



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“MONITOREO Y CARACTERIZACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN
INMUNOLÓGICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-
TRASPLANTADOS DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS, EMPLEANDO COMO FUENTE: SANGRE DE
CORDÓN UMBILICAL O SANGRE PERIFÉRICA”**

**TESINA QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LA ESPECIALIZACIÓN
EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
PRESENTA:**

QFB. ALBERTO FRAGOSO SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Julio Granados Arriola

VOCAL: Profesor: Dr. Armando Isibasi Araujo

SECRETARIO: Profesor: MASS. Eva Delia Calderón Garcidueñas

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios

2° SUPLENTE: Profesor: EBC Ana Margarita Zavala Ortiz

TRABAJO REALIZADO EN:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA-ONCOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

EBC. LINA ROMERO GÚZMAN

SUSTENTANTE:

QFB. ALBERTO FRAGOSO SÁNCHEZ

AGRADECIMIENTOS

A la EBC Lina Romero Guzmán jefa del departamento de análisis clínicos y estudios especiales del Instituto Nacional de Pediatría por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, gracias por su apoyo científico y profesional.

A la QFB Fabiola Mújica Guzmán quien formo parte activa en la asesoría de este trabajo, tanto en el desarrollo experimental como en la organización y revisión de la tesis escrita, gracias por su calidad humana, científica, profesional y el deseo de superación en todos los ámbitos.

A la máxima casa de estudios (UNAM) y la facultad de Química por los profesores que proporcionaron sus enseñanzas y conocimientos y al Instituto Nacional de Pediatría lugar de desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS

Agradezco en primera instancia a Dios por las cosas que he recibido hasta el día de hoy, las vivencias y aprendizaje a lo largo de esta especialidad y por permitirme finalizar esta etapa de mi vida.

A mis padres (Alberto Fragoso Sandoval y María Lina Sánchez Miranda) y hermana (María Lina Fragoso Sánchez) por su apoyo incondicional, su amor, su confianza, su fortaleza y palabras de aliento que han iluminado esta etapa de mi vida.

A toda mi familia les agradezco su gran apoyo en especial a mis abuelitas (Teresa Sandoval y Lina Miranda) mi tía abuela (Esperanza Sandoval) por su gran amor y cariño.

A Carolina Moreno Oliva por seguir siendo parte de mi vida, tu amor incondicional y sincero, doy gracias a dios por seguir juntos y por tenerte a mi lado y que sea así para toda la vida.

Gracias a todos mi amigos, por los momentos que hemos pasado juntos y que nuestra amistad perdure para siempre.

INDICE

Capítulo	Página
Abreviaturas	<i>i</i>
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
2.1 Generalidades del TCPH.....	2
2.1.1 Definición de TCPH.....	2
2.1.2 Antecedentes Históricos.....	3
2.1.3 Tipos de Trasplante.....	6
2.1.4 Tipo de Fuente de Trasplante.....	9
2.2 Importancia del Complejo Principal de Histocompatibilidad en TCPH.....	14
2.3 Enfermedad de Injerto contra Hospedero.....	20
2.4 Reconstitución Inmunológica post-TCPH.....	23
2.4.1 Linfocitos TCD4.....	26
2.4.2. Linfocitos TCD8.....	27
2.4.3 Células Natural Killers (NK) CD56.....	28
2.4.4 Linfocitos B CD19.....	30

2.5 Citometría de Flujo y Aplicaciones.....	31
III. Justificación.....	34
IV. Hipótesis.....	35
V. Objetivos.....	35
VI. Material y Métodos.....	36
6.1 Material.....	36
6.2 Métodos.....	36
VII. Análisis Estadístico.....	37
VIII. Resultados.....	38
IX. Discusión de Resultados.....	48
X. Conclusiones.....	51
XI. Bibliografía.....	54
XI. Anexos.....	60

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- APC- Célula presentadora de antígeno
- CPH- Células progenitoras hematopoyéticas
- CU- Cordón Umbilical
- G-CSF- Factor estimulador de colonias granulocíticas
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- EBMTG- Grupo Europeo de Trasplante de médula ósea
- GM-CSF- Factor estimulador de colonias granulocítico-macrofágico
- GVHD- Enfermedad de Injerto contra hospedero
- HLA- Antígeno leucocitario humano
- IBMTR- Registro Internacional de trasplante de médula ósea
- INP- Instituto Nacional de Pediatría
- Ig- Inmunoglobulina
- IgA- Inmunoglobulina A
- IgD- Inmunoglobulina D
- IgE- Inmunoglobulina E
- IgG- inmunoglobulina G
- IgM- Inmunoglobulina M
- SPm- Sangre periférica movilizada
- TCPH Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas
- TCR- Receptor de células T
- TMO- Trasplante de médula ósea

I. RESUMEN

Actualmente el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) se practica con mayor frecuencia como consecuencia de los avances en investigación que han ocurrido sobre todo en el estudio del sistema principal de histocompatibilidad o antígeno humano leucocitario (HLA por sus siglas en inglés *Human Leucocyte Antigen*), en el uso de mejores programas de acondicionamiento y medidas de soporte médico, así como la posibilidad de poder conservar vivas durante años a las células progenitoras hematopoyéticas (criopreservación), etapa fundamental para el trasplante autólogo y alogénico en el trasplante de células de cordón umbilical (CU).

La reconstitución inmunológica es un proceso complejo influenciado por ambos injertos; en el donante (dosis celular, histocompatibilidad) y factores relacionados con el receptor (edad, terapia previa, régimen de acondicionamiento, exposición a infecciones previas, etc.).

El objetivo de este trabajo fue describir, monitorear y caracterizar la reconstitución inmunológica de los pacientes pediátricos post-trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de fuente de cordón umbilical y sangre periférica movilizada (SPm). Para ello se estudiaron 31 casos a los cuales se les determinaron los niveles de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento post-trasplante.

El análisis del monitoreo de subpoblaciones linfocitarias, mediante citometría de flujo, en pacientes sometidos a TCPH, mostró que no se presentó una reconstitución inmunológica completa al año post- trasplante.

II. INTRODUCCIÓN

El TCPH, en alguna época se conoció como trasplante de medula ósea (TMO), ya que en este sitio era de donde se obtenían preferentemente las CPH.^{1, 2} Se ha convertido en una forma convencional y modalidad terapéutica eficaz en el tratamiento de enfermedades humanas de elevada mortalidad. Es posible curar diferentes enfermedades y es utilizada en el tratamiento de determinadas inmunodeficiencias congénitas, aplasias medulares y hemopatías congénitas y neoplasias onco-hematológicas.^{3, 4} Los avances en los últimos 15 años son formidables, logrando la desaparición de la enfermedad en 50-80% de los casos según la patología.¹

Por otra parte, es necesario tener en mente las complicaciones que pueden ocurrir como consecuencia de este procedimiento, como la enfermedad injerto contra hospederio (GVHD por sus siglas en inglés *Graft-versus-Host Disease*), las infecciones oportunistas que implican un riesgo importante de muerte o lesiones permanentes en el receptor y la inmunodeficiencia.

2.1. GENERALIDADES DEL TCPH

2.1.1. Definición de TCPH

El TCPH puede ser definido como la transferencia de células madre hematopoyéticas de un individuo a otro (trasplante alogénico) o el regreso de células tratadas del mismo individuo (trasplante autólogo) después de la manipulación de estas células y el receptor. El principio es sustituir una

hematopoyesis enferma, o con una función pobre o ausente, por una hematopoyesis normal obtenida a partir de un donante sano histocompatible.⁵

Los métodos y técnicas utilizados en el TCPH han ido mejorando en la actualidad, y es una terapia celular que ha sido practicada por décadas para el tratamiento de desórdenes hematológicos y tumores sólidos. El trasplante de estas células permite la restauración de componentes celulares de la sangre, ya que son responsables de la generación de un sistema hematopoyético nuevo como: componentes celulares de la sangre, incluyendo monocitos, linfocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, eritrocitos y trombocitos.^{4,6}

Las CPH o células madre se obtienen de 3 fuentes: la propia medula ósea, la sangre periférica movilizada y el cordón umbilical del recién nacido. Las CPH de sangre periférica son movilizadas por medio de citocinas y factores estimuladores de colonias; y esto ha remplazado en buena parte a la medula ósea, como origen de las células en el trasplante autólogo debido a una rápida reconstitución inmunitaria, de forma similar las CPH de sangre periférica movilizada alogénicos dan lugar a un restablecimiento hematológico más rápido.^{1, 3, 7, 8}

2.1.2. Antecedentes históricos

El primer trasplante de médula ósea humano documentado fue realizado por Osgood en 1939, cuando una mujer con aplasia medular tratada con transfusiones

regulares, recibió la médula ósea de su hermano con idéntico grupo sanguíneo intravenosamente, pero no hubo éxito y la paciente murió 5 días después. ¹

Otros investigadores tuvieron éxito cuando demostraron que ratones irradiados letalmente podían recuperar la hematopoyesis normal con infusiones de médula de ratones sanos a través del torrente sanguíneo,^{3, 9} hecho que permitió especular sobre la factibilidad de trasplantar médula ósea de un ser humano a otro y esto se presentó en un accidente radiactivo ocurrido en Yugoslavia, donde 6 víctimas viajan a París con la médula ósea destrozada por la irradiación; George Mathé y colaboradores mediante infusión por vía intravenosa de las células madre (responsables de la formación sanguínea) de familiares y voluntarios regeneran la médula ósea de las víctimas; sin embargo, uno fallece por la larga exposición a dosis de radiación.^{3,10}

Este comienzo fortuito, circunstancial de este proceso histórico, rápidamente se extendió a los países desarrollados que no solo estaban en posibilidad de implementar la nueva técnica, sino, mejorarla y enriquecerla. Aunque el comienzo fue lento y caracterizado mayormente por fracasos que por éxitos, debido a las limitaciones impuestas por la selección de donadores compatibles; la demostración de los HLA y el desarrollo de sus métodos de tipaje en la década de los sesentas llevo a una nueva fase el TCPH conducidos por Dausset and Van Rood. ³

El primer trasplante exitoso en Estados Unidos se logró en 1968 en Minnesota, en un infante con una inmunodeficiencia severa combinada, al que se le infundió

CPH de su hermana sana histocompatible, en Nueva York se realizó el primer trasplante exitoso de un donador no relacionado, en un niño de 5 años de edad con síndrome de inmunodeficiencia severa combinada. En ambos casos el trasplante se realizó en niños intensamente inmunodeprimidos.^{3, 10}

Para finales de 1970's numerosos centros en el mundo habían activado programas de trasplante de médula ósea BMT (por sus siglas en inglés *Bone Marrow Transplants*) influenciados por 2 multicentros que han sido establecidos: IBMTR (por sus siglas en inglés *International Bone Marrow Transplant Registry*) y el EBMTG (por sus siglas en inglés *European Bone Marrow Transplant Group*).³

En México en los años ochenta el Dr. Ricardo Sosa y colaboradores hicieron el primer trasplante en el Instituto Nacional de Nutrición (INN), seguido de varios intentos aislados en el Centro Médico Nacional del I.M.S.S. pero con pobres resultados lo que llevo a una suspensión transitoria y que resultaron anecdóticos hasta 1995 cuando se inicia la segunda etapa, con médicos entrenados en otros países extranjeros, debido a la evolución de los conocimientos en esta área: a) Se comenzaron a usar CPH de sangre periférica movilizada en vez de médula ósea, b) Se hicieron simplificaciones de los métodos para llevar a cabo los trasplantes, c) Se inició la práctica de alotrasplantes con esquemas de acondicionamiento, cuartos aislados y protocolos.^{1, 2}

En los años 90's y hasta la fecha se ha desarrollado el TCPH y el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad injerto contra hospedero,³ se estima que alrededor del mundo se realizan de 30,000 a 40,000 procedimientos de trasplante

de células progenitoras hematopoyéticas y ofrece un potencial de curación o control a largo plazo para un gran número de enfermedades en donde otras opciones terapéuticas han fallado o los índices pronósticos sugieren evolución desfavorable.¹

No existe información exacta sobre cuántos TCPH se han hecho en México. En el 2003 se organizó una reunión de directores de programa de TCPH en México en el que se informaron resultados de más de 400 pacientes trasplantados en todo el país. En un programa conjunto de TPCH Monterrey/Puebla, para enero de 2005 se habían llevado a cabo más de 250 TPCH.² En el INP durante el periodo comprendido entre los años 1998 y 2011 se realizaron un total de 125 trasplantes de CPH en pacientes pediátricos.

