



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

*“RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA DESPUÉS DE UN TRASPLANTE
HAPLOIDÉNTICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS”*

TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:
Q.F.B. CYNTHIA PATRICIA ORTIZ DOMÍNGUEZ

ASESOR DEL TEMA:
E.B.C. LINA T. ROMERO GUZMÁN

MÉXICO, D.F.

2012



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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Ricardo Gamboa Ávila

Vocal: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Secretario: Dr. Julio Granados Arriola

Primer Suplente: Dr. José Pérez Jáuregui

Segundo Suplente: M. en C. Isela Montúfar Robles

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Pediatría, Dirección de Análisis Clínicos y Estudios Especiales, Laboratorio de Hemato – Oncología.

Asesor del Tema:

E.B.C. Lina T. Romero Guzmán

Sustentante:

Q.F.B. Cynthia Patricia Ortiz Domínguez

AGRADECIMIENTOS

A la Q.F.B. Fabiola Mujica Guzmán por su entrega y valiosa colaboración para el desarrollo experimental, así como de la revisión y organización de esta tesina.

Al Instituto Nacional de Pediatría por brindarme la oportunidad para la realización de este trabajo.

A la E.B.C. Lina T. Romero Guzmán por depositar su confianza en mí al asignarme este proyecto, su dirección, paciencia y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos de esta tesina.

Al Dr. Rogelio Paredes por su apoyo y valiosos comentarios que ayudaron a dar forma a este trabajo.

Al Dr. Martín Pérez García (Unidad de TCPH del INP) por permitirme el acceso a los datos de sus pacientes para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Edgar Alejandro Medina Torres (Unidad de Inmunodeficiencias del INP) por su apoyo y valiosa asesoría en el análisis estadístico de los datos de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Miguel, mi esposo.

A quien jamás encontraré la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza esperando que comprendas que mis logros son también tuyos e inspirados en ti, hago de este un triunfo y quiero compartirlo por siempre contigo.

Con amor.

A Diana, mi hija.

Por seguir siendo la motivación y el motor de mi vida. Por las grandes lecciones que a veces me das.

A Fernando y Rebeca, mis Padres.

Porque gracias a su apoyo y consejos, he llegado a realizar una más de mis metas lo cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir.

Con el más sincero cariño.

A mis Hermanos.

Quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su gran apoyo.

A Emilia, mi Suegra y a mis Cuñados.

Por el cariño y apoyo moral que siempre he recibido de ustedes y con el cual he logrado culminar mi esfuerzo.

A Andrea y a Tatiana, mis compañeras y amigas.

Por los momentos compartidos en esta aventura del estudio y por su apoyo incondicional.
Simplemente gracias.

A Francisco, Ariadna, José, Consuelo y Miguel. Mis Compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunogenética Molecular.

Por el apoyo moral, por su motivación para continuar con este proyecto y por las cosas de todos los días.

Gracias.

Y a todas aquellas personas que comparten conmigo este triunfo.
Gracias.

*SI CAES ES PARA LEVANTARTE, SI TE LEVANTAS ES PARA SEGUIR,
SI SIGUES ES PARA LLEGAR A DONDE QUIERES IR
Y SI LLEGAS ES PARA SABER QUE LO MEJOR ESTA POR VENIR...*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	<i>i</i>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Generalidades del TCPH	2
2.1.1 Antecedentes Históricos	2
2.1.2 Fuentes de CPH	3
2.1.2.1 Médula Ósea	3
2.1.2.2 Sangre Periférica	4
2.1.2.3 Sangre del Cordón Umbilical y de la Placenta	4
2.1.3 Tipos de TCPH	4
2.1.3.1 Autólogo	4
2.1.3.2 Singénico	5
2.1.3.3 Alogénico	5
2.2 Complejo Principal de Histocompatibilidad	7
2.3 Reconstitución Inmunológica	9
2.3.1 Inmunidad Innata o inespecífica	9
2.3.2 Inmunidad Adaptativa	10
2.4 Desarrollo de Linaje Celular y Expresión de Antígenos	13
2.4.1 Células B	13
2.4.2 Células T	16
2.4.3 Células NK	17

2.5 Citometría de Flujo y sus Aplicaciones	18
2.5.1 Aplicaciones	19
III JUSTIFICACIÓN	20
IV HIPÓTESIS	21
V OBJETIVOS	22
5.1 General	22
5.2 Particulares	22
VI MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Material	23
6.2 Metodología	23
6.3 Estrategia de Trabajo	24
VII RESULTADOS	26
7.1 Comportamiento del monitoreo de los casos en estudio al año post Trasplante.	27
7.2 Análisis del Patrón de comportamiento de la reconstitución inmunológica al año post trasplante	33
VIII DISCUSIÓN	37
IX CONCLUSIONES	39
X ANEXOS	40
XI BIBLIOGRAFÍA	42

ABREVIATURAS:

TCPH	Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas.
TACPH	Trasplante Alogénico de Células Progenitoras Hematopoyéticas.
TMO	Trasplante de Médula Ósea.
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos.
EICH	Enfermedad Injerto Contra Huésped.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PE	Phycoeritina
PC5	Phycoeritina – Cianina 5
SI	Sistema Inmunológico.
CPA	Célula Presentadora de Antígeno.
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas
NK	Natural Killer
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
TCR	Receptor de células T
CD	Cluster of differentiation
IFNγ	Interferón gamma
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
TdT	Desoxirribonucleotidil transferasa terminal

I. RESUMEN

Actualmente el TCPH (Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas) Haploidéntico es una alternativa para aquellos pacientes que requieren de manera puntual un trasplante con relativa urgencia y en cuyo caso no se cuenta con un donador compatible, permitiendo ofrecer una alternativa a la falta de donadores histocompatibles. La evaluación del patrón de reconstitución inmunológica en los pacientes sometidos a este tipo de trasplante permite establecer el tiempo en el cual el paciente se encuentra en riesgo de contraer infecciones y cuando se pueda presentar una complicación injerto contra huésped, que pondría en riesgo su vida.

El objetivo de este trabajo fue describir el patrón de reconstitución inmunológica de los pacientes pediátricos post trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas mediante trasplante haploidéntico. Para ello se estudiaron 6 casos a los cuales se les determinaron los niveles de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo a los 1, 3, 6, y 12 meses de seguimiento postrasplante.

El análisis del monitoreo de subpoblaciones linfocitarias, mediante citometría de flujo, en pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de CPH (Células Progenitoras Hematopoyéticas), mostró que el 67% de los casos presentó una reconstitución inmunológica completa al año postrasplante. Así también se pudo sugerir un patrón de reconstitución inmunológica: primero reconstituyeron las células NK (Natural Killer) al mes de seguimiento, seguidas de los linfocitos B a los 3 meses, y posteriormente se evidenció la reconstitución de los linfocitos T

citotóxicos a los 6 meses, y de los linfocitos T cooperadores al año de seguimiento.

II. INTRODUCCIÓN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) se ha convertido en las últimas décadas en una alternativa de tratamiento para un grupo cada vez mayor de enfermedades tanto benignas como malignas.¹

Algunas de estas enfermedades son: Leucemia, inmunodeficiencias combinadas, anemia aplásica, Síndrome de Kostmann, Síndrome mielodisplásico y Síndrome de Omen.

2.1 Generalidades del TCPH

2.1.1 Antecedentes Históricos.

1959: Los primeros intentos de trasplante de médula ósea (TMO) fueron realizados en Francia y EEUU, cuando aún los conocimientos del sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) eran rudimentarios. Un paciente trasplantado por el grupo de Seattle, obtuvo un injerto transitorio.

1961: Mathe y cols., describieron el primer injerto duradero en un paciente que posteriormente murió a causa de cuadros infecciosos.

1968: Gati y cols. efectuaron el primer trasplante alogénico exitoso en un niño con inmunodeficiencia congénita.

1969: Donald Thomas (más tarde premio Nobel por su contribución en la biología del TMO) y su grupo de Seattle, comunicaron el primer trasplante de médula ósea en un paciente adulto con Leucemia Aguda, iniciando la era moderna de este procedimiento terapéutico.²

En México, la historia de los TCPH puede dividirse en dos etapas:

1980: Se llevó a cabo el primer TCPH en México por el Dr. Ricardo Sosa y cols., en el Instituto Nacional de la Nutrición en la ciudad de México. Después de este trasplante, se hicieron algunos otros aislados en el Centro Médico Nacional, en el Hospital Universitario de Monterrey, en el propio Instituto Nacional de la Nutrición y en otros sitios, con resultados pobres. Esto tuvo como consecuencia que en varias instituciones médicas del país se suspendieran de manera transitoria los programas de TCPH. En México la práctica de los TCPH fue casi anecdótica hasta antes de 1995.

1995: Se inició una segunda etapa con la llegada de algunos médicos entrenados en la práctica de los TCPH. Otra causa por la que se reactivaron los programas de TCPH, fue la evolución de los conocimientos en esta área: a) se comenzaron a usar células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de sangre periférica en vez de médula ósea; b) se hicieron simplificaciones de los métodos para llevar a cabo los trasplantes, y c) se inició la práctica de los alotrasplantes con esquemas de acondicionamiento no mieloablativo.³

2.1.2 Fuentes de CPH

2.1.2.1 Médula Ósea

La médula ósea se extrae a través de múltiples punciones en crestas iliacas posteriores del donante, previa colocación de anestesia general. Aproximadamente 10 mL/Kg. de médula ósea del paciente, dan el número de células progenitoras hematopoyéticas suficiente para asegurar el trasplante.⁴

2.1.2.2 Sangre Periférica

Las células progenitoras hematopoyéticas son obtenidas de sangre periférica y no de médula ósea. La aplicación de G-CSF moviliza las células de la médula ósea a la sangre y de allí son recolectadas por medio de procedimientos estándares de aféresis.

La recolección se realiza por vena periférica, pero en ocasiones es necesario colocar un catéter central. El procedimiento es en general bien tolerado, aunque un 25% de donantes presentan molestias debidas a las citoquinas.⁴

2.1.2.3 Sangre del cordón umbilical y de la placenta

Las CPH circulan en la sangre del feto, al igual que en los niños y los adultos. En la circulación fetal, la concentración y el crecimiento potencial de CPH es aún mayor que en la sangre de los adultos. En el momento del parto, el cordón umbilical es separado y desechado con todas las “secundinas” y la placenta.

