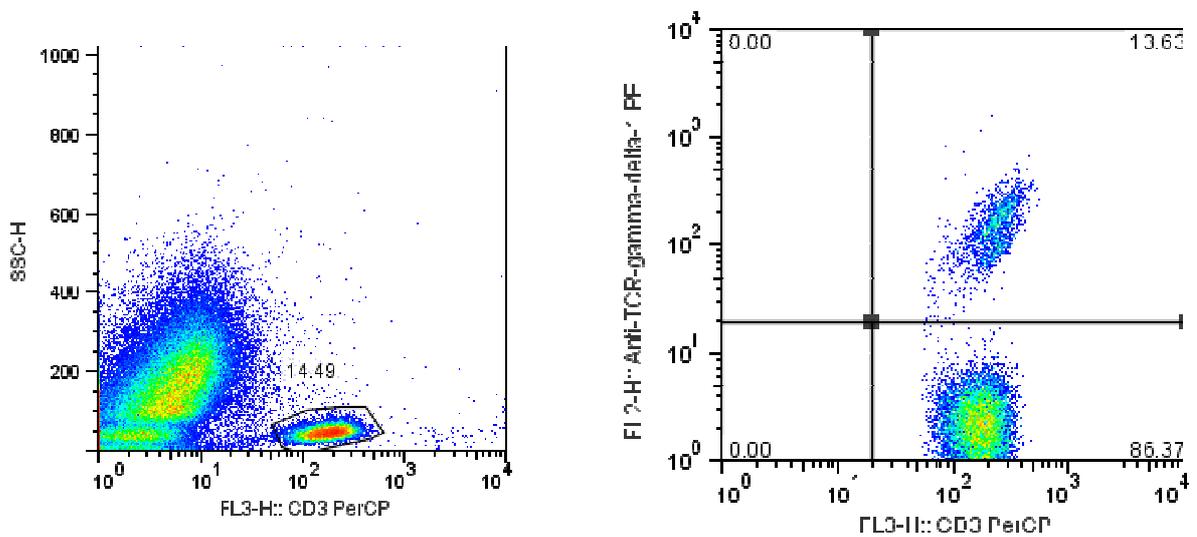


Dot-plot de una muestra de la cosecha 1 al día 4to de la movilización con FEC-G. A la izquierda se muestra la región y el porcentaje de linfocitos T CD3 y a la derecha en el cuadrante superior derecho se muestra el porcentaje de linfocitos T gamma/delta.



Grafica en Citometría de Flujo Dot-plot, de una muestra de la cosecha 2 al día 5to de la movilización con FEC-G.

El área marcada corresponde al área de los linfocitos. Muestra del paciente previo



Dot-plot de una muestra de la cosecha 2 al día 5to de la movilización con FEC-G. A la izquierda se muestra la región y el porcentaje de linfocitos T CD3 y a la derecha en el cuadrante superior derecho se muestra el porcentaje de linfocitos T gamma/delta. Muestra del paciente previo.

Finalmente se realizó dentro del análisis estadístico la correlación de Pearson, para los datos de las células nucleadas (CN o Leucocitos), linfocitos totales, linfocitos CD3 y linfocitos $\gamma\delta$. Se obtuvo una correlación de 0.119 con $p = 0.639$ en las muestras de las cosechas 1 y 2 en el 4to y 5to día de la movilización para la determinación de leucocitos, mientras que para CD3 fue de 0.181 con una $P = 0.472$ y para la cifra absoluta de LT $\gamma\delta$ fue de 0.597 con una $p = 0.009$.

