



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Estandarización de un perfil para la evaluación de las  
subpoblaciones de linfocitos T en pacientes pediátricos  
con leucemia aguda sometidos a TCPH”**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:**

**SALCEDA RANGEL KAREN SARAHI**

**ASESOR:**

**QC. ISRAEL PARRA ORTEGA**

**CO-ASESORA:**

**QFB. LAURA GRICELDA MARTÍNEZ MÈNDEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017**



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.





VIRREYDAD NACIONAL  
AVANZA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis

Estandarización de un perfil para la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes pediátricos con leucemia aguda sometidos a TCPH.

Que presenta la pasante: Karen Sarahí Salceda Rangel  
Con número de cuenta: 310316215 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia del Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	

NOTA: los suplentes suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

UMCF/cpa\*

## **DEDICATORIA**

A mis padres

Guadalupe Cancino y Oscar Salceda

Por apoyarme en toda mi trayectoria escolar y por educarme con el ejemplo, por compartir su sabiduría y experiencia de vida para ser una persona de bien, muchas gracias por estar conmigo, guiarme y hacer todo lo posible por darme lo mejor en todos los aspectos.

Gracias por el cariño, sin ustedes no hubiera sido posible cumplir ésta meta, todo lo que soy el día de hoy es gracias a ustedes y para ustedes.

¡GRACIAS!

A mis hermanos

Katya Salceda y Christopher Salceda

Por estar conmigo siempre, por la comprensión y la motivación que representan para mí al esforzarme por ser un buen ejemplo a seguir.

Sin su cariño y compañía no sería la persona y profesionista que soy el día de hoy.

¡GRACIAS!

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de todas aquellas personas que me han brindado sus conocimientos y su apoyo.

En primer lugar a todos mis compañeros de la universidad; a Diana, Oscar, René y Darío, por el tiempo compartido, por hacer mejor el camino a ésta meta que tenemos en común, gracias por su cariño y por motivarme en los buenos y malos momentos lo largo de este viaje.

En segundo lugar, mi agradecimiento a todo el personal del Laboratorio Clínico Central del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en especial a las siguientes personas:

A la TLC. Rosario Robledo, por la compañía, por compartir su conocimiento laboral y su experiencia de vida, por guiarme y motivarme en todo momento.

A mi asesor de tesis el Químico Israel Parra por darme la oportunidad y confianza para realizar este proyecto.

A mi coasesora de tesis la Química Laura Martínez, por apoyarme en todo momento en la elaboración de la tesis y por sus consejos.

A la Química Noemí Nájera por compartir diariamente el estrés, el trabajo y el aprendizaje obtenido durante todo el proyecto y sobre todo por enseñarme Citometría de flujo.

Y por último pero no menos importante a la Dra. Irlanda Olvera, por el apoyo, el tiempo y el conocimiento que me brindo, por enseñarme Citometría de flujo y contagiarme de su pasión por la investigación.

*¡Muchas gracias a todos!*

## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras.....	ii
Índice de gráficas.....	iv
Índice de tablas.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1 Maduración celular.....	2
2.1.1 Células Progenitoras Hematopoyéticas.....	2
2.1.2 Linfopoyesis.....	4
2.1.2.1 Linfocitos T.....	4
2.1.2.2 Otras células T.....	7
2.1.2.3 Linfocitos NK.....	8
2.2 Generalidades de la leucemia.....	12
2.3 Trasplante de células hematopoyéticas (TCPH).....	15
2.3.1 Tipos de TCPH.....	16
2.4 Reconstitución inmunológica.....	19
2.4.1 Efecto injerto contra leucemia (EICL).....	21
2.5 Técnicas para la caracterización de linfocitos.....	21
2.5.1 Citometría de flujo.....	23
2.5.1.1 Historia.....	23
2.5.1.2 Principio.....	25
2.5.1.3 Fluorocromos.....	30
3. Objetivos.....	31
4. Materiales y métodos.....	31
4.1 Calibración.....	31
4.2 Titulación de anticuerpos.....	32

4.3	Compensación.....	32
4.4	Preparación y tinción de muestras de sangre completa con EDTA para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos T.....	34
4.5	Análisis de datos.....	35
5.	Resultados.....	36
5.1	Fluorocromos.....	36
5.2	Control de calidad y calibración del Citómetro de flujo.....	37
5.3	Titulación de anticuerpos.....	38
5.4	Compensación.....	40
5.5	Identificación de las subpoblaciones de linfocitos T.....	43
5.5.1	Panel de linfocitos T vírgenes y de memoria.....	43
5.5.2	Panel de linfocitos activados.....	46
5.5.3	Panel de linfocitos NK.....	48
5.5.4	Valores absolutos de las subpoblaciones de linfocitos..	49
5.5.5	Valores porcentuales de las subpoblaciones de linfocitos T.....	66
5.5.6	MFI de CRTAM en las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria.....	81
5.5.7	Análisis estadístico de las subpoblaciones de linfocitos T en ICS y PIV.....	89
5.5.8	Aplicación del perfil de subpoblaciones de linfocitos T en un paciente post-trasplantado.....	94
6.	Discusión.....	96
7.	Conclusiones.....	101
8.	Referencias.....	102

## ABREVIATURAS

**BCR:** B cell receptor

**CD:** Clusters of differentiation

**CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**CMV:** Citomegalovirus

**CPA:** Células presentadoras de antígeno

**CPH:** Células progenitoras hematopoyéticas

**DN:** Doble negativo

**EICH:** Enfermedad injerto contra huésped

**EICL:** Efecto injerto contra leucemia

**FACS:** Fluorescence-activated cell sorter

**FSC:** Forward scattering

**G-CSF:** Factor de crecimiento de colonias de granulocitos

**HIM:** Hospital Infantil de México Federico Gómez

**ICS:** Individuos clínicamente sanos

**IL-2:** Interleucina 2

**MFI:** Intensidad media de fluorescencia

**LMA:** Leucemia mieloide aguda

**LMC:** Leucemia mieloide crónica

**LLA:** Leucemia linfoblástica aguda

**LLC:** Leucemia linfocítica crónica

**NK:** Células Natural Killer

**PGM:** Progenitores de Granulocitos y Monocitos

**PH:** Progenitores hematopoyéticos

**PIV:** Pacientes con infecciones virales diagnosticadas

**PLC:** Precursor linfoide común

**PMC:** Precursor mieloide común

**PMD:** Progenitores de macrófagos y células dendríticas

**PME:** Progenitores Megacariocíticos y Eritroides

**SSC:** Side scattering

**TCM:** Linfocitos centrales de memoria

**TCPH:** Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

**TCR:** T cell receptor

**TEM:** Linfocitos efectores de memoria

**VBK:** Virus BK

**VEB:** Virus de Epstein Barr

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conformación de los 5 compartimentos del sistema hematopoyético.....	3
Figura 2. Maduración de los linfocitos T.....	4
Figura 3. Maduración de linfocitos T $\alpha\beta$ .....	5
Figura 4. Diferenciación de los linfocitos T.....	6
Figura 5. Dispersión de luz y emisión de fluorescencia cuando la célula entra en contacto con el láser.....	26
Figura 6. Esquema general de los componentes del citómetro de flujo.....	26
Figura 7. Sistema óptico de un citómetro de flujo.....	28
Figura 8. Sistema electrónico de un citómetro de flujo.....	29
Figura 9. Procesamiento de señales en el sistema electrónico de un citómetro de flujo.....	30
Figura 10. Resultados de la calibración del Citómetro de Flujo FACS CANTO II....	37
Figura 11. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 5 $\mu$ l.....	39
Figura 12. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 10 $\mu$ l.....	39
Figura 13. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 15 $\mu$ l.....	39
Figura 14. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 20 $\mu$ l.....	39
Figura 15. MFI del fluorocromo FITC.....	40
Figura 16. MFI del fluorocromo PECy7.....	40
Figura 17. MFI del fluorocromo PE.....	41
Figura 18. MFI del fluorocromo PerCP 5.5.....	41
Figura 19. MFI del fluorocromo V450.....	41
Figura 20. MFI del fluorocromo APC H7.....	41

Figura 21. MFI del fluorocromo APC.....	41
Figura 22. Panel de linfocitos T vírgenes y de memoria.....	43
Figura 23. Panel de linfocitos T activados.....	46
Figura 24. Panel de linfocitos NK.....	48

## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Valores absolutos de leucocitos.....	49
Gráfica 2. Valores absolutos de linfocitos totales.....	50
Gráfica 3. Valores absolutos de linfocitos T.....	51
Gráfica 4. Valores absolutos de linfocitos T CD4.....	52
Gráfica 5. Valores absolutos de linfocitos T CD8.....	53
Gráfica 6. Relación entre linfocitos T CD4 y TCD8.....	54
Gráfica 7. Valores absolutos de linfocitos T vírgenes C.....	55
Gráfica 8. Valores absolutos de linfocitos T CD4 efectores.....	56
Gráfica 9. Valores absolutos de linfocitos TCM CD4.....	57
Gráfica 10. Valores absolutos de linfocitos TEM CD4.....	58
Gráfica 11. Valores absolutos de linfocitos T CD8 vírgenes.....	59
Gráfica 12. Valores absolutos de linfocitos T CD8 efectores.....	60
Gráfica 13. valores absolutos de linfocitos TCM CD8.....	61
Gráfica 14. Valores absolutos de linfocitos TEM CD8.....	62
Gráfica 15. Valores absolutos de linfocitos T CD4 activados.....	63
Gráfica 16. Valores absolutos de linfocitos T CD8 activados.....	64
Gráfica 17. Valores absolutos de linfocitos NK.....	65
Gráfica 18. Porcentaje de linfocitos totales.....	66
Gráfica 19. Porcentaje de linfocitos T.....	67
Gráfica 20. Porcentaje de linfocitos T CD4.....	68
Gráfica 19. Porcentaje de linfocitos T.....	69
Gráfica 22. Porcentaje de linfocitos T CD4 vírgenes.....	70

Gráfica 23. Porcentaje de linfocitos T CD4 efectores.....	71
Gráfica 24. Porcentaje de linfocitos TCM CD4.....	72
Gráfica 25. Porcentaje de linfocitos TEM CD4.....	73
Gráfica 26. Porcentaje de linfocitos T CD8 vírgenes.....	74
Gráfica 27. Porcentaje de linfocitos T CD8 efectores.....	75
Gráfica 28. Porcentaje de linfocitos TCM CD8.....	76
Gráfica 29. Porcentaje de linfocitos TEM CD8.....	77
Gráfica 29. Porcentaje de linfocitos T CD4 activados.....	78
Gráfica 30. Porcentaje de linfocitos T CD8 activados.....	79
Gráfica 31. Porcentaje de linfocitos NK.....	80
Gráfica 32. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 virgenes.....	81
Gráfica 33. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 efectores.....	82
Gráfica 34. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TCM CD4.....	83
Gráfica 35. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TEM CD4.....	84
Gráfica 36. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 virgenes.....	85
Gráfica 37. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 efectores.....	86
Gráfica 38. MFI del marcador CRTAM en linfocito TCM CD8.....	87
Gráfica 39. MFI del marcador CRTAM en linfocito TEM CD8.....	88
Gráfica 40. Seguimiento de las subpoblaciones de linfocitos T en un paciente post trasplante.....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores principales expresados por las subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos NK.....	9
Tabla 2. Tipos de leucemias según la línea celular que afectan.....	12
Tabla 3. Tipos de leucemia según su velocidad de progresión y pronóstico.....	13
Tabla 4. Tipos de tratamiento para leucemia.....	14
Tabla 5. Tipos de trasplante según el donante.....	17
Tabla 6. Tipos de Trasplante según el origen de las CPH.....	17
Tabla 7. Tipos de Trasplante según la identidad HLA.....	18
Tabla 8. Combinación de fluorocromos utilizados en la caracterización de Linfocitos T.....	33
Tabla 9. Fluorocromos utilizados en la estandarización de subpoblaciones de linfocitos T.....	36
Tabla 10. MFI de la titulación del anticuerpo CD45RA FITC a diferentes volúmenes.....	39
Tabla 11. Valores absolutos de leucocitos.....	49
Tabla 12. Valores absolutos de linfocitos totales.....	50
Tabla 13. Valores absolutos de linfocitos T.....	51
Tabla 14. Valores absolutos de linfocitos T CD4.....	52
Tabla 15. Valores absolutos de linfocitos T CD8.....	53
Tabla 16. Relación entre linfocitos T CD4 y T CD8.....	54
Tabla 17. Valores absolutos de linfocitos T vírgenes CD4.....	55
Tabla 18. Valores absolutos de linfocitos T CD4 efectores.....	56
Tabla 19. Valores absolutos de linfocitos TCM CD4.....	57

Tabla 20. Valores absolutos de linfocitos TEM CD4.....	58
Tabla 21. Valores absolutos de linfocitos T CD8 vírgenes.....	59
Tabla 22. Valores absolutos de linfocitos T CD8 efectores.....	60
Tabla. 23 valores absolutos de linfocitos TCM CD8.....	61
Tabla 24. Valores absolutos de linfocitos TEM CD8.....	62
Tabla 25. Valores absolutos de linfocitos T CD4 activados.....	63
Tabla 26. Valores absolutos de linfocitos T CD8 activados.....	64
Tabla 27. Valores absolutos de linfocitos NK.....	65
Tabla 28. Porcentaje de linfocitos totales.....	66
Tabla 29. Porcentaje de linfocitos T.....	67
Tabla 30. Porcentaje de linfocito T CD4.....	68
Tabla 31. Porcentaje de linfocitos T CD8.....	69
Tabla 32. Porcentaje de linfocitos T CD4 vírgenes.....	70
Tabla 33. Porcentaje de linfocitos T CD4 efectores.....	71
Tabla 34. Porcentaje de linfocitos TCM CD4.....	72
Tabla 35. Porcentaje de linfocitos TEM CD4.....	73
Tabla 36. Porcentaje de linfocitos T CD8 vírgenes.....	74
Tabla 37. Porcentaje de linfocitos T CD8 efectores.....	75
Tabla 38. Porcentaje de linfocitos TCM CD8.....	76
Tabla 39. Porcentaje de linfocitos TEM CD8.....	77
Tabla 40. Porcentaje de linfocitos T CD4 activados.....	78
Tabla 41. Porcentaje de linfocitos T CD8 activados.....	79
Tabla 42. Porcentaje de linfocitos NK.....	80

Tabla 43. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 vírgenes.....	81
Tabla 44. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 efectores.....	82
Tabla 45. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TCM CD4.....	83
Tabla 46. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TEM CD4.....	84
Tabla 47. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 vírgenes.....	85
Tabla 48. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 efectores.....	86
Tabla 49. MFI del marcador CRTAM en linfocito TCM CD8.....	87
Tabla 50. MFI del marcador CRTAM en linfocito TEM CD8.....	88
Tabla 51. Análisis estadístico comparativo de los parámetros analizados en los dos grupos de individuos estudiados.....	89
Tabla 52. Seguimiento de las subpoblaciones de linfocitos T en un paciente post trasplante.....	94

## 1. INTRODUCCIÓN

La leucemia es una de las principales causas de muerte infantil a nivel mundial y el cáncer que ataca con mayor frecuencia tanto a la población infantil como a los adolescentes; con una incidencia en edades de uno a tres años y de 12 a 14 años.

Los tratamientos utilizados varían de acuerdo a la edad del paciente y la gravedad de la enfermedad donde se puede utilizar quimioterapia o radioterapia como primeras opciones para el tratamiento del paciente.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) constituye una opción de tratamiento cuando la quimioterapia no remite la enfermedad, es un procedimiento delicado y consta de diferentes factores por ejemplo: económicos, disponibilidad y compatibilidad de donador, instalaciones adecuadas para su realización y el monitoreo del paciente, todo esto hace que este tratamiento sea utilizado solo en algunos hospitales y el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM) no es la excepción, ya que es un hospital de tercer nivel que atiende gran cantidad de niños con leucemia.

El éxito de un trasplante depende de diversos factores que afectan al individuo, sin embargo, el monitoreo del paciente es muy importante para conocer su evolución y prevenir complicaciones; es por esta razón que se ha vuelto una necesidad el desarrollo de una herramienta que facilite el monitoreo de la reconstitución inmunológica del paciente a lo largo del tiempo.

En este trabajo se presentará el desarrollo y estandarización de un perfil para evaluar las subpoblaciones de linfocitos T utilizando citometría de flujo, como una herramienta a futuro para el seguimiento de pacientes con leucemia aguda sometidos a TCPH.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Maduración celular**

#### **2.1.1 Células Progenitoras Hematopoyéticas**

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) son aquellas células que dan origen a todas las líneas celulares, mediante su autorrenovación (duplicándose sin perder su función) y diferenciación. La hematopoyesis se inicia con esta población la cual reside en el hígado en la vida fetal y en la médula ósea a partir del nacimiento.

(1)

En este sistema hematopoyético están descritos diferentes compartimentos, los cuales describen estadios de las células conforme se lleva a cabo la maduración.

En el primer compartimento se localizan las células troncales más primitivas, como se ha mencionado anteriormente, éstas tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación en diferentes líneas celulares, lo que le da la propiedad de ser multipotencial. Estas células corresponden a menos del 0.01% del total de las células nucleadas de la médula ósea. (2)

En el segundo compartimento encontramos a los progenitores multipotenciales, los cuales han perdido la capacidad de autorrenovación, pero conserva la capacidad de diferenciación, de ahí surgen el Precursor Mieloide Común (PMC) y el Precursor Linfoide Común (PLC), estas células comprenden entre el 0.5%-5% de las células nucleadas de la médula ósea. (2)

En el tercer compartimento se encuentran los progenitores oligopotenciales, se llaman así ya que se restringe su diferenciación a 2 o 3 tipos celulares e incrementa su capacidad de proliferación; se encuentran en este grupo los Progenitores de Granulocitos y Monocitos (PGM), los Progenitores Megacariocíticos y Eritroides (PME) y los Progenitores de macrófagos y células dendríticas (PMD) estas células comprenden entre el 0.5%-5% de las células nucleadas de la médula ósea. (2)

En el cuarto compartimento se encuentran los precursores de cada linaje celular, unipotenciales y de alta capacidad proliferativa; estas células se pueden caracterizar por microscopia ya que poseen una morfología diferenciada; estas

células comprenden cerca del 90% de las células hematopoyéticas de la médula ósea. (2)

Finalmente, en el quinto compartimento se encuentran las células maduras las cuales poseen una morfología, fenotipo y función diferenciada; estas células se dividen en 2 grandes grupos: células mieloides (granulocitos (basófilos, eosinófilos, neutrófilos y linfoides) eritrocitos, monocitos, macrófagos, megacariocitos, célula cebada y células dendríticas) y las células linfoides (Linfocitos B, T, NK y algunas categorías de células dendríticas). (1)

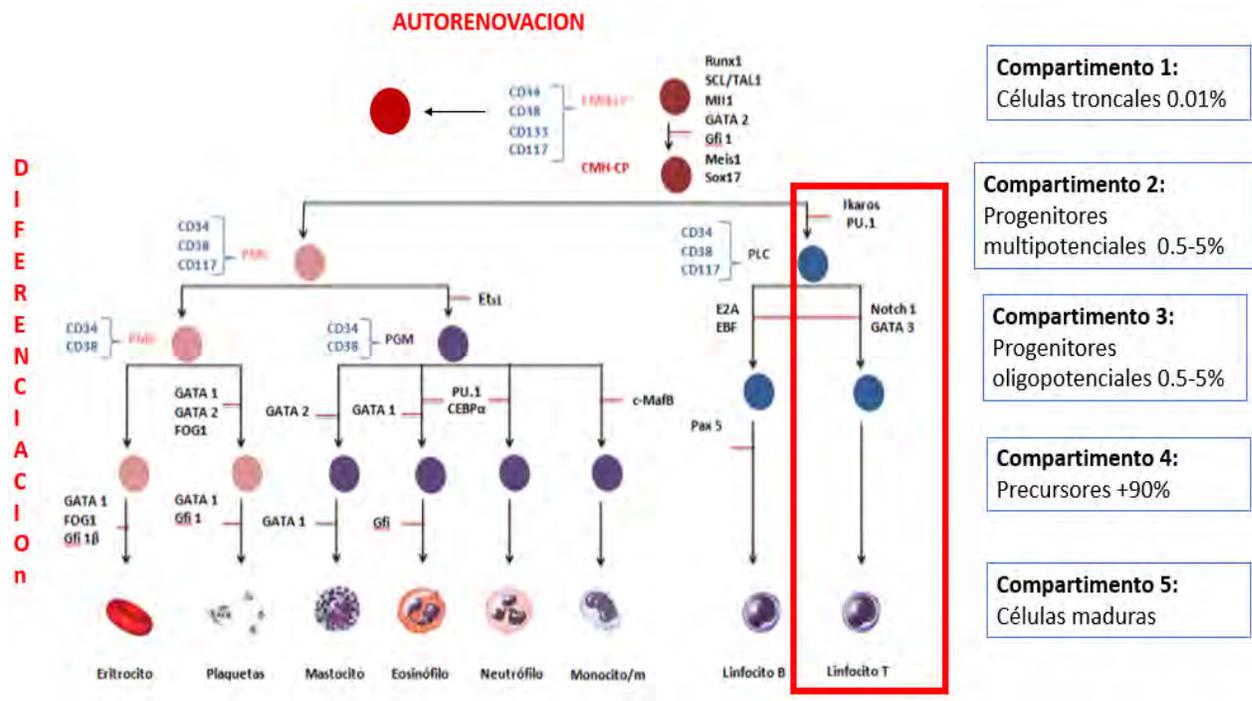


Figura1. Conformación de los 5 compartimentos del sistema hematopoyético. (Pelayo R, 2011).