En lugar de desecharse, la sangre puede ser drenada cuidadosamente en un envase plástico estéril. La suspensión de células con CPH puede congelarse y usarse para trasplantar en una fecha posterior. Cuando se usa como un producto de trasplante, se las denomina “células de la sangre del cordón”.⁵

2.1.3 Tipos de TCPH

Los tipos de TCPH puede clasificarse como:

2.1.3.1. Autólogo: Consiste en extraer y conservar células progenitoras del propio paciente, que le serán reinfundidas tras haberle sometido a tratamiento erradicativo de su enfermedad. Tiene el riesgo de que con el injerto se puedan reinfundir células tumorales contaminantes y no se puede emplear en pacientes con enfermedades primarias de la médula ósea.⁶

2.1.3.2. Singénico: Es el realizado entre hermanos gemelos univitelinos. Dada la total identidad antigénica no existirán problemas inmunológicos, ni rechazo ni enfermedad injerto contra huésped. Sin embargo, es un tipo de trasplante excepcional ya que es muy poco frecuente que un paciente tenga un hermano gemelo univitelino.⁶

2.1.3.3. Alogénico: Efectuado entre individuos de una misma especie. El procedimiento implica la infusión de CPH de un donante sano a un paciente que se ha sometido a un tratamiento de acondicionamiento, administrado previamente, con el fin de erradicar las células neoplásicas y la capacidad de respuesta inmune del receptor, para evitar un rechazo del injerto una vez infundido. La principal limitación para la realización de este tipo de trasplante es la disponibilidad de un donante familiar HLA compatible. Sin embargo, los avances obtenidos en los últimos años en el campo de la inmunología y la biología molecular, así como la creación de registros de donantes de médula y bancos de sangre de cordón, han permitido ampliar las posibilidades de encontrar donantes histocompatibles no relacionados para los pacientes que lo requieren.⁷

Este tipo de trasplante comprende las siguientes variantes:

- *Hermanos HLA-idénticos:* cada persona hereda un haplotipo de cada uno de sus progenitores; por ello, la posibilidad teórica de disponer de un hermano HLA idéntico es del 25 %. Es el tipo de donante ideal. Actualmente la mayoría de los trasplantes alogénicos se hacen con este tipo de donante.⁷

- *No familiares, total o parcialmente compatibles*: debido a la limitación de los tipos de trasplantes anteriormente descritos, se ha trabajado para aumentar las posibilidades de donantes no relacionados, los cuales alcanzan más de 7,5 millones en todo el mundo. En la actualidad, el 25% de los trasplantes alogénicos son de este tipo. A pesar de la cantidad de donantes disponibles en el registro internacional, es difícil encontrar uno para muchos pacientes, particularmente para las minorías étnicas y raciales.⁷
- *Familiares parcialmente compatibles*: para los pacientes que no cuentan con un familiar HLA idéntico, el [trasplante haploidéntico](#) de un familiar es una opción, y la ventaja más significativa de este trasplante es la mayor disponibilidad, por lo que un donante está disponible en el 90% de las veces y la demora para el proceder puede reducirse.⁷

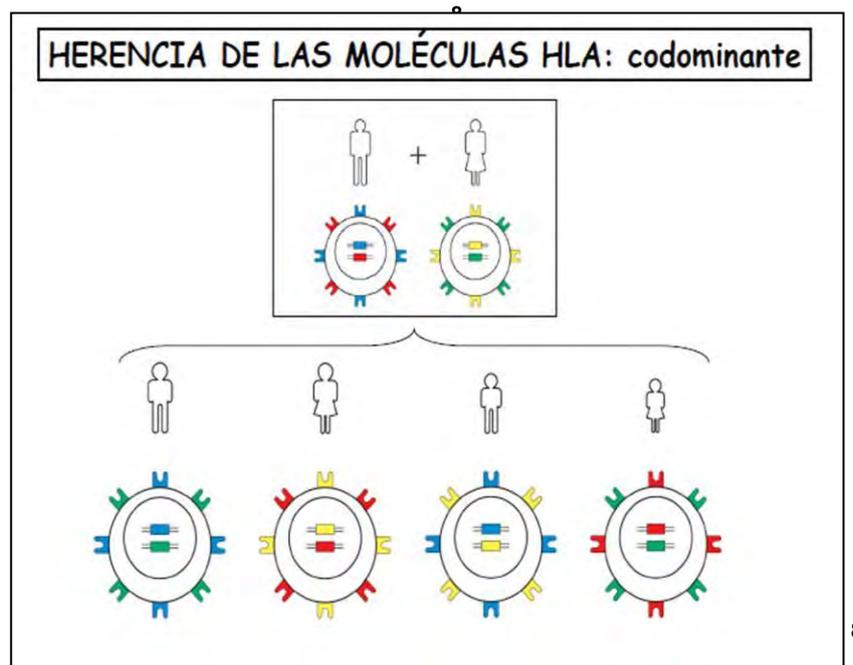
Para un trasplante de este tipo se toma a uno de los padres, generalmente a la madre, quien se convierte en la donadora. Esto en condiciones habituales resultaría imposible porque, desde el punto de vista inmunológico, los padres sólo comparten el 50% de la información necesaria para que puedan ser compatibles con su hijo, lo que trae como consecuencia una complicación injerto contra huésped, que pondría en riesgo la vida del paciente; actualmente se cuenta con tecnología de punta que nos permite eliminar las células encargadas de desarrollar esta complicación.¹

2.2. Complejo Principal de Histocompatibilidad

El sistema HLA (Human Leukocyte Antigen) codificado en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), juega un papel protagónico en los fenómenos de presentación y reconocimiento antigénico, instancias iniciales de la respuesta alogénica.

Su componente genético, ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, revela un alto grado de complejidad y polimorfismo. Se hereda siguiendo un patrón mendeliano simple y se expresa en forma codominante (véase fig. 1).

Fig. 1: La figura representa el patrón mendeliano simple de herencia codominante.



Tomado de: <http://campus.usal.es/~dermed//T.19%20BIOQ.pdf>

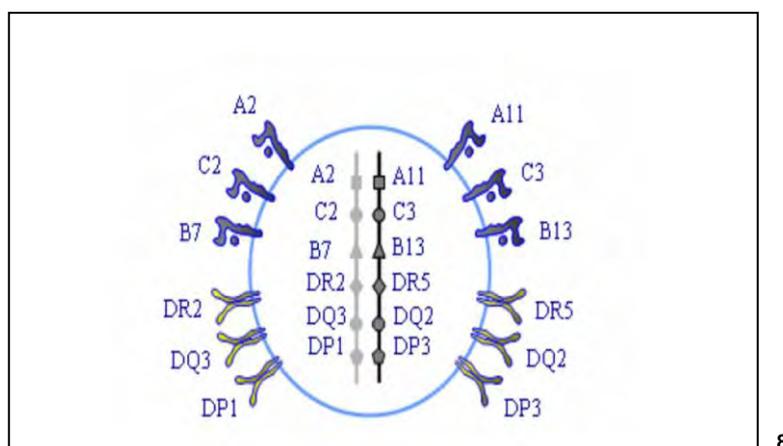
Hasta octubre de 2002 las variantes moleculares identificadas de los loci que habitualmente se consideran en TMO (HLA A, B, C, DR, DQ) son: 263 para HLA-A, 501 para HLA-B, 125 para HLA-C, 397 para HLA-DRB, 53 para HLA-DQB1.

Las frecuencias y distribuciones de estos alelos varían en los diferentes grupos étnicos.⁹

Para este tipo de Trasplantes las CPH son obtenidas de familiares que comparten en su HLA al menos un haplotipo, esto permite contar con un donador de CPH en prácticamente todos los niños que requieran de un TACPH.¹⁰

La cercanía de genes HLA hace que por lo general se hereden como una unidad, la unidad hereditaria constituida por varios genes se llama **haplotipo** (ver fig. 2).

Fig. 2: Representación de un haplotipo HLA y los diferentes alelos que se expresarían en una CPA.



8

Tomado de: <http://campus.usal.es/~dermed/T.19%20BIOQ.pdf>

En las células somáticas de cada sujeto hay dos **haplotipos** HLA (uno paterno y otro materno) y en los gametos sólo existe uno de ellos.¹¹

Existen diversas complicaciones del TMO, entre las cuales se puede mencionar las reacciones por toxicidad a medicamentos inmunosupresores, las infecciones y la EICH¹²

2.3. Reconstitución Inmunológica

La función principal del sistema inmunológico (SI) es proteger al organismo de la agresión de agentes extraños de cualquier índole, como virus, bacterias o moléculas no reconocidas como propias, es decir, que no integren su estructura biológica.¹³

La principal función de cualquier respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento del patógeno o del material extraño, para poder iniciar después una reacción destinada a eliminarlo. La respuesta inmunitaria se puede dividir en dos categorías: la respuesta inmunitaria innata (o no adaptativa) y la respuesta inmunitaria adaptativa.¹⁴

2.3.1. Inmunidad innata ó inespecífica:

La tienen en mayor o menor medida todos los seres vivos. Carece de memoria inmunológica pero en cambio es rápida (actúa en segundos). Innata significa que nacemos con ella. La inmunidad innata es capaz de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio y durante sus primeras fases (0 – 5 días). Inespecífica hace referencia a que no identifica patógenos concretos, sino más bien grupos de patógenos.¹⁵

Los agentes de la inmunidad innata siempre actúan igual (no tienen memoria) sea cual sea el patógeno y el número de contactos previos. Utilizan receptores siempre idénticos entre sí que reconocen moléculas comunes a grupos de patógenos. La inmunidad innata está mediada por el complemento, los fagocitos, los interferones y las células NK.¹⁵

2.3.2. Inmunidad adaptativa, específica o adquirida:

Es exclusiva de vertebrados. Tarda una semana en desarrollarse y es la responsable de la memoria inmunológica. Adaptativa significa que se adapta al patógeno. Específica alude a que identifica patógenos muy concretos, a los que reconoce por sus antígenos. Adquirida significa que tenemos que obtenerla, puesto que no nacemos con ella.¹⁵