Correlación entre cosecha 1 y 2 para Células Nucleadas

		COS1CN	COS2CN
COS1CN	Pearson Correlation	1.000	.119
	Sig. (2-tailed)	.	.639
	N	18	18
COS2CN	Pearson Correlation	.119	1.000
	Sig. (2-tailed)	.639	.
	N	18	18

COS1CN= Cosecha 1 células nucleadas, COS2CN= Cosecha 2 células nucleadas

Correlación entre cosecha 1 y 2 para CD3

		COS1CD3	COS2CD3
COS1CD3	Pearson Correlation	1.000	.181
	Sig. (2-tailed)	.	.472
	N	18	18
COS2CD3	Pearson Correlation	.181	1.000
	Sig. (2-tailed)	.472	.
	N	18	18

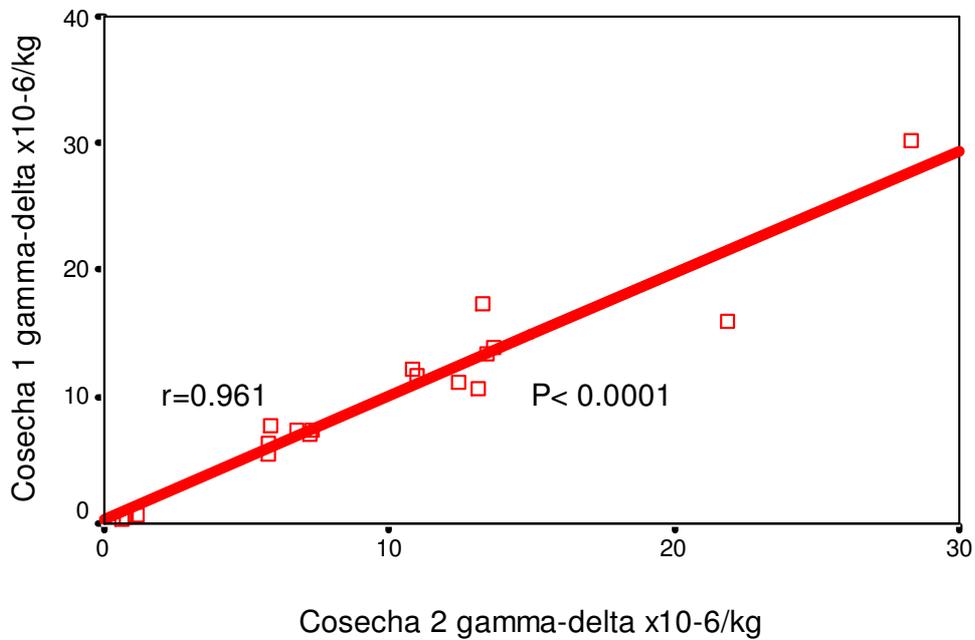
COS1CD3= Cosecha 1 Linfocitos T CD3 en porcentaje, COS2CD3, Cosecha 2 Linfocitos T CD3 en porcentaje

Correlación entre cosecha 1 y 2 para linfocitos T $\gamma\delta$

		COS1RESU	COS2RES
COS1RESU	Pearson Correlation	1.000	.597(**)
	Sig. (2-tailed)	.	.009
	N	18	18
COS2RES	Pearson Correlation	.597(**)	1.000
	Sig. (2-tailed)	.009	.
	N	18	18

COS1RESU= Cosecha 1 de Linfocitos T $\gamma\delta$ expresado $\times 10^6/\text{Kg}$, COS2RES= Cosecha 2 Linfocitos T $\gamma\delta$ expresados $\times 10^6/\text{Kg}$

Correlación entre primera y segunda cosechas Gamma-Delta



Finalmente se realizó un seguimiento en cuanto a la evolución de los pacientes al día 50 ó 100 postrasplante, encontrándose que de los 3 pacientes que presentaron una recaída posterior a la infusión de células STEM CELL ninguno de ellos obtuvo la cifra mayor o menor de células T $\gamma\delta$, en ambas bolsas de las cosechas. Es de llamar la atención que los pacientes que obtuvieron la cifra menor de linfocitos T $\gamma\delta$, en ambas cosechas se encuentran en remisión completa y sin datos de actividad, así mismo el paciente que obtuvo la cifra mayor se encuentra en remisión clínica completa, sin embargo el paciente que cursa aun con citopenias y probable síndrome mielodisplásico, aunque mostró una adecuada movilización de células mononucleares y una cifra de CD34 por arriba de $2 \times 10^6/\text{Kg}$, es uno de aquellos que obtuvo una escasa movilización de linfocitos T $\gamma\delta$.