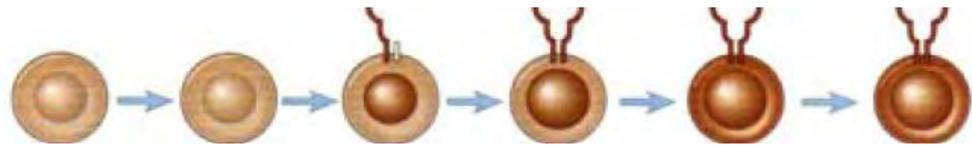
Una vez maduras las células, salen de la medula ósea y se dirigen a sangre periférica a cumplir sus funciones o a órganos periféricos a cumplir su maduración.

Para este trabajo nos centraremos en la linfopoyesis, específicamente en la maduración de los linfocitos T.

## 2.1.1 Linfopoyesis

### 2.1.2.1 Linfocitos T

Una vez madurado el PLC sale de la medula ósea a los órganos linfáticos primarios, entre ellos llega al timo para dar lugar a la maduración de los linfocitos T, una vez en la corteza, a los timocitos (linfocitos T inmaduros) se les presenta el marcador celular CD3 (Cluster Differentiation), molécula la cual es característica de esta estirpe celular. <sup>(1)</sup>



Fase de la maduración	Célula troncal	Linfocito pro-T	Linfocito pre-T	Linfocito doble positivo	Linfocito T inmaduro simple positivo	Linfocito T inmaduro doble positivo	Linfocito T maduro indiferenciado
<b>Marcadores de superficie</b>	CD44+ CD25-	CD44+ CD25+	CD44- CD25+	CD4+CD8+ RTL/CD3baja	CD4+CD8- o CD4-CD8+ RTL/CD3alta	CD4+CD8- o CD4-CD8+ RTL/CD3alta	CD4+CD8- o CD4-CD8+ RTL/CD3alta
<b>Localización anatómica</b>	Medula ósea	Timo	Timo	Timo	Timo	Timo	Periferia
<b>Respuesta al antígeno</b>	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Selección positiva y negativa			Activación (diferenciación y proliferación)

Figura 2. Maduración de los linfocitos T (Abbas, 2016).

En la maduración de los Timocitos se pueden encontrar diferentes estadios, en primer lugar tenemos el estadio doble negativo (DN); se denominan así ya que no

expresan CD4 ni CD8; este estadio se subdivide a su vez en 4; teniendo el DN1, DN2, DN3 y DN4, estos estadios varían en la expresión de CD44 y CD25, los cuales son marcadores de madurez tal y como se muestra en la figura 3; una vez que el timocito se encuentra en el estadio DN4 pasa por un fenómeno denominado reordenamiento de TCR $\alpha$  (Receptor células T  $\alpha$ ) y pasa a un estadio de doble positividad, en el cual expresa CD4 y CD8; para posteriormente diferenciarse y volverse unipositivo CD4+ o CD8+.<sup>(3)</sup>

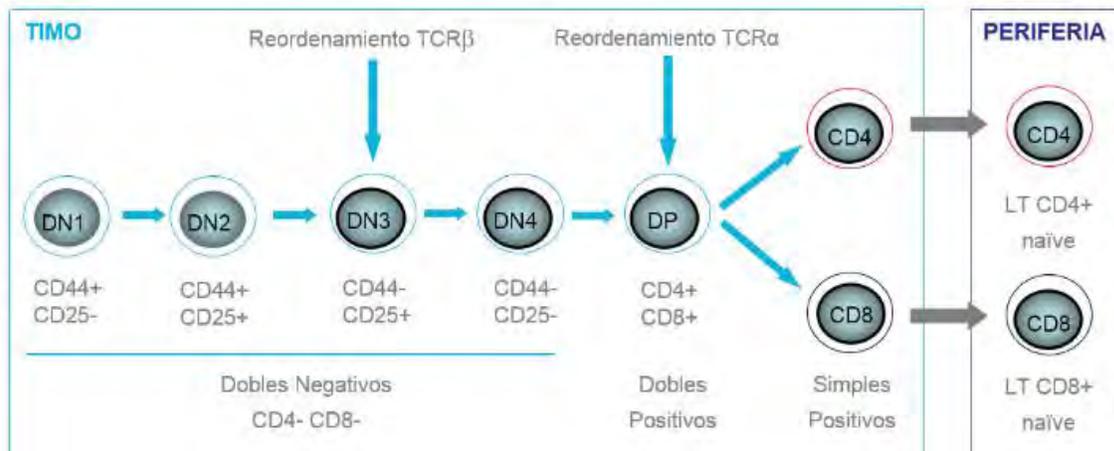


Figura 3. Maduración de linfocitos T  $\alpha\beta$

Una vez diferenciado el linfocito en CD4+ o CD8+ sale a sangre periférica a cumplir su función, a estos linfocitos se les denomina linfocitos vírgenes, éstos linfocitos no se dividen y tienen una limitada vida media.

Se han descrito cuatro fases principales durante una respuesta inmunológica, las cuales están relacionados a la generación de células T de memoria: fase de iniciación, fase de expansión clonal, fase de contracción y finalmente, la generación de células T de memoria. Siguiendo un encuentro con un antígeno extraño presentado por células especializadas, tales como las células dendríticas, las células T proliferan y se diferencian en células efectoras y memoria <sup>(4)</sup>. Con respecto a las células T CD8, las células T efectoras se convierten en citolíticas y producen ciertas citocinas, en particular IFN- $\gamma$ , mientras que las células T CD4 producen citocinas (Th1 y Th2) que pueden mediar efectos directos sobre las células dianas

o asistir en la activación de otros mecanismos efectores del sistema inmunológico (5).

Los linfocitos vírgenes se enfrentan a un fenómeno denominado reconocimiento de antígeno, el cual es crucial para la activación y diferenciación de ellos en sus diferentes subpoblaciones.

Los linfocitos CD4+ al reconocer un antígeno se activan con ayuda de la Interleucina 2 (IL-2), se lleva a cabo su expansión clonal y se diferencia según las necesidades del sistema inmune en: Linfocito T CD4+ efector o Linfocito T CD4+ de memoria; cada uno diferenciado por los marcadores que se describirán posteriormente. (5)

Los linfocitos T CD8+ también pasan por el reconocimiento de un antígeno y con ayuda de IL-2 y demás activadores se produce su expansión clonal para finalmente diferenciarse en un linfocito T CD8+ efector o un linfocito T CD8+ de memoria. Tal como se muestra en la Figura 4.

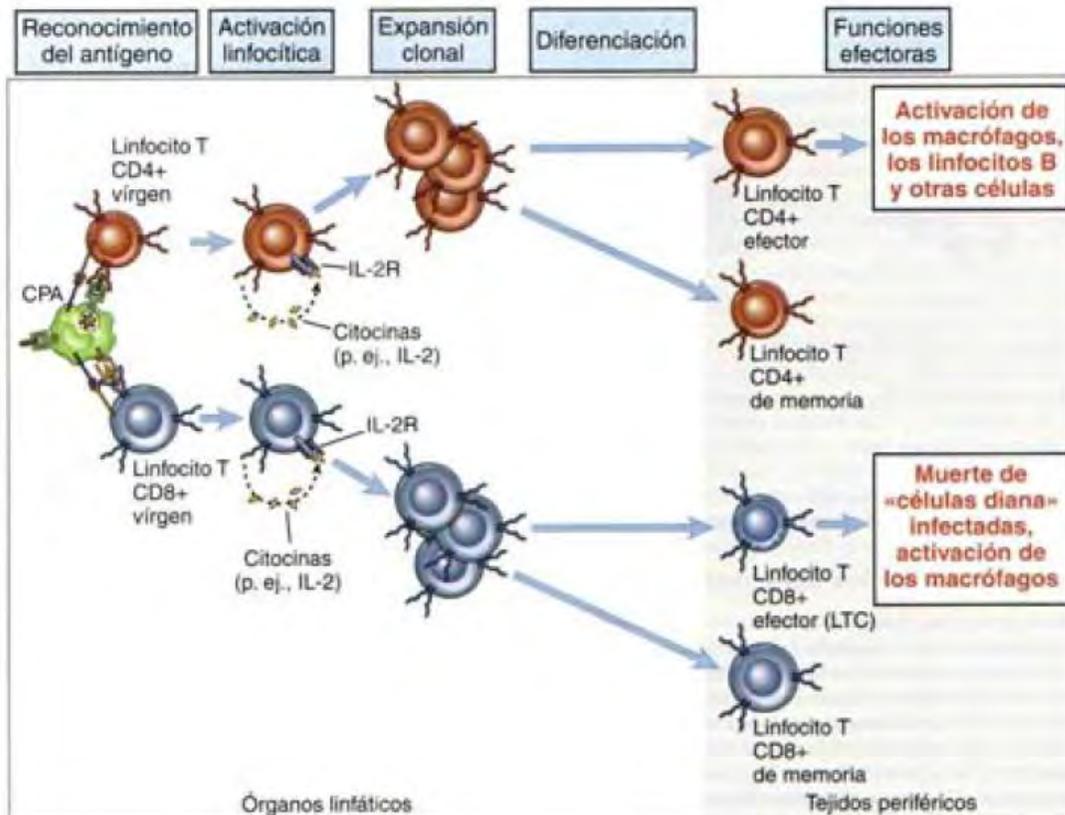


Figura 4. Diferenciación y activación de los linfocitos T (Abbas, 2016).

En el momento que comienza a activarse una respuesta inmunológica por la presencia de un antígeno, las células efectoras producidas comienzan a sufrir de apoptosis, ocasionando un retorno del equilibrio de las poblaciones celulares que habían proliferado inicialmente. Sin embargo, hay un pequeño número de estas células que escapan de la muerte y se convierten en células de memoria. <sup>(5)</sup>

Las células T de memoria están en un estado de reposo, sin embargo, ellas retienen muchas de los atributos funcionales de las células efectoras. La renovación y supervivencia de las células T CD4 y CD8 de memoria no requiere ni de antígenos ni del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), aunque las interacciones del complejo TCR/CMH se requieren para mantener la función de las células T de memoria. <sup>(6)</sup>

Finalmente las células de memoria se van diferenciando y cuando van a ganglios linfáticos y bazo son llamados linfocitos T centrales de memoria (TCM) que son los que poseen la capacidad más limitada para realizar funciones efectoras ya que son las que más se han diferenciado, sin embargo tienen alta capacidad proliferativa y linfocitos T efectores de memoria (TEM) los cuales se ubican en tejidos periféricos, mucosas, sangre y linfa; estas poseen una alta actividad citolítica pero baja capacidad proliferativa.

#### **2.1.2.2 Otras células T**

Las células T  $\gamma\delta$  representan aproximadamente el 5% de la célula T totales, esta población se encuentra en su mayoría en tejido epitelial y mucosas, su TCR está compuesto por cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ . Son células capaces de reconocer antígenos no peptídicos y se pueden diferenciar fácilmente a células de memoria en presencia de una infección dándoles capacidad antitumoral, regulando respuestas inmunes y manteniendo tejidos protegidos, e incluso pueden proveer acción en el EICL (Efecto Injerto Contra Leucemia). <sup>(7)</sup>

Las células NKT Constituyen del 0.01-1% de todas las células periféricas mononucleares. Se ha demostrado que tienen funciones antitumorales y antimicrobianas, así mismo son capaces de suprimir enfermedades autoinmunes y en algunas ocasiones exacerbar algunas patologías tales como las alergias. Estas células pueden ser identificadas con los marcadores CD4+, CD8+ o por ser dobles negativas ya que expresan cadenas  $\alpha\beta$  invariantes del TCR, adicionalmente pueden expresar moléculas de superficie de las células NK convencionales. <sup>(7)</sup>

### **2.1.2.3 Linfocitos Natural Killer (NK)**

Las células NK son esenciales como parte de la respuesta inmunológica innata y también por su colaboración en la respuesta inmunológica adaptativa. En las primeras fases de la infección, las células NK actúan especialmente frente a virus.

Además de las acciones defensivas frente a agentes externos, las células NK, tienen la propiedad de respetar las células propias de cada individuo, reconociendo así su identidad biológica. Esto se debe a la presencia en las células de moléculas HLA-I que actúan a modo de escudo protector. Por ello cuando las propias células pierden estas moléculas, son destruidas por las células NK, es por esta razón que las células NK son esenciales en la eliminación de células tumorales. Igualmente, tienen la capacidad de secretar citocinas como interferones tipos I y II. <sup>(8)</sup>

Los linfocitos NK se caracterizan por no expresar CD3 y carecer de TCR y de BCR y, en su mayoría, expresar en su superficie las moléculas CD16 y CD56. Se encuentran en sangre, bazo, médula ósea y en muy baja proporción en ganglios linfáticos. <sup>(8)</sup>

Para entender mejor la naturaleza y función de los marcadores de estas subpoblaciones de describirá cada uno de ellos en la siguiente tabla:

Tabla 1. Marcadores principales expresados por las subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos NK.

MARCADOR	NATURALEZA	FUNCION	CELULAS EN LA QUE SE EXPRESA
<b>CD3</b>	Familia de las inmunoglobulinas	Intervenir en la transducción de señales, expresión del TCR en la superficie de la célula y asociación a este último receptor.	Timocitos y células T
<b>CD4</b>	Glicoproteína monomérica de 4 dominios tipo inmunoglobulina	Maduración tímica y transmisión de señales intracelulares durante la presentación de péptidos por las moléculas del MHC clase II. Confiere a la célula papel de cooperadora, proliferación de células T	Células T y células dendríticas
<b>CD8</b>	Glicoproteína dimérica de un dominio N-terminal extracelular de inmunoglobulina	Co-receptor en la estabilización de la adhesión del receptor de linfocitos T a MHC I, Implicada en la transmisión de señales intracelulares durante la presentación de péptidos por las moléculas del MHC clase I.	Células T
<b>CD45RA</b>	Glucoproteína	Transmisión de señales intercelulares T-B	Células T vírgenes
<b>CD45RO</b>	Glucoproteína	Transmisión de señales intercelulares T-B	Células T de memoria o activadas
<b>CD69</b>	Lectina tipo C	Se expresa tras la activación de linfocitos, migración y secreción de citocinas	Linfocitos activados

<b>CCR7</b>	Receptor de quimiocinas CC tipo 7	Participa en la migración de las células T a diversos órganos linfoides secundarios tales como los ganglios linfáticos y el bazo, así como el tráfico de células T dentro de bazo.	Células dendríticas, linfocitos B y T
<b>CD62L</b>	Molécula de adhesión celular (MAC) de la familia de las selectinas	Ayuda en la entrada de los linfocitos en los órganos linfáticos secundarios, para ser activados por un antígeno, en caso de una infección	Granulocitos, monocitos y linfocitos
<b>CRTAM</b>	Proteína transmembranal	Confiere alto potencial citotóxico, produce perfil de inflamación, identifica a una población productora de IFN $\gamma$ , aumenta la producción de IL-7.	Linfocitos T y NKT activados
<b>CD16</b>	Familia de las inmunoglobulinas, con 2 isoformas: una proteína transmembranal y un receptor anclado a la membrana por el glicosil fosfatidil inositol (GPI)	Componente del receptor de baja afinidad para Fc, Fc $\gamma$ RIII, y mediar en la fagocitosis y citotoxicidad	Neutrófilos, células NK y macrófagos
<b>CD56</b>	Glicoproteína	Adhesión célula-célula, el crecimiento de neuronas, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria	Neuronas, los astrocitos, las células de Schwann, los linfocitos citolíticos naturales y linfocitos NKT activados.

En conclusión, tenemos diferentes subpoblaciones de linfocitos T con diferentes fenotipos los cuales se describen a continuación:

- Linfocitos T vírgenes: CD3+, CD4+ o CD8+, CD45RA+, CD62L+, CCR7+
- Linfocitos T efectores: CD3+, CD4+ o CD8+, CD45RA+, CD62L-, CCR7-
- Linfocitos TCM: CD3+, CD4+ o CD8+, CD45RO+, CD62L+, CCR7+
- Linfocitos TEM: CD3+, CD4+ o CD8+, CD45RO+, CD62L-, CCR7-
- Linfocitos T activados: CD3+, CD4+ o CD8+, CD45RO+, CD69+ y/o CRTAM+
- Linfocitos NK: CD3-, CD16+, CD56+

## 2.2 Generalidades de la leucemia

La leucemia es un cáncer de la médula ósea que se caracteriza por la producción desordenada y descontrolada de precursores hematopoyéticos. Las células de leucemia se dividen para dar origen a otras clonas. Las clonas leucémicas se expanden reemplazando a la hematopoyesis normal. Al contrario de las células normales de la sangre, las células de leucemia no mueren cuando se hacen viejas o se dañan. Puesto que no mueren, las células de leucemia pueden acumularse y desplazar a las células normales de la sangre. La concentración baja de células normales genera un balance negativo en el transporte de oxígeno, así como en la producción de células eficientes para el sistema inmunológico y para la homeostasia. También, las células se pueden diseminar a otros órganos, como a los ganglios linfáticos, al bazo y al cerebro. <sup>(9)</sup>

Hay diferentes tipos de leucemia las cuales pueden clasificarse de acuerdo a la línea celular que afectan:

Tabla 2. Tipos de leucemias según la línea celular que afectan.

Tipo de leucemia	Línea celular que afecta
<b>Mieloide</b>	Empieza en las células mieloides se llama leucemia mieloide, mielógena o mieloblástica
<b>Linfoide</b>	Empieza en las células linfoides se llama leucemia linfoide, linfoblástica o linfocítica. La leucemia linfoide puede acumularse en los ganglios linfáticos, los cuales se inflaman. <sup>(10)</sup>

También se pueden clasificar según su velocidad de progresión y pronóstico:

Tabla 3. Tipos de leucemia según su velocidad de progresión y pronóstico.

Tipo de leucemia	Progresión y pronóstico
<b>Aguda</b>	Se forma de ordinario con rapidez. El número de las células de leucemia aumenta rápidamente, y estas células anormales no hacen el trabajo de los glóbulos blancos normales. Un análisis de la médula ósea puede mostrar una alta concentración de células de leucemia y bajas concentraciones de glóbulos normales. Las personas con leucemia aguda pueden sentirse muy cansadas, pueden magullarse con facilidad y contraen infecciones con frecuencia.
<b>Crónica</b>	Se forma de ordinario lentamente. Las células de leucemia trabajan casi tan bien como los glóbulos blancos normales. Las personas no se sienten enfermas al principio, y el primer signo de enfermedad pueden ser resultados anormales en un análisis rutinario de sangre. Si no se tratan, las células de leucemia pueden más tarde desplazar a las células normales de la sangre. <sup>(9)</sup>

Hay 4 tipos de leucemia más comunes en la población:

- **Leucemia mieloide aguda (LMA):** Afecta las células mieloides y crece con rapidez. Las células blásticas leucémicas se acumulan en la médula ósea y en la sangre. Los casos de LMA están más diseminados en los años de la niñez, aunque este tipo de leucemia es ligeramente más común durante los primeros dos años de vida y durante la adolescencia y ocurre casi igualmente entre niños y niñas de todas las razas. <sup>(11)</sup>
- **Leucemia linfoblástica aguda (LLA):** Afecta las células linfoides y crece con rapidez. Las células blásticas leucémicas se acumulan ordinariamente en la médula ósea y en la sangre. <sup>(9)</sup> Aproximadamente 3 de cada 4 niños que son diagnosticados con leucemia son diagnosticados con LLA, es más

frecuente en niños menores de 5 años. <sup>(12)</sup> La LLA es ligeramente más común entre los niños blancos e hispanos que entre los niños afroamericanos y americanos asiáticos, y es más común entre los niños que entre las niñas. <sup>(11)</sup>

- **Leucemia mieloide crónica (LMC):** Afecta las células mieloides y de ordinario crece con lentitud al principio. Los análisis de sangre muestran un aumento del número de glóbulos blancos. Los glóbulos anormales trabajan bien. Puede haber un número pequeño de células blásticas leucémicas en la médula ósea. Este tipo de leucemia es más común en adultos mayores a 50 años. <sup>(9)</sup>
- **Leucemia linfocítica crónica (LLC)** afecta las células linfoides y de ordinario crece con lentitud. Los análisis de sangre muestran un aumento del número de glóbulos blancos. Las células anormales trabajan casi tan bien como los glóbulos blancos normales. <sup>(9)</sup>

El tratamiento adecuado depende principalmente del tipo de leucemia, edad y estado general de salud. Las personas con leucemia tienen muchas opciones de tratamiento, y se puede recibir más de un tipo de tratamiento. Las opciones de tratamiento pueden ser:

Tabla 4. Tipos de tratamiento para leucemia.