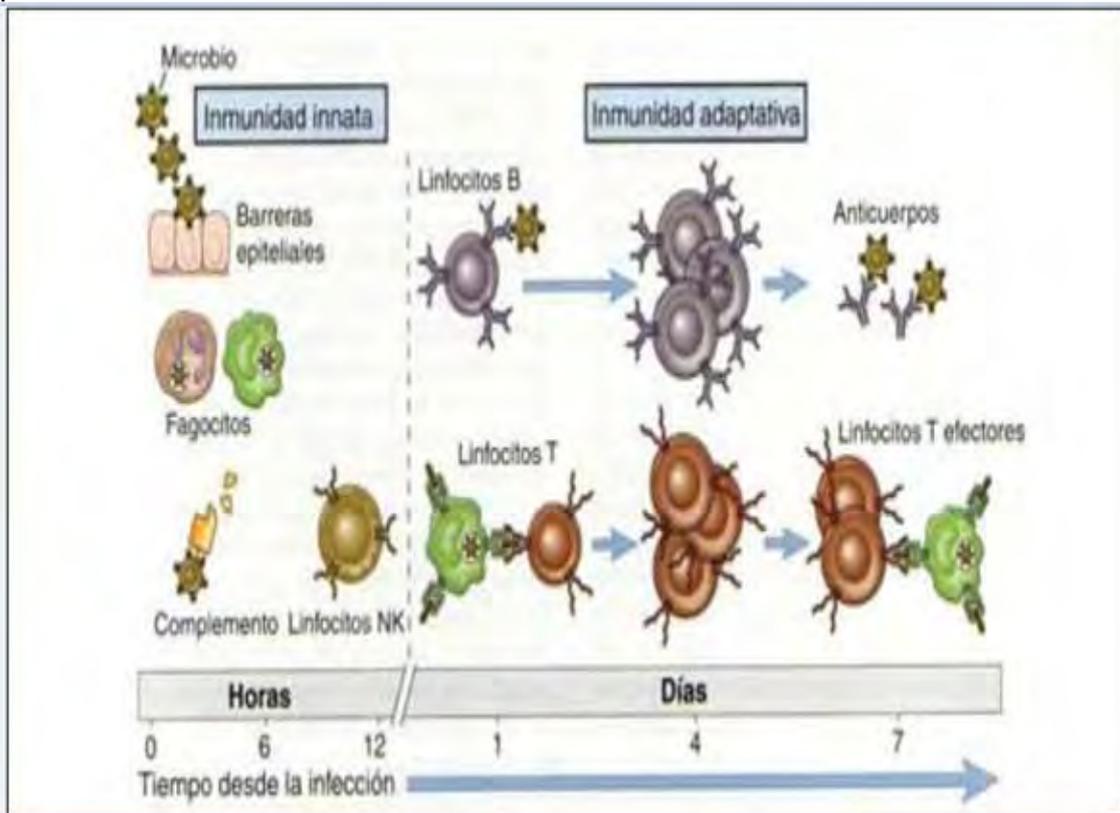
La inmunidad adaptativa tiene una enorme especificidad y memoria ya que es capaz de distinguir patógenos muy similares por los antígenos que los distinguen, de mejorar ese reconocimiento con cada nuevo contacto y de recordarlo durante muchos años.¹⁵

La inmunidad adaptativa está mediada por los linfocitos B y T; la selección clonal y la memoria inmunitaria.

La primera y la segunda línea de defensa son mayoritariamente innatas y relativamente poco específicas, pero rápidas, mientras que la tercera línea de defensa es más lenta, aunque muy específica y además tiene memoria (como los anticuerpos).¹⁵

Tanto la inmunidad innata como la adaptativa persiguen la detección y eliminación del patógeno. Para ello utilizan una estrategia común que consiste, primero, en identificar o reconocer al patógeno, después activar a la célula o molécula implicada y por último desplegar la función efectora que se asocia a esa célula o molécula.¹⁵ (véase fig. 3)

Figura 3. Inmunidad Innata y Adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata aportan la primera defensa contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas surgen mas tarde y consisten en la activación de los linfocitos. Las cinéticas de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa no son más que aproximaciones y pueden variar en las diversas infecciones.



16

Tomado de: Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Sección I. Elsevier Saunders. 6a Edición

La reconstitución del sistema inmunológico después de un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas es crítica ya que la muerte o la morbilidad son frecuentemente atribuidas a infecciones que se presentan por inmadurez o incapacidad del sistema inmune.¹⁷

Después del TCPH, el número de linfocitos T y B circulantes, recupera sus valores normales en las primeras 6 semanas, manteniendo un déficit funcional durante el primer año.¹⁸

Se mantiene una inversión prolongada del índice CD4/CD8, debido a una disminución de las CD4 cooperadoras y un aumento de las CD8 citotóxicas. Existe una deficiencia en el número de células CD45RA+, generadas durante este

período y la relación CD4/CD45RA+ puede no recuperarse hasta los 2 años. Durante este tiempo, también hay una pérdida de receptores T, lo que persiste por más de un año.¹⁸

La reconstitución de las células asesinas naturales (NK) no requiere un timo funcional y ocurre rápidamente en las primeras semanas del período postrasplante.¹⁸

Las células NK y NKT son importantes como parte de la respuesta inmune celular. Estas células representan otro tipo de linfocitos diferente a los linfocitos B o T (1). Su participación en inmunopatogénesis de algunas enfermedades los convierte en parte importante en el análisis inmune celular de laboratorio clínico.¹⁹

Desde los puntos de vista morfológico y funcional, los linfocitos representan un heterogéneo grupo de células. En cuanto a su función se distinguen dos poblaciones: las células B y T y varias subpoblaciones de linfocitos T, las cuales pueden identificarse por métodos inmunológicos basados en el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen la presencia de marcadores y receptores celulares específicos de superficie; de ahí que se distingan linfocitos T cooperadores, supresores y citotóxicos.²⁰

Los linfocitos T proceden de la célula primitiva linfoide ubicada en la médula ósea. Ambos tipos de linfocitos B y T participan en la respuesta inmune específica, con una población heterogénea de células con funciones diversas. Los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral, estimulados frente a un antígeno, se transforman en células plasmáticas, es decir, en las responsables de la síntesis

de las distintas clases de inmunoglobulinas o anticuerpos específicos contra ese antígeno.²⁰

Los linfocitos B se derivan también de una célula germinal linfoide pluripotente y en el hombre adquieren su competencia inmunológica en la médula ósea, el hígado fetal y, posiblemente, la placenta.²⁰

2.4. Desarrollo de linaje celular y expresión de antígenos

2.4.1. CÉLULAS B

La diferenciación de células troncales a linfocitos B maduros se lleva a cabo a través de cuatro pasos que pueden ser identificados por el patrón de expresión de inmunoglobulinas. Las células más primitivas de la médula ósea comprometidas al desarrollo del linaje B tienen rearrreglos de las regiones de diversidad y unión (DJ) del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas pero no sintetizan inmunoglobulinas proteicas. Estas células tempranas pre-B expresan en su superficie CD10, CD19, CD24, CD34, HLA-DR, contienen en su citoplasma CD22, CD79a, CD79b y en su núcleo TdT (desoxirribonucleotidil transferasa terminal). La expresión del antígeno leucocitario común, CD45, es débil inicialmente pero incrementa con la maduración celular.²¹

El rearrreglo funcional del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas es precedido por la aparición de cadenas pesada μ en el citoplasma y la diferenciación de células tempranas pre-B a la etapa pre-B.²¹

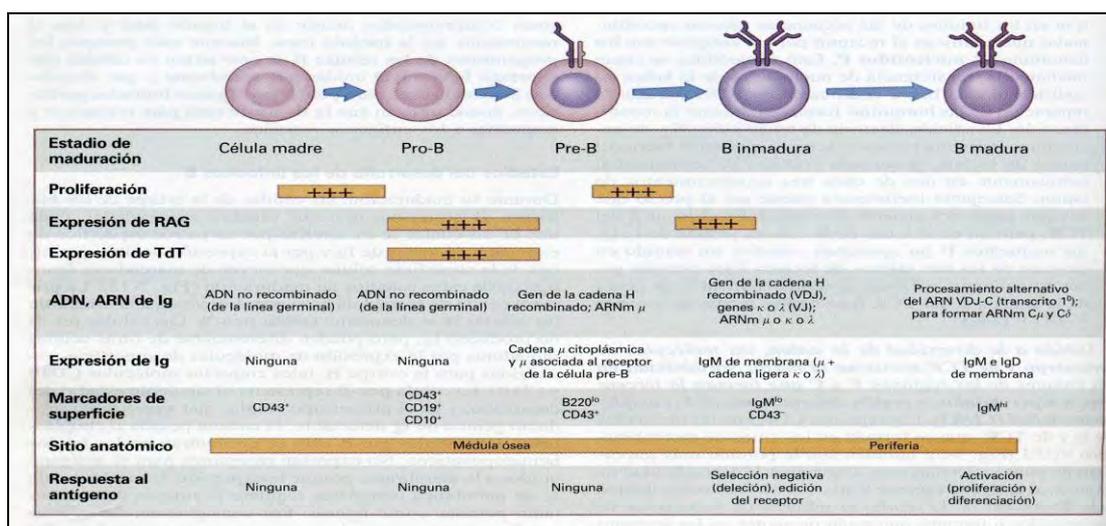
Los linfocitos pre-B jóvenes son las primeras células que expresan en su superficie CD22, y esto es seguido de la aparición de CD20. Durante las últimas etapas de maduración de las células pre-B, los linfocitos expresan débilmente en

su superficie cadenas pesadas μ pero no cadenas ligeras κ o λ . Las cadenas pesadas μ son transportadas a la superficie celular en compañía de cadenas pseudo ligeras (ψ LC), las cuales primero aparecen durante la etapa de maduración de células tempranas pre-B. Las ψ LCs consisten en una asociación no covalente entre $\lambda 5$ y proteínas V_{preB} que están unidas a μ por enlaces bisulfuro. Las proteínas ψ LC están codificadas por los genes V_{preB} y $\lambda 5$ localizados en el cromosoma 22 (el cual también contiene el gen de cadena ligera λ). Aunque estos dos genes comparten homología parcial con las regiones variable y constante, respectivamente, de la cadena ligera λ , no experimentan rearrreglos. El enlace bisulfuro entre las moléculas CD79a y CD79b está asociada de forma no covalente con el complejo μ - ψ LC de un modo parecido a su asociación con la IgM. El complejo μ - ψ LC no es necesario para la producción de cadenas ligeras λ pero participa en la sobrevivencia y diferenciación de las células B. Hacia el final de la etapa pre-B, TdT, CD34 y CD10 desaparecen.²¹

El rearrreglo y transcripción de los genes de cadena ligera de la inmunoglobulina conducen a la formación de moléculas completas de inmunoglobulina y a la diferenciación de células pre-B de transición a linfocitos B maduros que expresan en su superficie IgM. Por un breve tiempo, la célula B joven podría coexpresar μ - ψ LC e IgM. Las células B que no producen moléculas funcionales de inmunoglobulinas de superficie experimentan apoptosis en la médula ósea. La expresión de inmunoglobulinas de superficie está acompañada por el incremento en la densidad de CD20 y, en algunas células, la aparición de CD21, un receptor para C3d y virus Epstein-Barr.²¹

Los linfocitos B maduros migran de la médula ósea para poblar folículos linfoides, bazo, placas de Peyer y amígdalas. En estos tejidos linfoides secundarios, el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina de las células B experimenta otros rearrreglos, resultando en la producción de IgD o en un completo encendido a la producción de IgG, IgA o IgE. La inmunoglobulina encendida toma lugar en los folículos linfoides, donde las células B antigénicamente activadas proliferan y forman los centros germinales. Las células B germinales (centroblastos y centrocitos) comparten algunas similitudes con las células pre-B, ambas expresan CD10 y tienen gran propensión a apoptosis. Estas células no re-expresan TdT o CD34. Los centrocitos que no experimentan apoptosis forman plasmablastos que se dirigen a la médula ósea o a las regiones medulares de los nodos linfoides donde maduran a células plasmáticas o llegan a ser células B de memoria que salen de los centros germinales. Las células plasmáticas pueden secretar grandes cantidades de inmunoglobulina, pero no exhiben inmunoglobulinas de superficie, CD19, CD20, CD22 o HLA-DR.²¹ (véase fig. 4).