2.1.3. Tipos de Trasplante

Esta terapia consiste en la infusión intravenosa de células progenitoras hematopoyéticas para restablecer la función medular en pacientes con daño o defectos en médula ósea. El uso de sangre venosa movilizada en lugar de médula ósea como fuente para colectar precursores hematopoyéticos ha aumentado cada vez más en trasplantes alogénicos con la idea de que a más rápida reconstitución hematopoyética, menor incidencia de complicaciones, pero el tiempo para que el injerto sea exitoso parece reducirse y la cantidad de células T

maduras que se infunden en el receptor es mayor, y por ende el riesgo y la gravedad de la GVHD también aumentan.

El trasplante contiene una variedad de células precursoras, pero las células progenitoras hematopoyéticas son identificadas por el antígeno de superficie CD34+, y este tipo de células establecen una adecuada y prolongada hematopoyesis y regeneran todo el sistema inmunológico.

Trasplante de Células Progenitoras hematopoyéticas Autólogo

Las aplicaciones del trasplante autólogo de CPH se llevan a cabo en enfermedades como son linfomas, mielomas múltiples y tumores sólidos. Especialmente en leucemias y linfomas existe el riesgo de que células malignas contaminen las CPH en el proceso de aféresis. El paciente actúa como su propio donante, o sea, sus propias CPH, después de ser extraídas, conservadas y tratadas (en enfermedades tumorales no invasivas de la médula ósea o en remisión completa de esta en caso de leucemias) en condiciones adecuadas, son reinfundidas como procedimiento de rescate permitiendo el empleo previo de tratamientos de quimio y radioterapia, permitiendo un desarrollo seguro en adultos mayores, debido a que no existe riesgo de GVHD como complicación.

En el trasplante autólogo de CPH, el mayor problema son las células malignas, con su resistencia inherente a la quimioterapia, pueden sobrevivir y su reinfusión probablemente puede contribuir a la alta incidencia de sufrir una recaída observada después del trasplante, sin embargo, es más seguro en pacientes mayores de 60 años, por el procedimiento simple.¹¹

Trasplante de células Progenitoras Hematopoyéticas Alogénico

Es un procedimiento curativo potencial para una variedad de enfermedades hematológicas malignas y no malignas, preferencial en pacientes con leucemias; las CPH son obtenidas de un donante que no es el propio paciente y con la mejor compatibilidad posible en el sistema HLA codificados por los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*), sea un familiar o no. Este tipo de trasplante es realizado en pacientes menores de 70 años, debido a la alta incidencia de complicaciones en estos pacientes, como GVHD, mayor complicación del trasplante alogénico de CPH.^{4, 11, 12.}

Como solo el 20-30% de los pacientes tienen hermanos donantes totalmente compatibles, se está realizando un número creciente de trasplantes de CPH con donantes compatibles no emparentados. En estos existe un mayor grado de aloreactividad que en los TCPH de hermanos HLA-idénticos debido a diferencias en los antígenos “menores de histocompatibilidad”. Actualmente se estima entre 55,000-60,000 TCPH alrededor del mundo.¹³

Trasplante singénico y haploidéntico

En el trasplante singénico el donante es un hermano gemelo univitelino y por lo tanto un HLA idéntico, o un TCPH haploidéntico lo que significa que el donador es el padre o la madre o un hermano con el 50% de probabilidad de tener HLA idéntico. Uno de los desarrollos más significativos dentro de estos 10 años de

TCPH ha sido el desarrollo y proliferación en la reducción de la intensidad de los regímenes de acondicionamiento.

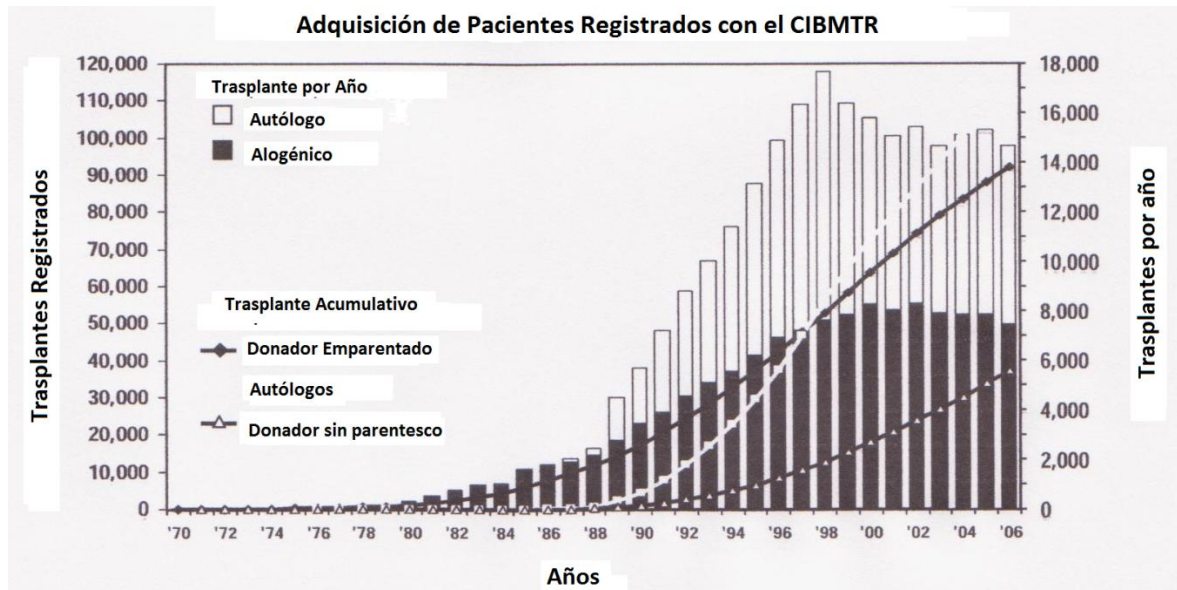


Figura 1. Muestra el acceso acumulativo del trasplante alogénico desde la recopilación que empieza en 1991 de IBMTR, y el acceso acumulativo del trasplante autólogo desde 1990 (cuando la recopilación fue iniciada) y donadores emparentados, donadores sin parentesco y donadores de trasplante autólogos. (Tomado y Modificado por IBMTR et al., 2007¹⁴).

2.1.4. Tipo de Fuente de Trasplante

La elección de la fuente de las células madre para trasplante hematopoyético no depende de las necesidades del receptor sino más bien de las posibilidades de su obtención. Cada fuente tiene diferentes propiedades intrínsecas estrechamente relacionadas con la edad ontogénica. La proporción de las células CD34+ las

cuales son un marcador específico para las células progenitoras hematopoyéticas en médula ósea fetal, médula ósea adulta, sangre periférica, y sangre del cordón es de 24.6%, 2.1%, 0.5% y 2.0% respectivamente.¹

Sangre de Cordón Umbilical

El trasplante de sangre de cordón umbilical representa la estrategia más reciente que expande un potencial de número de donadores mientras se mantiene un aceptable nivel de tratamiento relacionado a las complicaciones. Primeramente utilizado en niños, el trasplante de CU permite un alto grado de disparidad HLA mientras se demuestra una reducción en la incidencia y severidad de GVHD comparada con las otras modalidades de trasplante.^{8, 15,16, 17.}

En los primeros meses post-trasplante, los receptores de sangre de CU muestran menor recuperación de conteo de neutrófilos y plaquetas y mayor probabilidad de infecciones post-trasplante y muerte comparada con los receptores de trasplante de médula ósea. Las CPH procedentes de la sangre de cordón umbilical presentan algunas ventajas en comparación con otras fuentes de progenitores hematopoyéticos (médula ósea y sangre periférica); se ha demostrado que una unidad de sangre de cordón umbilical (SCU) contiene suficientes células hematopoyéticas para reconstituir la hematopoyesis en pacientes, hasta de 60 kg de peso. En pacientes adultos, el uso de 2 unidades de SCU proporciona la dosis adecuada de células y estas células contienen una mayor proporción de células CD34+ primitivas con una mayor capacidad

clonogénica en presencia de factores de crecimiento añadidos y con una capacidad mucho mayor de generar colonias secundarias.^{1, 15}

Si bien la capacidad de proliferación de los linfocitos T de la sangre de CU, frente a estímulos alogénicos primarios es similar a la de la sangre o la médula ósea del adulto, su actividad citotóxica basal es menor. También se han observado niveles inferiores en varias citocinas, inmadurez funcional de las células dendríticas y menor actividad celular NK. Estos datos podrían explicar, al menos en parte, la menor intensidad de la enfermedad injerto contra huésped observadas en los trasplantes con SCU y que permiten usar unidades con diferencias en el complejo principal de histocompatibilidad en uno y hasta tres antígenos. Hay asimismo diferencias en las características fenotípicas entre las células progenitoras primitivas de la SCU y de la médula ósea.

Para que las CPH puedan ser viables para su utilización en trasplantes tienen que ser obtenidas, procesadas y criopreservadas mediante procedimientos realizados bajo rigurosos controles de calidad. La recolección debe llevarse a cabo por el ginecólogo responsable de atender el parto. Tras éste, el cordón umbilical se pinza precozmente (menos de 35 seg) a 5 cm del ombligo con dos pinzas y a continuación se corta el vínculo materno-fetal, iniciándose la recolección de la sangre cuando la placenta está aún dentro del útero, previa asepsia del cordón con yodo. La técnica se efectúa mediante punción de la vena umbilical, con la bolsa de recolección y drenado por gravedad.

Las bolsas llenas de sangre de cordón se podrán mantener hasta 24 h a temperatura ambiente o bien en una hielera a 4°C acondicionada para tal fin hasta que sean enviadas al centro de procesamiento, la SCU se congela tras someterla a procedimientos de fraccionamiento. Es recomendable utilizar procesadores celulares automatizados, que garanticen un proceso siempre uniforme, reproducible y sobre todo que ofrezcan una recuperación celular máxima, con capacidad de reconstitución hematopoyética. La criopreservación debe hacerse de preferencia antes de las primeras 24 h desde la recolección o máximo antes de las 40 h.

Se sugiere que una mayor compatibilidad disminuye la necesidad de infundir una mayor cantidad de células. Si la compatibilidad es 6/6, la recomendación de la dosis a transfundir es de por lo menos $2.5-3 \times 10^6$ CD34+/kg de peso, por el contrario si la compatibilidad disminuye la dosis debe aumentar.^{1, 15, 16.}

Hoy en día, más del 25 % de los donadores de CPH en todo el mundo son de sangre de Cordón Umbilical, en el mundo están presentes más de medio millón de unidades de UCB preservados en bancos de cordones públicos. Cerca de 4000 UCB se proveen anualmente.^{17, 18}

Sangre Periférica Movilizada

La utilización de SPm como fuente de CPH después de un régimen de movilización tiene ventajas tanto para el receptor como el donador. En el receptor produce un injerto más rápido el cual se traduce en menores problemas infecciosos, menor estancia hospitalaria y menor requerimiento transfusional. En el

donador evitar la sedación profunda dando como resultado mayor aceptación a la donación inicial.¹

La movilización de CPH es usualmente lograda con el uso de factores de crecimiento solos o en combinación con quimioterapia o eritropoyetina en el cual mayor número de células CD34+ pueden ser recolectadas. Los agentes movilizadores que se utilizan son: factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) , los cuales son capaces de aumentar hasta 58 veces la cantidad de precursores obteniendo un aproximado de $2.5-5 \times 10^6$ CD34+/kg de peso.¹⁸

Las CPH son recolectadas con equipo de aferésis después de haber administrado los factores estimulantes vía intravenosa, normalmente se hace la recolección en el quinto día, las CPH se encuentran mezcladas en exceso con células de la sangre periférica y contienen cerca de 10 veces más linfocitos que células madre, este equipo hace una selección de separación celular por densidad; en este caso existe un mayor riesgo de GVHD^{3, 18}.