DISCUSIÓN

En los últimos años, los avances técnicos así como los conocimientos en el campo de la hematopoyesis y la biología del trasplante de células progenitoras han estimulado el desarrollo de técnicas de manipulación del injerto con la intención de disminuir la morbilidad, la mortalidad del procedimiento y así mismo otorgar un mayor número de meses de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, por lo tanto también de disminuir el número de recaídas e idealmente lograr la curación de la enfermedad.

El antígeno CD34 se expresa en progenitores hematopoyéticos tanto inmaduros como comprometidos sin que se exprese en las células mieloides y linfoides maduras. Por lo tanto la realización del trasplante con células CD34 positivas previamente seleccionadas, al menos en forma teórica aporta la mayoría de las células progenitoras responsables del injerto y elimina la mayor fuente de células neoplásicas y células “T” reguladoras. Aunque esto último no es del todo cierto, ya que si bien la gran mayoría de las células seleccionadas son células pluripotenciales, un gran porcentaje incluyen células T con capacidad antitumoral, como son: NK, NKT, T citotóxicos, T cooperadoras, células dendríticas y T $\gamma\delta$. Recientemente se han desarrollado técnicas para aumentar la pureza de las células CD34 positivas, mediante la depleción entre 3 y 4 logaritmos de linfocitos T, sin embargo los métodos utilizados hasta ahora siguen siendo poco eficaces y siguen proporcionando en por lo menos un logaritmo de células no CD34 positivas, lo que nos lleva a la conclusión de que no debemos preocuparnos por la eliminación de dichas células, sino más bien de su manipulación para mejorar los efectos del trasplante o por lo menos conocer cuales puede ser útiles en determinadas enfermedades.

Varios estudios se han llevado a cabo para determinar la dosis óptima de CD34 + para asegurar el injerto después de un trasplante, ya que como se mencionó previamente la contaminación con linfocitos T durante la movilización es alta y existe el riesgo de no contar con un adecuado injerto y

por lo tanto quedar con citopenias en forma definitiva o Síndrome Mielodisplásico. Algunos autores opinan que la dosis ideal de células CD34 + para un injerto exitoso es de $3 \times 10^6/\text{Kg}$, sin embargo otros sugieren una dosis mayor de $5 \times 10^6/\text{Kg}$. En este estudio se observó que la cifra promedio cosechada de stem cell CD34 positivas fue de $2.95 \times 10^6/\text{Kg}$.

Además, se corroboró lo ya publicado en diferentes estudios, mostrando que el FEC-G utilizado en los 18 pacientes logró la movilización de células desde la médula ósea hasta la sangre periférica, obteniendo una cifra mayor de células nucleadas o leucocitos totales en comparación con las cifras basales. Los resultados encontrados en este estudio muestran por primera ocasión que aumentaron tanto en porcentaje como en número absoluto los linfocitos T $\gamma\delta$ en comparación con las cifras basales, mostrando significancia estadística. También se observó la movilización y por lo tanto aumento en las cifras de las células nucleadas y linfocitos T $\gamma\delta$ en las bolsas de las cosechas en comparación con la cifra basal obtenida en la muestra de sangre periférica. Esto es importante y original, ya que hasta la fecha no existe ningún estudio clínico en relación a las células T $\gamma\delta$ en pacientes candidatos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Así mismo los resultados traducen que además de las células CD34 obtenidas mediante separación por aféresis en las bolsas infundidas, se encuentra una gran cantidad de células T $\gamma\delta$ que aumentan con el uso de FEC-G. En relación a lo anterior es importante mencionar que existen pocos estudios que estudien y cuantifiquen las células T reguladoras (NK, NKT, FOXP3, T citotóxicos) en pacientes candidatos a trasplante de stem cell, tal es el caso de lo publicado por el grupo de Hematología de esta Institución.