Figura 4. Fases de maduración de los linfocitos B



16

Tomado de: Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Sección I. Elsevier Saunders. 4a Edición

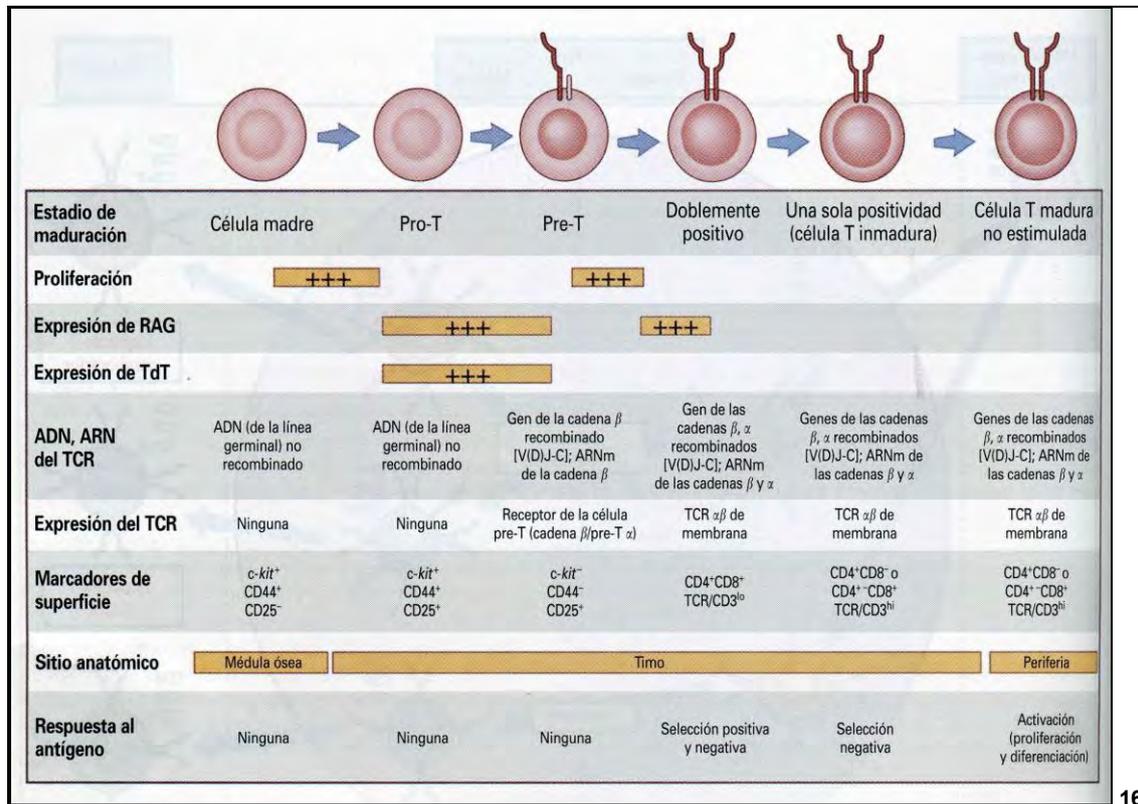
2.4.2. CÉLULAS T

Algunos estudios indican que los linfocitos T son derivados de las células pluripotentes de la médula ósea que expresan CD34, CD7, CD33 y posiblemente, CD2. El compromiso de las células troncales de la médula ósea a linaje T tiene lugar en el timo bajo la influencia del estroma celular tímico.²¹

Las primeras células comprometidas al desarrollo de células T son localizadas en las áreas corticales de los lóbulos del timo y son identificadas por su expresión de CD34, CD7, CD5, CD2, CD3 citoplásmico y TdT. Consecutivamente el receptor β (TCR β) de las células T se asocia a un sustituto de la cadena α (llamada pT α para célula α pre-T) y este receptor pre-TCR β es transportado a la superficie celular. La expresión de este receptor resulta en la expansión y progresión de células T tempranas a la etapa de timocito común compuesto de células CD34/CD7/CD5/CD2/CD4/CD8-positivas (llamadas células doble positivas por la co-expresión de CD4 y CD8). Estas células doble positivas también pueden expresar CD10, CD21 y CD1a. Durante la etapa de timocito común, pequeñas cantidades de CD3 en compañía de proteínas TCR α y β (TCR $\alpha\beta$) o, menos comúnmente, proteínas γ o δ (TCR $\gamma\delta$), aparecen en la superficie celular (células CD3^{lo}). La mayoría de estas células doble positivas morirán por apoptosis como resultado de que los receptores TCR no sean capaces de reconocer los antígenos MHC propios (muerte por selección positiva defectuosa). Las células sobrevivientes de la selección positiva incrementan su densidad de CD3 y receptores TCR superficiales (células CD3^{hi}), y dejan de expresar CD1, CD10, CD21, TdT, y cualquiera de los siguientes: CD4 o CD8. Estas células en etapa tímica tardía (también llamadas células simples positivas porque sólo expresan

CD4 o CD8) son sometidas a otra selección negativa. Las células CD3⁺, CD4⁺ o CD3⁺, CD8⁺ sobrevivientes son exportadas del timo por circulación sistémica a los tejidos linfoides periféricos.²¹ (véase fig. 5)

Figura 5. Fases de maduración de los linfocitos T



16

Tomado de: Abbas A., Lichtman A., Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Sección I. Elsevier Saunders. 4a Edición

2.4.3. CÉLULAS NK

El linaje preciso de las células NK aún no se ha establecido. Comparten un progenitor prematuro común con las células T y expresan la molécula CD2 que también está presente en las células T. Además, poseen receptores IL-2, son inducidas a proliferar por IL-2 y producir IFN γ . La mayoría de las NK expresa CD56, una molécula también presente en una subpoblación de células T CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo, no se desarrollan en el timo, los genes de variabilidad (V) del

receptor de célula T no se reordenan y, a diferencia de las células T, expresan CD16 FcγRIII. Por consiguiente la visión actual es que se separan del linaje de células T muy temprano en su diferenciación.²²

2.5. Citometría de Flujo y aplicaciones

La Citometría de Flujo es un método automatizado, multiparamétrico y cuantitativo que analiza las señales dispersadas y fluorescentes producidas por una célula al pasar por un haz de luz, estas medidas son realizadas mientras las células (partículas) pasan en fila, a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo. La citometría tiene múltiples aplicaciones, permite obtener información sobre la fisiología, morfología, genética y diversidad de microorganismos, animales y plantas.²³

La citometría de flujo es una tecnología de alta sensibilidad y desarrollo que permite examinar muchas propiedades de un gran número de células en poco tiempo. Algunos autores, definen a la citometría de flujo como una tecnología analítica que permite la medición simultánea de varias características de muestras biológicas. Se pueden realizar recuentos celulares, para separar células o para realizar análisis de marcadores bien sean de superficie o intracelulares.²³

El principio de la citometría de flujo se basa en que las células suspendidas en un líquido pasan individualmente al frente de una fuente de luz intensa (generalmente un láser) y los datos de luz reflejada, y de la fluorescencia son recogidos y organizados en un archivo. Los análisis posteriores de las poblaciones y subpoblaciones se producen mediante el uso de programas de cómputo especializados lo cual permite obtener información valiosa para el

investigador o el clínico. Debido a su capacidad de recolectar información de miles de células al mismo tiempo, la citometría de flujo facilita el análisis multiparamétrico como lo realizan otras técnicas de laboratorio (multiarreglos o microarrays, proteómica).²³

2.5.1. Aplicaciones de la Citometría de Flujo

- Hematología: Tipificación y conteo de células, reticulocitos y análisis de médula ósea.
- Farmacología: Estudios de cinética celular.
- Inmunología: Subpoblaciones de linfocitos, tiraje tisular.
- Oncología: Diagnóstico y pronóstico, monitores de tratamientos.
- Microbiología: Diagnóstico bacteriano y vírico, estudios de sensibilidad a los antibióticos.
- Genética: Cariotipo y diagnóstico de portador y diagnóstico prenatal.²³

III. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales obstáculos para realizar un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TACPH) es la carencia de un donador idéntico en el HLA, situación que ocurre en casi dos terceras partes de los pacientes que requieren de este procedimiento.²⁴ Con el transcurso del tiempo ha habido avances en el campo del TACPH que han beneficiado directamente a este grupo de pacientes, permitiendo ofrecer una alternativa a la falta de donadores histocompatibles.

El propósito del presente trabajo fue monitorear la reconstitución inmunológica en pacientes pediátricos después de un trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas, lo cual permite evaluar la sobrevida del paciente y poner de manifiesto las ventajas de los trasplantes haploidénticos como una medida terapéutica para los pacientes que no cuentan con un donador 100% compatible y que requieren de un TACPH; así como prever la mejoría de la condición clínica en la aparición de la Enfermedad Injerto contra Huésped (EICH), si se presenta, y disminuir el tiempo de tratamiento profiláctico de infecciones post TACPH.

IV. HIPÓTESIS

El monitoreo de subpoblaciones linfocitarias, en pacientes pediátricos postrasplantados, mediante citometría de flujo permitirá establecer un patrón de reconstitución inmunológica después de un TCPH Haploidéntico.

V. OBJETIVOS

General:

- Describir el patrón de reconstitución inmunológica de los pacientes pediátricos post trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas mediante trasplante haploidéntico.

Particulares:

- Evaluar la reconstitución inmunológica empleando citometría de flujo en las diferentes subpoblaciones linfocitarias T, B y las células NK después de un TCPH Haploidéntico.
- Analizar el comportamiento de recuperación inmunológica al año postrasplante

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron 6 pacientes del Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría sometidos a trasplante haploidéntico de CPH, 4 del género femenino y 2 del género masculino y cuyas edades oscilan entre 10 y 16 años, las CPH fueron obtenidas de Sangre Periférica (Tabla 1).