Médula Ósea

En los infantes y en los niños, la médula ósea esta distribuida a través del esqueleto, incluyendo los huesos largos, después la médula ósea reside en el esqueleto axial. La espina anterior y posterior de la pelvis, esternón alto en adultos y la cabeza de la tibia en los infantes son los sitios más usados para obtención de TCPH, la recolección se realiza por punción en estos huesos bajo sedación. Una colección típica puede requerir de unas 200 a 300 aspiraciones de médula,

obtenidas de varias punciones e incisiones en hueso y en la piel. Se define una buena colección cuando la cantidad total de células extraídas es igual o superior a 3.6×10^8 CMN/ kg de peso.^{1,3}

2.2. IMPORTANCIA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EN EL TRASPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

El MHC se localiza en la región 6p21.3 del brazo corto del cromosoma 6, contiene cerca de 4 millones de pares de bases, descubierto como un locus extendido con un alto contenido en genes sumamente polimorfos que determinan el pronóstico de los tejidos trasplantados entre los individuos. Se estima que 40% de los genes codifican proteínas involucradas en la respuesta inmune y el resto codifican para moléculas con funciones no relacionadas en el reconocimiento inmune. Las moléculas del MHC de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II) son las únicas involucradas en la respuesta inmunológica contra los trasplantes.¹

La función fisiológica de las moléculas del MHC es la presentación de péptidos a los linfocitos T. De hecho, las moléculas del MHC son componentes integrales de los ligandos que reconocen la mayor parte de los linfocitos T, ya que sus receptores del antígeno en realidad son específicos frente a complejos formados por péptidos de antígenos extraños y moléculas del MHC propias. Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y las de la clase II a los linfocitos T cooperadores CD4⁺.¹⁹

Las moléculas MHC-I fueron las primeras que se descubrieron en humanos, debido a que originalmente se identificaron por respuestas de anticuerpos contra los leucocitos y fueron denominados antígenos leucocitarios humanos (HLA). Se llevaron a cabo entonces estudios familiares para construir el mapa de *locus* del HLA. En los humanos las moléculas de MHC-I son: HLA-A, HLA-B y HLA-C, mientras las moléculas de MHC-II son: HLA-DP, HLA-DR Y HLA-DQ. Sabemos que las diferencias en los alelos del HLA entre personas son determinantes en el rechazo de trasplante de un individuo a otro y solo el 30 % de los pacientes tiene un donador idéntico HLA.^{1, 19, 20, 21} Se suman identidades y se aceptan 4/6 con un mínimo de 3.5×10^7 de células CD34+/kg y 2.5×10^7 de células CD34+/kg, para 5/6 y 6/6 únicamente en SCU. Si no se llega a esa dosis se pueden realizar trasplantes a partir de 2 unidades siempre que cada una de ellas tenga un mínimo de 1.5×10^7 células CD34+/ kg de peso.²¹

MHC-I

Moléculas también designadas de clase-I, corresponden a las denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C, se caracterizan por un alto nivel de polimorfismo alélico y se expresan como glicoproteínas transmembranales en la superficie celular de todas las células nucleadas y plaquetas. El nivel de expresión basal de moléculas MHC-I varía entre las estirpes celulares, las células linfoides expresan altos niveles mientras que las células neuronales, las células musculares o los espermatozoides expresan niveles bajos. Las moléculas de clase I constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente: una cadena alfa codificada por el CPH (o cadena pesada) y una subunidad no codificada por el

MHC denominada β_2 -microglobulina, la cadena pesada posee tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) semejantes a dominios de inmunoglobulinas, una región transmembranal de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos y una región citoplasmática carboxilo-terminal de 30 aminoácidos hidrofílicos. En los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se localiza el polimorfismo de las moléculas de MHC-I donde contribuyen a producir variaciones entre diferentes alelos en la unión de péptidos y en el reconocimiento de linfocitos T, mientras que el dominio $\alpha 3$ es muy conservado, presenta alta homología con un dominio constante de inmunoglobulina e interacciona con la molécula CD8 que se expresa en la superficie de los linfocitos T citotóxicos.^{7, 19}

La presentación del antígeno mediante las moléculas del MHC es una parte fundamental para la respuesta inmune adaptativa, para el caso de las moléculas MHC-I, los péptidos que se unen a ellas provienen principalmente de proteólisis (procesamiento de antígeno) de proteínas sintetizadas en el citosol de la célula, como lo son proteínas virales, proteínas anormales de células tumorales etc. de tal manera que la molécula MHC-I presenta en la superficie de la célula, el péptido antigénico para que sea reconocido por el TCR de los linfocitos T CD8⁺, así el TCR interactúa tanto con el péptido como con la misma molécula MHC.

MHC-II

Las moléculas clase II clásicas, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ presentan alto polimorfismo alélico y se expresan constitutivamente como glicoproteínas transmembranales sobre la superficie de un grupo limitado de células

denominadas células presentadoras de antígeno (APC) de origen mieloide como células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B, células epiteliales corticales y medulares del timo. Las moléculas de clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente, una cadena α y una cadena β . El extremo amino-terminal de ambas cadenas se orienta hacia el exterior de la célula y se distinguen dos dominios de inmunoglobulinas denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$ cada uno constituido por 90 aminoácidos, la región transmembranal conforman 23 residuos hidrofóbicos y la región intracitoplásmica carboxilo-terminal es de 15 aminoácidos hidrofílicos. La mayor parte del polimorfismo se encuentra en la cadena β . El dominio $\beta 2$ interacciona con la molécula $CD4^+$ expresada en los linfocitos T cooperadores.

Los péptidos antigénicos que son presentados por las moléculas MHC-II provienen de proteínas que ingresan a la vía endocítica, entre estas tenemos a las que se originan de patógenos que son interiorizados por las APC mediante receptores específicos.^{7, 19}

Una característica que distingue tanto a las moléculas de MHC-I y MHC-II, es que su expresión en la superficie celular se ve incrementada por citocinas que se liberan durante la respuesta inmune. El efecto de las citocinas se debe a un incremento en los niveles de transcripción génica de las moléculas de MHC mediados por diversos factores nucleares.

El reconocimiento del sistema inmune de los polimorfismos codificados genéticamente entre miembros de la misma especie se define como

alorreconocimiento mientras que alorespuesta define a los mecanismos efectores del sistema inmune que participan en la reacción en contra de esos polimorfismos. De tal manera que la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa participan en la alorespuesta pero son los linfocitos T las principales células involucradas en este tipo de respuestas, por lo tanto el alorreconocimiento implica que células T de un individuo reconocen como extrañas a las moléculas del MHC de un segundo individuo (alógeno) y la alorespuesta incluye la activación de linfocitos T con respuestas efectoras como: liberación de citocinas por parte de linfocitos T CD4⁺ y la actividad citotóxica por parte de los linfocitos T CD8⁺ que van a eliminar aquella célula que exprese MHC-I o MHC-II alogénicas.

La interacción del TCR con el péptido y MHC es altamente específica y a su vez genéticamente restringida al reconocimiento del MHC del mismo individuo de donde proviene la clona de linfocito T. La restricción genética se debe a que el polimorfismo de las moléculas de MHC clase I y II determinan el repertorio de péptidos que presentan cada alelo del MHC. Así por ejemplo, linfocitos T CD8 provenientes de un individuo y específicos en contra de algún antígeno del citomegalovirus, no van a cumplir su función citotóxica cuando se transfieran a otro individuo.

Por otro lado en el timo ocurre un proceso de maduración donde los timocitos cursan por procesos de selección positiva y selección negativa que conlleva a la generación del repertorio de linfocitos T maduros que fueron seleccionados con su capacidad de interactuar con el conjunto de moléculas MHC que expresa el individuo. En este contexto es difícil de comprender la razón por la cual los

linfocitos T se activan cuando interactúan con moléculas MHC alogénicas, además la frecuencia con la que se producen células T aloreactivas es más alta que la frecuencia de las células T específicas contra antígenos extraños, lo que da como resultado una fuerte respuesta alogénica y la consecuencia es la GVHD que se observa en un trasplante alogénico de células hematopoyéticas.

Tradicionalmente el aloreconocimiento se ha expresado de cuatro formas¹:

1. Aloreconocimiento directo- Cuando los linfocitos T del receptor reconocen al complejo MHC alogénico/péptido ofrecidos por CPA del donante.
2. Aloreconocimiento indirecto- Cuando los linfocitos T reconocen péptidos provenientes del procesamiento de las moléculas del MHC alogénicas y que son presentados por las moléculas MHC del receptor del trasplante a través de sus CPA.
3. Aloreconocimiento semidirecto- Cuando las APC del donador adquieren complejos de MHC alogénico/péptido y los presentan a los linfocitos T.
4. Aloreconocimiento de antígenos menores de histocompatibilidad- Cuando los linfocitos T reconocen péptidos provenientes del procesamiento de proteínas polimórficas codificadas fuera del MHC.

Las moléculas del MHC son el blanco de la respuesta alogénica, por lo tanto el grado de compatibilidad entre donador y receptor son determinantes en el éxito del trasplante, la incidencia de encontrar un donador familiar compatible con las moléculas de HLA es de 30 %.^{21, 22} De tal manera que es de la mayor importancia

la tipificación del HLA previo al trasplante y han emergido los siguientes conceptos: 1. Los alelos de HLA deben tipificarse mediante métodos de alta resolución (tipificación basada en ADN), 2. La histoincompatibilidad entre donador y receptor está asociada con el incremento en el rechazo del trasplante, la incidencia de GVDH aguda y crónica y el incremento de la mortalidad, 3. El número de alelos de HLA histoincompatibles es un factor de riesgo de las complicaciones post-trasplante, 4. La histoincompatibilidad definida serológicamente también lo será por tipificación alélica (tipificación basada en ADN), 5. La magnitud de histoincompatibilidad dependerá del número y localización de los residuos polimórficos, es decir, si estarían ubicados en el sitio de unión del péptido inmunogénico o en la zona de contacto con el TCR, 6. Factores no genéticos también son determinantes por ejemplo, la gravedad de la enfermedad al momento de realizar el trasplante.

2.3. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO

El término de la GVHD se debe al danés Morton Simonsen. La enfermedad GVHD, es un síndrome que puede ocurrir después de un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, el cual está asociado con una tardía mortalidad, morbilidad, mal funcionamiento, duración prolongada de la supresión inmunológica y una calidad de vida inferior. En el 2005 el Instituto Nacional de salud (NIH por sus siglas en *inglés National Institutes of Health*) hizo un consenso de desarrollo

para la protección de GVHD crónica, proponiendo cambios en diagnóstico, clasificación y grados de GVHD. Los principales objetivos del análisis fueron: (i) características de GVHD incluyendo el tipo de comienzo (de novo, inactivo y progresivo), y la clasificación del síndrome (aguda tardía, clásica, coincidir parcialmente) y (ii) la severidad global de GVHD, usando determinaciones de criterios de NIH y resultados de trasplantes.^{23, 24}

En función de sus manifestaciones clínicas y el momento de aparición, antes o después de 3 meses, la GVHD se ha dividido en aguda y crónica. No obstante, son las manifestaciones clínicas las que deben tenerse en cuenta a la hora de catalogar como agudo o crónico y no el momento de aparición, la GVHD aguda aparece antes de los 100 días pos trasplante y es definida como GVHD clásica, la GVHD ha sido separada de la crónica no por el tiempo si no por la presencia del criterio de diagnóstico o por los resultados distintivos de biopsias u otros procedimientos.²³

La GVHD aguda ocurre cuando las células presentadoras de antígeno del receptor presentan sus propios antígenos a los linfocitos T del donador. Las condiciones inmunológicas para GVHD aguda requieren un desajuste en el complejo HLA o por antígenos menores, lo que favorece un medio pro-inflamatorio. Aunque las CPA persisten solo de semanas a unos meses post-trasplante, el riesgo de GVHD aguda de una transfusión de linfocitos de un donador desciende al tiempo que transcurre el trasplante.^{12, 24}

La GVHD aguda causa enfermedad sistémica pero el objetivo del tejido es muy específico, implicando el epitelio del tracto gastrointestinal y su continuación hasta el árbol biliar, la piel, la conjuntiva, glándulas exocrinas, llevando a la tríada clásica de gastroenteritis, salpullido de piel y obstrucción de la vena hepática, curiosamente el riñón no es dañado, como el endotelio vascular, neuronal, muscular y tejido adiposo. Todo este proceso de GVHD es caracterizado por un ligero infiltrado linfocítico y apoptosis celular de la renovación celular normal del endotelio o epitelio.^{3, 23}

La GVHD crónica se desarrolla aproximadamente 3 meses después post-trasplante, la inmunología de esta condición todavía no es bien entendida pero involucra alo-reactividad de linfocitos T CD4+ y CD8+ del donador, producción de anticuerpos que llevan a daño de tejido, fibrosis e inmunocompetencia inmunológica, tiene rasgos como escleroderma: la diana de tejido es la piel, glándulas exocrinas, pulmones, sistema musculo-esquelético el cual es afectado por una fibrosis facial y dérmica, y síndrome de Sjögren. La hematopoyesis es dañada y la trombocitopenia es común.^{3, 23}