Tratamiento	Características
<b>Quimioterapia</b>	Es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Actúa evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan en más células
<b>Quimioterapia dirigida</b>	Son fármacos que bloquean el crecimiento de las células de leucemia. Por ejemplo, una terapia dirigida puede bloquear la acción de una proteína

	anómala que hace crecer a las células de leucemia.
<b>Radioterapia</b>	Es un tratamiento del cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores
<b>Trasplante de Células Progenitoras (TCPH)</b>	Para reemplazar las células madre normales de la sangre que fueron destruidas por la radioterapia y por la quimioterapia se trasplantan células madre progenitoras hematopoyéticas que irán a la médula ósea y producirán nuevas células de la sangre. <sup>(10)</sup>

### 2.3 Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un tratamiento establecido para los pacientes con leucemias en los cuales la quimioterapia no remite la enfermedad. El TCPH que se realiza es de origen alogénico en el 85% de los casos, lo que conlleva a un tratamiento inmunosupresor prolongado, se ha descrito el efecto injerto contra leucemia (EICL) que contribuye a la eliminación de células neoplásicas al momento del trasplante, o bien, aquellas que pudieran generarse posteriormente. <sup>(13,14)</sup>

El TCPH puede ser parte importante del tratamiento de algunos cánceres, como: ciertas leucemias, mieloma múltiple y algunos linfomas. Este funciona de la siguiente manera: las dosis altas de quimioterapia (a veces junto con radiación), son más efectivas que las dosis estándar para eliminar las células cancerosas. Sin embargo, las altas dosis también pueden eliminar todas las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y hacer que la médula ósea deje de producir por completo las células sanguíneas que son necesarias para vivir. En este caso es cuando se

llevan a cabo los TCPH. Las células trasplantadas reemplazan las CPH del cuerpo después de que la médula ósea y sus CPH han sido destruidas por el tratamiento. Este trasplante permite que los médicos usen dosis mucho más altas de quimioterapia para tratar de eliminar todas las células cancerosas. <sup>(13)</sup>

Las células del sistema inmunológico tienen un origen común en una CPH, localizada en la médula ósea, a partir de la cual la diferenciación da lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas. Las CPH se caracterizan por dos de sus capacidades: 1) autorrenovación y 2) de diferenciación en diversas células hematopoyéticas. Éstas pierden la capacidad de autorrenovación y adquieren la capacidad de multiplicarse y diferenciarse, dando lugar, a su vez, a las células precursoras que tienen características específicas de cada linaje celular. Por lo tanto, siempre que existan las condiciones adecuadas para las CPH, puede alcanzarse una reconstitución inmunológica y hematológica completa y eficiente. <sup>(16,17)</sup>

El trasplante células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un tratamiento establecido para los niños con leucemias, sin embargo realizar este proceso requiere de un equilibrio inmunológico en el cual se deben controlar las diversas interacciones de las células T y NK (Natural Killer), para minimizar los efectos de la enfermedad aguda de injerto contra huésped (EICH), infecciones virales y favorecer el efecto injerto contra leucemia, por ello se han propuesto varios biomarcadores clínicos para predecir y evaluar la EICH sin embargo esta patología sigue siendo de interés para el área clínica y básica porque una respuesta inmunológica compleja. <sup>(17-20)</sup>

### **2.3.1 Tipos de TCPH**

Según el donante, existen tres modalidades de TCPH: los autólogos, los alogénicos y los singénicos.

Tabla 5. Tipos de trasplante según el donante

<b>Tipo de trasplante</b>	<b>Características</b>
<b>Autólogos</b>	Los progenitores hematopoyéticos (PH) son del propio paciente, obtenidos antes de usar el tratamiento en altas dosis. <sup>(13)</sup> Las indicaciones pediátricas actuales para el trasplante autólogo incluyen a los pacientes con ciertos tipos de linfomas, neuroblastomas y tumores cerebrales, También se ha usado para intentar restaurar el sistema inmunitario en casos de trastornos autoinmunitarios graves. <sup>(1)</sup>
<b>Alogénicos</b>	Las CPH se obtienen de una fuente distinta a un gemelo univitelino.
<b>Singénicos</b>	Las CPH se obtienen de hermanos gemelos univitelinos.

Según el origen de las CPH existen 3 tipos de trasplante

Tabla 6. Tipos de Trasplante según el origen de las CPH.

<b>Tipo de trasplante</b>	<b>Características</b>
<b>Médula ósea</b>	Fuente original de las CPH. La extracción se realiza en quirófano bajo anestesia general o epidural.
<b>Sangre Periférica</b>	En condiciones normales existe una mínima cantidad de CPH circulantes, que aumentan durante la fase de recuperación de una aplasia inducida por quimioterapia o tras la administración de factores de crecimiento hematopoyético, el más utilizado G-CSF (factor de crecimiento de colonias de granulocitos)
<b>Cordón Umbilical</b>	Se obtiene por punción de la vena umbilical una vez producido el parto, se extraen 70 a 120 ml. El volumen

	limitado hace que el número total de células madres sea pequeño y la recuperación inmunohematológica sea lenta. <sup>(21)</sup>
--	---

Sin embargo, se debe considerar la identidad HLA y de ahí derivan los TCPH de tres tipos:

Tabla 7. Tipos de Trasplante según la identidad HLA.

<b>Tipo de trasplante</b>	<b>Características</b>
HLA genotípicamente idéntico (familiar)	Cada persona hereda un haplotipo de cada uno de sus progenitores; por ello, la posibilidad teórica de disponer de un HLA idéntico es del 25 %, este el tipo de donante ideal; actualmente la mayoría de los trasplantes alogénicos se hacen con este tipo de donante
HLA fenotípicamente idéntico (familiar o no familiar)	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. <sup>(22)</sup>
HLA no idéntico	En la actualidad, el 25 % de los trasplantes alogénicos son este tipo.

Las principales indicaciones para un TCPH son las siguientes:

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

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

- Enfermedades no neoplásicas (aplasias medulares, hemopatías congénitas, inmunodeficiencias y otros errores congénitos) en las que, o ya no existe una médula funcionante, o esta médula no es capaz de producir ciertos elementos celulares sanguíneos en número y función adecuados por defectos genéticos. Para estas indicaciones sólo son utilizados los TCPH alogénicos. <sup>(15,23)</sup>

Los pacientes con Leucemia aguda son altamente sensibles a la quimioterapia de inducción con elevadas tasas de remisiones completas (80-90%). Sin embargo, la sobrevida a largo plazo en adultos es inferior al 35% a 40%, como resultado principal de la alta incidencia de recaídas. Para alcanzar una sobrevida libre de enfermedad prolongada el tratamiento post-remisión debe ser capaz de prevenir las recaídas con una toxicidad relacionada al mismo aceptable. El trasplante alogénico representa la terapia con mayor potencial antileucémico y con mayor probabilidad de sobrevida libre. El estudio de histocompatibilidad del paciente y sus hermanos es recomendado al diagnóstico en todos los casos. <sup>(21)</sup>

## **2.4 Reconstitución inmunológica**

La reconstitución del sistema inmunológico principalmente del componente celular es de vital importancia ya que después de la quimioterapia y radioterapia pretrasplante, toda la hematopoyesis normal del receptor, así como los componentes del sistema inmunológico celular y humoral son afectadas gravemente. Dentro de los mecanismos de defensa se encuentra la participación de

los linfocitos T, principalmente en el control de infecciones por bacterias, virus, protozoos y hongos y mediante la regulación de la producción de anticuerpos específicos por los linfocitos B. (24,29,31)

En el período postrasplante inmediato, la reconstitución del sistema inmunológico comienza con las células B, la recuperación de las células inmunológicas innatas, NK y del hospedero posterior a un TCPH generalmente tarda semanas y en algunos casos hasta meses, la reconstitución completa de la inmunidad adaptativa a menudo se retrasa dependiendo de las características del trasplante, llegando a tardar hasta años para obtener un número adecuado de células linfoides con una funcionalidad óptima pues la reconstitución inmunológica cualitativa tiene un periodo muy largo de recuperación lo cual ocasiona la afectación de la capacidad de respuesta ante los agentes infecciosos oportunistas, lo cual aumenta el riesgo de EICH y la posibilidad de recaída en la leucemia. (29,30)

La inmunidad celular es el tipo de defensa del hospedero mediado por los linfocitos T y sirve de mecanismo de defensa contra los patógenos intra y extracelulares, La función de los linfocitos T efectores CD4+ es reclutar y activar a los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) y otros leucocitos para eliminar a los microorganismos intra y extracelulares y ayudar a los linfocitos B a producir anticuerpos. Los Linfocitos T CD4+ son cruciales en la eliminación de patógenos por medio de los fagocitos mientras que los linfocitos efectores CD8+ son responsables de la erradicación de los patógenos como virus que infectan y replican de todas las células. (31) la reconstitución inmunológica de las células T se logra tempranamente, sin embargo, hay mayor producción de linfocitos T CD8+, y la relación CD4/CD8 puede tardar más de un año en valores bajos. (6)

En general, la recuperación inmunológica depende de un número de factores y se produce más rápidamente en los trasplantes en los cuales la fuente de obtención de células CD34+ es sangre periférica comparado con una obtención directa de médula ósea, esto es porque en la movilización de células en sangre periférica se obtiene 10 veces más células T y B y existe un aumento importante de células CD4+, así como una relación CD4/CD8 más alta que en las recolecciones directas

de médula ósea. <sup>(33)</sup>

#### **2.4.1 Efecto Injerto contra leucemia (EICL)**

El efecto injerto contra leucemia se atribuye principalmente a los linfocitos T, aunque existen múltiples interacciones entre distintos tipos celulares, anticuerpos y citocinas. Además de los linfocitos T, las células naturales Killer (NK) alorreactivas y las presentadoras de antígenos (CPA) son fundamentales. <sup>(27)</sup>

El efecto injerto contra leucemia en el trasplante haploidéntico, al menos en leucemia mieloide aguda, puede ser óptimo si las células NK del donante expresan determinados genes ligados al receptor de las inmunoglobulinas de las células NK. Los aloantígenos necesarios para el efecto injerto contra huésped pueden proveerlos las CPA del huésped, mientras que los antígenos tumorales necesarios para el efecto injerto contra leucemia pueden aportarlos las CPA del huésped o del donante; ésta diferencia podría ayudarnos a separar ambos efectos: eliminar las CPA del huésped y mantener las del donante para eliminar el efecto injerto contra huésped y preservar el efecto injerto contra tumor. <sup>(32)</sup>

La inducción del efecto injerto contra leucemia no sólo depende del tipo de tumor y de la expresión antigénica, sino de la compleja interacción de citocinas, múltiples células efectoras y anticuerpos. El mecanismo efector puede ser diferente, dependiendo de la intensidad del régimen de acondicionamiento, de la existencia o ausencia de depleción de linfocitos T, etc. Aunque es posible inducir efecto injerto contra leucemia en pacientes con leucemia aguda, la mayoría de los pacientes no reaccionan positivamente a la infusión de linfocitos del donante (respuestas reportadas entre 0 y 20% con supervivencia alrededor de 15%). <sup>(23)</sup>

#### **2.5 Técnicas para la caracterización de linfocitos**

Algunos métodos para la identificación y purificación de linfocitos en sangre periférica comprenden la enumeración o recuento de linfocitos T y B por métodos

manuales, las pruebas de respuesta proliferativa hacia mitógenos en cultivo, la determinación de antígenos HLA, la respuesta al cultivo mixto de linfocitos, y otros procedimientos de utilidad en el laboratorio clínico.

Las primeras técnicas empleadas para aislar los linfocitos sanguíneos consistían en mezclar la muestra con un agente aglutinante de eritrocitos, con el fin de que estos se separaran debido a la sedimentación de los grumos. Sin embargo, estas técnicas son lentas, dan un bajo rendimiento final y una baja pureza. Posteriormente se desarrollaron las técnicas de centrifugación en gradientes, Bøyum (1958) ideó un método basado en la centrifugación de la muestra sobre un gradiente de densidad discontinuo, cuyo medio original consistía en una mezcla de ficoll y metrizoato de sodio, con densidad de 1,077 g/ml. Este método es rápido y simple, por lo que se utiliza muy comúnmente para obtener preparaciones enriquecidas de linfocitos sanguíneos. <sup>(33)</sup>

Para identificar las diferentes poblaciones y subpoblaciones de linfocitos, se utilizan métodos con los cuales se detectan proteínas de membrana que utilizamos como marcadores; ya que éstos no se pueden diferenciar morfológicamente. <sup>(33)</sup>

Alrededor de 1970 se encontró que los linfocitos T humanos poseen la propiedad de unirse espontáneamente a los eritrocitos de carnero in vitro, formando agrupaciones llamadas rosetas E. <sup>(34)</sup>

El fenómeno de formación de rosetas se debe a que los linfocitos T humanos poseen en su superficie un receptor que media la unión con los eritrocitos de carnero. Inicialmente, este receptor fue denominado "antígeno T11", posteriormente, cuando se introdujo el uso de la nomenclatura de "grupos de diferenciación" (CD, clusters of differentiation), se cambió su nombre a CD2. Esta es una glicoproteína de membrana de 50 kDa, presente en todos los linfocitos T humanos maduros, cuya función natural es la interacción con una glicoproteína de 40-70 kDa, denominada LFA-3 (leukocyte function antigen) o CD58, presente en la superficie de diversos tipos celulares. Los eritrocitos de carnero poseen una molécula análoga al LFA-3 humano en su superficie. <sup>(34)</sup>

Actualmente este método para cuantificar los linfocitos T humanos ha sido sustituido por métodos de Inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, ya sea manuales o automatizados, utilizando la citometría de flujo principalmente. Sin embargo, dado su bajo costo en reactivos y equipo, el método de rosetas E constituye una alternativa válida y todavía útil para el laboratorio pequeño, no especializado.

## **2.5.1 Citometría de flujo**

### **2.5.1.1 Historia**

La Citometría de Flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico, es decir, puede combinar las medidas de distintos parámetros analizados sobre la misma célula y relacionarlos. Su fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas, por delante de un haz de láser focalizado; el impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estas señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un equipo informático; formándose lo que hoy conocemos como FACS (fluorescence-activated cell sorter).

El FACS nació en 1968 pero se le llamó así hasta 1972, y se basó en las técnicas de separación de Sweet y en el sistema de flujo coaxial de Crossland-Taylor. <sup>(35)</sup> Los instrumentos para medir y contar en un flujo se tenían desde mediados del siglo pasado, pero la reproducibilidad y la confianza en los resultados no se alcanzó sino hasta que se aplicó un flujo laminar que guiaba la corriente de células en un flujo estable y por un canal relativamente largo. <sup>(36)</sup>

En 1961 Moller demostró que las células vivas de cultivos en suspensión podían marcarse específicamente con anticuerpos conjugados a fluoresceína; lo cual fue un parte aguas en el marcaje celular para reconocimiento de estructuras y vitalidad de las células. <sup>(37)</sup>

En 1965, Sweet desarrolló la inyección de tinta y con ella surgió la idea del sorteo electroestático, mientras que Mack Fulwyler desarrolló el citómetro del flujo que se convirtió en el precursor a los instrumentos de hoy; este instrumento podía separar las células basadas en volumen electrónico de la célula y la desviación electroestática también usada para la segregación y clasificación. Fue llamado el Microflurómetro de flujo de Los Álamos. <sup>(37)</sup>

En 1969, Phywe AG de Gottingen produjo el primer citómetro comercial del flujo construido alrededor de un microscopio fluorescente de Zeiss y en 1970, el citómetro comercial, el Cytograph, utilizó el sistema del láser ÉI-Ne en 633 nanómetro para la dispersión y se convirtió en el primer instrumento comercial para incorporar un láser. Este instrumento podía separar las células vivas y muertas de la clase dependiendo de la absorción del azul Tripan. Posteriormente se lanzó una versión con la fluorescencia llamada el Cytofluorograph, que fue desarrollado más a fondo en un dispositivo con un láser de argón enfriado por aire en 488 nm. <sup>(37)</sup>

El conjunto de todas estas técnicas a través de los años dieron origen al FACS. El láser se introdujo al FACS en 1969, además se introdujeron medidas ópticas en el flujo del sorteo en vez de en el flujo celular y en 1972 se añadió un canal para la dispersión de la luz del láser que hizo posible la detección de células no fluorescentes y que ha servido para medir el tamaño de la célula y para discriminar entre vivas y muertas. El primer instrumento comercial de esta naturaleza fue el FACS I de Beckton Dickinson y se basó en el sistema descrito. <sup>(38)</sup> A partir de ahí, se han introducido pocos cambios que tienen que ver con las mediciones multiparamétricas y con la generación de softwares de análisis más sofisticados y potentes. Originalmente, el FACS medía sólo un tipo de fluorescencia, pero conforme se desarrollaron nuevos fluorocromos y se mejoró la producción de anticuerpos monoclonales, se abrieron nuevas perspectivas en cuanto a la capacidad de detección del aparato. En el laboratorio de Herzenberg, la habilidad de acoplar los anticuerpos monoclonales a diferentes fluorocromos generó la inquietud de hacer análisis multicolores por lo que se adaptó el aparato para poder hacer lecturas de dos diferentes espectros de emisión a partir de un mismo rayo

láser. La aparición de mejores monoclonales y mejores fluorocromos estimuló el desarrollo del FACS de doble láser ya que se volvió interesante aumentar el número de marcadores que podían medirse simultáneamente en una sola célula. Actualmente, los FACS de un sólo láser se utilizan para medir tres diferentes anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos y los FACS de doble láser se usan para medir hasta 5 colores de fluorescencia al mismo tiempo. Además, el mismo grupo, desarrolló recientemente un aparato con tres láseres que permite la medición simultánea de hasta 11 colores de fluorescencia. <sup>(39)</sup>

La importancia de esta tecnología es la capacidad de realizar diferentes mediciones sobre una misma célula, analizando cuantitativamente múltiples parámetros de la célula mediante un haz de luz láser. <sup>(40)</sup>

La citometría de flujo tiene gran importancia en los campos de la hematología e inmunología para lograr un análisis completo y caracterización detallada de las células sanguíneas. Entre las aplicaciones clínicas más frecuentes de estos métodos se encuentran la caracterización de leucocitos en estados de inmunodeficiencia (innatos o adquiridos) y en enfermedades onco-hematológicas. El desarrollo de la tecnología de hibridomas, al proveer anticuerpos monoclonales capaces de reconocer epítomos únicos de las moléculas de superficie celular, ha sido un gran avance logrado en la citometría. Cabe resaltar que en la actualidad el citómetro no solo se utiliza para la detección de células sanguíneas, sino de bacterias, partículas y sin fin de células que se deseen caracterizar. A esto se debe agregar el desarrollo de un gran número de fluorocromos, que son utilizados para marcar covalentemente a los anticuerpos monoclonales que se emplean en estas técnicas. <sup>(40)</sup>

### **2.5.1.2 Principio**

Al tener una suspensión celular la cual se desea analizar, esta es conducida mecánicamente a una sección que la convierte en una delgada corriente de fluido, envuelta en otro fluido a presiones diferentes; finalmente dispersado en gotas

microscópicas sobre las cuales incide un fino haz de luz láser. Cada célula dispersa en varias direcciones esta luz, la cual es recogida por distintos fotodiodos y tubos fotomultiplicadores. Dos parámetros físicos de las células son cuantificados con base en la dispersión de la luz: la dispersión frontal (forward scattering), que correlaciona principalmente con su tamaño, y la dispersión lateral (side scattering), a 90°, que correlaciona mayormente con su granularidad, o complejidad de la superficie. Así mismo si la célula es marcada con fluorocromos, la luz láser activa a los fluorocromos correspondientes y las señales lumínicas emitidas son detectadas por tubos fotomultiplicadores. <sup>(40)</sup>

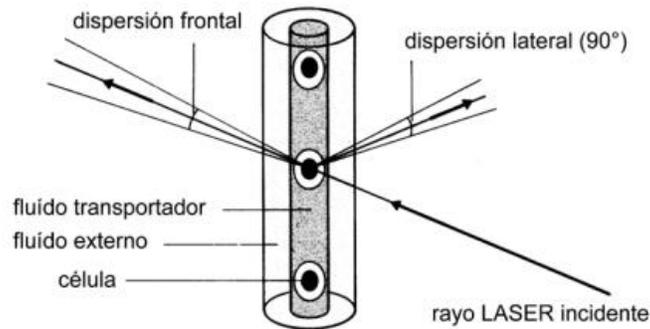


Figura 5. Dispersión de luz y emisión de fluorescencia cuando la célula entra en contacto con el láser. (Salgado M, 2002)

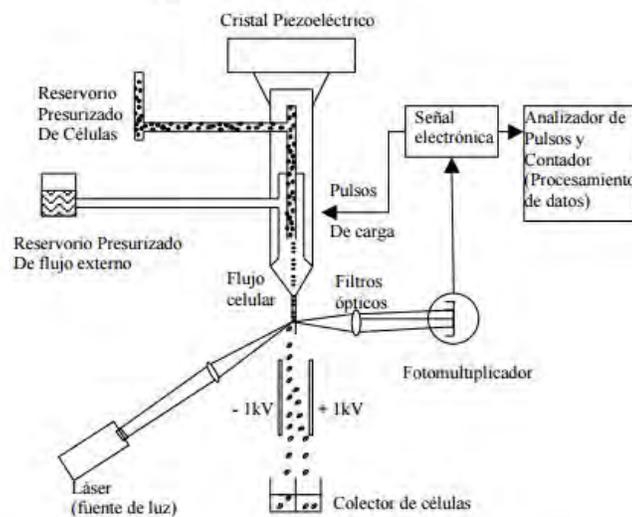


Figura 6. Esquema general de los componentes del citómetro de flujo. (Bonner W, 1972)

El FACS se compone por 3 sistemas principalmente: el sistema de flujo, el sistema óptico y el sistema electrónico.

El sistema de flujo se basa en el paso de un líquido isotónico por un capilar con una velocidad y presión constante, de forma que envuelve a la suspensión celular; estas características de velocidad y presión son necesarias para la formación de un flujo laminar (sin turbulencia).