Se realizó el seguimiento de subpoblaciones linfocitarias por Citometría de flujo empleando anticuerpos monoclonales de superficie: CD3-PC5, CD4-FITC, CD8-PE, CD19-FITC y CD56-PE, durante los 1, 3, 6 y 12 meses de seguimiento post-trasplante.

6.1. Material

- a) Citómetro de Flujo Cytomics F500 Beckman Coulter.
- b) Equipo Lisante de Células TQ-Prep Beckman Coulter.
- c) Anticuerpos monoclonales fluorescentes Beckman Coulter
 - CD4 FITC/ CD8 PE/ CD3 PC5
 - CD19 FITC
 - CD56 PE
- d) Estuche de reactivo Immunoprep de Beckman Coulter para lisar, fijar y estabilizar las células

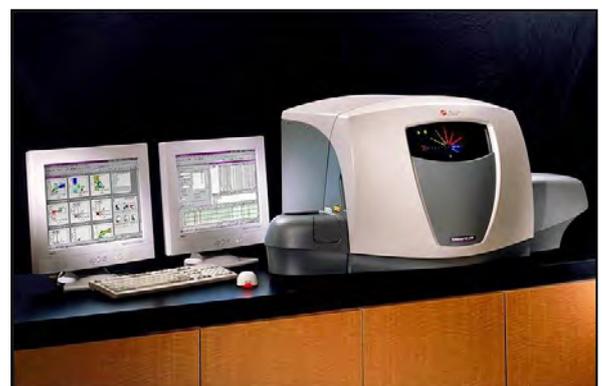
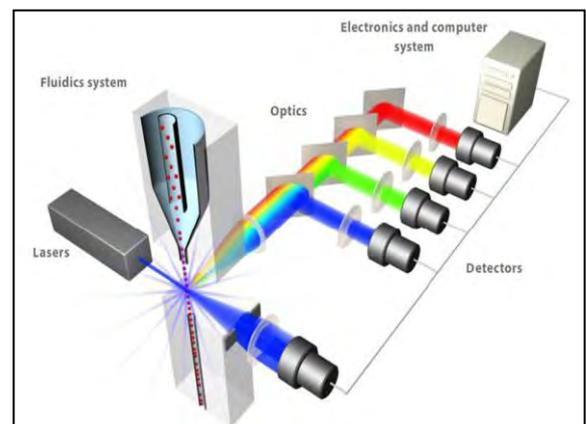
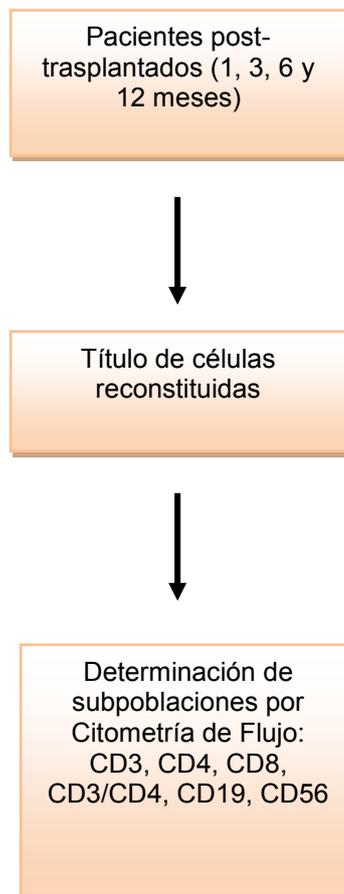
6.2. Metodología

- a) Se realizó el marcaje de los tubos para Citometría como se indica en la siguiente tabla:

TUBO	AcMo
1	Control
2	CD4FITC/CD8PE/CD3PC5
3	CD19FITC/CD56PE

- b) Adicionar 20 μ l a cada tubo del anticuerpo monoclonal indicado en la tabla.
- c) Agregar 100 μ l de la muestra a cada tubo.
- d) Incubar los tubos durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- e) Hemolizar los componentes celulares no linfocitarios con ácido fórmico a una concentración de 1.2 ml/l en el equipo TQ-prep y se agregó estabilizador y fijador paraformaldehído a una concentración de 10.0g/l para preservar las poblaciones celulares linfocitarias.
- f) Realizar la lectura de las poblaciones celulares linfocitarias en el Citómetro de Flujo.
- g) Interpretar y calcular valores absolutos de las diferentes poblaciones celulares linfocitarias.

6.3. Estrategia de Trabajo



Display CD4 & CD8 distribution

CD8 pos: 27.6%



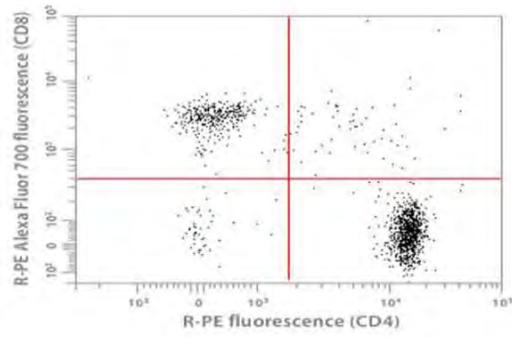
CD4/CD8 pos: 2.0%



CD4/CD8 neg: 2.4%



CD4 pos: 68.0%



RESULTADOS

VII. RESULTADOS

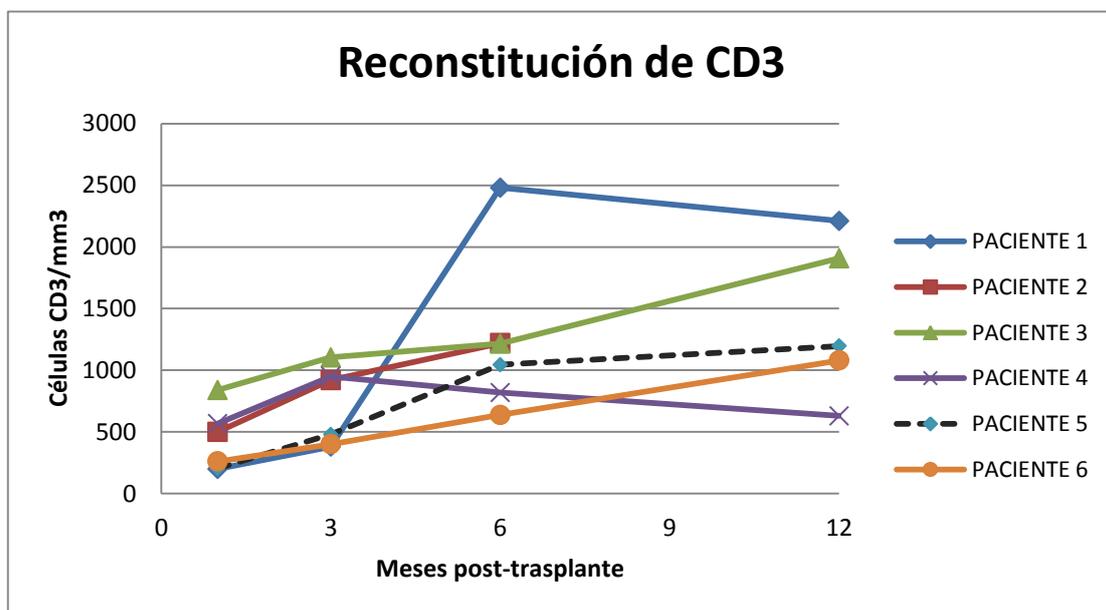
7.1 Comportamiento del monitoreo de los casos en estudio al año postrasplante

A) Monitoreo de CD3

De los 6 casos estudiados, se observaron niveles de CD3 normales (1100 – 1700 cel./mm³) a los 3 meses en 1 paciente (16.67%), a los 6 meses en 2 pacientes (33.34%), a los 12 meses 4 pacientes (66.67%) presentaron valores normales; cabe mencionar que a lo largo del monitoreo 1 paciente (16.67%) nunca alcanzó niveles normales.

Es importante mencionar que la normalización de valores de CD3 a los 6 meses fue a expensas de CD8 que se encontró incrementado con respecto a CD4.

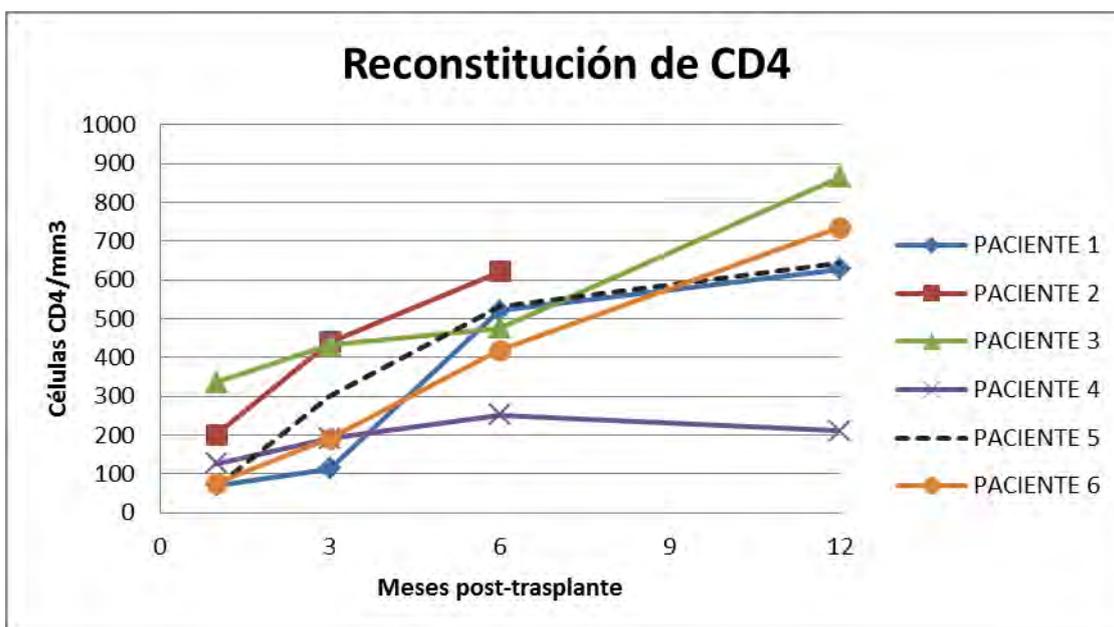
Hasta el año post trasplante CD4 y CD8 alcanzaron el equilibrio (Gráfica 1).



Gráfica 1. Muestra el seguimiento de la reconstitución de células CD3 en cada uno de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas.