Los factores de riesgo asociados con un incremento de riesgo de enfermedad GVHD crónica incluyen el uso de células sanguíneas del injerto, disparidad en HLA o donador no emparentado, paciente mayor de edad e historia clínica de GVHD aguda, dosis celular de CD34+, tipo de fuente celular. Este riesgo puede disminuir por una depleción exhaustiva de las células T del injerto o por tratamiento del receptor con anticuerpos específicos para humanos para células T como parte de un régimen acondicionamiento antes del trasplante de células

progenitoras hematopoyéticas. Sin estas medidas de precaución aproximadamente el 30% a 50% de los receptores de trasplante de CPH desarrollan GVHD crónica.^{23, 25}

2.4. RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA POST -TCPH

Después de la infusión intravenosa, las CPH circulan y se acumulan en los pulmones antes de entrar a los sitios hematopoyéticos dentro de 24 horas. Las células madre llegan al sitio por rodamiento endotelial dentro de las sinusoides medulares, pasando a través del endotelio de las sinusoides y alojándose en el nicho de las CPH. Dentro del nicho las células madre pueden proliferar y establecerse enfocadas a las hematopoyesis y también replicarse.³

Recobrar el sistema inmunológico completamente es un proceso lento y regularmente incompleto que envuelve la reconstitución de diversas familias celulares y moleculares en el trasplante alogénico y autólogo de células progenitoras hematopoyéticas. Mientras la inmunidad innata se reconstituye rápidamente como las células NK, la respuesta adaptativa de linfopoyesis; linfocitos B y especialmente de linfocitos T se ve comprometida por años después del trasplante. Este déficit inmunológico se debe a la disminución o ausencia de la timopoyesis post-TPH.^{3, 8, 25, 26, 27, 30}

La importancia de la inmunología del trasplante depende de la respuesta del rechazo inmunitario, que sigue siendo en la actualidad uno de los obstáculos más importantes para el trasplante. Las células CD34+ establecen la hematopoyesis y regeneración del sistema inmunológico comprometiendo células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, B y NK.^{3, 25, 26, 27} Después de la quimioterapia y radioterapia pre-trasplante, toda la hematopoyesis normal del receptor, la respuesta celular y la mayoría de la respuesta humoral es eliminada.^{1, 27, 28}

En ambos procesos autólogos y alogénicos de CPH, las células NK son las primeras en la reconstitución alcanzando niveles normales sanguíneos, incluso dentro del 1er mes post-trasplante. Incrementando la producción de factores de crecimiento linfocitarios, especialmente IL-12 e IL-15, estimulando una rápida neogénesis de células NK, células presentadoras de antígeno incluidas macrófagos, células dendríticas (mieloides y plasmoides), linfocitos B y células de Langerhans. La recuperación de estas células presentadoras de antígeno empieza dentro de las primeras semanas post-trasplante y se completa aproximadamente a los 6 meses post-trasplante.³

La deficiencia de la función de los linfocitos T y linfocitos B post-TPH se debe a una inadecuada timopoyesis, como resultado la reconstitución depende de una vía alterna de desarrollo “expansión homeostática periférica” (HPE por sus siglas en inglés *homeostatic peripheral expansión*), una rápida división celular de clones maduras de linfocitos T que dependen de citocinas y estimulación antigénica.²⁷ En HPE los linfocitos T maduros del donador, son un repertorio limitado de linfocitos T capaces de reconocer y señalar a su homólogo linfocito B. Los linfocitos B

pueden alcanzar niveles normales hasta los 12 meses post-trasplante y los linfocitos T hasta 2 años post-trasplante.³⁰

Los linfocitos T del donador pueden interactuar con las células presentadoras de antígenos del receptor, células de la piel, intestino, hígado también como células residuales T hospederas y células medulares, resultando en GVHD. Es importante, porque las células T del injerto pueden reconocer y eliminar células malignas residuales; comúnmente llamado injerto contra leucemia o efecto de injerto contra tumor. La completa reconstitución de la inmunidad humoral es lenta, alcanzando niveles de inmunoglobulinas normales entre 6 y 12 meses post-trasplante, regularmente más tiempo para IgA y aquellos pacientes que desarrollan GVHD crónica.^{3, 28}

La función tímica es influenciada por: edad, fuente de células progenitoras hematopoyética, el grado o daño debido a un régimen de acondicionamiento del receptor, citocinas, factores de crecimiento y hormonas. La edad del hospedero afecta la recuperación tímica significativamente, en la cual cada década reduce el rango y renovación tímica. En gran parte, la recuperación linfoide se dificulta por la falta de timopoyesis. La recuperación funcional del sistema inmunológico es esencial en la efectiva erradicación de la enfermedad mínima residual y el control de infecciones oportunistas.²⁹

El problema de la ineficaz o tardía reconstitución inmunológica después del trasplante de CPH, es la susceptibilidad a infecciones oportunistas como: infecciones virales, entre los más notables el virus Epstein-Barr y el

citomegalovirus, infecciones por hongos y bacterias y la recaída de enfermedades malignas, el uso agresivo del soporte médico incluye antibióticos, antifúngicos, antivirales e inmunoglobulinas intravenosas. Otra explicación de la inadecuada recuperación inmunológica en los pacientes post- trasplante, es debido, al daño del microambiente tímico por la quimioterapia o radioterapia pre-trasplante, las condiciones de los regímenes y la ocurrencia de la enfermedad injerto contra hospedero.^{20, 25}

2.4.1. Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos TCD4⁺ o colaboradores representan una subpoblación de linfocitos T y tiene como una de sus principales funciones la regulación de todas las respuestas inmunitarias frente a antígenos proteicos y ayudan en su calidad de células efectoras, en la eliminación de microorganismos intracelulares. Sus precursores provienen de médula ósea, después migran y maduran en el timo (el nombre de linfocitos “T” se refiere a que derivan del timo). Los linfocitos CD4⁺ segregan unas proteínas llamadas citocinas, cuyas funciones consisten en poner en marcha la proliferación y la diferenciación de los propios linfocitos T y activar diversas células, como linfocitos B, macrófagos y otros leucocitos.^{19, 28}

Los linfocitos CD4⁺ interactúan con moléculas del CPH clase II, cuando los receptores del antígeno de los linfocitos reconocen específicamente complejos péptido-MHC sobre las células presentadoras de antígeno, CD4 es una

glicoproteína transmembranaria que pertenece a la superfamilia de las Ig, CD4+ se expresa como un monómero en la superficie de los linfocitos t periféricos y los timocitos y también esta presente en los fagocitos mononucleares y algunas células dendríticas.^{7, 19} La reconstitución inicial en pacientes pediátricos de los linfocitos CD4⁺ tardan aproximadamente 9 meses o más en obtener niveles normales hasta que una actividad tímica sea eficiente, incluso 20 años después del trasplante, déficits en poblaciones de estos linfocitos persisten en pacientes con una inadecuada renovación de timopoyesis.^{8, 30}

2.4.2. Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8+ o citotóxicos también representan una subpoblación de células T, regulan las funciones de todas las respuestas inmunitarias frente a antígenos proteicos y ayudan a la eliminación de microorganismos intracelulares. Son células claves en el periodo inmediato post-TCPH, participan en la lisis de las células infectadas por virus y células tumorales. Su maduración y selección también se realiza en el timo. Las moléculas CD8 son glicoproteínas transmembranales y también miembro de la superfamilia de las Ig, la estructura CD8 interacciona con las moléculas del MHC clase I.^{7, 19}

La mayoría de las moléculas CD8+ aparecen como heterodímeros, están presentes en aproximadamente en 20-25 % en la sangre, 15-20% en los ganglios linfáticos y entre 10-15% en el bazo. La función biológica esencial de los linfocitos

T citotóxicos es la vigilancia de las infecciones virales asociada al reconocimiento y lisis directa de células extrañas del injerto en el rechazo celular agudo y a la inmunovigilancia y destrucción de las células que contienen genes mutados capaces de producir o asociarse a transformación malignas. La reconstitución de los linfocitos T CD8 es aproximadamente de 4 meses en los cuales pueden alcanzarse niveles normales.^{28, 30}

2.4.3. Células Natural Killer (NK) CD56+

Las células NK representan una subpoblación de linfocitos que tienen como marcador específico CD16+ CD56+. El sistema inmune innato comprende de varios tipos celulares que reconocen y erradican patógenos o células aberrantes sin la presentación antigénica, las células NK eliminan células tumorales o infectadas por virus, en un mes post-TPH las células NK circulan a niveles normales y confieren un grado de protección inmunológica.^{8, 30} Existen datos que sugieren que el receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR por sus siglas en inglés *Killer immunoglobulin-like receptor*) juega un papel crítico en la erradicación de tumores, ya que estudios han asociado el receptor KIR de las células NK con un desajuste con la protección de las recaídas y GVHD en desajustes de antígeno leucocitario en humano.³⁰

La inhibición de las células NK ocurre cuando una de las familias de KIR en las células NK capta una molécula de MHC clase I de una célula, deliberando una

señal inhibitoria a la célula y bloqueando la activación de su maquinaria lítica. El comportamiento de una célula NK con su objetivo depende de un balance entre las expresiones de superficie de moléculas efectoras e inhibitorias caracterizando la clona particular de NK. Las condiciones requeridas para aloreactividad de NK se presentan cuando las células NK fallan en la captación con su molécula inhibitoria MHC clase I, esto es porque la molécula no lo expresa o pertenece a un grupo no compatible. Los grupos KIR son heredados diferentemente del complejo MHC, el donador puede no expresar moléculas MHC compatibles con los grupos KIR del receptor.

Las células NK difieren de las células T en su respuesta alo-reactiva en importantes vías; las células NK predominantemente reconocen células del linaje hematopoyético, esto explica la importancia de las células NK en el injerto: células NK del hospedero pueden destruir un injerto, mientras las células NK del donador facilitan el injerto por eliminación residual de células hematopoyéticas y linfoides, así como de blastos.²⁰ Una segunda consecuencia de las células NK es que no causan directamente GVHD, de hecho su habilidad es eliminar las células presentadoras de antígenos del hospedero reduciendo la habilidad del hospedero para estimular una aloreactividad hacia las células T del donante.³

Los linfocitos NK contribuyen al rechazo de células progenitoras hematopoyéticas, esto se ha estudiado en animales de investigación, es posible que los NK del huésped reaccionen contra los precursores de la médula ósea carentes de las moléculas de MHC clase I expresados por el huésped.¹⁹ La

reconstitución inmunológica de las células NK se presenta dentro la primer semana post-trasplante alcanzado niveles normales rápidamente.^{3, 8, 22, 25, 26, 27, 30}

2.4.4. Linfocitos B CD19⁺

Los linfocitos B se generan en la medula ósea de progenitores linfoides, poseen receptores de inmunoglobulinas que son generados por recombinación somática, a través de rearreglos genéticos para crear diversas secuencias de receptores. Los linfocitos B experimentan una selección en la medula ósea previo a su liberación a la sangre periférica. Linfocitos B naïve emergen de la medula con inmunoglobulinas (Ig) de superficie IgM e IgD, estos linfocitos migran a estructuras linfoides secundarias. Una vez que entra en contacto con el antígeno a través del linfocito CD4⁺ o células dendríticas, se activa y libera IgM.^{21, 30}

El linfocito B posee una especificidad en forma de su receptor Ig, capaz de dirigir la unión a los antígenos de cualquier tamaño en forma de solución o sólida, y puede diferenciarse en una célula plasmática, que reside en los tejidos y secreta anticuerpos a la circulación. Una vez activado por el encuentro con el antígeno específico en condiciones apropiadas durante una respuesta inmunitaria primaria, el linfocito B madura y en ese momento se limita a manifestar tan sólo un isotipo de inmunoglobulina de superficie (subclase A, D, E, G Y M). En este estadio los linfocitos B pueden convertirse en linfocitos B de memoria, preparados para ciclos adicionales de activación y diferenciación si encuentran de nuevo al antígeno

específico, o pueden experimentar una diferenciación final en una célula plasmática madura.^{7, 19}

Los linfocitos B alcanzan niveles normales por al menos de 9 a 12 meses post-TPH y la reconstitución de la producción de anticuerpo puede retrasarse por más de 2 años. Los linfocitos B del donador presentan un fenotipo naïve (IgM⁺ IgD⁺) inicialmente, con memoria linfocítica aproximadamente 5 años. Los niveles de anticuerpos IgM se restablecen primero 2-6 meses, seguido de niveles de IgG con un aproximado normal de 3-18 meses pos-TPH. Finalmente la reconstitución de IgA puede retrasarse hasta 3 años.^{1, 8, 30}

2.5. CITOMETRÍA DE FLUJO Y APLICACIONES

La citometría de flujo es ampliamente utilizada en muchas disciplinas para la medición de propiedades intrínsecas de las células, como el tamaño, dispersión de la luz y la estructura celular; también propiedades extrínsecas basadas sobre marcas bioquímicas fluorescentes que son utilizadas para observar una variedad de características celulares como proteínas de unión, actividades metabólicas o contenido de DNA.³¹

La clasificación de las células puede basarse en propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y funcionales. Los métodos de clasificación que se basan en propiedades funcionales utilizan características tales como afinidad, adherencia o

crecimiento. La clasificación inmunológica se basa en la utilización de anticuerpos dirigidos contra epítopes celulares. En la práctica, las características fisicoquímicas son las más utilizadas para la separación o “sorteo celular”; se incluyen características como tamaño, volumen, densidad, propiedades de dispersión de la luz, potencial de membrana, pH, carga eléctrica y contenido celular de diferentes compuestos como ácidos nucleicos, enzimas y otras proteínas.