Cuando se realizó el análisis de las cosechas obtenidas al día 4 y 5to de movilización de ambas bolsas, no se observó diferencia estadísticamente significativa en los resultados entre cada una de las variables analizadas (CN, LINF, CD3, T $\gamma\delta$). Debido a lo anterior se realizó un análisis de correlación el cual no mostró diferencia alguna en las cifras obtenidas entre la bolsa 1 de cosecha y la bolsa 2 en relación a la variable de los linfocitos T $\gamma\delta$. Por ello se sugiere que en el futuro se puede medir el número de células nucleadas y linfocitos T $\gamma\delta$ en una sola ocasión en forma

indistinta ya sea en la cosecha uno o bien en la cosecha 2, esta medición podrá ser un dato fiel aproximado de las células movilizadas. Por otra parte será importante continuar con el estudio de todas las células que llegan a movilizar con el uso de las citocinas, ya que son pocos aun los estudios publicados en relación a la cuantificación de las células T reguladoras, todas ellas e inclusive las células T $\gamma\delta$ pueden llegar a tener un efecto citotóxico, antitumoral, si bien también pueden contar con una actividad opuesta del tipo supresora, lo que nos lleva a indagar y a cuestionar, cuales son los mecanismos que condicionan que este tipo de células puedan en algún momento contar con actividad citotóxica o supresora o bien ambas. Si bien esto puede y debe ser estudiado en un estudio a futuro, no solo con la cuantificación del número de células sino también e idealmente el estudio de patrón de citocinas que llegan a secretar estas células y que nos orienten un poco más a la función que desempeñan en los pacientes trasplantados.⁽³⁾

Por otro lado, si bien es cierto se demostró que con el uso de FEC-G se movilizan células nucleadas y linfocitos T $\gamma\delta$ será importante reconocer las limitaciones observadas, como lo es la escasa población estudiada, sin embargo estos resultados solo muestran un Estudio piloto y debe ser como lo ya hemos dicho, motivo para continuar con un seguimiento en los pacientes postrasplantados. Otro punto a considerar es el hecho que solamente se utilizo como anticuerpo monoclonal el anti – TCR $\gamma\delta$ del tipo V δ 1+ las cuales residen principalmente en tejidos epiteliales, donde pueden actuar como 1^{ra} línea de defensa contra infecciones y enfermedades malignas, siendo ideal el uso de anticuerpos monoclonales ya sea en forma de pan-TCR $\gamma\delta$ e idealmente el uso de anticuerpos monoclonales específicos como serían anti-T $\gamma\delta$ que expresen la región V γ 9+ V δ 2+ del TCR y los cuales representan la mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ de sangre periférica, recordemos que esta variedad juega un papel muy importante en la defensa contra los patógenos intracelulares y malignidades hematológicas y que se ha demostrado en estudios “in Vitro” que estas células activadas son capaces de destruir líneas celulares de Linfoma y Mieloma, encontrándose también con alta frecuencia en pacientes con LMA post-transplantados libres de enfermedad.⁽²⁾

CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos y el análisis realizado, podemos concluir que todos los pacientes incluidos en este estudio mostraron una movilización de células nucleadas en sangre periférica y en las bolsas de las cosechas. También se observó un aumento en la cifra total de los linfocitos T $\gamma\delta$ tanto en sangre periférica como en las bolsas de las cosechas posterior al uso del FEC-G. No existe diferencia alguna en la cantidad de células obtenidas cuando se compara la cifra en la bolsa de la cosecha 1 versus bolsa de la cosecha 2, esto en relación a las células mononucleares y los linfocitos T $\gamma\delta$. Hasta el momento no se puede concluir si este tipo de células con efecto antitumoral bien conocido puede influir en la supervivencia global o libre de enfermedad de los pacientes, esto deberá ser motivo de estudio, otorgándose un adecuado seguimiento y análisis respectivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roitt I, et al (1998). Immunology.; ED ELSEVIER; 5ta. Ed. pp 14-15.
2. Moser B and Brandes M (2006). $\gamma\delta$ T cells: an alternative type of professional APC. Trends Immunol. 20 ; 2-7.
3. Rischer M et al (2004). Human $\gamma\delta$ T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity. British Journal of Haematology; 126, 583–592.
4. Wisnewski et al (2003) . Human $\gamma\delta$ T-cell proliferation and IFN- γ production induced by hexamethylene diisocyanate. J ALLERGY CLIN IMMUNOL 112(3), 538-546.
5. Sato K et al (2005). Cytotoxic effects of $\gamma\delta$ T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. Int. J. Cancer: 116, 94–99.
6. Kolb et al (2004). Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. Blood; 103: 767 - 776.
7. Antin Joseph (2003). Stem cell transplantation-harnessing of graft-versus-malignancy. Curr Opin Hematol 10:440–444.
8. Arai S et al (2000). Management of graft-versus-host disease *Blood Reviews* 14, 190–204.
9. Ferrarini M, et al, (2002). Human $\gamma\delta$ T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. Trends Immunol. 23 : 14-18
10. Brandes M, et al. (2005). Professional Antigen-Presentation Function by Human $[\gamma][\delta]$ T Cells *Science*. 309; 264-268.