B) Monitoreo CD4

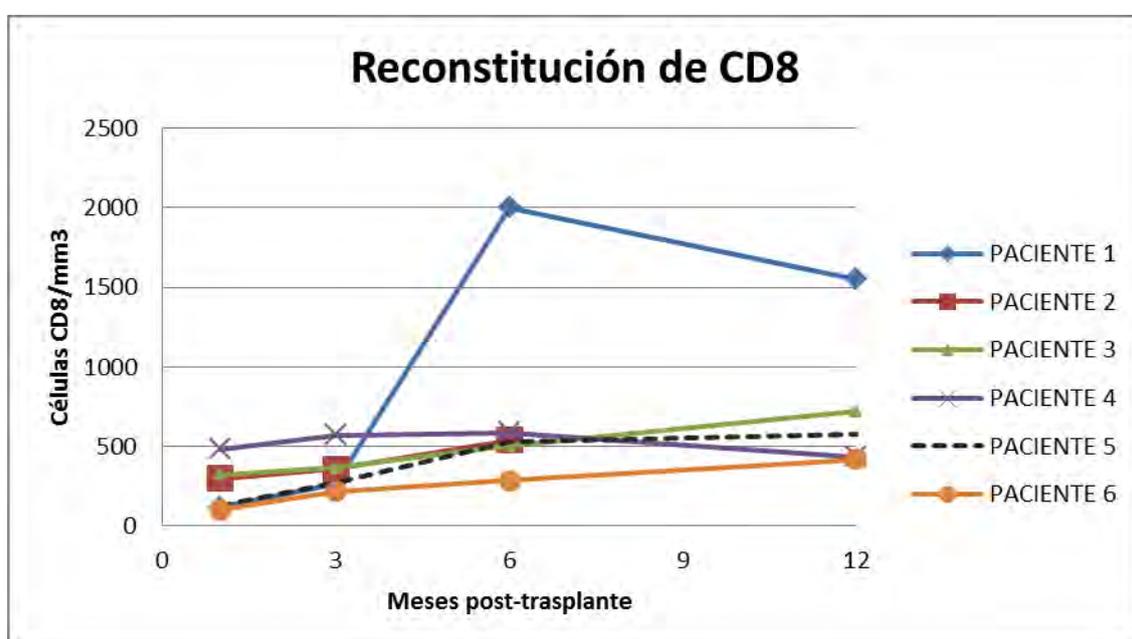
En niveles de CD4 todos los pacientes mostraron incremento a lo largo del monitoreo pero fue hasta el año que 2 (33.34%) de los casos alcanzaron valores normales (700 – 1100 cel./mm³), mientras que otros 2 (33.34%) casos se aproximaron al valor normal y 1 caso (16.64%) nunca alcanzó la normalización (Gráfica 2).



Gráfica 2. Muestra el seguimiento de la reconstitución de células CD4 en cada uno de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas.

C) Monitoreo de CD8

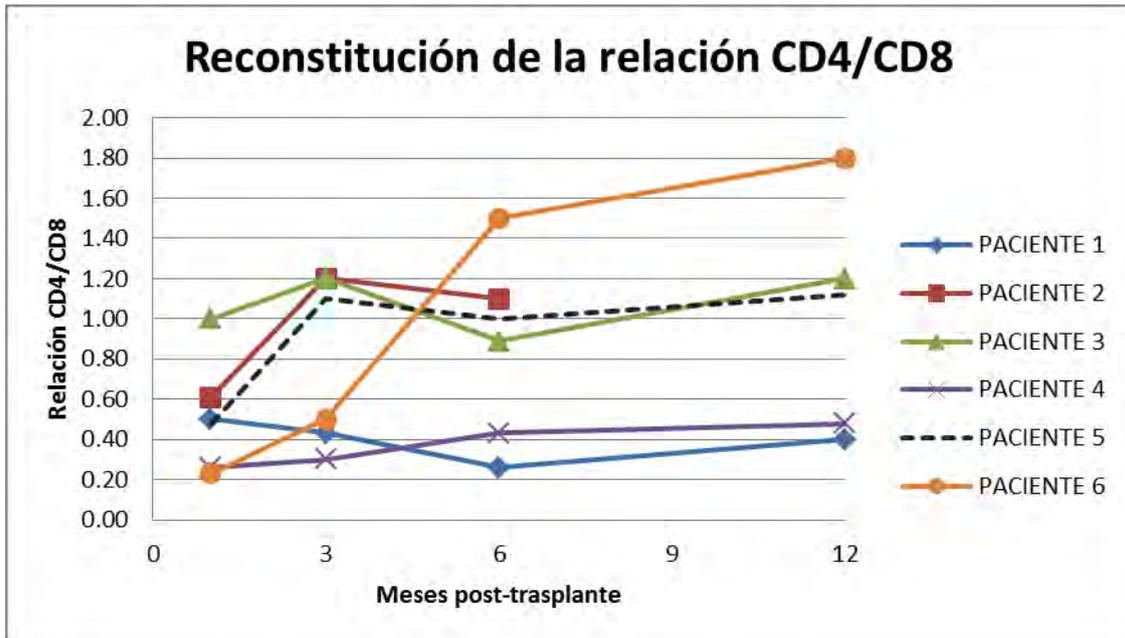
En niveles de CD8 hubo un incremento excesivo, se comenzaron a normalizar los valores a los 6 meses excepto en 1 paciente (16.67%), aunque a los 3 meses 1 paciente (16.67%) presentó valores normales (500 – 900 cel./mm³) pero los demás aún no se acercaban a la normalidad y al año prácticamente ya todos los pacientes presentaron valores normales: 3 (50%) casos alcanzaron rangos normales y 2 (33.34%) casos estaban cercanos al rango normal (Gráfica 3).



Gráfica 3. Muestra el seguimiento de la reconstitución de células CD8 en cada uno de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas.

D) Monitoreo de la relación CD4/CD8

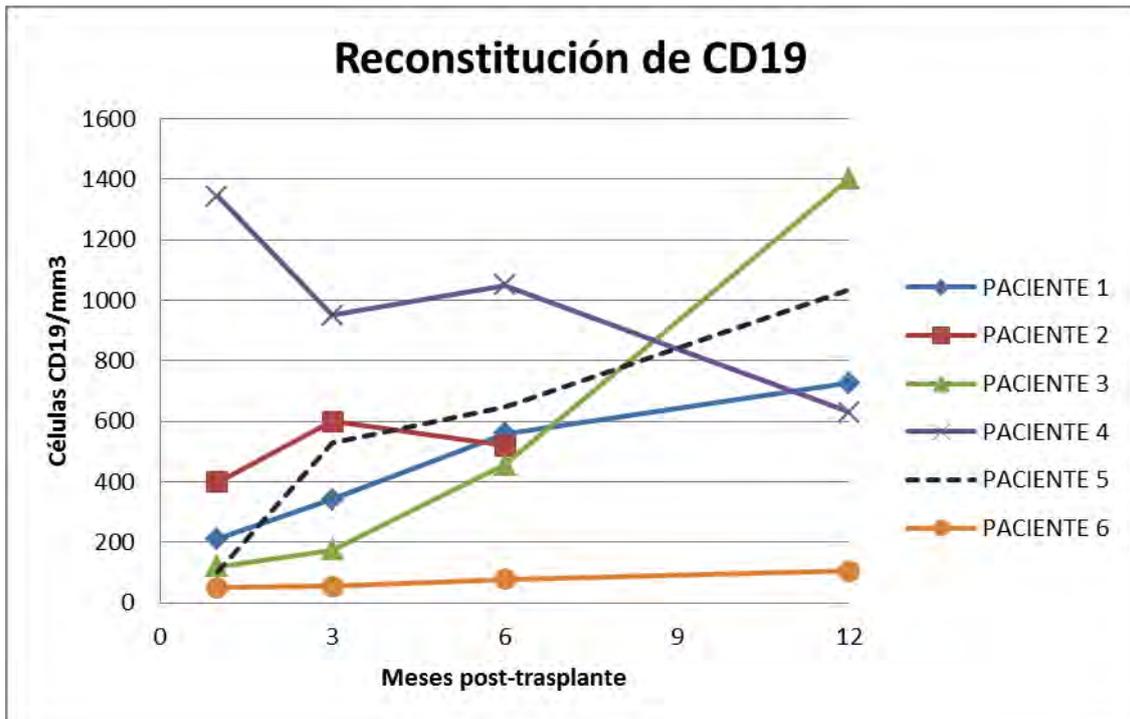
Al mes post trasplante 3 pacientes (50%) evidenciaron valores normales (0.5 – 1.5), 1 paciente (16.67%) casi alcanzo ese rango. A partir de los 6 meses post trasplante 4 pacientes (66.67%) se normalizaron (Gráfica 4).



Gráfica 4. Muestra el seguimiento de la reconstitución de la relación CD4/CD8 en cada uno de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas.

E) Monitoreo de CD19

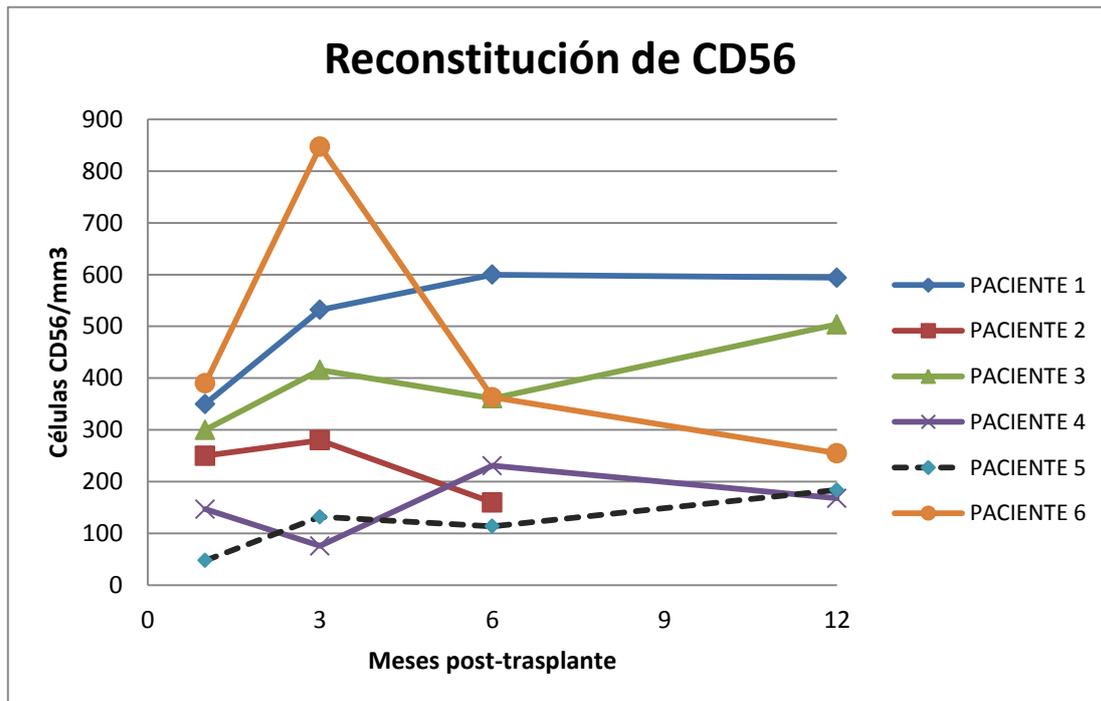
A los 6 meses se observaron valores normales de CD19 (200 – 400 cel./mm³) en 5 pacientes (83.34%). Al año se mantuvo esta tendencia y 1 paciente (16.67%) nunca alcanzó valores normales (Gráfica 5).