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato (Citómetro de Flujo Cytomics F500 Beckman Coulter). Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que las componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, aprovechando propiedades intrínsecas y extrínsecas.

La citometría de flujo proporciona datos como tamaño relativo de la célula, granularidad, complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. El citómetro de flujo posee un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y

la digitaliza para el análisis en computadora. El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales: una fuente de luz (láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.³²

Las suspensiones celulares se incuban con sondas que llevan marcadores fluorescentes, y se mide la cantidad ligada por cada célula integrante de la población después de pasarlas de una en una a través de un fluorímetro provisto de un haz incidente generado por el laser. Las proporciones relativas de una molécula concreta en las diversas poblaciones celulares pueden compararse entre si mediante la tinción de cada una con la misma sonda y la determinación del grado de fluorescencia emitido. Lo más habitual es que estas sondas sean anticuerpos específicos frente a una molécula de la superficie celular, y estén marcados con fluorocromos. Además también miden las propiedades de dispersión de la luz del rayo laser, cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula y esto genera información. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula (forward scatter light), la luz dispersada hacia los lados 90° de ángulo provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular (side scatter) y los resultados son analizados por el software del citómetro y hace correlaciones entre marcadores de fluorescencia, tamaño celular, estructura subcelular o la combinación de estos parámetros, permitiendo la identificación de subpoblaciones dentro de las muestras.^{19, 32}

La computadora que adquiere los datos proporcionados por el sistema eléctrico y hace una presentación gráfica. La computadora produce un histograma o un despliegue de dos parámetros (dot plot o contour plot) a partir de la luz dispersada por las células o a partir de la fluorescencia.

III. JUSTIFICACIÓN

Aunque el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas sea satisfactorio, a menudo se asocia a dos problemas adicionales, la GVHD y enfermedades infecciosas. La reconstitución inmunológica post-trasplante, tiene un importante valor pronostico, ya que permite correlacionar el estado clínico del paciente con los niveles de subpoblaciones linfocitarias en los diferentes meses de seguimiento. En México no existen reportes de reconstitución inmunológica en pacientes pediátricos post-trasplantados, y es necesario aprender y tener el conocimiento del impacto de la biología de la reconstitución inmunológica después del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas,

El presente trabajo monitorea los niveles de subpoblaciones linfocitarias y caracteriza un patrón de reconstitución inmunológica en pacientes pediátricos, posterior a un TCPH durante un año, lo cual permite evaluar la sobrevida del paciente y poner de manifiesto las ventajas de los trasplantes así como prever la mejoría de la condición clínica en la aparición de la GVHD si se presenta, y disminuir el tiempo de tratamiento profiláctico de infecciones post-TCPH.

IV. HIPOTESIS

El monitoreo de subpoblaciones linfocitarias en pacientes pediátricos post-trasplantados, determinadas mediante citometría de flujo, permitirá sugerir un patrón de reconstitución inmunológica después de un TCPH empleando como fuente sangre de cordón umbilical o sangre periférica movilizada.

V. OBJETIVOS

General:

- Evaluar el monitoreo de las subpoblaciones linfocitarias y describir el patrón de reconstitución inmunológica en pacientes pediátricos post-trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas de fuentes de cordón umbilical o sangre periférica; durante el periodo 2008-2010.

Particulares:

- Evaluar la reconstitución inmunológica empleando citometría de flujo en las diferentes subpoblaciones linfocitarias T, B y las células NK después de un TCPH empleando como fuente: sangre de cordón umbilical o sangre periférica movilizada.
- Analizar estadísticamente el comportamiento de recuperación inmunológica al año posterior al trasplante.
- Evaluar la reconstitución inmunológica entre los tipos de fuente de células progenitoras hematopoyéticas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. MATERIAL

Se incluyeron 31 pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, 12 del género femenino y 19 del género masculino. A 2 de ellos se les realizó trasplante autólogo y a 29 trasplante alogénico, de acuerdo a la fuente 14 fueron trasplantados a partir de células de cordón umbilical y 17 de sangre periférica. Se realizó el seguimiento de subpoblaciones por citometría de flujo empleando Citómetro de Flujo Cytomics F500 Beckman Coulter.

6.2. MÉTODOS

Se realizó el seguimiento de sub poblaciones linfocitarias por Citometría de flujo durante los 3, 6, 9 Y 12 meses de seguimiento post-trasplante y empleando para el marcaje anticuerpos monoclonales fluorescentes de superficie: CD4-FITC/ CD8-PE/ CD3- PC5; CD19-FITC; CD56-PE. Se utilizaron tres tubos para Citometría de flujo: el primer tubo se empleo como control el cual contenía 100 µL de sangre total, el segundo tubo contenía 100 µL de sangre total más 20 µL del monoclonal CD4-FITC/ CD8-PE/ CD3- PC5, y el tercer tubo contenía 100 µL de sangre total mas 20 µL de CD19-FITC y 20 µL de CD56-PE. Se incubó durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Al concluir la incubación se hemolizaron los componentes celulares no linfocitarios con ácido fórmico a una concentración de 1.2mL/L en el equipo lizante de Células TQ-Prep Beckman Coulter TQ-prep, y se agrego estabilizador y fijador para-formaldehido a una concentración de 10.0g/L

para preservar las poblaciones celulares linfocitarias y obtener exclusivamente linfocitos marcados con los anticuerpos monoclonales ya descritos. Se determinó lectura de cada tubo en el Citómetro de Flujo. Finalmente se realizó interpretación y cálculo de resultados.

POBLACIÓN A ESTUDIAR. Se evaluó la reconstitución inmunológica a los 3, 6, 9 y 12 meses post-trasplante en 31 niños receptores de Trasplantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH), autólogo o alogénico, en cualquiera de sus modalidades en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea del Instituto Nacional de Pediatría en el período comprendido entre Enero 2008 y Enero 2010, en niños con enfermedades neoplásicas y no neoplásicas que hayan recibido trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en la Unidad de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas de Instituto Nacional de Pediatría.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se efectuó un análisis descriptivo univariado en cada uno de los periodos de observación; Posteriormente se realizó un análisis bivariado entre los parámetros de reconstitución inmunológica y las variables que podían tener algún efecto sobre los mismos. Dichos análisis se efectuaron mediante pruebas no paramétricas. Por otro lado para estudiar la asociación entre dos variables categóricas se utilizó la X^2 de Pearson.

VIII. RESULTADOS

La población total se conformó por 31 casos (100%), y éstos presentaron las mediciones completas en cada una de las toma de muestra a los 3, 6, 9 y 12 meses. Cuatro de los casos (13 %) fallecieron durante el seguimiento (Tabla 1). En el análisis bivariado, se realizaron tablas que muestran las mediciones de los grupos de células por mes de seguimiento. Se ajustó por tipo de precursor hematopoyético dado su distribución homogénea de dicha variable, en otras palabras, el tipo de precursor divide la muestra total de niños con seguimiento completo en grupos casi iguales. Se observan discretas diferencias en las pruebas de diferencia de medias (t de Student) a lo largo de las mediciones repetidas. Solamente las células CD8 alcanzaron diferencia significativa en la medición al 3er y 6to mes en sangre de CU y SP movilizada entre tipo de precursor. Dada la muestra pequeña, se graficaron las medianas (percentil 50) para corroborar los hallazgos en el análisis bivariado, solo se observa una discreta tendencia de lo CD3 a aumentar con el tiempo sin ser estadísticamente significativa (p de 0.58), debido a la muestra tan pequeña entre trasplantes autólogos (6.4%) y trasplante alogénicos (93.5%) no es posible hacer una diferencia significativa entre ambos.

Tabla 1: Existen mayor cantidad de sujetos masculinos que de sujetos femeninos. El diagnóstico más común fue el del tipo neoplásico. La edad promedio de los sujetos fue de 6.7 años, con un rango desde el primer año de vida hasta los 17 años de edad. El tipo más común de trasplante fue el alogénico. El tipo de precursor hematopoyético se distribuyó de manera homogénea.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO n=31				
Variables categóricas	n(%)			
Estado	Fallecido	Vivo		
	4(13%)	27(87%)		
Sexo	Masculino	Femenino		
	19(61.3%)	12(38.7%)		
Diagnóstico	Hematológico	Neoplasia	Inmunodeficiencia	Metabólico
	6(19.3%)	16(51.6%)	6(19.3%)	3(9.7%)
Tipo de trasplante	Autólogo	Alogénico		
	2(6.4%)	29(93.5%)		
Precursores hematopoyéticos	Sangre periférica	Cordón umbilical		
	17(54.8%)	14(45.16%)		

ANALISIS BIVARIADO:

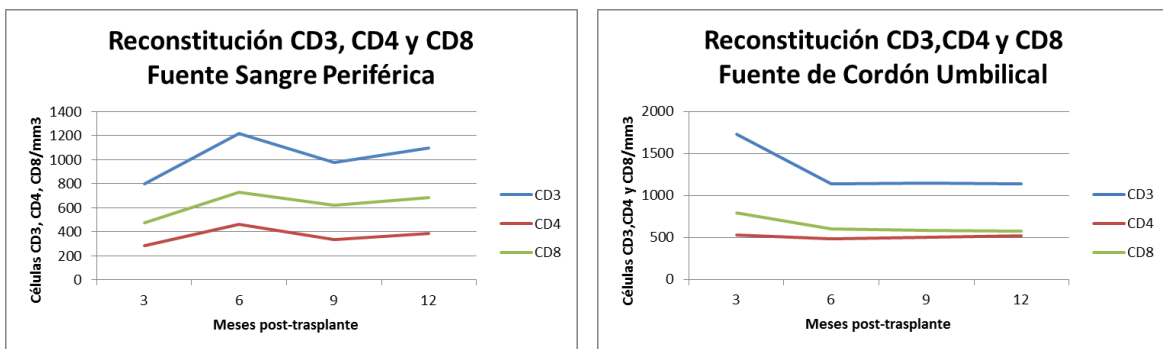
Se decidió estratificar por tipo de precursor hematopoyético por la razón de que esta variable parte prácticamente en dos la muestra y esto aumentaría la probabilidad de encontrar diferencias significativas. Se utilizaron pruebas de diferencia de medias de una muestra simple. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores promedio con su desviación estándar de células CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, CD19 y CD56, estratificados por precursor. Solo se observa diferencia estadística significativa en la medición a los 3 meses entre los grupos. El número reducido de sujetos no afectó χ . ^a sangre periférica n= 17 pacientes, ^b cordón umbilical n= 14 pacientes.

Población de Linfocitos	Fuente	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
CD3	χ				
	SPm ^a	797.1±524.8	1221.3±1004.9	975.6±947.3	1097±972.7
	CU ^b	1734.6±1845.7	1144.9± 812.4	1145.7±750	1138.3±782.1
	P	0.05	0.82	0.58	0.89
CD4	χ				
	SPm	282.4±39.5	460.3±107.7	335.9±77.5	385.1±81.6
	CU	534.5±148.6	485.9±117.9	501.1±108.7	527.2±122.6
	P	0.06	0.87	0.21	0.32
CD8	χ				
	SPm	474.9±96.1	727.1±172.	620.8±160.1	682.6±160.6
	CU	795±198.5	602.5±99.9	584±97.7	576.7±114.4
	P	0.13	0.55	0.85	0.61
CD4/CD8	χ				
	SPm	0.7±0.2	0.1±0.1	0.05±0.04	0.16±0.08
	CU	0.5±0.1	0.3±0.1	0.32±0.13	0.4±0.14
	P	0.38	0.21	0.03	0.12
CD19	χ				
	SPm	92±28	192±43	173±42	179±44
	CU	15±4	265±4.1	261±3.1	261±2.9
	P	0.24	0.24	0.11	0.15
CD56	χ				
	SPm	86±4	128±38	119±45	89±44
	CU	16±47	174±37	185±31	133±26
	P	0.24	0.41	0.26	0.43

A) Patrón de la reconstitución inmunológica de las poblaciones celulares de linfocitos T CD3, CD4 y CD8

La población celular correspondiente a linfocitos T se llevo a cabo por monitoreo de CD3, CD4 y CD8 y se analizó que la reconstitución inmunológica de CD3 alcanzó niveles normales a partir del 3er mes pos trasplante en cordón umbilical no siendo lo mismo para fuente de sangre periférica movilizada; mientras que la reconstitución de CD4 no alcanzo niveles normales al año post- trasplante, y CD8 en ambas fuentes alcanzo una reconstitución inmunológica de niveles normales. (Gráfica 1 y 2).