La suspensión celular a analizar pasa por el centro del capilar se hace pasar la suspensión celular, con aproximadamente de  $5 \times 10^5$  a  $2 \times 10^7$  células/mL y a una presión mayor que la del flujo acarreador. Este enfoque hidrodinámico se asegura de que las células permanezcan centradas y viajen una tras otra en el flujo de inyección y de esta forma evaluar sus características individualmente. <sup>(35,41)</sup>

El Sistema óptico es el encargado de detectar cuando la fluorescencia y la luz dispersada se producen; cuando una célula contenida en el líquido inyectado pasa por el rayo enfocado de un láser. La luz dispersada hacia el frente es colectada por un detector que capta la luz difractada entre  $1$  y  $10^\circ$  arriba o abajo del punto de incidencia del láser. La luz dispersada lateralmente y la fluorescencia son colectadas por un lente que está a  $90^\circ$  del eje de incidencia del láser. Esta luz lateral y la fluorescencia son divididas por un "beamsplitter" (Divisor del rayo) para separar entre la luz difractada y la fluorescencia. La fluorescencia es a su vez dividida por un espejo dicroico que permite distinguir entre diferentes longitudes de onda. Cada detector de fluorescencia tiene otros filtros ópticos para excluir la luz del láser dispersada y para dejar pasar la luz con la longitud de onda deseada para ese detector. <sup>(35,38)</sup>

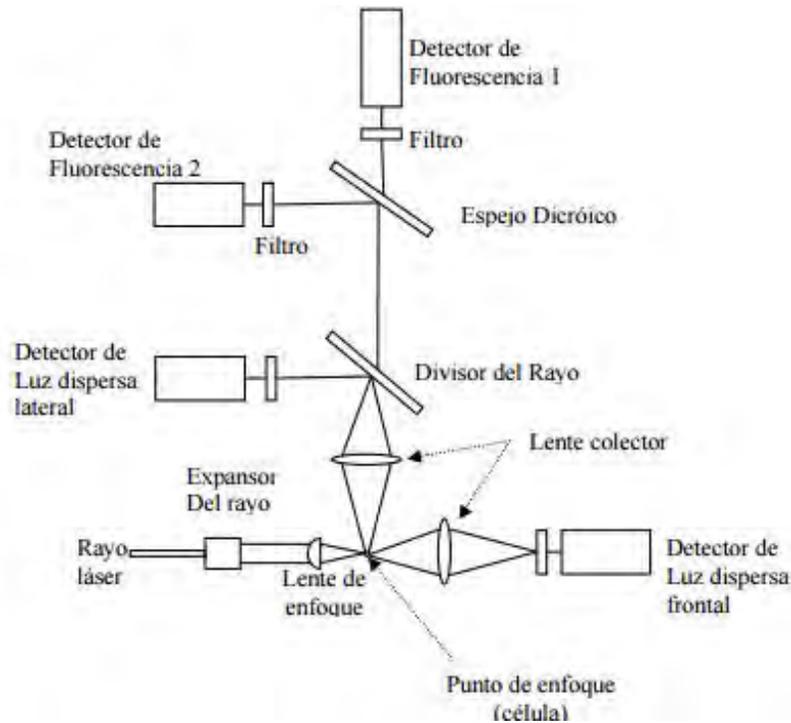


Figura 7. Sistema óptico de un citómetro de flujo (Beckton Dickinson, 1995)

El Sistema eléctrico transforma los datos para la obtención física de las poblaciones celulares, es necesario que las células vayan en gotas aisladas y con un marcaje que permita distinguir y separar una población de otra. Cuando una célula atraviesa el rayo láser, se ilumina por varios microsegundos y durante ese tiempo emite un pulso fluorescente. Si este pulso cae en los límites de amplitud predeterminados, se genera eléctricamente un pulso cargado. Este pulso toma en cuenta la demora que hay entre el evento de la célula estando incidida por el láser y la célula estando en el lugar donde debe formarse la gota. Este pulso llega a un cristal piezoeléctrico que está conectado a la estructura por la que pasa el capilar. Este artefacto se expande y contrae ligeramente cuando se aplica un voltaje y este movimiento guía a un oscilador que hace vibrar la estructura por donde pasa el capilar. La vibración lleva una frecuencia cercana a la frecuencia con la que naturalmente el flujo se rompe en una gota. Esto estabiliza la formación de la gota en esa frecuencia, resultando en una gota de tamaño uniforme y una demora de tiempo bien definida entre la detección de una célula por el rayo del láser y la incorporación de la célula a una

gota libre. <sup>(35,41)</sup> El sistema electrónico también está involucrado con la amplificación de las señales que salen de los detectores, tanto de fluorescencia como de luz dispersa, y con el procesamiento de los datos para su evaluación.

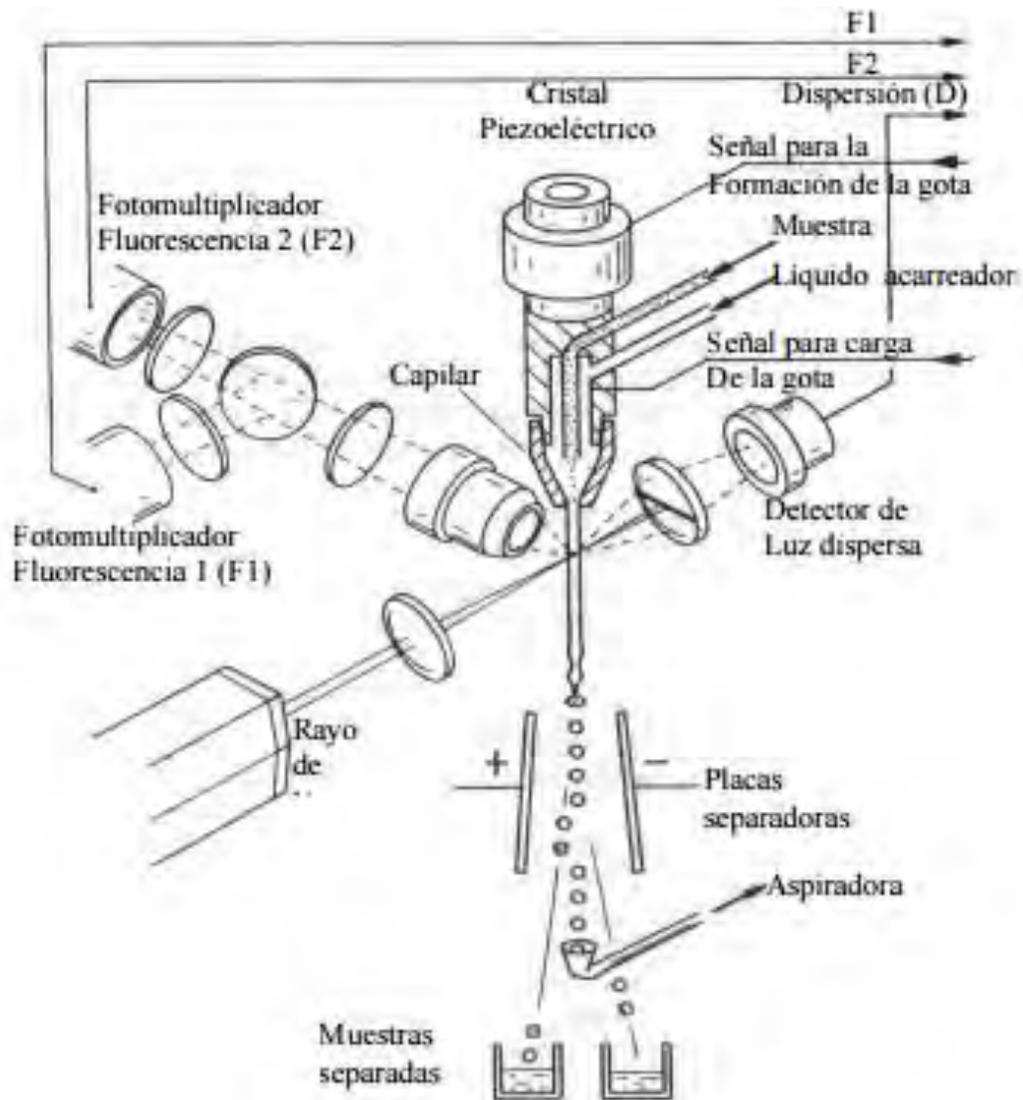


Figura 8. Sistema electrónico de un citómetro de flujo (Parks, 1984)

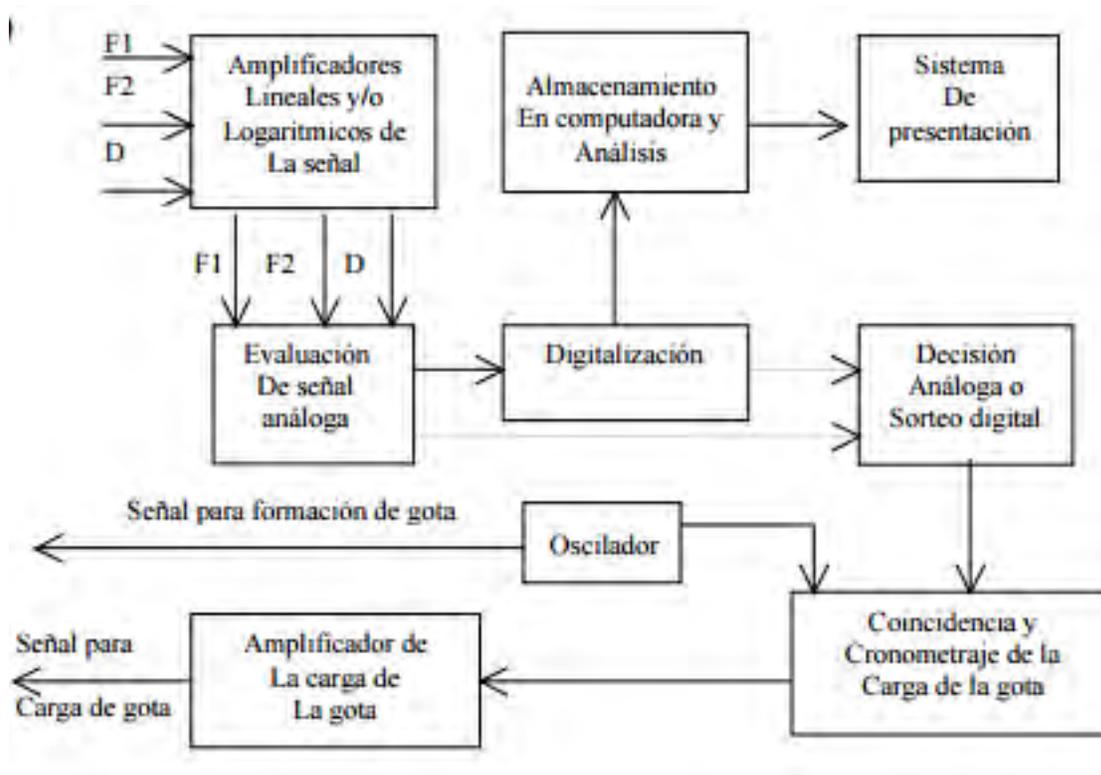


Figura 9. Procesamiento de señales en el sistema electrónico de un citómetro de flujo.  
(Parks, 1984)

Por ultimo para la obtención de los datos e interpretación, el aparato de FACS va acompañado por una 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 (gráfico de puntos) o contour plot (gráfico de contorno)) a partir de la luz dispersada por las células o a partir de la fluorescencia

### 2.5.1.3 Fluorocromos

Los fluorocromos son sustancias químicas que al ser estimulados con fotones con longitud de onda comprendida entre determinados rangos (de excitación) emiten a su vez otro fotón de longitud de onda mayor (de emisión).

En citometría de flujo los fluorocromos están ligados a un anticuerpo, el cual sirve para caracterizar a la célula, el enlace entre el fluorocromo y el anticuerpo es covalente, un ejemplo es FITC, el cual crea enlaces covalentes con los amino terminales del anticuerpo.

### **3. OBJETIVOS**

Estandarizar un perfil celular para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos T: vírgenes (naïve), activados y de memoria en sangre periférica mediante citometría de flujo para su uso en el monitoreo de pacientes con leucemia aguda sometidos a TCPH.

#### **Particulares**

1. Seleccionar los marcadores para la caracterización de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.
2. Estandarizar técnicas de tinción y determinación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo.

### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Equipo**

Para la caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T se utilizó un Citómetro de flujo BD FACS Canto II; para lo cual se recibió la capacitación por medio del fabricante (Beckton and Dickinson) para su correcta utilización.

#### **4.1 Calibración del equipo**

Se realizó la calibración del equipo en la cual se verifica el correcto funcionamiento de los 3 láseres (azul, rojo y violeta), tarjetas, parámetros de lectura y voltaje. Se colocó una gota de Perlas CST en 350 µl de FACS Flow en un tubo de 12x75mm y

se introdujo al citómetro para su lectura, siguiendo el procedimiento como lo marca el manual de usuario de dicho equipo.

#### **4.2 Titulación de anticuerpos**

Se tituló el anticuerpo BD Pharmingen FITC mouse anti-human CD45RA partiendo del volumen que indica el fabricante (20µl) hasta 5µl.

Se colocaron 4 tubos diferentes con 20, 15, 10 y 5µl de anticuerpo CD45RA se agregaron 350 µl de FACS Flow y se determinó la Intensidad media de fluorescencia (MFI) mediante el citómetro BD FACS Canto II.

#### **4.3 Compensación del equipo**

Al terminar la calibración se realizó la compensación de los fluorocromos utilizados, con la cual se verifica que cada fluorocromo sea leído en el canal y la longitud de onda correspondiente y que no haya traslapamiento en la lectura de sus longitudes de onda; para ello se utilizaron 8 tubos diferentes.

El primer tubo es el control negativo, se colocaron 100µl de FACS Flow en un tubo de ensayo de 12x75 mm, se adiciono 1 gota de Perlas Compbeads Negativas, se incubo 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad; se adicionaron 2 ml de FACS Flow, se centrifugó 5 minutos a 1800 rpm, se decantó y se resuspendió el pellet en 350µl de FACS Flow.

Los 7 tubos restantes fueron utilizados para la compensación de fluorocromos, se identificó cada tubo de 12x75mm con un fluorocromo a utilizar: FITC, PE, Percp Cy 5.5, APC, APC H7, V450 y PE Cy7; se colocaron 100µl de FACS Flow en cada tubo, se adicionó 1 gota de Perlas Compbeads Positivas y 1 gota de Perlas Compbeads Negativas, más 5 µl del anticuerpo correspondiente; se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad; se adicionaron 2 ml de FACS Flow, se centrifugó 5 minutos a 1800 rpm, se decantó y se resuspendió el pellet en 350µl de FACS Flow.

Una vez teniendo los nueve tubos se introdujeron en el equipo, siguiendo el procedimiento como lo marca el manual de usuario de dicho equipo; primero el tubo con muestra, después el control negativo y posteriormente los tubos con fluorocromos; se calculó la compensación y se aplicó a todos los experimentos a realizar.

### **Fluorocromos**

Se seleccionaron los marcadores con base a la disponibilidad, compatibilidad y combinación para la coexpresión de los mismos.

Se realizaron tres paneles celulares diferentes, para cada panel se eligieron los marcadores que presenta cada población con diferentes fluorocromos como se muestra a continuación.

Tabla 8. Combinación de fluorocromos utilizados en la caracterización de Linfocitos T.

<b>Fluorocromo</b>	<b>Panel 1 Linfocitos vírgenes y memoria</b>	<b>Panel 2 Linfocitos T de activados</b>	<b>Panel 3 Linfocitos NK</b>
<b>FITC</b>	CD45RA	CD45RA	
<b>PE</b>	CRTAM	CRTAM	CD16
<b>Percp- Cy 5.5</b>	CD45RO	CD45RO	
<b>APC</b>	CD62L	CD69	CD56
<b>APC H7</b>	CD4	CD4	
<b>V450</b>	CD3	CD3	CD3
<b>PE Cy7</b>	CCR7	CD8	

## **Muestras**

Para la estandarización de la tinción de las muestras para la evaluación y caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T, se emplearon dos diferentes grupos de individuos.

- Grupo 1: Individuos clínicamente sanos (ICS)

Criterios de inclusión: Individuos que no cursaran con alguna infección viral, sin leucemia y que al menos una semana antes de la toma de muestra no padecieran ningún tipo de enfermedad ni estar bajo tratamiento farmacológico.

- Grupo 2: Pacientes con infecciones virales diagnosticadas

Criterios de inclusión: Diagnóstico molecular de Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB) y/o Virus BK (VBK) (PIV).

### **4.4 Preparación y tinción de muestras de sangre completa con EDTA para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos T.**

Se realizó una biometría hemática a cada muestra de los dos grupos en el equipo LH Coulter 780.

Para la tinción de las muestras se utilizaron 3 tubos de ensayo de 12x75mm, uno para cada panel, se colocaron 5 µl de cada anticuerpo del panel y se adicionó sangre periférica completa con EDTA.

Para muestras con una cantidad de leucos entre 2,000 y 13,000 se colocaron 50 µl de sangre periférica completa con EDTA y para muestras con una cantidad de leucocitos menor a 2,000 se colocaron 100 µl de sangre periférica completa con EDTA; esto para obtener una cantidad de células apropiada para el numero de eventos que serán adquiridos.

Se incubó este mix 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad; posteriormente se agregaron 2 ml de FACS Lysing, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, al finalizar el tiempo se centrifugaron los tubos 5 minutos a 1800 rpm;

se decantaron y se lavó el pellet 2 veces con 2 ml de FACS Flow, al finalizar se resuspendió el pellet con 350 µl de FACS Flow frío.

Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo BD FACS Canto II siguiendo el procedimiento como lo marca el manual de usuario de dicho equipo.

#### **4.5 Análisis de datos**

Los resultados de cada grupo de individuos fueron analizados en el programa FACS DIVA, realizando los gráficos para la identificación de cada población y por último se guardó la plantilla del panel.

Se obtuvieron porcentajes parciales de las subpoblaciones de linfocitos T para los que adicionalmente se convirtieron los datos a valores absolutos (No. de células por ml para su análisis) realizando una base de datos con la cual, mediante conversiones de los porcentajes parciales en relación a los leucocitos totales, se obtenían los valores absolutos, por ejemplo:

$$\text{valor absoluto de linfocitos} = \frac{(\% \text{ linfocitos})(\text{valor absoluto leucocitos})}{100 \%}$$

$$\text{valor absoluto de linfocitos T CD3} = \frac{(\% \text{ linfocitos T CD3})(\text{valor absoluto linfocitos})}{100 \%}$$

Por último, se realizó un análisis estadístico t de Student por cada parámetro analizado para comparar los datos de los dos grupos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Fluorocromos

Se seleccionaron los siguientes fluorocromos después de considerar que no hubiera traslapamiento en la lectura de ellos y para el aprovechamiento de los tres rayos láser que posee el equipo; así también se seleccionaron los anticuerpos monoclonales de acuerdo a la disponibilidad del distribuidor.

Para el anticuerpo monoclonal CRTAM se seleccionó el fluorocromo PE, ya que al ser una molécula de baja expresión se prefirió utilizarlo un fluorocromo de mayor intensidad, como se resume en la siguiente tabla:

Tabla 9. Fluorocromos utilizados en la estandarización de subpoblaciones de linfocitos T.

Fluorocromo	Nombre	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)	Láser que lo detecta	Anticuerpo monoclonal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	495	419	Azul (488nm)	CD45RA
PE	Ficoeritrina	480-565	578	Azul (488nm)	CRTAM/CD16
Percp- Cy 5.5	Peridina Clorofila	490	695	Azul (488nm)	CD45RO
PE Cy7	Ficoeritrina Cy7	488	774	Azul (488nm)	CCR7/CD8
APC	Alofocianina	650	660	Rojo (633nm)	CD62L/CD69/ CD56
APC H7	Alofocianina H7	650	785	Rojo (633nm)	CD4
V450		405	450	Violeta (405nm)	CD3

## 5.2 Control de calidad y calibración del Citómetro de flujo

El control de calidad del equipo se llevó a cabo usando las perlas CS&T, lo que proporcionó reportes diarios con valores similares a la calibración del fabricante, por lo que corroboramos que el citómetro BD FACS CANTO II operaba de manera adecuada.