Gráfica 5. Muestra el seguimiento de la reconstitución de CD19 en cada uno de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas.

F) Monitoreo de CD56

A partir del primer mes se observó una normalización de los valores de CD56 (200 – 400 cel./mm³) en 4 pacientes (66.67%) y la tendencia continuo de esa manera (Gráfica 6).



Gráfica 6. Muestra el seguimiento de la reconstitución de CD56 en cada uno de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de células progenitoras hematopoyéticas.

7.2. Análisis del patrón de comportamiento de la reconstitución inmunológica al año postrasplante

Se analizaron 6 muestras de pacientes pediátricos sometidos a trasplante haploidéntico, 5 casos (83%) aportaron mediciones completas y 1 caso (17%) solo tuvo tres mediciones ya que falleció pero se incluyó en el estudio debido al número tan pequeño de casos.

Los pacientes que fallecieron fueron 2: un caso a los 7 meses de seguimiento y el otro caso al año de monitoreo.

En la tabla 1 se observan las características de la población en estudio.

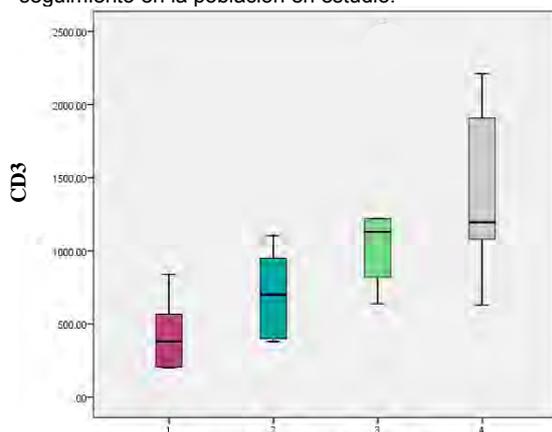
TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO n=6		
Variables categóricas	n(%)	
Estado	Fallecido	Vivo
	2 (33%)	4 (67%)
Sexo	Masculino	Femenino
	2 (33.33%)	4 (66.67%)
Diagnóstico	Hematológico	
	6 (100%)	
Tipo de Trasplante	Alogénico	
	6 (100%)	
Precursos Hematopoyéticos	Sangre Periférica	
	6 (100%)	

Dado que la **n** (número de muestras) fue pequeña, se graficaron las medianas (percentil 50) para observar la tendencia del patrón de reconstitución inmunológica en la población de estudio al año postrasplante.

A) Patrón de reconstitución Inmunológica de la población celular de Linfocitos T.

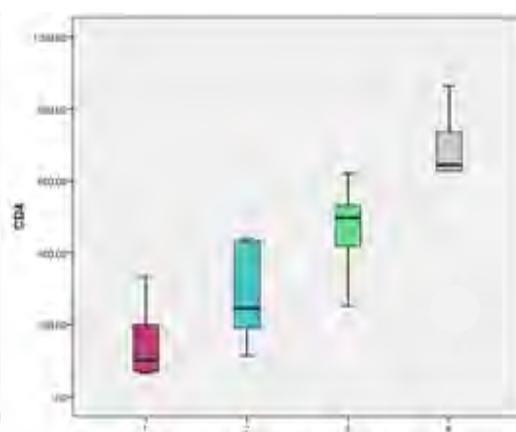
La población celular correspondiente a Linfocitos T esta representada mediante el monitoreo de CD3, CD4 y CD8; los resultados de la población en estudio mostraron una tendencia general de recuperación de la reconstitución en dichas células y alcanzaron valores normales de CD3 a partir de los 6 meses post trasplante (Gráfica 7), de CD4 (linfocitos T cooperadores) al año post trasplante (Gráfica 8) y de CD8 (linfocitos T citotóxicos) a partir de los 6 meses post trasplante (Gráfica 9).

Monitoreo de la reconstitución de células CD3 (Gráfica 7), CD4 (Gráfica 8) y CD8 (Gráfica 9) a lo largo de un año de seguimiento en la población en estudio.



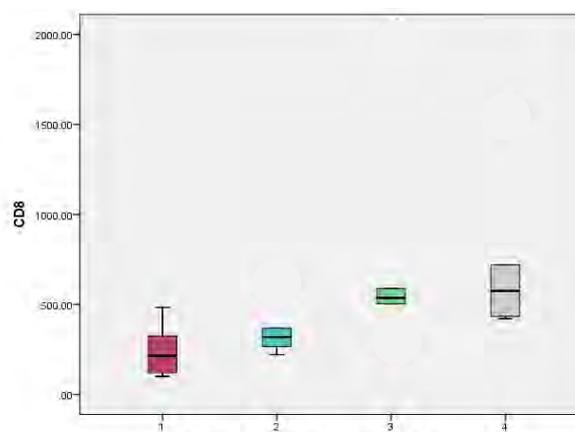
1= 1mes, 2= 3 meses, 3= 6 meses, 4= 12 meses

Gráfica 7



1= 1 mes, 2= 3 meses, 3= 6 meses, 4= 12 meses

Gráfica 8



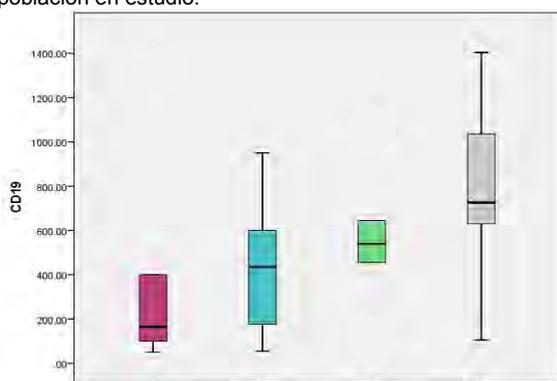
1= 1mes, 2= 3 meses, 3= 6 meses, 4= 12 meses

Gráfica 9

B) Patrón de reconstitución Inmunológica de la población celular de Linfocitos B y Células NK.

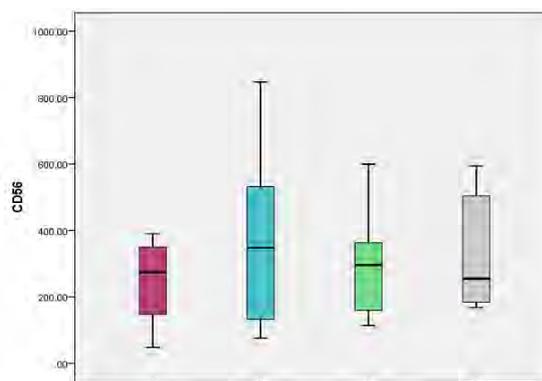
Las gráficas 4 y 5 evidenciaron, en la población en estudio, la reconstitución inmunológica de las células CD19 (linfocitos B) y CD56 (células NK) y se analizó que la reconstitución de células CD19 alcanzó valores normales a partir del tercer mes post trasplante (Gráfica 10), mientras que la reconstitución de las células CD56 alcanzaron valores normales a partir del primer mes post trasplante (Gráfica 11).

Monitoreo de la reconstitución de células CD19 (Gráfica 10) y CD56 (Gráfica 11) a lo largo de un año de seguimiento en la población en estudio.



1= 1 mes, 2= 3 meses, 3= 6 meses, 4= 12 meses

Gráfica 10



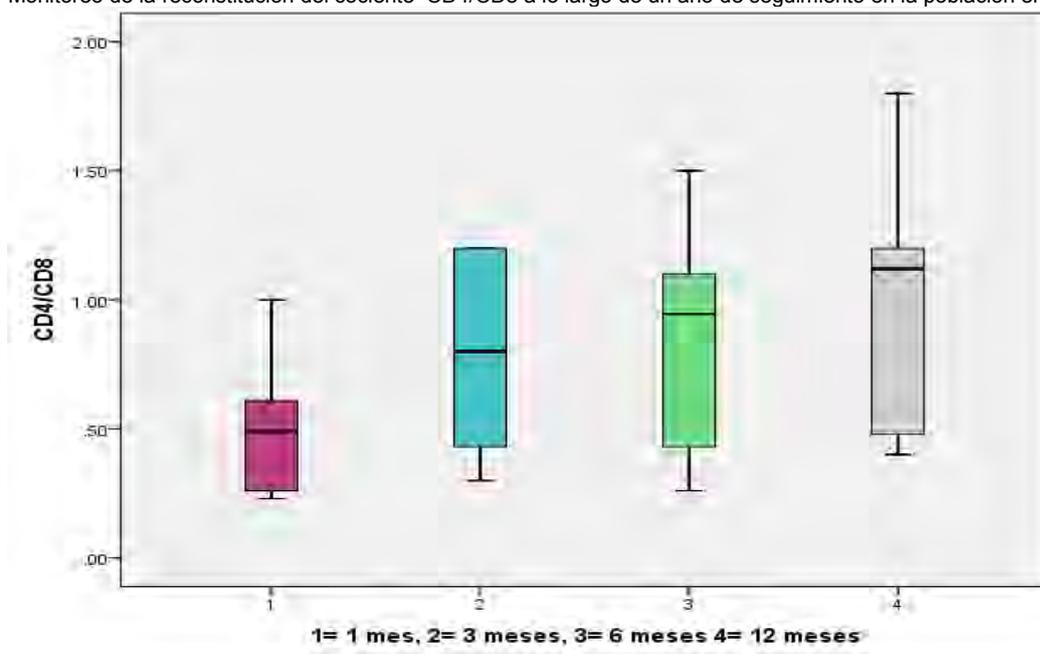
1= 1 mes, 2= 3 meses, 3= 6 meses, 4= 12 meses

Gráfica 11

C) Patrón de reconstitución Inmunológica de la relación CD4/CD8

En esta gráfica se observó la relación CD4/CD8 de la población en estudio, la cual alcanzó valores normales a partir del primer mes post trasplante y se mantuvo durante todo el periodo de seguimiento (Gráfica 12).