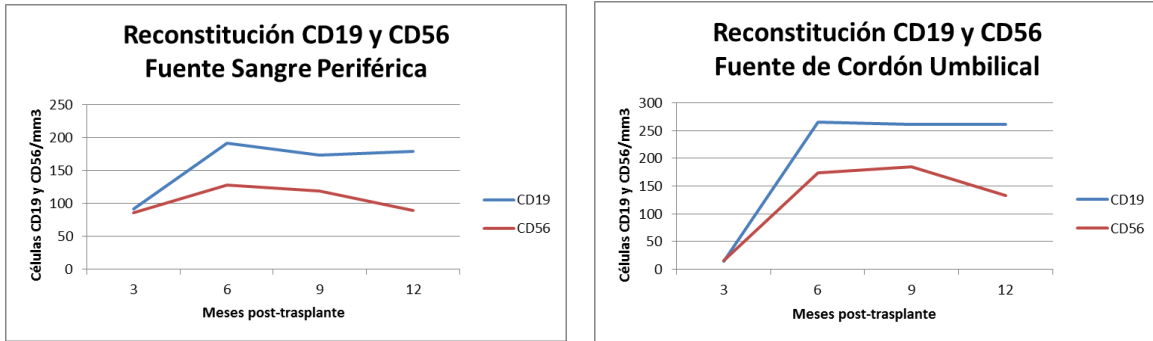
Gráfica 1 y 2. Comparación de Conteo de células CD3, CD4 y CD8 por mes de seguimiento (3, 6, 9 y 12 meses post-trasplante) en ambas fuentes. Valores de referencia linfocitario. Anexo 1

B) Patrón Reconstitución Inmunológica CD56 (células NK) y CD19 (linfocitos B)

La población celular correspondiente a linfocitos T se llevo a cabo por monitoreo de CD56 y CD19, y se analizó que la reconstitución inmunológica de CD56 (NK) no alcanzo niveles normales al año pos trasplante en ambas fuentes,

mientras en CD19 solo se observaron niveles adecuados en sangre de cordón umbilical. (Gráfica 3 y 4).

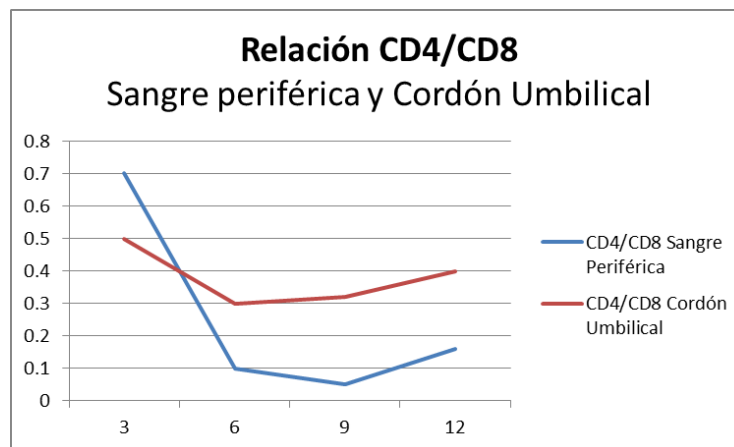
Valores de referencia. Anexo 1



Gráfica 3 y 4. Conteo de células CD19 y CD56 pos mes de seguimiento (3, 6, 9 y 12 meses post-trasplante) en ambas fuentes. Valores de Referencia linfocitarios. Anexo 1

C) Reconstitución Inmunológica relación cociente CD4/CD8.

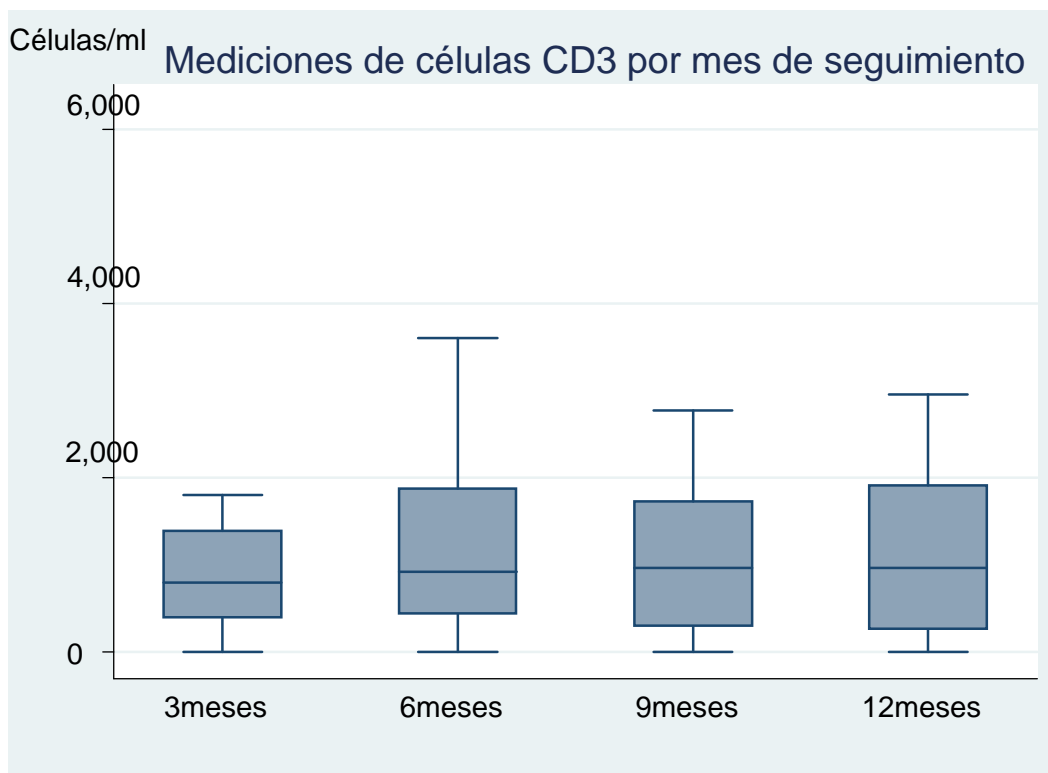
El monitoreo del cociente CD4/CD8 se mostró con niveles bajos en ambas fuentes celulares no alcanzando niveles normales al año de post-trasplante. (Gráfica 5).



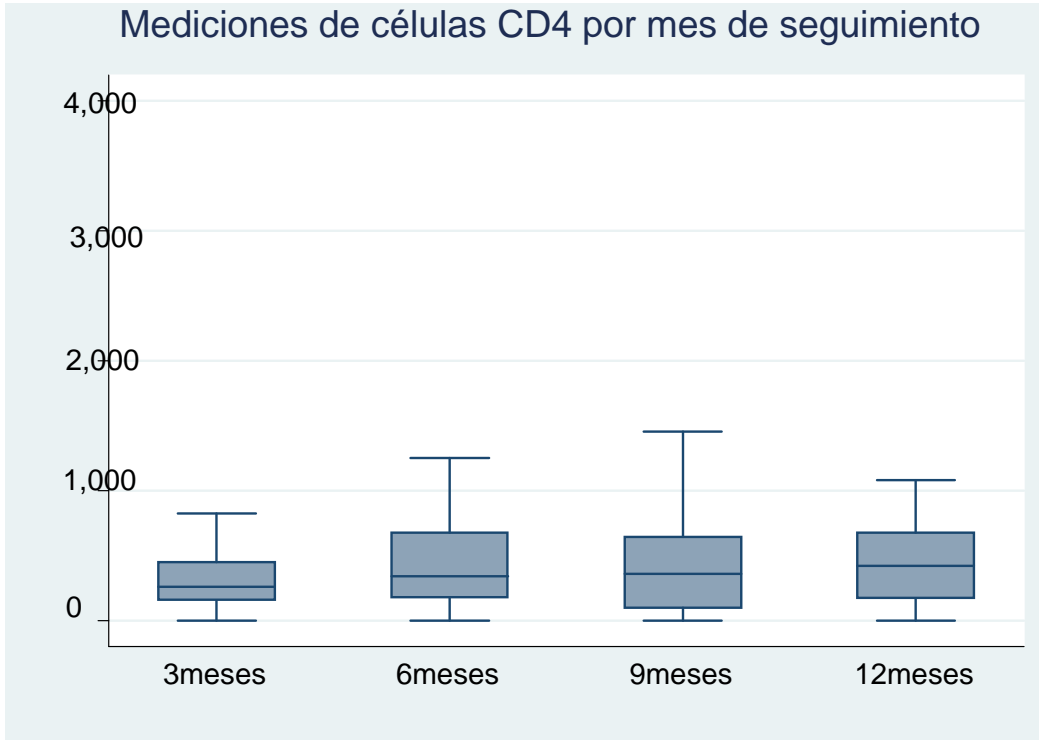
Gráfica 5. Conteo celular del cociente CD4/CD8 por mes de seguimiento (3, 6, 9 y 12 meses post-trasplante) en ambas fuentes. Valores de Referencia. Anexo 1

D) Patrón de reconstitución inmunológica de linfocitos T, análisis bivariado.

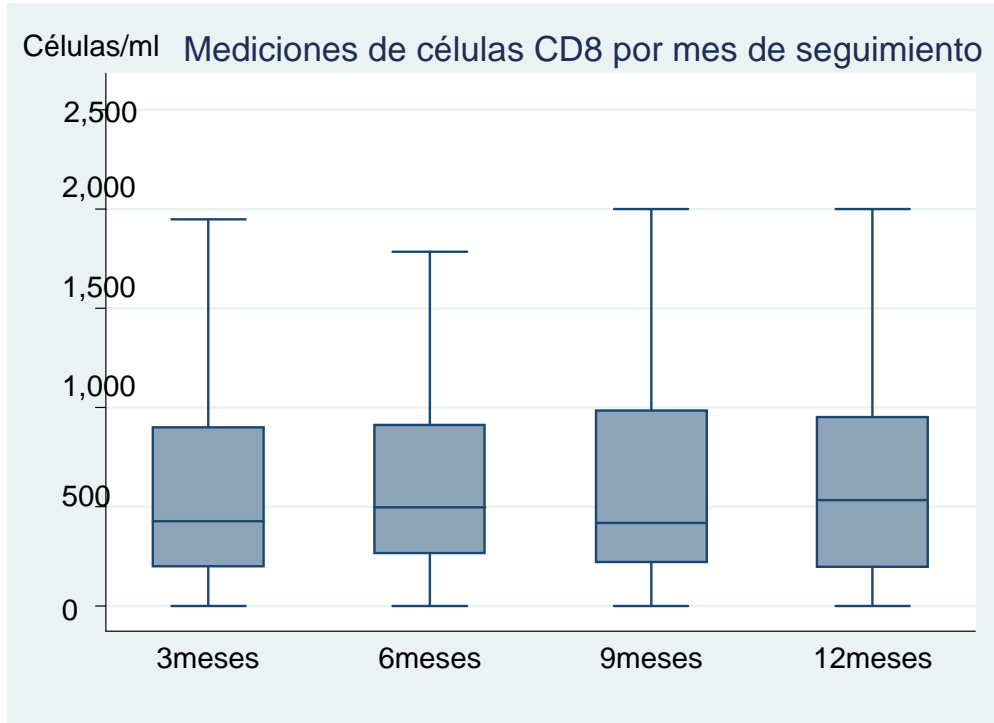
Las gráficas 6 y 7 evidenciaron, en la población de estudio que los linfocitos CD3 y CD4 no mostraron una reconstitución inmunológica al año, mientras que en la gráfica 8 se mostró una reconstitución de linfocitos CD8; en la gráfica 9 se encontró una reconstitución CD19 y por ultimo en la gráfica 10 no se alcanzó una reconstitución CD56.