11. Sadelain M et al (2003). Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nature Reviews Cancer*. 3:35-45.
12. Morita C, et al. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*. 3:495–507.
13. Shild H, et al (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell*. 76:29-37.
14. Kunzmann V, et al. (2000). Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 96:384–392
15. Born W, et al (2006). The function of gd T cells in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 18:31–38.
16. Peggs K, et al. (2004). Immune reconstitution following haematopoietic stem cell Transplantation *British Journal of Haematology*: 124; 407–420.
17. Korbling M, et al. (2002). Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*. 98:2900-2909.
18. Maeda Y, et al. (2005). Critical role of host $\gamma\delta$ T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood*. 106:749-755

ANEXO I

ANÁLISIS DE COSTOS

Variable	Costo unitario	# unidades promedio	Costo total
Ecocardiograma	92	1	92
Consulta psiquiatría	1238	1	1238
Consulta maxilofacial	1238	1	1238
Pruebas función respiratoria	350	1	350
Consulta trabajo social	1238	1	1238
Consulta dietología	1238	1	1238
Estudio donadores banco de sangre	610	15	9150
Estudio HLA serología	517	5	2585
Estudio HLA PCR	2900	5	14500
Día cama	2876	28	80528
Aféresis stem cell	4000	2	8000
Aféresis plaquetas	3000	5	15000
Filtros plaquetas	350	5	1750
Paquete globular	580	3	1740
Filtros paquete globular	350	2	700
Cateter Hickman	1707	1	1707
Catéter Mahurkar	746	1	746
Cirugía menor	2000	1	2000
Curación cateter	380	9	3420
Filgrastim 300 ugr	7254.66	3	21763.98
Busulfán tab. 2 mg cajas	32.45	22	714
Ciclofosfamida 500 mg, ámpulas	150	9	1350

Mesna	499	3	1497
Ondansetron amp 8 mg	199.85	8	1599
Dexametasona	5	6	30
Difenilhidantoina tabletas, cajas	22	1	22
Trimetoprim + sulfametoxazol, cajas	1.9	30	57
Ácido folínico amp. 3 mg	49.93	12	599
Aciclovir amp 250 mg	340	40	13600
Ciprofloxacina tab 250 mg, cajas	1.77	2	3.54
Fluconazol tab 100 mg, cajas	55	3	165
Ceftazidima amp 1 gr	13.75	21	289
Amikacina amp. 500 mg	2.93	14	41
Vancomicina amp 500 mg	70.99	28	1988
Imipenem	293	40	11720
Anfotericina B amp 50 mg	269.55	10	2695
Ciclosporina amp. 50 mg	782.67	13	10174
Ciclosporina caps 100 mg	3550	13	46150
Metotrexate amp. 50 mg	61	6	366
Micofenolato de mofetilo	2429	3	7287
Metilprednisolona	4900	1	4900
Otros medicamentos	250	28	7000
Nutrición parenteral total, días	748	10	7480
Dieta polimérica	8	30	240
Biometría hemática	48	15	720
Química sanguínea	48	15	720
Electrolitos séricos	48	15	720
Pruebas de función hepática	48	15	720
Niveles de ciclosporina	437	10	4370

Citometría de flujo CD34	1200	4	4800
Coagulograma	48	8	384
Hemocultivos	73	6	438
Electrocardiograma	196	2	392
Tele tórax	295	5	1475
Aspirado médula ósea	49	3	147
Biopsia de hueso	1200	2	2400
Soluciones parenterales	30	70	2100
GRAN TOTAL			308336.52