### Cytometer Performance Report

Cytometer:	FACSCantoII	User:	Administrator
Cytometer Name:	FACSCantoII	Institution:	N/A
Serial Number:	V33896202461	Software:	BD FACSDiva 8.0.1
Input Device:	Manual	Date:	02/16/2017 11:45 AM
Cytometer Configuration:	Copy of 3-laser, 8-color (4-2-2)	Cytometer Baseline:	12/05/2016 11:40 AM
		P/F:	Pass

#### Setup Beads

Bead Product: CST Setup Beads Part #: 910858  
 Lot ID: 74538 Expiration Date: 08/31/2017  
 Bead Lot Information: Available

#### Detector Settings

Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference Target Value	Bright Bead % Robust CV	Mid Bead Median Channel	Mid Bead % Robust CV
Blue	FSC	FSC	125000	124662	-1	3.81	124749	3.78
Blue	F	SSC	125000	123163	-2	2.59	124326	2.61
Blue	E	FITC	8126	7900	-3	2.85	209	15.18
Blue	D	PE	14547	13827	-5	2.77	361	11.92
Blue	B	PerCP-Cy5-5	24050	23578	-2	3.80	753	13.69
Blue	A	PE-Cy7	22268	22022	-2	4.76	536	18.69
Red	C	APC	32524	32088	-2	2.04	1082	10.39
Red	A	APC-Cy7	26988	26119	-4	2.04	872	7.94
Violet	B	V450	6931	6747	-3	2.33	461	11.02
Violet	A	V500	26330	25646	-3	1.99	726	8.37

#### Detector Settings (Continued)

Laser	Detector	Parameter	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Robust CV	PMTV	Δ PMTV	Qr	Br	P/F
Blue	FSC	FSC	21148	3.82	574	12	N/A	N/A	Pass
Blue	F	SSC	56717	2.52	420	3	N/A	N/A	Pass
Blue	E	FITC	30	57.49	485	3	0.0318	55	Pass
Blue	D	PE	61	45.85	477	3	0.2147	225	Pass
Blue	B	PerCP-Cy5-5	113	36.24	594	7	0.0148	57	Pass
Blue	A	PE-Cy7	86	47.62	642	8	0.0307	3	Pass
Red	C	APC	182	26.11	567	1	0.0309	126	Pass
Red	A	APC-Cy7	142	20.91	482	-1	0.0074	714	Pass
Violet	B	V450	52	72.01	405	-3	0.0660	3384	Pass
Violet	A	V500	84	36.74	442	-5	0.0296	1462	Pass

#### Specifications

PMTV Delta from baseline: 50 (BD)  
 Violet Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV: 6.00 (Recommended)  
 Blue Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV: 6.00 (Recommended)  
 Red Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV: 6.00 (Recommended)

Calibración aceptada

## Cytometer Performance Report

Cytometer:	FACSCantoII	User:	Administrator
Cytometer Name:	FACSCantoII	Institution:	N/A
Serial Number:	V33896202461	Software:	BD FACSDiva 8.0.1
Input Device:	Manual	Date:	02/16/2017 11:45 AM
Cytometer Configuration:	Copy of 3-laser, 8-color (4-2-2)	Cytometer Baseline:	12/05/2016 11:40 AM
		P/F:	Pass

### Laser Settings

Laser	Power (mW)	Power Spec. (mW)	Current (mA)	Current Guidelines (mA)	Delay (Trigger on FSC)	Delay (Trigger on Fluorescence)	Area Scaling Factor
Violet	59.57	47.64 - 71.46	N/A	N/A	-29.00	-28.45	0.75
Blue	20.11	16.16 - 24.24	1.12	0.91 - 1.37	0.00	0.00	0.63
Red	16.62	13.44 - 20.16	N/A	N/A	27.86	28.39	0.61

Window Extension: 7.00  
FSC Area Scaling Factor: 0.52

### Threshold

Threshold (FSC): 13262

### Fluidics

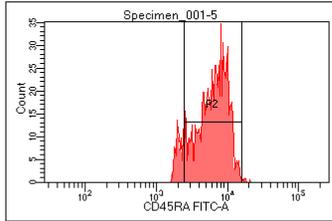
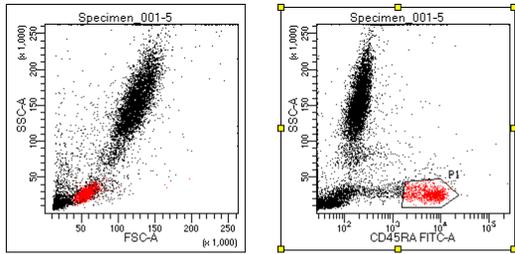
FACSFlow Pressure: 4.50      Sample Pressure: 4.20  
Spec.: 4.40 - 4.60

Comments

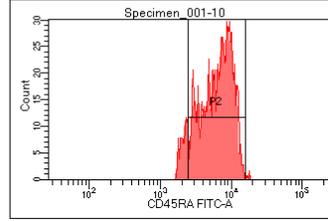
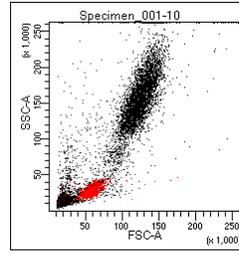
Figura 10. Resultados de la calibración del Citómetro de Flujo FACS CANTO II

### 5.3 Titulación de anticuerpos

La titulación del anticuerpo BD Pharmingen FITC mouse anti-human CD45RA se muestra en la siguiente imagen, donde podemos observar que, al comparar las medias de fluorescencia en relación con el volumen de anticuerpo monoclonal CD45RA, se logró optimizar su uso a 5µl, ya que la MFI no tiene una variación significativa.



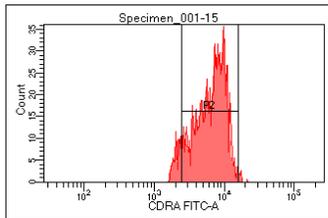
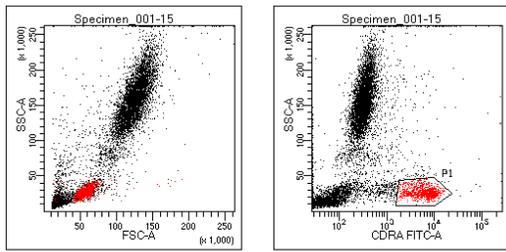
Experiment Name:	TITULACION			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	5			
Record Date:	Mar 13, 2017 3:28:02 PM			
SOP:	Administrator			
GUID:	dbf16bd8-495e-492d-9b8e-025...			
	Population	#Events	%Parent	CD45RA FITC-A Mean
	P1	876	8.8	6.272
	P2	780	89.0	6.736



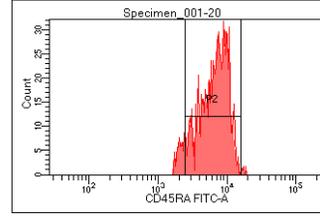
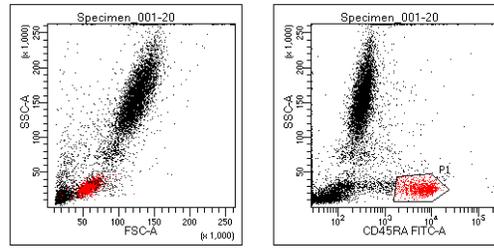
Experiment Name:	TITULACION			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	10			
Record Date:	Mar 13, 2017 3:31:56 PM			
SOP:	Administrator			
GUID:	577a2e2d-6b56-45c1-8048-c55...			
	Population	#Events	%Parent	CD45RA FITC-A Mean
	P1	925	9.3	6.336
	P2	831	89.8	6.770

Figura11. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 5µl

Figura12. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 10µl



Experiment Name:	TITULACION			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	15			
Record Date:	Mar 13, 2017 3:33:26 PM			
SOP:	Administrator			
GUID:	162fca67-7337-4fa8-b3f2-2b61...			
	Population	#Events	%Parent	CD45RA FITC-A Mean
	P1	940	9.4	6.548
	P2	847	90.1	6.920



Experiment Name:	TITULACION			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	20			
Record Date:	Mar 13, 2017 3:35:01 PM			
SOP:	Administrator			
GUID:	44501ea2-6341-47aa-89b5-91...			
	Population	#Events	%Parent	CD45RA FITC-A Mean
	P1	871	8.7	6.570
	P2	799	91.7	6.886

Figura13. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 15µl

Figura14. Titulación del anticuerpo CD45RA FITC, Volumen 20µl

Tabla 10. MFI de la titulación del anticuerpo CD45RA FITC a diferentes volúmenes.

Anticuerpo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	MFI
CD45RA FITC	5	6736
	10	6770
	15	6920
	20	6886

### 5.4 Compensación

La compensación de los 7 fluorocromos analizados mostró una buena definición y lectura en los rayos láser, observando un pico de MFI definido correspondiente a la población de perlas positivas y separado de la población de perlas negativas como se muestra a continuación para cada fluorocromo.

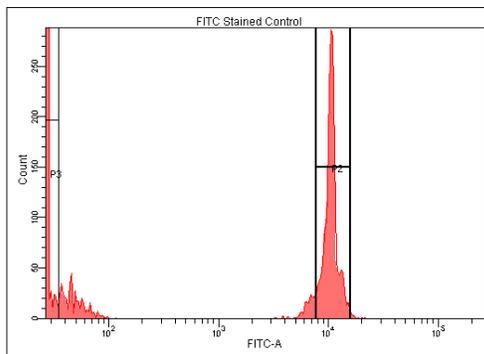


Figura 15. MFI del fluorocromo FITC

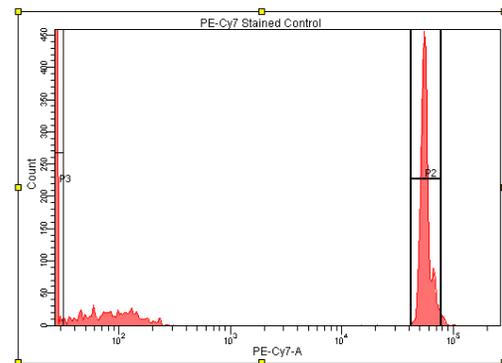


Figura 16. MFI del fluorocromo PECy7

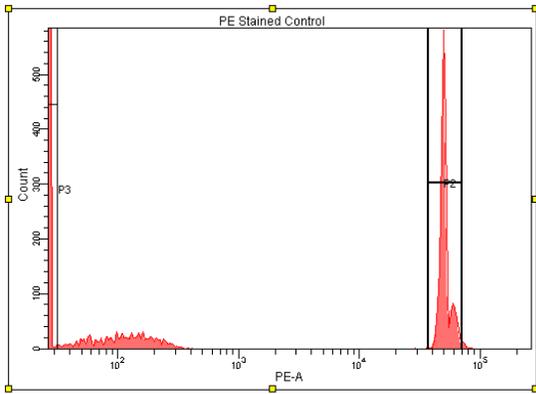


Figura 17. MFI del fluorocromo PE.

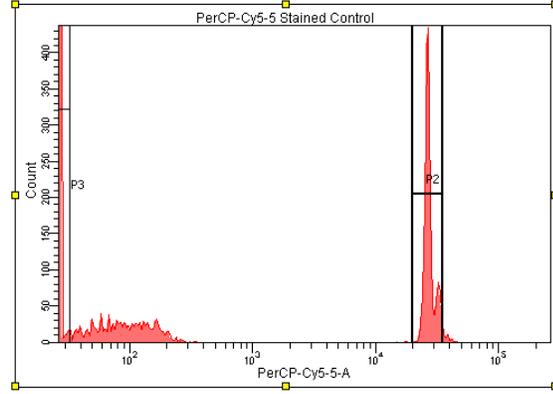


Figura 18. MFI del fluorocromo PerCP Cy 5.5

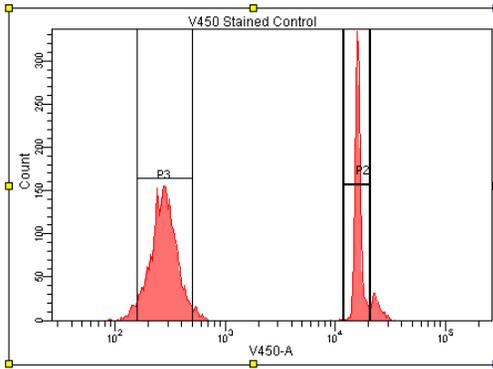


Figura 19. MFI del fluorocromo V450.

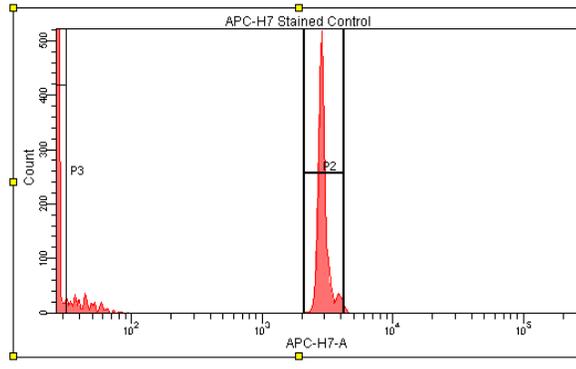


Figura 20. MFI del fluorocromo APC H7.

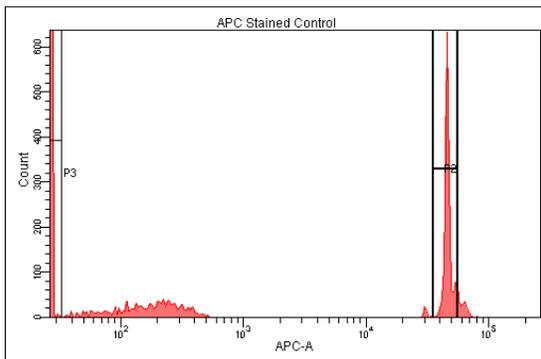


Figura 21. MFI del fluorocromo APC.

## **Muestras**

- Grupo1: Individuos clínicamente sanos (ICS)

Este grupo de individuos se eligió para la identificación de las subpoblaciones de linfocitos T en las gráficas, como control positivo y para comprobar la reproducibilidad del experimento. Se utilizó un grupo de 11 individuos con edades entre 8 y 28 años, para incluir tres grupos de población (niños, adolescentes y adultos jóvenes) para evaluar tanto a donadores como receptores del TCPH.

- Pacientes con infecciones virales diagnosticadas de Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB) y Virus BK (VBK) (PIV)

Este grupo de individuos se eligió, a fin de comprobar que los paneles 1 y 2 detectan los linfocitos activados y adicionalmente observar el patrón de comportamiento del marcador CRTAM en la activación de linfocitos y en las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria. Se eligieron pacientes infectados con estos tres virus, ya que son los virus más recurrentes que afectan a pacientes trasplantados. De este grupo de individuos se utilizó una n de 10 muestras.

### **5.5 Identificación de las subpoblaciones de linfocitos T en Individuos clínicamente sanos.**

#### **5.4.1 Panel de linfocitos T vírgenes y de memoria.**

Los pasos a seguir para identificar las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria por citometría de flujo se muestran en la figura 22.

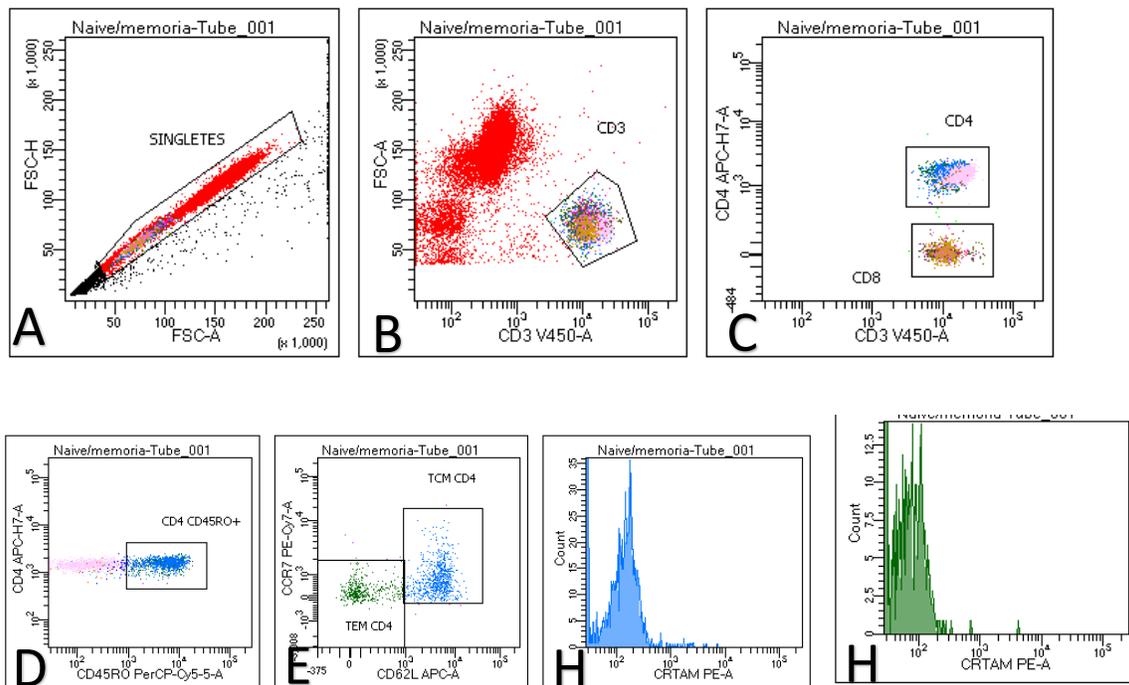
En principio se seleccionan los singletes, es decir los eventos únicos, descartando basura celular y células que hayan pasado juntas por el láser (dobletes, tripletes y demás agregados) de cincuenta mil eventos (A). Posteriormente se genera una gráfica en donde se seleccionan las células CD3+ en relación al FSC-A (B). A partir de estos datos se generan 2 gráficas para la selección de linfocitos TCD4+ y TCD8+, éstos últimos fueron seleccionados por exclusión (C).

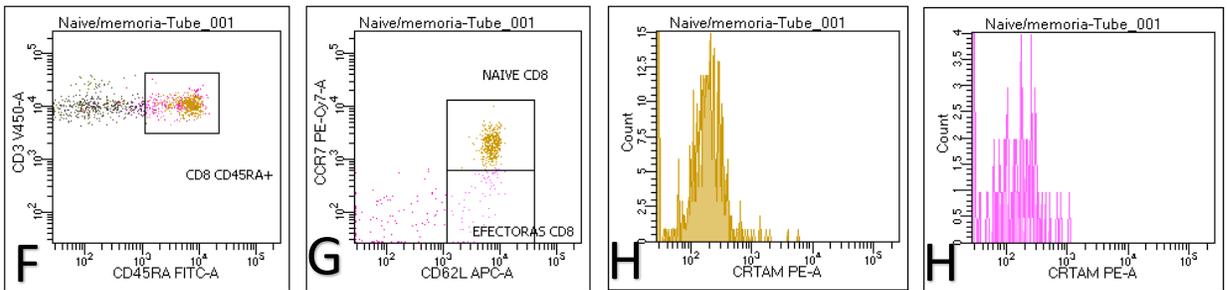
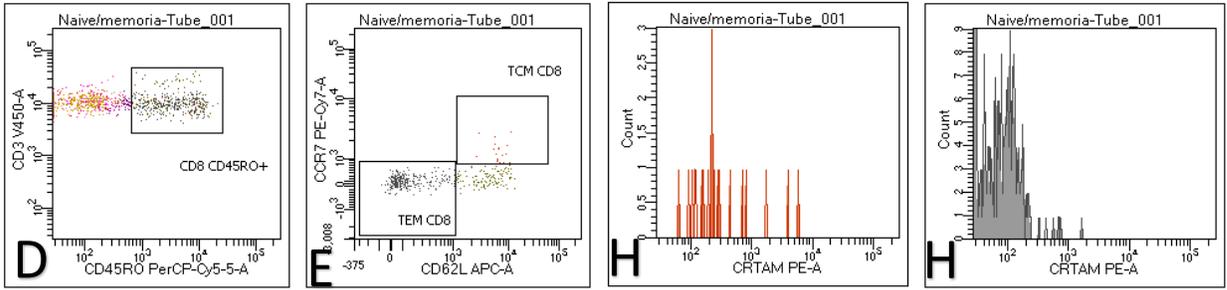
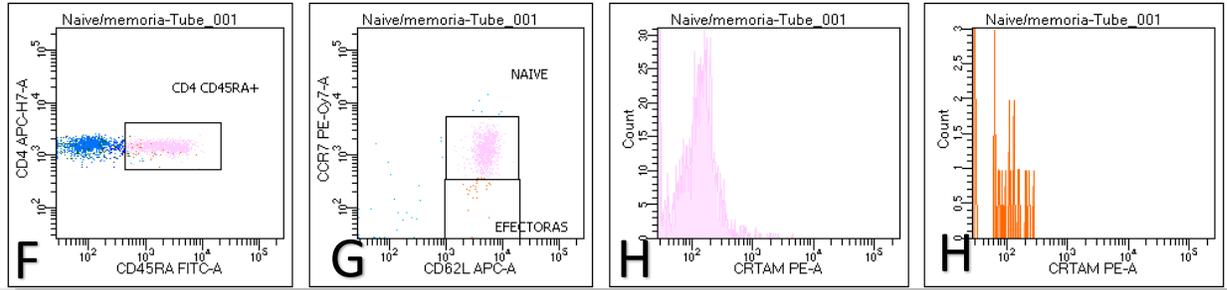
Una vez obtenidos los linfocitos TCD4+ y TCD8+ se procede a diferenciar a las células de memoria (CD45RO+) de las células vírgenes (D) (CD45RA+) de cada población (F).

Al seleccionar la población CD45RO+ se identificaron 2 grupos de eventos que cumplen diferentes criterios; los linfocitos TCM (CCR7+/CD62L+) y los linfocitos TEM (CCR7-/CD62L-) (E).

Por otro lado, al analizar la población CD45RA+ se identificaron 2 poblaciones de eventos: los linfocitos vírgenes (CCR7+/CD62L+) y los linfocitos T efectores (CCR7-/CD62L+) (G).

La identificación de estas subpoblaciones se hizo para los linfocitos TCD4+ y TCD8+; adicionalmente a cada subpoblación identificada se le asignó un gráfico para medir la expresión del marcador CRTAM (H) en cada una de ellas, obteniendo la MFI, esto con el fin de obtener información adicional sobre este marcador ya que es un marcador poco conocido y estudiado.





Specimen Name:	Naive/memoria
Tube Name:	Tube_001
Record Date:	Jan 31, 2017 1:40:23 PM
SOP:	Administrator
GUID:	1932c977-c435-4e52-8036-504...

Population	#Events	%Parent	Mean
TEM CD4	459	35.7	68
TCM CD4	821	63.9	180
NAIVE	938	94.6	152
EFECTORAS	25	2.5	81
TEM CD8	288	69.4	80
TCM CD8	20	4.8	726
NAIVE CD8	397	68.1	225
EFECTORAS CD8	77	13.2	163

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	###	100.0
SINGLETES	18,429	36.9	36.9
CD3	3,365	18.3	6.7
CD4	2,320	68.9	4.6
CD4 CD45RO+	1,284	55.3	2.6
TEM CD4	459	35.7	0.9
TCM CD4	821	63.9	1.6
CD4 CD45RA+	992	42.8	2.0
NAIVE	938	94.6	1.9
EFECTORAS	25	2.5	0.0
CD8	1,039	30.9	2.1
CD8 CD45RO+	415	39.9	0.8
TEM CD8	288	69.4	0.6
TCM CD8	20	4.8	0.0
CD8 CD45RA+	583	56.1	1.2
NAIVE CD8	397	68.1	0.8
EFECTORAS CD8	77	13.2	0.2

Figura 22. Panel de linfocitos T vírgenes y de memoria. A: Selección de singletes. B: Linfocitos CD3+. C: Diferenciación entre linfocitos CD4+ y CD8+. D: Selección de linfocitos de memoria. E: Selección de linfocitos vírgenes. F: Diferenciación de linfocitos TCM y TEM. G: Diferenciación de linfocitos vírgenes y efectores. H: Expresión del marcador CRTAM para cada subpoblación de linfocitos.