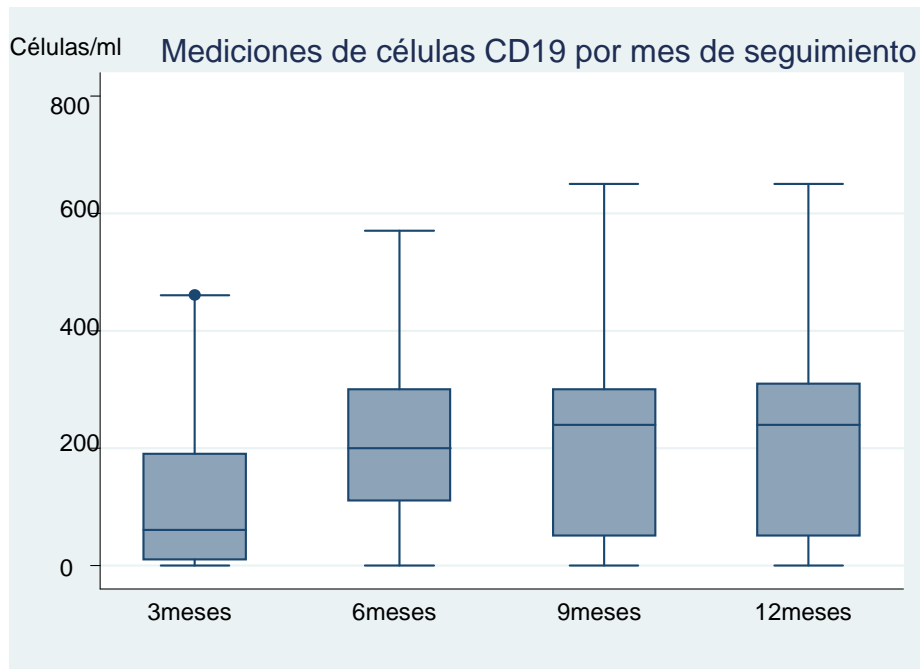
Grafica 6. Conteo de células CD3 por mes de seguimiento, análisis bivariado de ambas fuentes (Sangre Periférica y Cordón Umbilical) representado en gráfica de caja. Valores de Referencia. Anexo 1



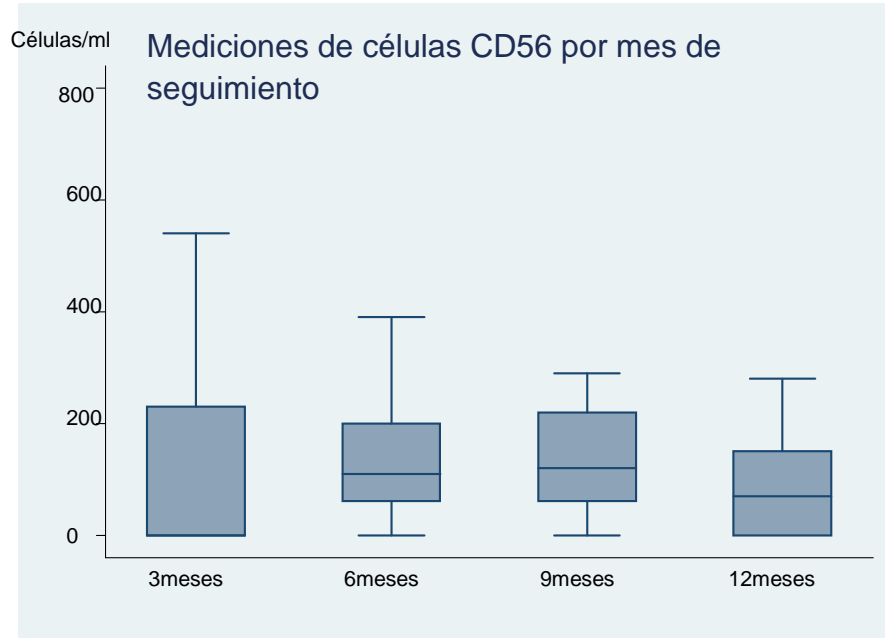
Grafica 7. Conteo de células CD4 por mes de seguimiento, análisis bivariado de ambas fuentes (Sangre Periférica y Cordón Umbilical) representado en gráfica de caja. Valores de referencia.
Anexo 1



Grafica 8. Conteo de células CD8 por mes de seguimiento, análisis bivariado de ambas fuentes (Sangre Periférica y Cordón Umbilical) representado en gráfica de caja. Valores de Referencia.
Anexo 1



Grafica 9. Conteo de células CD19 por mes de seguimiento, análisis bivariado de ambas fuentes (Sangre Periférica y Cordón Umbilical) representado en gráfica de caja. Valores de referencia.
Anexo 1

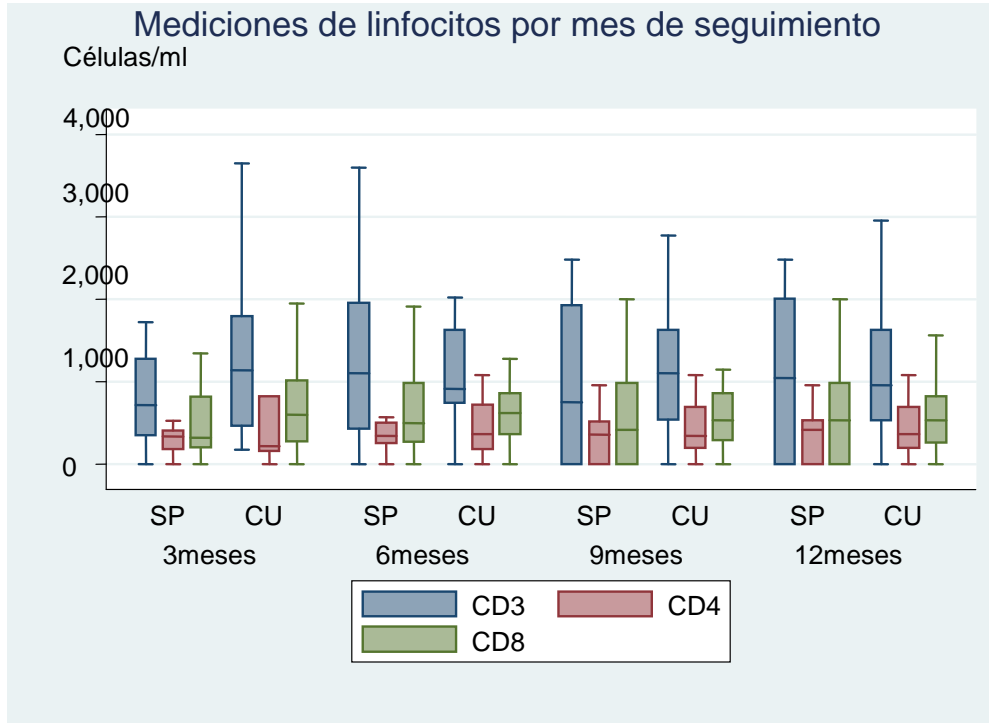


Gráfica 10. Conteo de células CD56 por mes de seguimiento, análisis bivariado de ambas fuentes (Sangre Periférica y Cordón Umbilical) representado en gráfica de caja. Valores de Referencia.

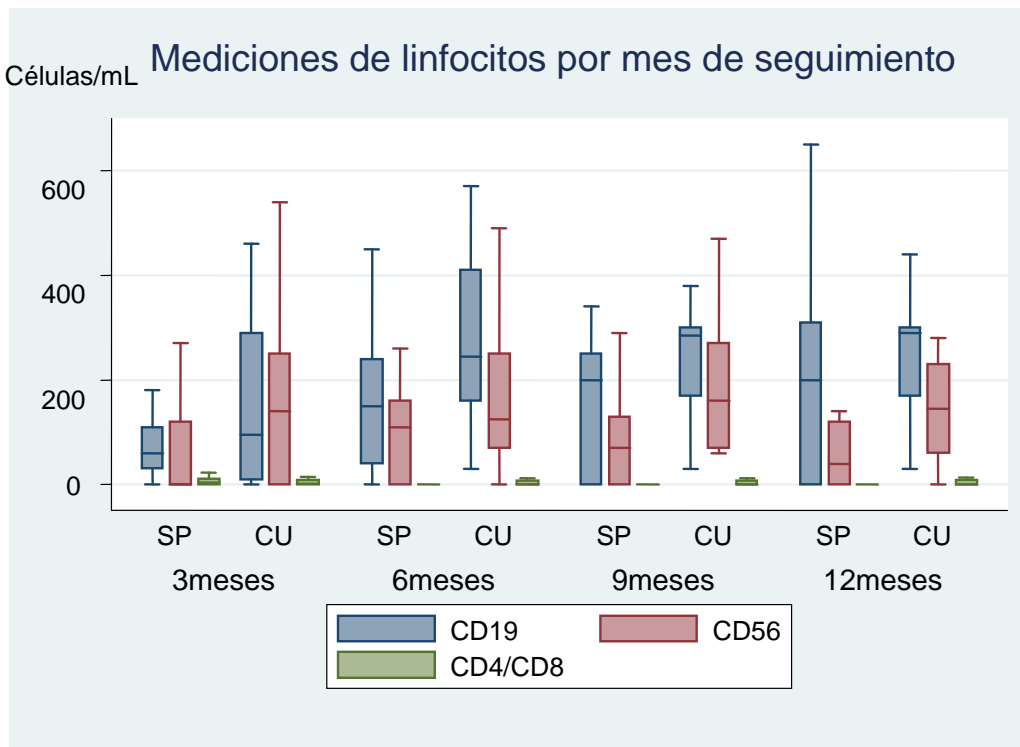
Anexo 1

E) Reconstitución Inmunológica de los linfocitos T por mes de seguimiento en ambas fuentes.

En la gráfica 11 se mostraron los resultados de las poblaciones linfocitarias CD3, CD4 y CD8 en ambas fuentes y la gráfica 12 muestra los resultados CD19, CD56 y coeficiente CD4/CD8 en ambas fuentes, por mes de seguimiento.



Gráfica 11. Seguimiento de la reconstitución de las poblaciones CD3+, CD4+, CD8+ post-trasplante de células de Sangre Periférica y células de Cordón Umbilical en pacientes pediátricos.



Gráfica 12. Seguimiento de la reconstitución de las poblaciones CD19+, CD56+ post-trasplante de células de sangre periférica y células de Cordón Umbilical en pacientes pediátricos.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La reconstitución inmunológica post-trasplante de CPH en la población infantil hasta el momento ha sido poco estudiada, por lo que en nuestro trabajo por primera vez se analizaron las subpoblaciones linfocitarias para describir un patrón de reconstitución inmunológica con este tipo de trasplante, el presente estudio evaluó en un periodo de 12 meses, con intervalo de cada 3 meses post-trasplante la reconstitución inmunológica, de las distintas subpoblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56), con el objetivo de analizar que factores contribuyen en la cinética de recuperación linfocitaria T y B.

La mayoría de los datos que se han publicado sobre la reconstitución inmunológica en edad pediátrica se basan en comparaciones individualizadas, de acuerdo con las características que se estudian (según fuente de CPH y tipo de trasplante).

Reconstitución inmunológica en relación con la fuente de progenitores hematopoyéticos (sangre periférica y cordón umbilical)

En nuestro estudio los linfocitos **CD3+** se mostraron disminuidos en sangre periférica en comparación con cordón umbilical, el valor de referencia es de 1100-1700 células/mm³; sin embargo, en sangre periférica movilizada se observa un número normal desde el mes 3 pero después este disminuye y no alcanza los niveles normales a los 12 meses post-trasplante, en cordón umbilical a partir del 3er mes se muestran niveles normales. Existen datos reportados que la reconstitución de los linfocitos CD3 es rápida no importando el tipo de fuente de

CPH.²⁹ Los linfocitos CD3 son responsables de la memoria inmunológica, son importantes debido a que pueden replicarse y sobrevivir por un largo periodo en el receptor.