Monitoreo de la reconstitución del cociente CD4/CD8 a lo largo de un año de seguimiento en la población en estudio.



Gráfica 12

VIII. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que más del 50% de la población presentó una recuperación total de los parámetros CD3, CD4, CD8 y de la relación CD4/CD8.

A partir de los 6 meses 5 pacientes (83.34%) ya presentaban normalización en valores de CD19.

Desde el primer mes 4 pacientes (66.67%) ya contaban con valores normales de CD56.

Estudios realizados por Imamura y cols. en trasplantes alogénicos, (Hematology. 2003 Feb; 8(1):19-26.); Federmann y cols. en trasplantes haploidénticos (Leukemia. 2010 Oct 14. [Epub ahead of print]) demuestran que las células NK presentan una reconstitución más rápida comparada con otras células linfoides tales como los linfocitos T cooperadores y los linfocitos B cuya reconstitución es más lenta.^{25, 26}

Existen otros estudios realizados por Lessa de Castro (Tesis de Doctorado, Barcelona 2001) que pone de manifiesto el siguiente patrón de reconstitución inmunológica después de un TCPH alogénico: Células NK, Linfocitos T, Linfocitos B.²⁷

En el presente trabajo se empleó como herramienta la Citometría de Flujo para determinar los niveles de subpoblaciones linfocitarias: CD3+, CD4+, CD8+, CD56+ y CD19+, con la cual se obtuvo el siguiente patrón de reconstitución inmunológica: Células NK, Linfocitos T citotóxicos (CD8+), Linfocitos B y Linfocitos T cooperadores (CD4+).

El patrón descrito en el presente trabajo coincide, en términos generales, con los trabajos desarrollados anteriormente.

Este trabajo pone de manifiesto las ventajas, los puntos críticos a cuidar en este tipo de trasplante y, lo más importante, demuestra que el trasplante haploidéntico es una buena alternativa para que todos los pacientes que requieran de este procedimiento tengan acceso a él y con esto, una oportunidad de vida.

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 este trabajo se analizaron por primera vez 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

- El análisis del monitoreo de subpoblaciones linfocitarias, mediante citometría de flujo, mostró que el 67% de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico de CPH presentó una reconstitución inmunológica completa al año postrasplante.
- Se pudo establecer un patrón de reconstitución inmunológica: primero reconstituyeron las células NK al mes de seguimiento, seguidas de los linfocitos T citotóxicos a los 3 meses, y posteriormente se evidenció la reconstitución de los linfocitos B a los 6 meses, y de los linfocitos T cooperadores al año de seguimiento.
- El monitoreo de la reconstitución inmunológica postrasplante, tiene un importante valor pronóstico, ya que existe correlación entre el estado clínico del paciente y los niveles de subpoblaciones linfocitarias en los diferentes meses de seguimiento.
- La obtención de muestra para este tipo de análisis es menos invasivo ya que se trata de sangre periférica, y no de médula ósea. Esto permite establecer un programa de monitoreo periódico que no implica riesgo alguno para el paciente.

X. ANEXOS

ANEXO 1

VALORES DE REFERENCIA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS.

POBLACIÓN CELULAR	%	Cel./mm³
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

28

ANEXO 2

RESULTADOS DE CADA UNO DE LOS PACIENTES

REGISTRO	NOMBRE	DIAGNÓSTICO	DETERMINACIONES POST-TRANSPLANTE (MESES)	CD3 Células/mm ³	CD4 Células/mm ³	CD8 Células/mm ³	RELACION CD4/CD8	CD19 Células/mm ³	CD56 Células/mm ³
460108	Castro Flores Jashia Noelani	LAL	1	200	70	120	0.50	210	350
			3	380	114	266	0.43	342	532
			6	2480	520	2000	0.26	560	600
			12	2211	627	1551	0.40	726	594
			1	500	200	300	0.61	400	250
			3	920	440	360	1.20	600	280
461754	García Ramírez Raúl	LAM-M4	1	500	200	300	0.61	400	250
			3	920	440	360	1.20	600	280
			6	1220	620	540	1.10	520	160
			1	840	336	324	1.00	120	300
			3	1104	432	368	1.20	176	416
			6	1216	475	504	0.89	456	361
455504	Jara Gálvez Aylín	LAM-M2	12	1908	864	720	1.20	1404	504
			1	567	126	483	0.26	1344	147
			3	950	190	570	0.30	950	76
			6	819	252	588	0.43	1050	231
			12	630	210	434	0.48	630	168
			1	205	65	130	0.48	100	48
469448	Palma Carmona Gregoria Yamileth	LAL	12	630	210	434	0.48	630	168
			6	819	252	588	0.43	1050	231
			3	950	190	570	0.30	950	76
			1	567	126	483	0.26	1344	147
			3	950	190	570	0.30	950	76
			6	819	252	588	0.43	1050	231
453275	Trejo Gavilga Karen Dennise	LAM-M7	3	480	300	276	1.10	528	132
			6	1045	532	532	1.00	646	114
			12	1196	644	575	1.12	1035	184
			1	260	76	100	0.23	50	390
			3	400	190	220	0.50	55	847
			6	638	418	286	1.50	77	363
461202	Espinoza Sierra Iván Alexander	IDCS	12	1080	735	420	1.80	105	255
			6	638	418	286	1.50	77	363
			3	400	190	220	0.50	55	847
			1	260	76	100	0.23	50	390
			12	1196	644	575	1.12	1035	184
			6	1045	532	532	1.00	646	114

BIBLIOGRAFÍA

1. Olaya-Vargas A, et al. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría. Rev. Invest Clin 2005; 57 (2): 324-332.
2. Del Fávero, H. TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA. Clínica y Ciencia Vol. 1 No 1, Abril 2001: 39-42
3. GJ Ruiz-Argüelles. Historia del trasplante de médula ósea en México. Revista Biomédica Vol. 16/No. 3/Julio-Septiembre, 2005: 207-213.
4. Unidad de Cáncer - Luz Mejía de Obeso, Fundación Valle del Lili - Cali, Colombia <http://www.oncolili.org> Potenciado por Joomla! Generado: 12 August, 2010, 19:56
5. The Leukemia & Lymphoma Society. Trasplantación de células troncales de la sangre y de la médula ósea: La leucemia, el linfoma y el mieloma. New York
6. J. J. Rifón. Trasplante de progenitores hemopoyéticos. An. Sist. Sanit. Navar. 2006; 29 (Supl. 2): 137-152.
7. Dr. Juan Carlos Jaime Fagundo, Dra. Elvira Dorticós Balea, Dra. Valia Pavón Morán y Dr. Lázaro Cortina Rosales. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones. Revista Cubana Hematología 2004; 20(2)
8. <http://campus.usal.es/~dermed//T.19%20BIOQ.pdf>
9. Milka Bengochea, Inés Álvarez, Pedro C. Hidalgo, Lic. Adriana Cabrera y colaboradores. HLA-A, -B, -DR en receptores de trasplante de médula ósea en Uruguay. Revista Médica del Uruguay Vol. 19 N° 2 Agosto 2003; p. 149-158
10. Oscar González de Llano. Trasplante haploidéntico en niños. Revista de Hematología Vol. 11, Supl. 1, Abril-Mayo 2010; p. 29-30
11. M. en C. Mario Adán Moreno E. Apuntes de la clase de Inmunología de la Especialización en Bioquímica Clínica. Semestre 2011-I. Laboratorio de investigación en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.
12. Gonzalo Rojas, Néstor González, Cristián Venables, Daniel Araos. Enfermedad injerto contra huésped (EICH). Caso clínico con expresión en mucosa bucal. Rev. Méd Chile 2008; 136: 1570-1573.

13. Dr. José M. Ballester Santovenia y Dra. Consuelo Macías Abraham. El sistema inmunológico: comentarios de interés básico. Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2003;19(2-3)
14. Roitt, Brostoff, Male. Inmunología. 5ª Edición. Editorial Mosby
15. Regueiro González J.R. López Larrea C. González Rodríguez S. Martínez Naves E. Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmunitario. 4ª Edición. Editorial Panamericana. Septiembre 2010.
16. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Sección I. Elsevier Saunders. 6ª Edición
17. Michael E. Trigg, MD. Hematopoietic Stem Cells. PEDIATRICS Vol. 113 No. 4 April 2004.
18. Dr. Juan Carlos Jaime Fagundo,¹ Dra. Elvira Dorticós Balea,¹ Dra. Valia Pavón Morán,¹ Dr. Ariel Jesús Jauma Rojo² y Dr. Lázaro Cortina Rosales¹. Aspectos inmunológicos del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Rev. Cubana HematolInmunolMedTransf 2006; 22(3).
19. Francia Rojas-Pandales, Natalia Bolaños, Marcela Mercado, John Mario González, Adriana Cuéllar • Bogotá, D.C. Catherine Cifuentes-Rojas • Texas (EUA). Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. Acta Médica Colombiana Vol. 32 No. 3 ~ Julio-Septiembre ~ 2007.
20. Atlas de Morfología Celular. Universidad Javeriana.
21. Ching-Hon Pui. Childhood Leukemias. Cambridge University Press. 1999. Cap. 7 Immunophenotyping. pp. 111-115.

22. Roitt. Inmunología Fundamentos. 10a Edición. Editorial Panamericana. Capítulo 12 Ontogenia y Filogenia.
23. Dicipa S.A. de C.V. Guía rápida de Operación Equipo FC 500
24. González de Llano O. Trasplante haploidéntico en niños. Revista de Hematología Vol. 11, Supl. 1, Abril-Mayo 2010; p. 29-30
25. Imamura M, Tsutsumi Y, Miura Y, Toubai T, Tanaka J. Immune reconstitution and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Hematology. 2003 Feb; 8(1):19-26.
26. Federmann B, Hägele M, Pfeiffer M, Wirths S, Schumm M, Faul C, Vogel W, Handgretinger R, Kanz L, Bethge WA. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. Leukemia. 2010 Oct 14. [Epub ahead of print]
27. Lessa de Castro S. Reconstitución Inmunológica en niños receptores de Trasplantes de Progenitores Hematopoyéticos (Tesis de Doctorado). Barcelona 2001.
28. Llovera D, Solano L. Subpoblaciones linfocitarias en preescolares Venezolanos de alto nivel socioeconómico. Archivos Latinoamericanos de Nutrición V.54 n.2. Caracas. Junio 2004.