#### **5.4.2 Panel de linfocitos activados**

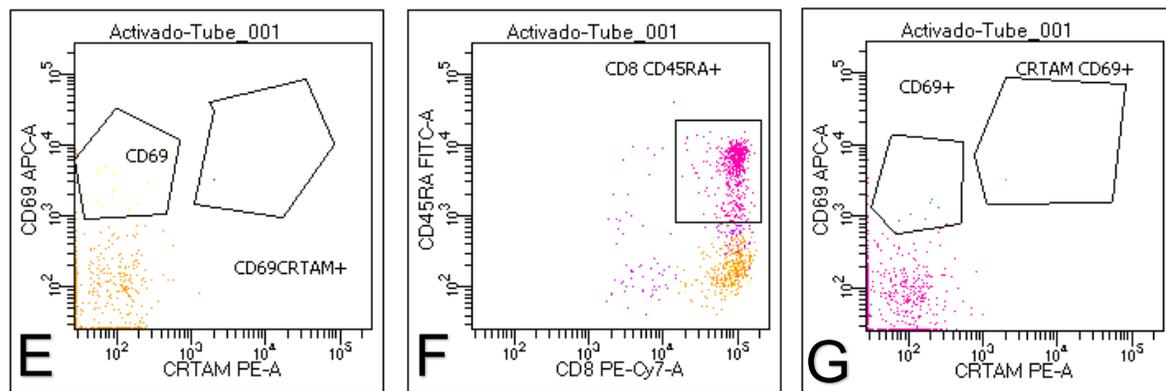
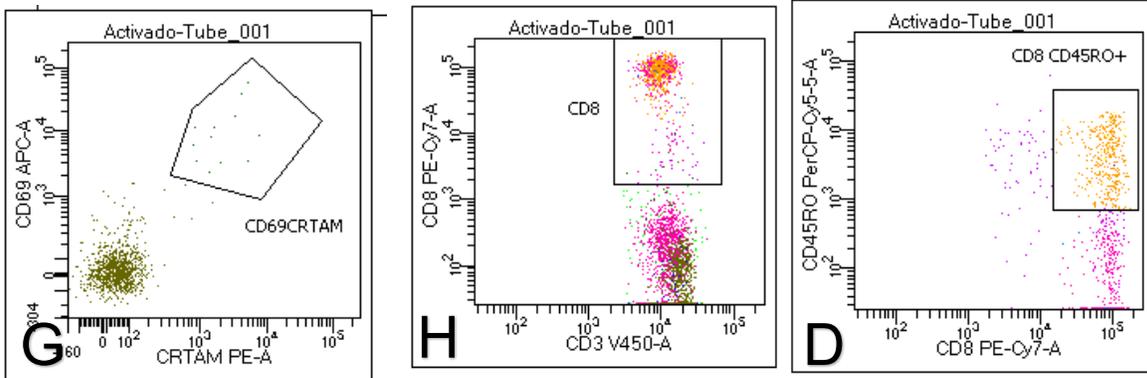
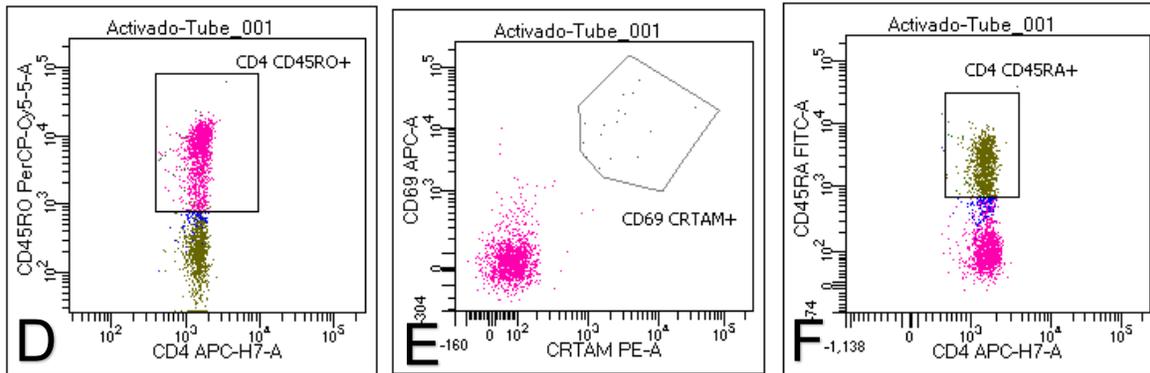
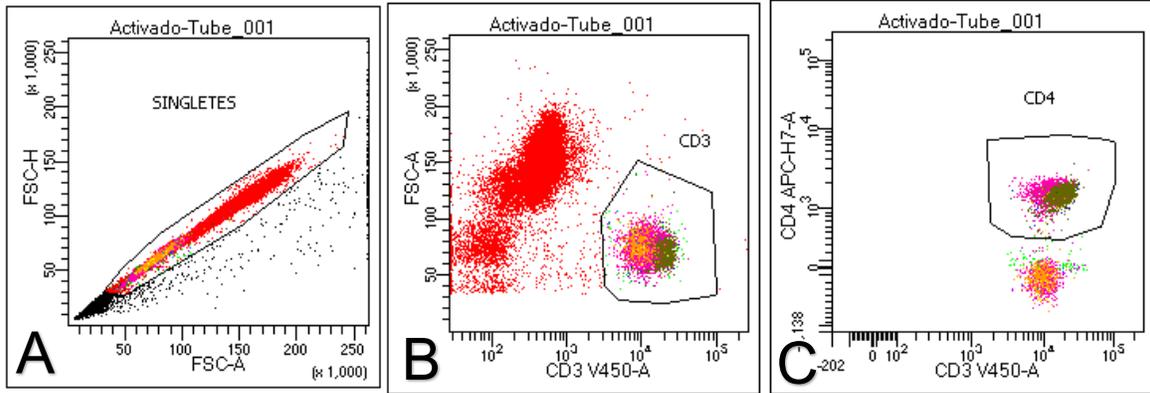
Los pasos a seguir para identificar las subpoblaciones de linfocitos T activados por citometría de flujo se muestran en la figura 23.

En principio se seleccionan los singletes, es decir los eventos únicos, descartando basura celular y células que hayan pasado juntas por el láser (dobletes, tripletes y demás agregados) de cincuenta mil eventos (A). Posteriormente se genera una gráfica en donde se seleccionan las células CD3+ en relación al FSC-A(B). A partir de estos datos se generan 2 gráficas para la selección de linfocitos TCD4+ (C) y TCD8+ (H).

Una vez obtenidos los linfocitos TCD4+ y TCD8+ se procede a diferenciar a las células de memoria (CD45RO+) (D) de las células vírgenes (CD45RA+) (F) de cada población.

Los linfocitos activados se seleccionan a partir de la población de linfocitos CD45RO+ que expresen los marcadores CD69 y/o CRTAM. (E)

Se realizó un gráfico adicional para la población CD45RA+ tanto de TCD4+ y TCD8+ para observar la expresión del marcador CRTAM, ya que este marcador es poco conocido y estudiado. (G)



Tube: Tube\_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
SINGLETES	20,604	41.2	41.2
CD3	3,778	18.3	7.6
CD4	2,608	69.0	5.2
CD4 CD45RO+	1,455	55.8	2.9
CD69 CRTAM+	16	1.1	0.0
CD4 CD45RA+	1,011	38.8	2.0
CD69CRTAM	12	1.2	0.0
CD8	1,137	30.1	2.3
CD8 CD45RA+	631	55.5	1.3
CD69+	6	1.0	0.0
CRTAM CD69+	1	0.2	0.0
CD8 CD45RO+	386	33.9	0.8
CD69	15	3.9	0.0
CD69CRTAM+	1	0.3	0.0

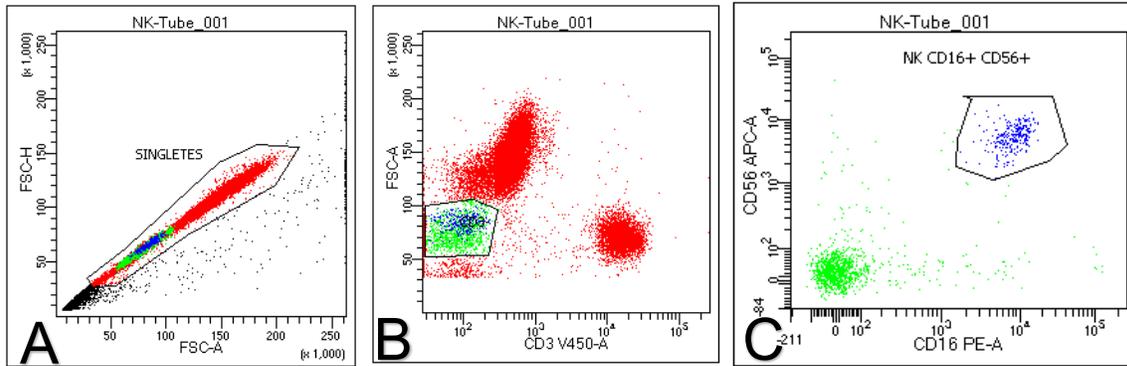
Figura 23. Panel de linfocitos T activados. A: Selección de singletes. B: Linfocitos CD3+. C: Selección de linfocitos CD4+ D: Selección de linfocitos CD4+ y CD8+. E: Selección de linfocitos de memoria. F: Selección de linfocitos vírgenes. G: Selección de linfocitos activados. H: Expresión del marcador CRTAM en poblaciones CD4+CD45RA+ y CD8+CD45RA+.

### 5.4.3 Panel de linfocitos NK

Para identificar la subpoblación de linfocitos NK por citometría de flujo se realizó el procedimiento que se muestra en la figura 24.

En principio se seleccionan los singletes, es decir los eventos únicos, descartando basura celular y células que hayan pasado juntas por el láser (dobletes, tripletes y demás agregados) de cincuenta mil eventos (A). Posteriormente se genera una gráfica en donde se seleccionan las células CD3- en relación al FSC-A (B).

De la población CD3- se realizó un gráfico donde se selecciona la población que exprese CD56 y CD16 (C).



Tube: Tube\_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
SINGLETES	20,365	40.7	40.7
CD3-	1,429	7.0	2.9
NK CD16+ CD56+	260	18.2	0.5

Figura 24. Panel de linfocitos NK. A: Selección de singletes. B: Linfocitos CD3-. C: Selección de linfocitos CD16+CD56+.

#### 5.4.4 Valores absolutos de las subpoblaciones de linfocitos

Tabla 11. Valores absolutos de leucocitos.

No. de muestra	Leucocitos/ml Individuos sanos	Leucocitos/ml Pacientes con infección viral
1	7300000	2800000
2	7000000	2700000
3	7400000	6200000
4	7500000	6000000
5	7600000	6600000
6	7000000	18100000
7	6000000	8000000
8	6500000	4000000
9	7400000	7900000
10	7700000	10800000
11	10100000	

Grafica 1. Valores absolutos de leucocitos.

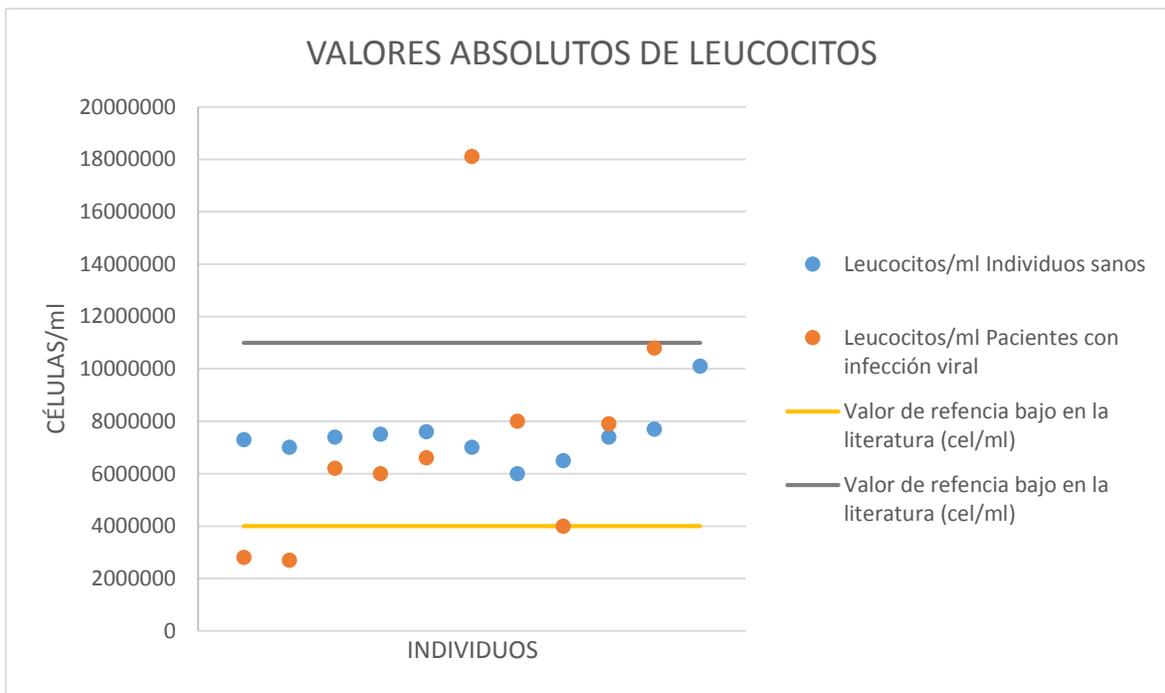


Tabla 12. Valores absolutos de linfocitos totales

No. de muestra	Linfocitos/ml Individuos sanos	Linfocitos/ml Pacientes con infección viral
1	2345800	1758400
2	1716000	807300
3	2220000	1041600
4	2065900	2406000
5	2340800	2013000
6	3246000	905000
7	3959200	3624000
8	2317000	724000
9	2310000	1698500
10	2702000	2527200
11	1892400	

Grafica 2. Valores absolutos de linfocitos totales

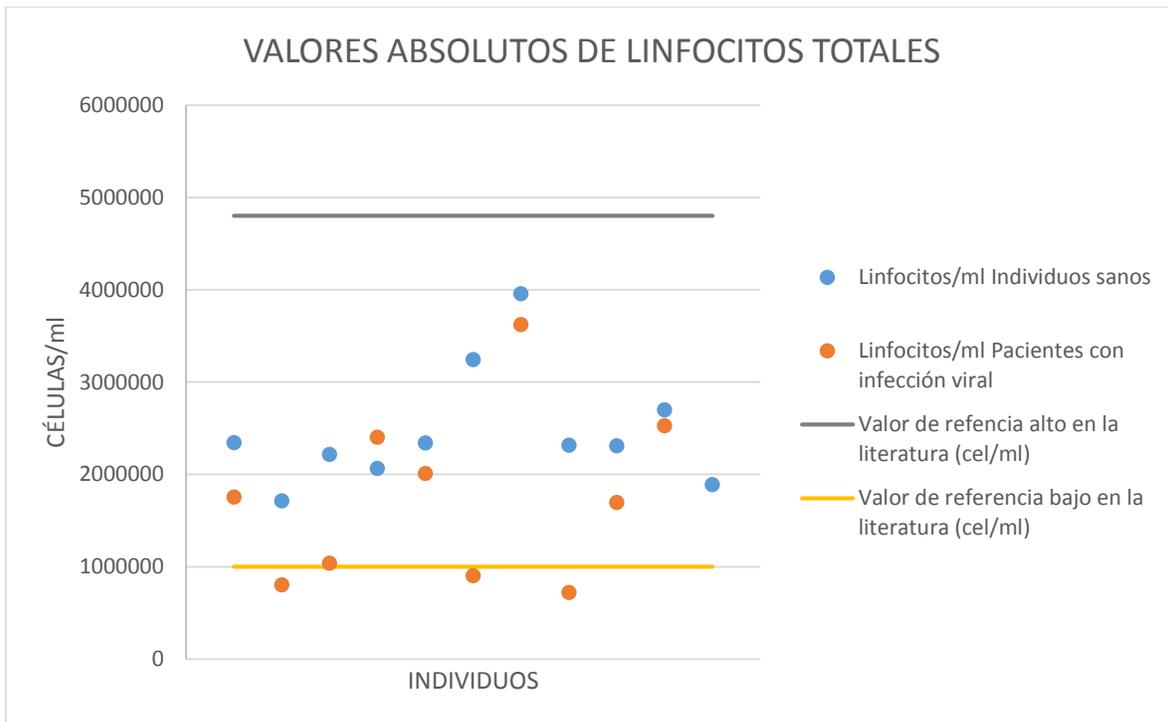


Tabla 13. Valores absolutos de linfocitos T

No. de muestra	Linfocitos T CD3/ml Individuos sanos	Linfocitos T CD3/ml Pacientes con infección viral
1	612253.8	963603.2
2	259116	192944.7
3	455100	280190.4
4	378059.7	659244
5	500931.2	408639
6	889404	34390
7	807676.8	985728
8	329014	101360
9	392700	186835
10	543102	404352
11	278182.8	

Grafica 3. Valores absolutos de linfocitos T

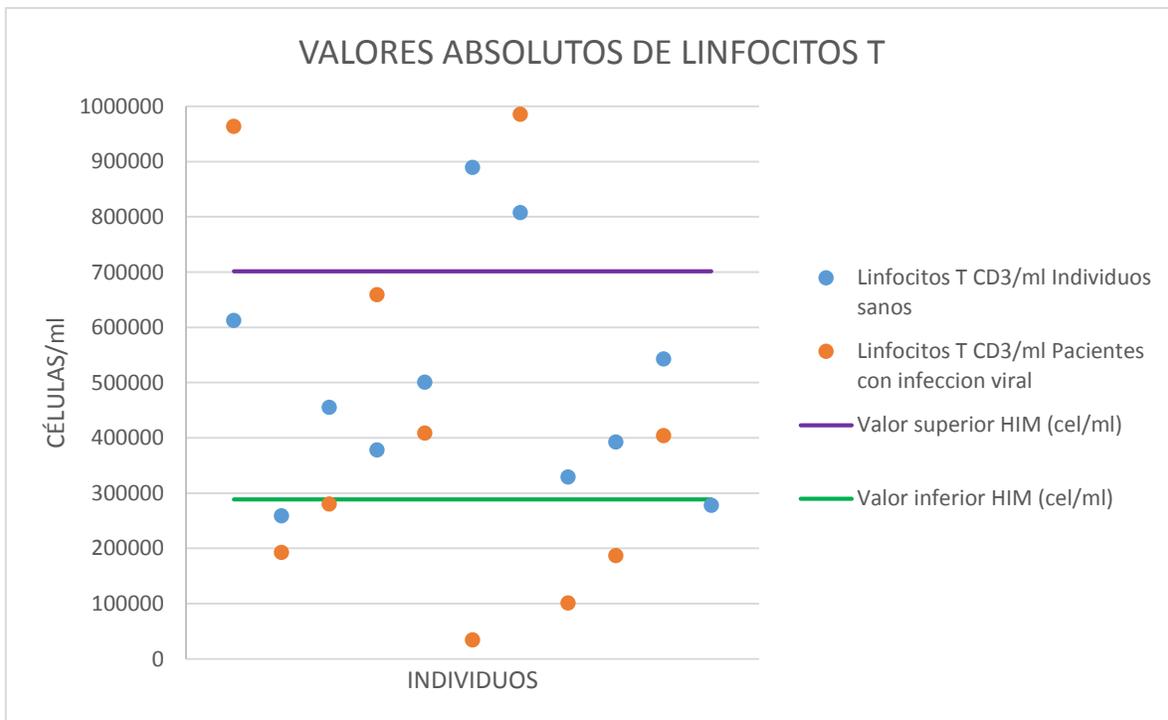


Tabla 14. Valores absolutos de linfocitos T CD4

No. de muestra	Linfocitos T CD4/ml Individuos sanos	Linfocitos T CD4/ml Pacientes con infección viral
1	268779.418	35653.3184
2	133962.972	44184.3363
3	251670.3	146819.77
4	260483.133	359947.224
5	294547.546	211266.363
6	533642.4	8184.82
7	486221.434	457377.792
8	159571.79	60207.84
9	219126.6	110979.99
10	284585.448	210263.04
11	115167.679	