Los linfocitos **CD4** cooperadores se mostraron disminuidos en sangre periférica movilizada en comparación con cordón umbilical, el valor de referencia es de 700-1100 células/mm³; en ambas fuentes la reconstitución fue baja en comparación con lo reportado en la literatura, algunos autores señalan una recuperación de niveles normales después de los 6 meses^{1, 8, 15, 20, 22, 25, 26, 29, 30}, en nuestros resultados hasta el mes 12 no alcanzaron niveles normales, recordando que los linfocitos T cooperadores, son importantes por la síntesis de citocinas y en colaboración de los linfocitos B y linfocitos T CD8.^{7, 19, 30}

Los linfocitos T **CD8** citotóxicos se mostraron disminuidos en sangre periférica movilizada en comparación con cordón umbilical, el valor de referencia es de 500-900 células/mm³, en sangre periférica movilizada alcanza niveles normales a partir del 6to mes y en cordón umbilical a partir del 3er mes; los linfocitos citotóxicos tienen funciones citotóxicas y son células claves en los mecanismos de respuesta anti infecciosa en el periodo inmediato post-trasplante. Algunos estudios señalan una rápida recuperación de esta subpoblación linfocitaria^{1, 15, 30}, incluso desde la primera semana pudiendo permanecer elevados por un largo periodo, pero la reconstitución CD8 alcanza niveles normales a partir del 4to mes.^{1, 8, 30}

Los linfocitos cooperadores se encontraron en número reducido y los linfocitos citotóxicos en número aumentado post- TCPH, el cociente **CD4/CD8**, cuyo valor de referencia es 1.0-1.5 células/mm³, los valores en ambas fuentes fueron muy bajos.

La subpoblación de linfocitos B **CD19** presentó una reconstitución más baja en sangre periférica movilizada no alcanzando niveles normales durante este estudio; comparada con cordón umbilical en donde a partir del 3^{er} mes presentan niveles normales 200-400 células/mm³, diversas fuentes señalan una reconstitución de esta estirpe celular alcanzando niveles normales entre 7 y 8 meses^{8, 15, 22, 29}, pero otros reportan niveles normales después de 1 año o incluso después de 2 años. Los anticuerpos IgM tienen una recuperación dentro de los primeros 6 meses, seguidos por niveles de IgG aproximadamente entre 3 y 18 meses, la reconstitución de IgA puede tardarse mas de 3 años.³⁰ Después del trasplante la memoria celular B requiere de linfocitos CD4+ para el cambio de isotipo, y la falta de reconstitución CD4+ tiene un defecto en el ambiente post-trasplante, debido a que el rango de hipermutación somática es disminuido en células B maduras.³⁰

Las células NK o citotóxicas naturales **CD56**, tienen un importante papel en el periodo post-trasplante en al respuesta inicial frente a infecciones virales, capaces de destruir algunas células tumorales, sobre todo las de origen hematopoyético, su reconstitución ocurre de forma muy temprana según estudios y algunos autores^{3, 8, 20, 22, 25,26,27,30}, incluso dentro de la primer semana post-TCPH se alcanzan

niveles normales; sin embargo, en este estudio en sangre periférica y cordón umbilical no se alcanzan niveles normales 200-400 células/mm³.

No existe a la fecha en México, reportes del patrón de reconstitución inmunológica en los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de CPH, por lo que en nuestro trabajo por primera vez se analizaron las subpoblaciones linfocitarias para describir un patrón de reconstitución inmunológica con este tipo de trasplante, no se puede asegurar que dicho comportamiento es general en este tipo de trasplante, para ello debe realizarse un análisis con una población más representativa (mayor número de casos), que definan un comportamiento homogéneo de la población.

IX. CONCLUSIONES

- La completa reconstitución inmunológica de la subpoblación linfocitaria CD3 solo se presenta en cordón umbilical, los linfocitos cooperadores no alcanzan niveles normales en ninguna fuente de CPH y los linfocitos citotóxicos alcanza niveles normales a partir del 3er y 6to mes en cordón umbilical y sangre periférica movilizada respectivamente.

- Los linfocitos naturales asesinos no muestran una recuperación inmunológica en ambas fuentes al año post-trasplante, y los linfocitos B solo en cordón umbilical a partir del 6to mes se obtiene niveles normales.

- La reconstitución inmunológica en sangre de cordón umbilical y sangre periférica muestran resultados muy bajos en casi todas sus poblaciones linfocitarias aunque se muestra mayor reconstitución en cordón umbilical pero se requiere un mayor tiempo de seguimiento así como un mayor número de pacientes para establecer el patrón definitivo y en ninguna de ellas se alcanza la reconstitución inmunológica al año.

- La reconstitución inmunológica tiene una importancia clínica relevante ya que depende de ello directamente la posibilidad de establecer la enfermedad injerto contra tumor, enfermedad injerto contra hospedero y el riesgo de desarrollar enfermedades virales asociadas. La recuperación funcional del sistema inmunológico es esencial para la efectiva erradicación de la enfermedad mínima residual y el control de enfermedades infecciosas.

- El prolongado periodo de la disfunción de las células T tiene serias consecuencias clínicas, ya que limita la respuesta a vacunas, reduce resistencia a infecciones, permite la recaída de tumores, y contribuye al desarrollo de autoinmunidad.

- La citometría de flujo ofrece ventajas en cuanto a la separación de subpoblaciones celulares, además de hacer la separación física de las células de interés y se puede hacer una medición cuantitativa y multiparamétrica de ciertas características celulares en una mezcla, los resultados se obtienen un tiempo corto emitiendo el resultado al médico el mismo día. En general es una herramienta muy útil que debe considerarse dentro del panel de pruebas para

monitorear la reconstitución inmunológica en los pacientes post-trasplantados de células progenitoras hematopoyéticas.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Vela O. Jorge, García R. Esparza, Borbolla E. José Rafael. *Trasplantes de Células Hematopoyéticas*. 2008. Editorial Prado.
2. Ruiz-Argüelles GJ, Gomez-Almaguer David. Trasplantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas en México. *Revista Biomédica* 2006; 4 (1): 25-28.
3. Treleaven Jennifer, Barrett John A. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice*. 2009. Editorial Elsevier
4. Swenson E.S. and Theise ND. Stem Cell therapeutics: potential in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2010. 3: 1-10.
5. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 October; 15(10): 1143–1238.
6. Shyam A. Patel and Pranela Rameshwar. Stem Cell Transplantation for Hematological Malignancies: Prospects for Personalized Medicine and Co-therapy with Mesenchymal Stem Cells. *Curr Pharmacogenomics Person Med*. 2011 September 1; 9(3): 229–239.
7. Mark Peakman, Diego Vergani. *Inmunología Básica y Clínica*. 2da edición. 2011, 151-166.

8. Paul Szabolcs, MD, and Donna Niedzwiecki, Ph.D. Immune Reconstitution in Children After Unrelated Cord Blood Transplantation. *Cytotherapy*. 2007; 9(2): 111-122.
9. Santos W. George. Application of Marrow Grafts in Human Disease. *Am J Pathol*. 1971 December; 65(3): 658-668.
10. Starzl E. Thomas. History of clinical Transplantation. *World J Surg*. 2000 July; 24(7): 759–782.
11. Goncalves L. Thissiane, Benvegnú M. Dalia and Bonfanti Gabriela. Specific factors influence the success of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009 June 2(2): 82-87
12. Hess D. Allan. Reconstitution of self-tolerance after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Res*. 2010 July; 47(1-3): 143-152.
13. Boglarka Gyurkocza, Andrew Rezvani, and Rainer F. Storb. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol*. 2010 June; 3(3): 285–299.
14. Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *CIBMTR. Progress Report*. January-December. 2007.
15. Brown Julia and Boussiotis A., Vassiliki. Umbilical Cord Blood Transplantation: Basic Biology and Clinical Challenges to Immune Reconstitution. *Clin Immunol*. 2008 June; 127 (3): 286-297.

16. Sideri Anastasia, Neokleous Nikolaos, Brunet De La Grange Philippe, Guerton Bernadette , Le Bousse Kerdilles Marie-Caroline , Georges Uzan, Corina Peste-Tsilimidos, Eliane Gluckman. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. *Hematological*. 2011 August; 96(8): 1213-1220.
17. Bart Thomas. Cost Effectiveness of Cord Blood versus bone marrow and peripheral Blood stem cells. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2010:2 141-147.
18. Quittet Philippe, Ceballos Patrice, Lopez Ernesto, Zhao-Yang Lu, Latry Pascal, Becht Catherine, Legouffe Eric, Fegueux Nathalie, Exbrayat Carole, Pouessel Damien, Valérie Rouillé, Jean-Pierre Daures, Bernard Klein, Jean-François Rossi. Low doses of GM-CSF (molgramostim) and G-CSF (filgrastim) after cyclophosphamide (4 g/m²) enhance the peripheral blood progenitor cell harvest: results of two randomized studies including 120 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2006 August; 38(4): 275–284.
19. Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Shiv Pillai. *Inmunología Celular y Molecular*. Sexta Edición. 2008. Editorial Elsevier Saunders.
20. Handgretinger R., Chen X., Pfeiffer M., Schumm M., Mueller I., Feuchtinger T., Hale and Lang P. Cellular Immune Reconstitution after Haploidentical Transplantation in Children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008. 14:59-65.
21. Martínez-Alvarez J.C., Arrazola-García Araceli. Importancia de la tipificación HLA en alta resolución para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. *Rev Med Inst Seguro Soc*. 2006; 44 (Supl 2): 11-14.

22. Ball I. M., Lankester A.C., Bredius RGM., Fibbe W.E., van Tol MJD and Egeler RM. Graft dysfunction and delayed immune reconstitution following haploidentical peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005. 35: S35-S38
23. Martin J. Paul, Inamoto Yoshihiro, Carpenter A. Paul, Lee J. Stephanie and Flowers E.D. Mary. Treatment of chronic graft-versus host disease: Past, present and future. *Korean J Hematol.* 2011; 46:153-63.
24. Pidala Joseph, Kim Jongphil, Anasetti Claudio, Nishihori Taiga, Betts Brian, Field Teresa and Perkins Janelle. The global severity of chronic graft-versus-host disease, determined by National Institutes of Health consensus criteria, is associated with overall survival and non-relapse mortality. *Haematologica* 2011. 96; (11): 1678-1684.
25. Crooks M Gay, Weinberg Kenneth, Mackall Crystal. Immune Reconstitution: From Stem Cells to Lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006. 12:42-46.
26. Bernstein D., Irwin, Boyd L., Richard and van den Brink R.M., Marcel. Clinical Strategies to enhance post-transplant immune reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008. January, 14(I suppl 1): 94-99.
27. Williams Kirsten, Hakim T. Frances and Gress E. Ronald. T Cell Immune Reconstitution Following Lymphodepletion. *Semin Immunol.* 2007 October; 19 (5): 318-330.

28. Lessa de Castro, Selma. Reconstitución Inmunológica en Niños Receptores de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos. 2001. *Tesis Doctorado*. Universidad Autónoma de Barcelona.
29. Singh K. Rakesh, Varney L. Michelle, Leutzinger Cherly, Vose M. Julie, Bierman J. Philip, Buyukberber Suleyman, Ino Kazuhico, Loh Kevin, Nichols Craig, Inwards David, Rifkin Robert and Talmadge E. James. Immune Reconstitution after Autologous Hematopoietic Transplantation with Lin⁻, CD34, Thy-1^{LO} Selected or Intact Stem Cell Products. *Int Immunopharmacol*. 2007 August; 7 (8): 1033-1043.
30. Williams M Kirsten, MD (Assistant Clinical Investigator) and Gress E. Ronald, MD. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008 September; 21 (3): 579-596.
31. Black B. Christopher, Duensing D. Thomas, Trinkle S. Linda and Dunlay Terry R. Cell-Based Screening Using High-Throughput Flow Cytometry. *Assay Drug Dev Technol*. 2011. February 9 (1): 13-20.
32. Salgado Lynn Milena. Citometría de Flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). *UNAM Instituto de Biotecnología*. 2002.
33. Llovera F. Daisy, Rodríguez S. Liseti. Subpoblaciones linfocitarias en prescolares Venezolanos de alto nivel socioeconómico. *ALAN*. 2004. Junio 54 (2): 1-13.

34. Rodak F. Bernadette. *Hematología Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. 2^a edición. 2005.

ANEXO 1

VALORES DE REFERENCIA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS.^{33, 34}

POBLACIÓN CELULAR	%	Cel./mm ³
Leucocitos totales		3,900 – 11,100
Linfocitos Totales	28 – 39	1,600 – 2,400
Linfocitos B (CD19+/CD45+)	11 – 16	200 – 400
Células NK (CD3+/CD8+/CD56+/CD45+)	10 – 19	200 – 400
Linfocitos T (CD3+/CD45+)	67 – 76	1,100 – 1,700
Linfocitos T (CD3+/CD4+)	38 – 46	700 – 1,100
Linfocitos T (CD3+/CD8+)	31 – 40	500 – 900
Cociente (CD4/CD8)		0.5 – 1.5