Gráfica 4. Valores absolutos de linfocitos T CD4

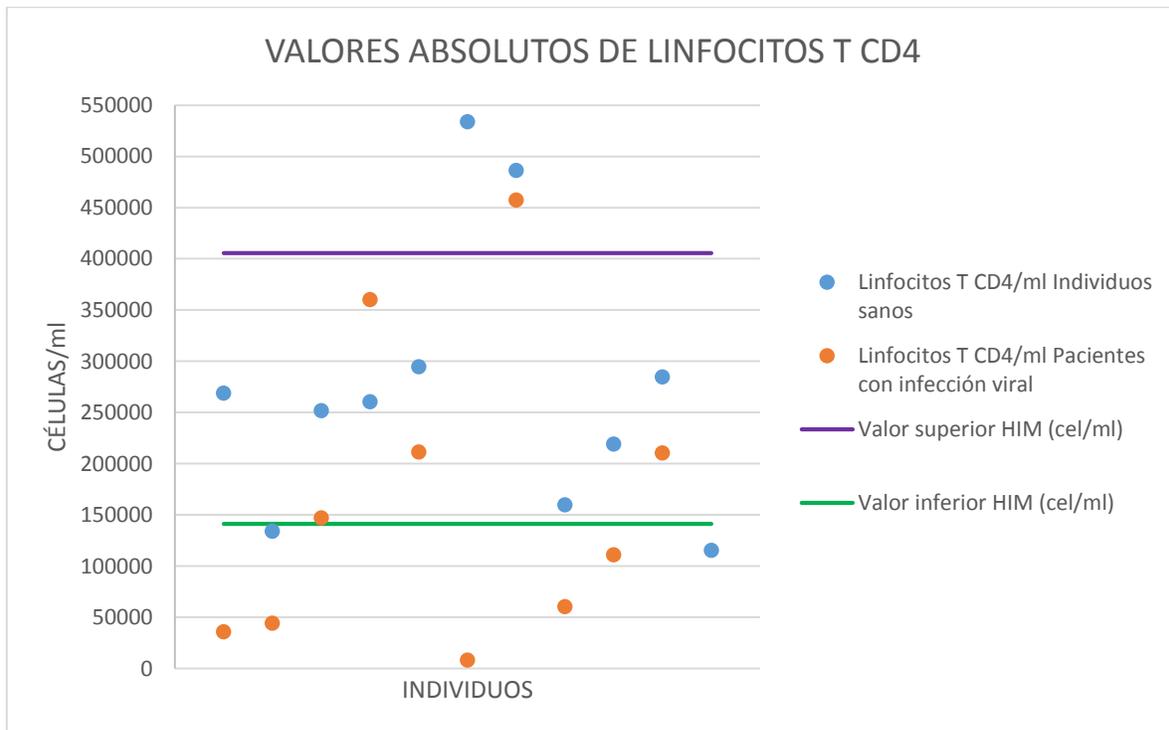


Tabla 15. Valores absolutos de linfocitos T CD8

No. de muestra	LINFOCITOS T CD8/ml INDIVIDUOS SANOS	LINFOCITOS T CD8/ml PACIENTES CON INFECCION
1	340413.113	924095.469
2	124634.796	148181.53
3	202064.4	128047.013
4	116820.447	293363.58
5	204880.861	195738.081
6	352203.984	26170.79
7	320647.69	522435.84
8	167139.112	40138.56
9	173180.7	74920.835
10	257973.45	190449.792
11	161624.207	

Gráfica 5. Valores absolutos de linfocitos T CD8

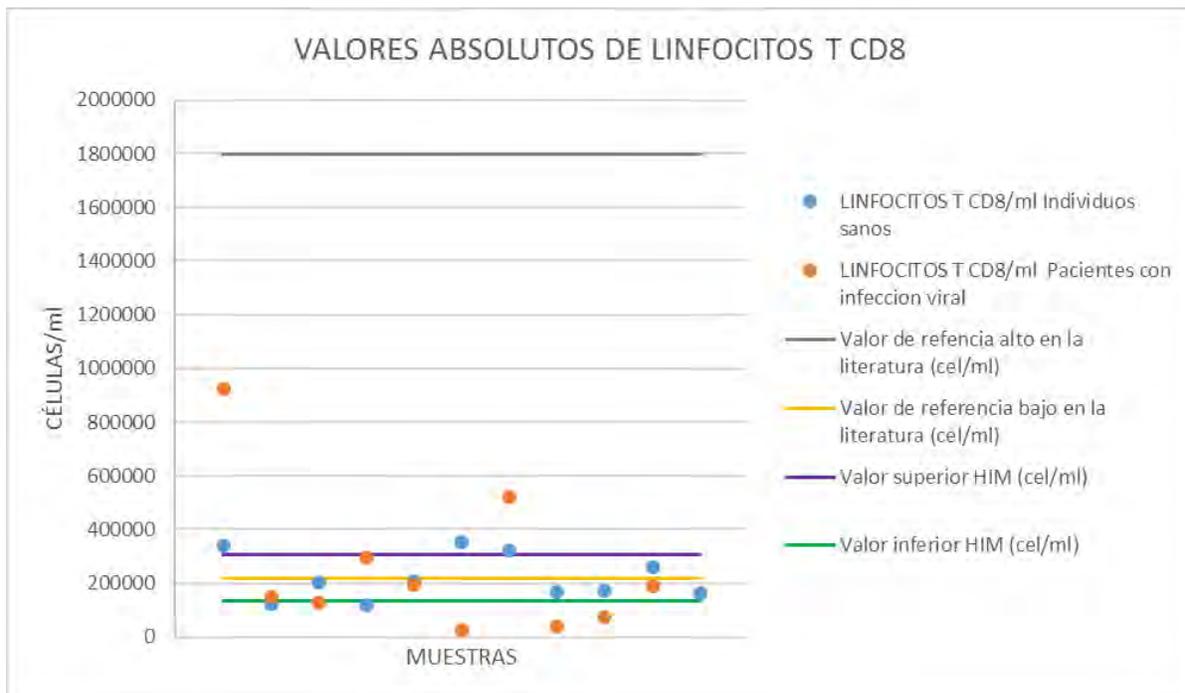


Tabla 16. Relación entre linfocitos T CD4 y T CD8

No. de muestra	REL 4/8 Individuos sanos	REL 4/8 Pacientes con infección viral
1	2.22977346	0.03858186
2	1.10315789	0.29817708
3	1.2454955	1.14660832
4	1.05482042	1.22696629
5	0.71256454	1.07933194
6	0.95472441	0.31274639
7	1.51515152	0.8754717
8	1.07484407	1.5
9	0.78956835	1.48129676
10	1.43765281	1.10403397
11	1.5163728	

Grafica 6. Relación entre linfocitos T CD4 y TCD8

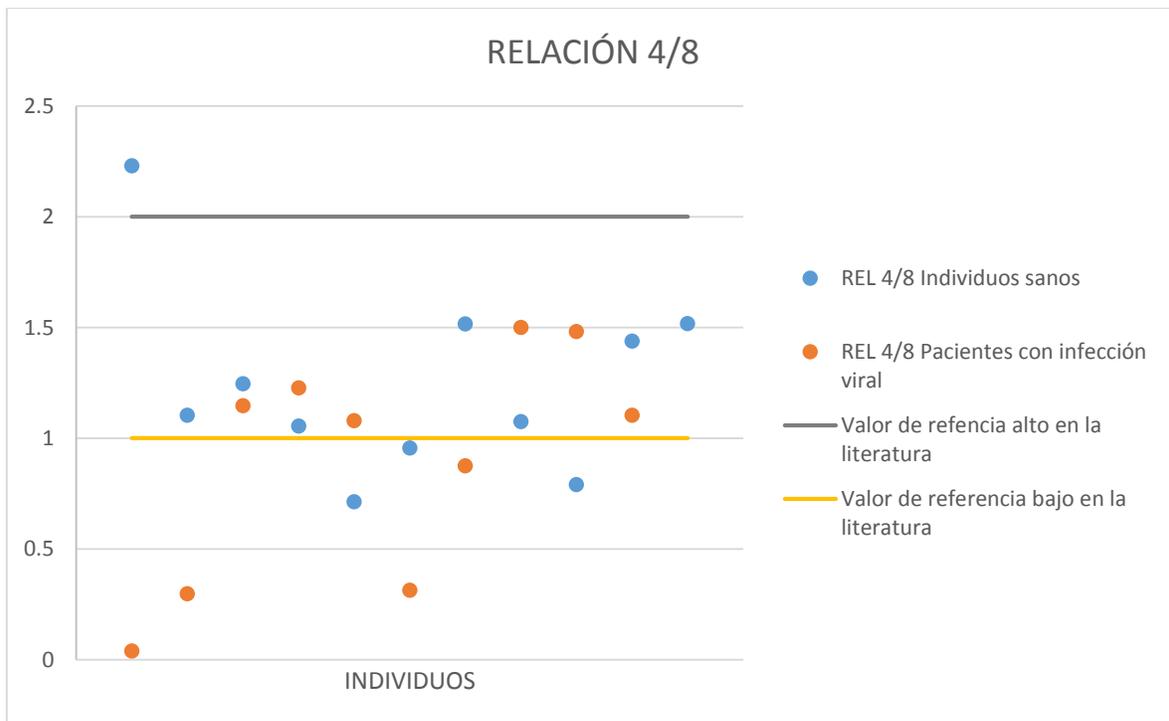


Tabla 17. Valores absolutos de linfocitos T vírgenes CD4

No. de muestra	Linfocitos T vírgenes CD4/ml Individuos sanos	Linfocitos T vírgenes CD4/ml Pacientes con infección viral
1	115051.836	8885.16348
2	52912.0249	1906.99595
3	102395.585	17978.3744
4	87970.8847	65919.2948
5	96403.6444	47212.3279
6	310018.485	503.857519
7	329884.711	201703.606
8	61913.2162	34869.3705
9	128239.898	2848.63438
10	148901.936	28726.1365
11	37172.6718	

Gráfica 7. Valores absolutos de linfocitos T vírgenes CD4

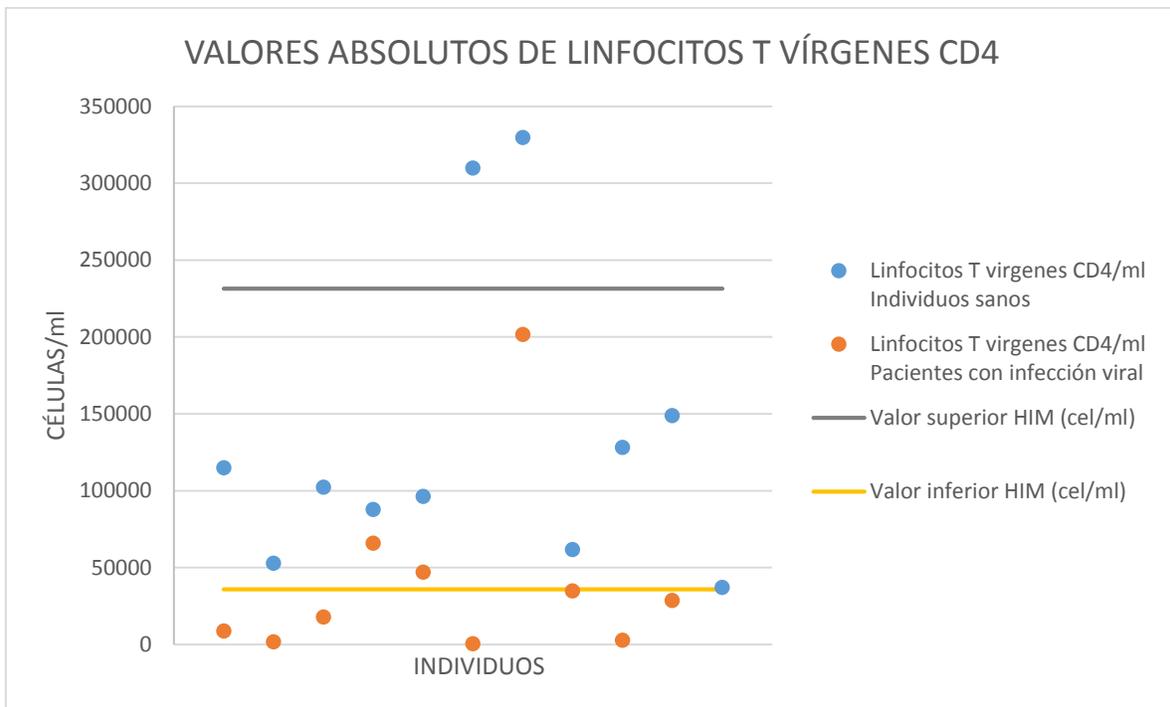


Tabla 18. Valores absolutos de linfocitos T CD4 efectores

No. de muestra	Linfocitos T efectores CD4/ml Individuos sanos	Linfocitos T efectores CD4/ml Pacientes con infección viral
1	4326.27352	2506.07175
2	3146.1204	1305.55877
3	13066.722	4618.94995
4	2324.81196	17669.0893
5	3324.2636	2169.49428
6	12613.1718	365.296701
7	9611.6253	19133.0278
8	7560.83055	2235.21606
9	415.464034	3096.34172
10	6840.58041	42339.8273
11	3930.90323	

Gráfica 8. Valores absolutos de linfocitos T CD4 efectores

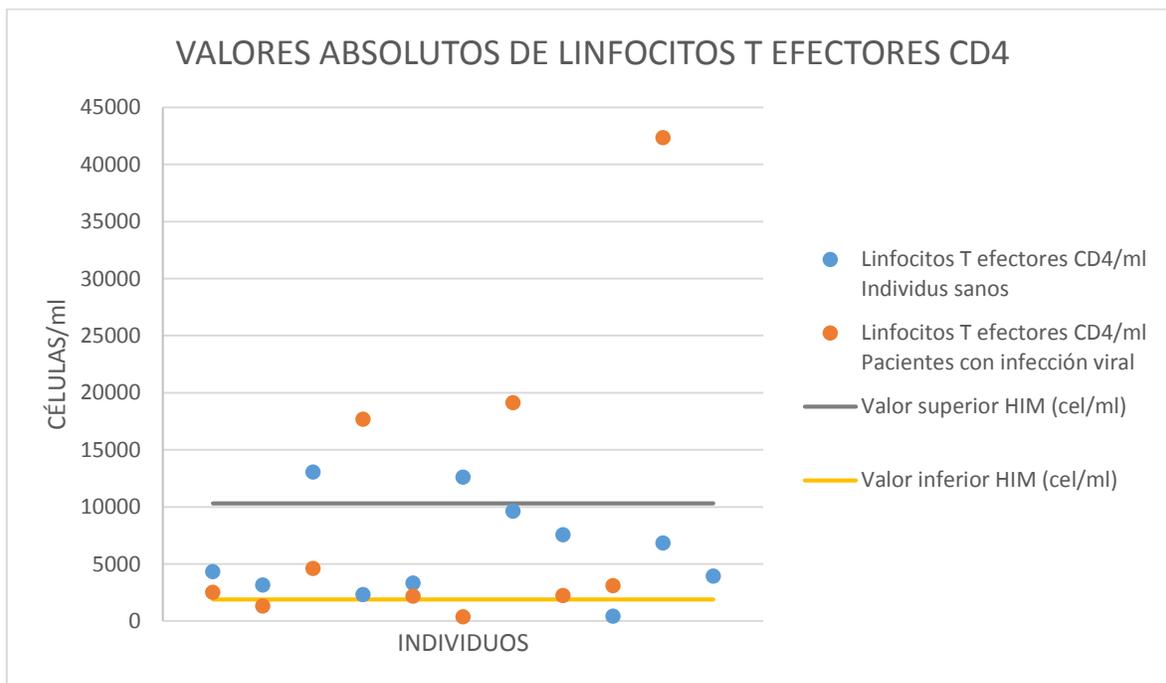


Tabla 19. Valores absolutos de linfocitos TCM CD4

No. de muestra	Linfocitos TCM CD4/ml Individuos sanos	Linfocitos TCM CD4/ml Pacientes con infección viral
1	29434.5716	15500.5654
2	14178.9089	2355.64371
3	76357.0207	15116.5635
4	92046.1434	43591.0486
5	117272.633	4022.08902
6	86882.8528	822.279756
7	64302.7846	9858.77831
8	33742.4124	9129.43519
9	35007.2274	7105.38288
10	73859.0305	5571.12951
11	3669.24226	

Gráfica 9. Valores absolutos de linfocitos TCM CD4

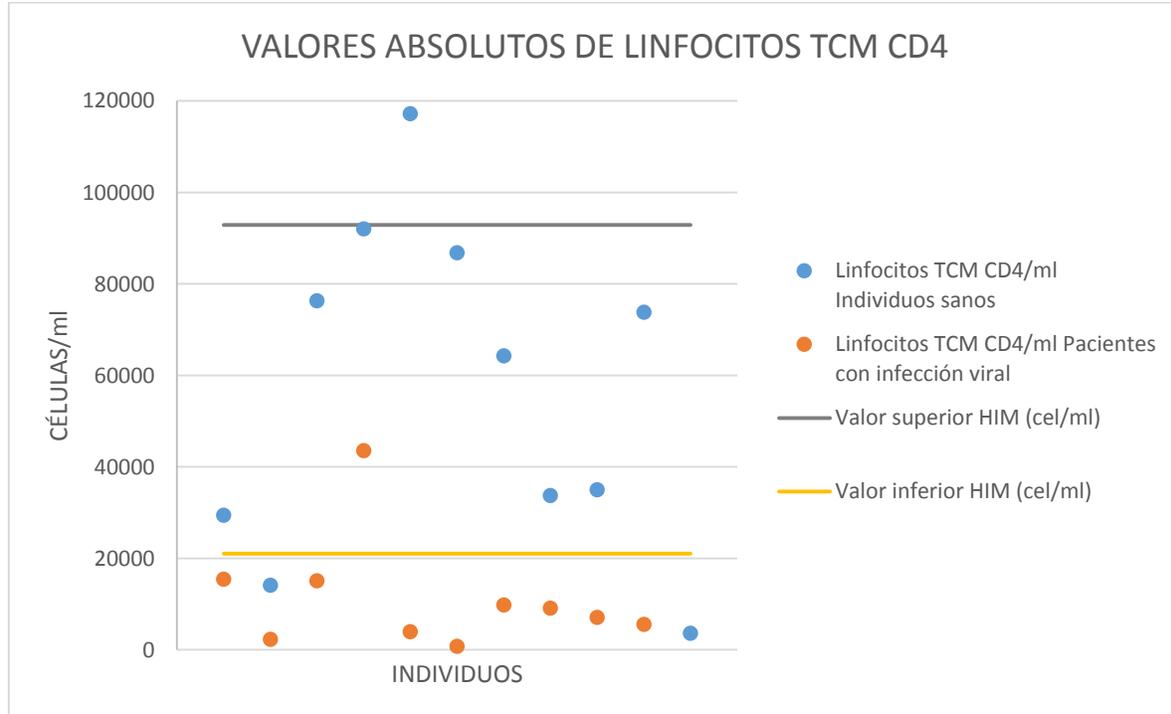


Tabla 20. Valores absolutos de linfocitos TEM CD4

No. de muestra	Linfocitos TEM CD4/ml Individuos sanos	Linfocitos TEM CD4/ml Pacientes con infección viral
1	55347.0578	4511.00046
2	31163.2703	34678.1647
3	43142.3295	55656.4383
4	51424.8407	129645.791
5	69390.9835	63294.9798
6	80718.2158	3235.49209
7	36568.714	139994.652
8	29750.5645	5917.22652
9	28257.2516	35291.6368
10	26208.0431	57810.5613
11	31188.5592	

Gráfica 10. Valores absolutos de linfocitos TEM CD4

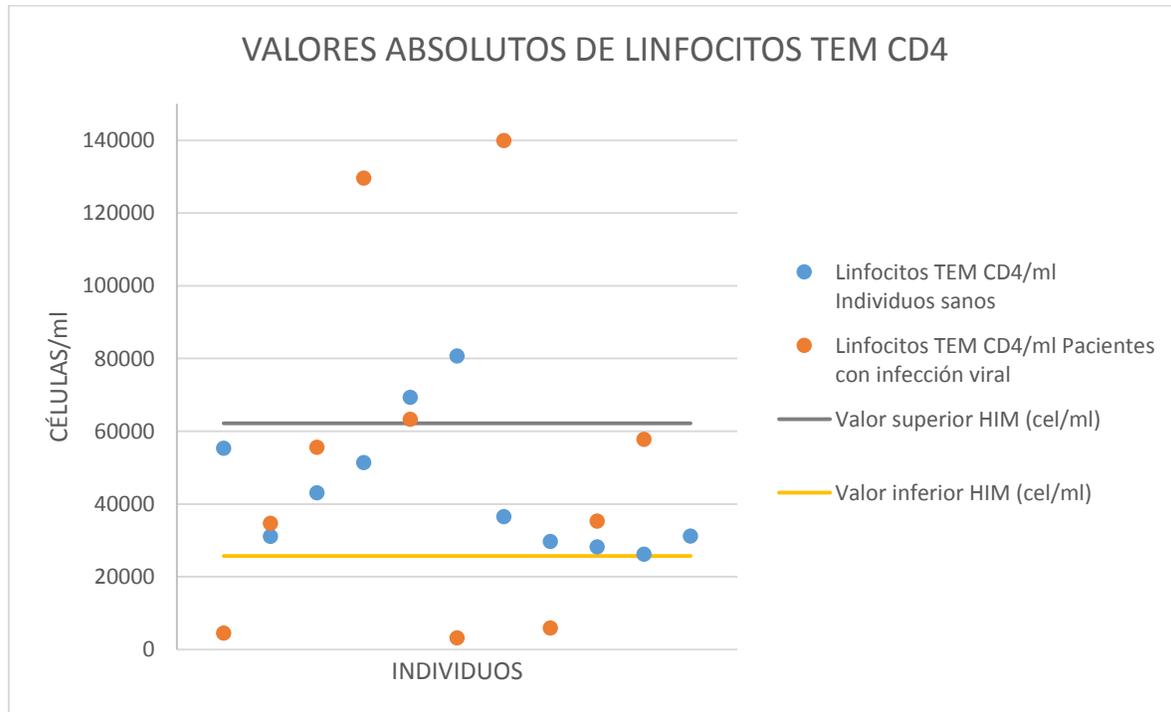


Tabla 21. Valores absolutos de linfocitos T CD8 vírgenes

No. de muestra	Linfocitos T vírgenes CD8/ml Individuos sanos	Linfocitos T vírgenes CD8/ml Pacientes con infección viral
1	67685.02	2066.27747
2	46408.2648	1061.4243
3	57616.2389	5215.86702
4	44630.2005	17625.2839
5	42311.5856	32185.6041
6	135598.534	600.59346
7	192038.146	108384.017
8	59039.8856	21822.9337
9	65114.2114	8138.80015
10	145853.803	14894.6973
11	41202.5358	

Gráfica 11. Valores absolutos de linfocitos T CD8 vírgenes

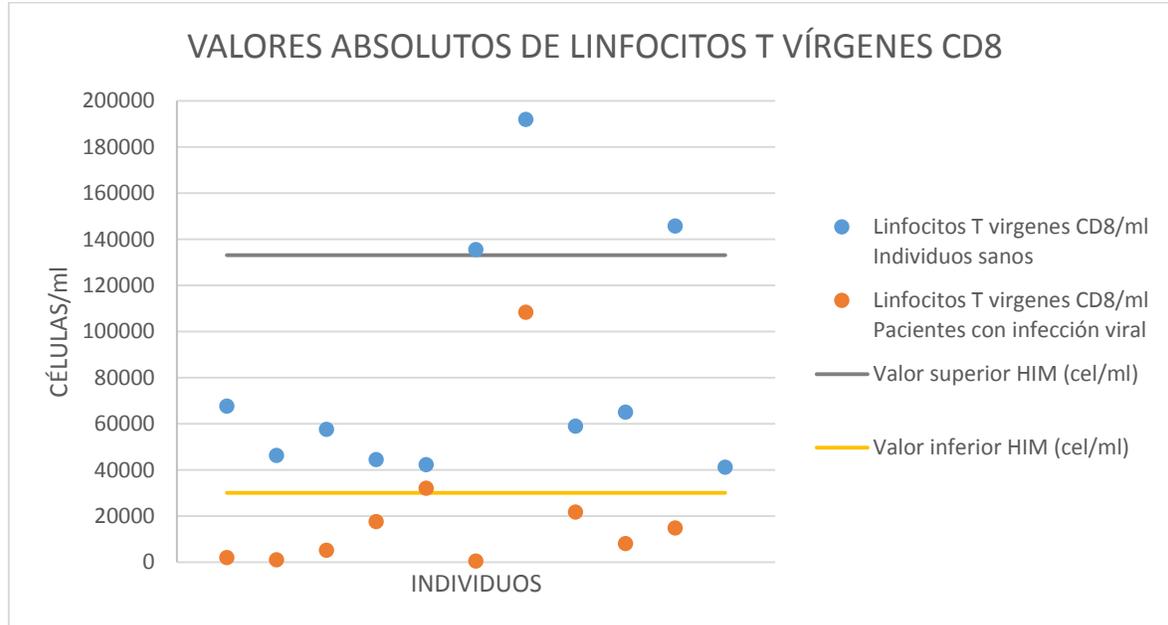


Tabla 22. Valores absolutos de linfocitos T CD8 efectores

No. de muestra	Linfocitos T efectores CD8/ml Individuos sanos	Linfocitos T efectores CD8/ml Pacientes con infección viral
1	39548.5146	1561.72134
2	3824.54335	2452.25613
3	23497.867	8665.0694
4	8650.78776	56180.5924
5	11356.9559	27606.8989
6	29250.5409	1529.81353
7	24889.315	109601.815
8	16893.4186	2124.1326
9	40794.4457	4124.39197
10	24085.9491	23917.4467
11	14756.9366	

Gráfica 12. Valores absolutos de linfocitos T CD8 efectores

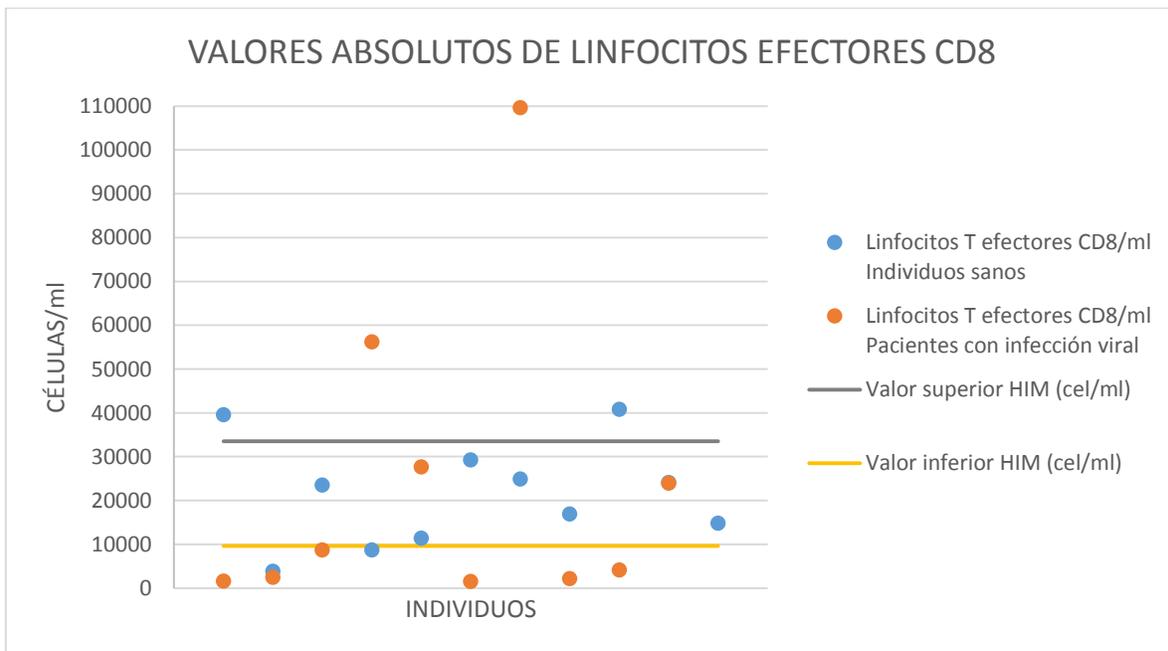


Tabla. 23 valores absolutos de linfocitos TCM CD8

No. de muestra	Linfocitos TCM CD8/ml Individuos sanos	Linfocitos TCM CD8/ml Pacientes con infección viral
1	1136.63938	9860.09865
2	4913.22829	1831.37552
3	8847.38975	2327.3825
4	2237.34521	3740.38565
5	56071.9989	992.392071
6	2897.58218	92.3305471
7	2356.76052	2908.92276
8	2723.86611	1576.24125
9	761.99508	588.802842
10	2067.6572	339.381529
11	1285.88219	

Gráfica 13. valores absolutos de linfocitos TCM CD8

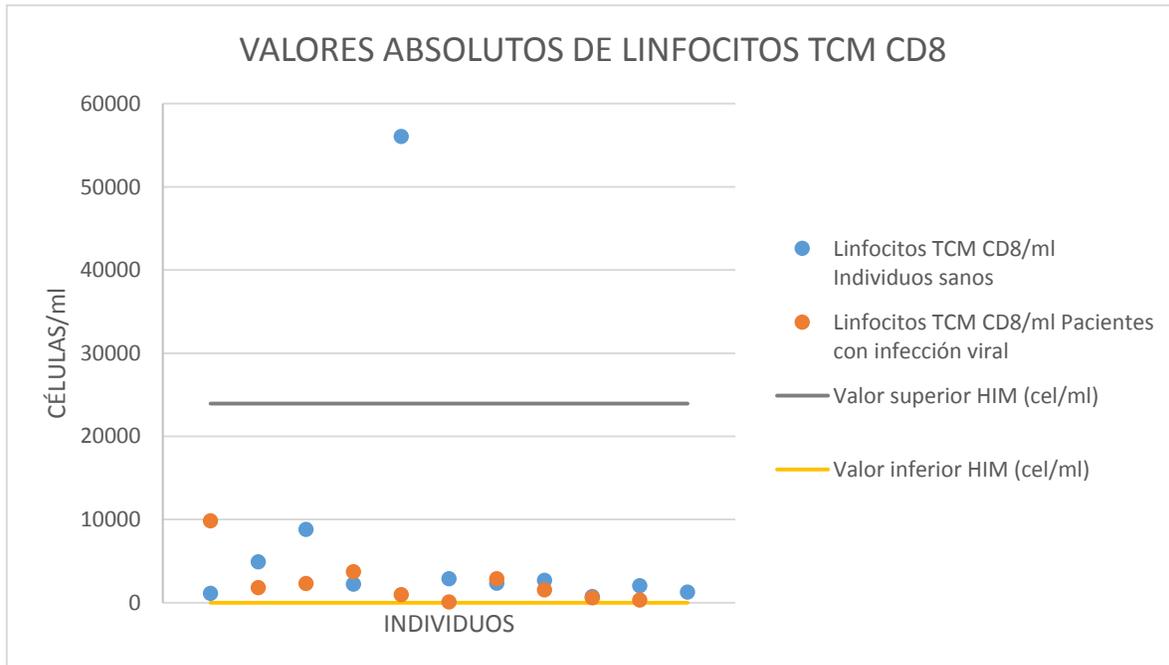


Tabla 24. Valores absolutos de linfocitos TEM CD8

No. de muestra	Linfocitos TEM CD8/ml Individuos sanos	Linfocitos TEM CD8/ml Pacientes con infección viral
1	91183.7372	836315.64
2	50002.9816	80149.6112
3	33734.6516	31092.3756
4	32348.2828	57377.5158
5	76220.8022	54647.7234
6	122308.469	13449.483
7	38998.7752	81650.4526
8	49979.7758	8740.97421
9	12330.4658	16242.837
10	31664.6931	31336.2279
11	53078.3593	

Gráfica 14. Valores absolutos de linfocitos TEM CD8

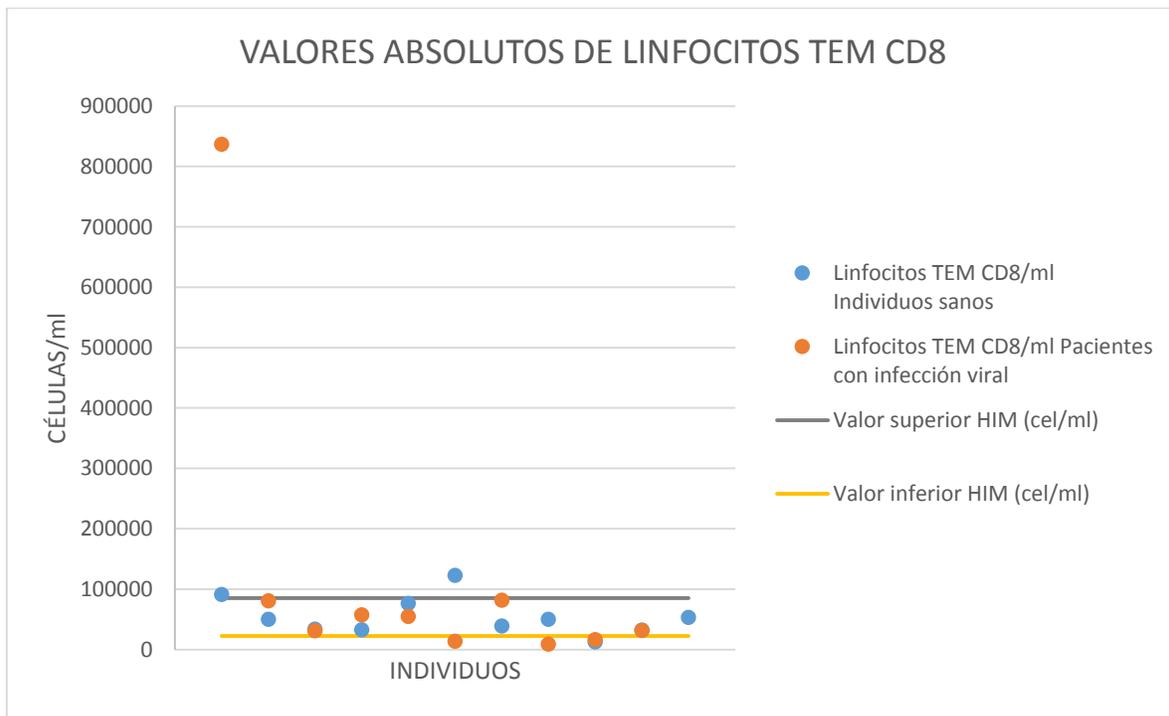


Tabla 25. Valores absolutos de linfocitos T CD4 activados

No. de muestra	Linfocitos T CD4 ACTIVADOS/ml Individuos sanos	Linfocitos T CD4 ACTIVADOS/ml Pacientes con infección viral
1	1233.65634	2956.15625
2	1065.83247	1799.62416
3	460.144994	8383.57538
4	1601.166	5306.179
5	2058.70918	1666.29175
6	4902.01425	113.293896
7	1929.86675	1387.89761
8	6728.78348	6455.40524
9	1360.75207	2142.38157
10	1663.93012	7458.009
11	756.079913	

Gráfica 15. Valores absolutos de linfocitos T CD4 activados

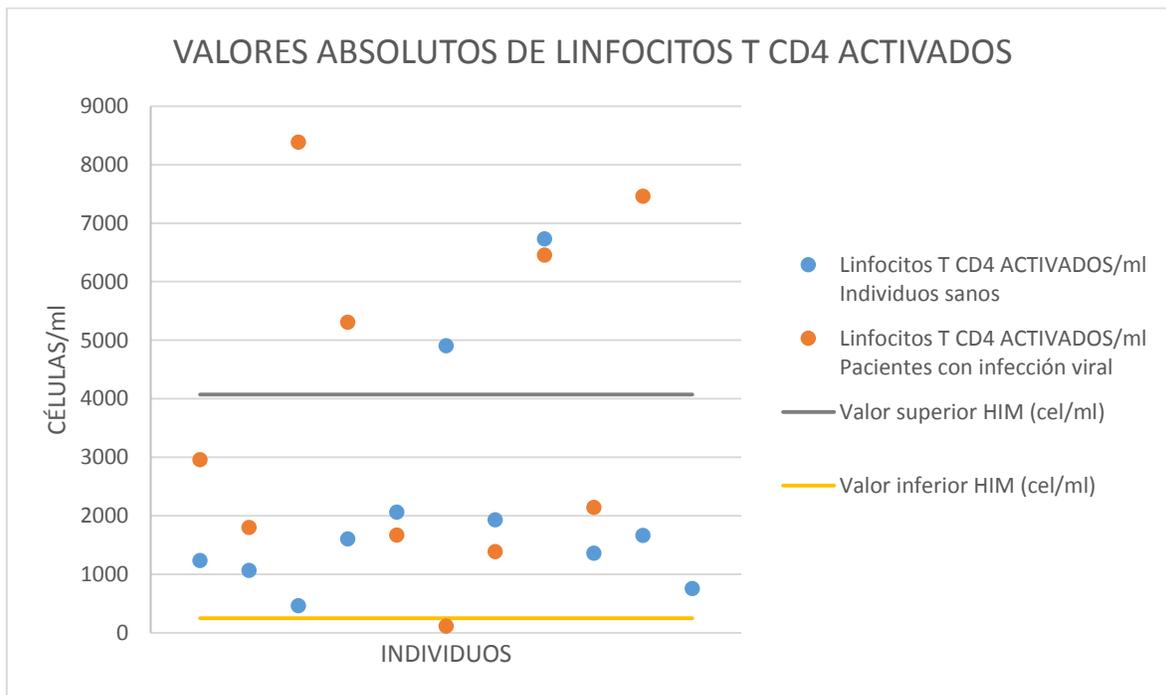


Tabla 26. Valores absolutos de linfocitos T CD8 activados

No. de muestra	Linfocitos T CD8 ACTIVADOS/ml Individuos sanos	Linfocitos T CD8 ACTIVADOS/ml Pacientes con infección viral
1	2954.13514	10394.5263
2	4174.45024	4772.17227
3	972.371195	10657.2866
4	1620.22702	3745.82601
5	4349.35114	12000.4649
6	4732.4228	727.249783
7	3472.10792	4229.0969
8	17750.3553	2853.83134
9	572.990418	2389.28316
10	4328.16349	5066.90713
11	2188.91637	

Gráfica 16. Valores absolutos de linfocitos T CD8 activados

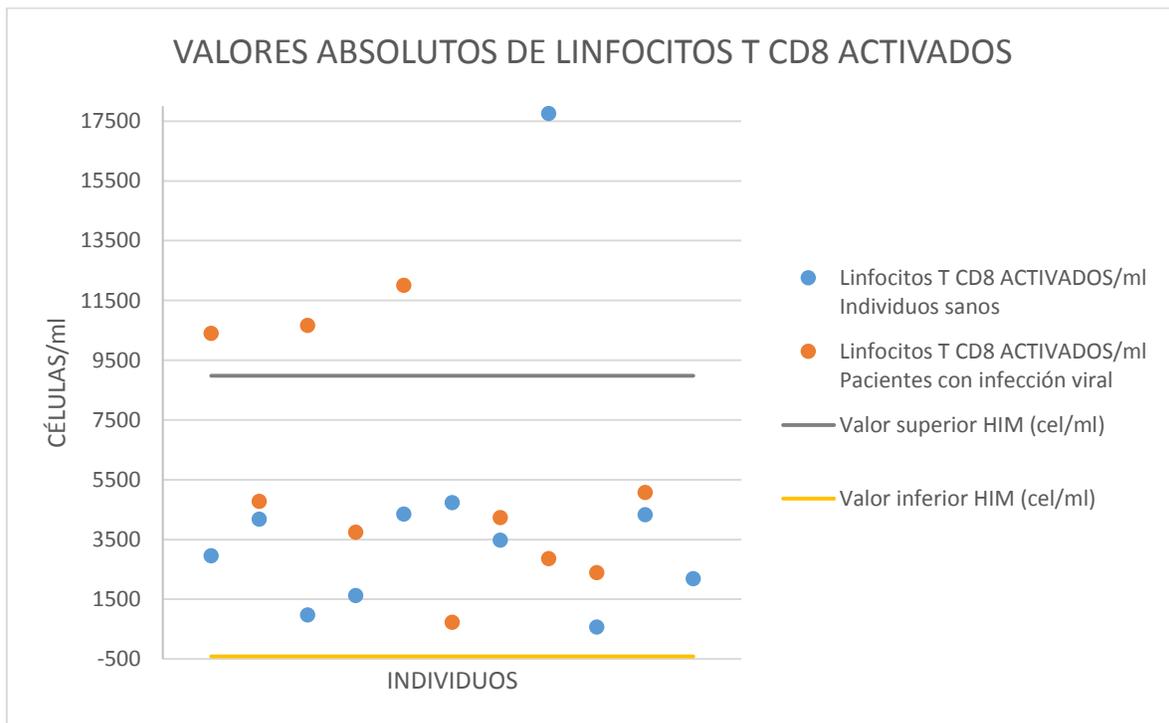
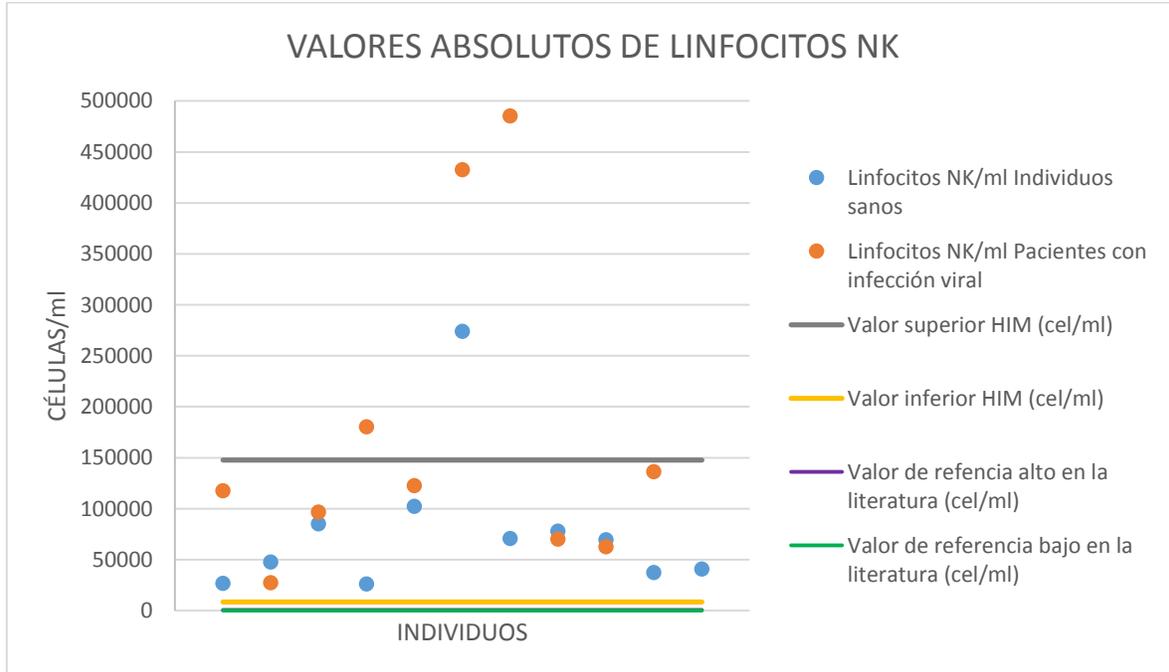


Tabla 27. Valores absolutos de linfocitos NK

No. de muestra	Linfocitos NK/ml Individuos sanos	Linfocitos NK/ml Pacientes con infección viral
1	26854.7184	117812.8
2	47943.324	27448.2
3	85174.74	96868.8
4	26319.566	180450
5	102466.179	122793
6	274222.08	432590
7	70948.864	485616
8	78219.603	70228
9	69507.9	62844.5
10	37537.6464	136468.8
11	41030.22	

Gráfica 17. Valores absolutos de linfocitos NK



### 5.4.5 Valores porcentuales de las subpoblaciones de linfocitos T

Tabla 28. Porcentaje de linfocitos totales

No. de muestra	%Linfocitos Individuos sanos	%Linfocitos Pacientes con infección viral
1	28.3	62.8
2	38.6	29.9
3	30	16.8
4	30.8	40.1
5	24.9	30.5
6	33.1	5
7	54.1	45.3
8	26.4	18.1
9	31.7	21.5
10	30.4	23.4
11	39.2	

Gráfica 18. Porcentaje de linfocitos totales

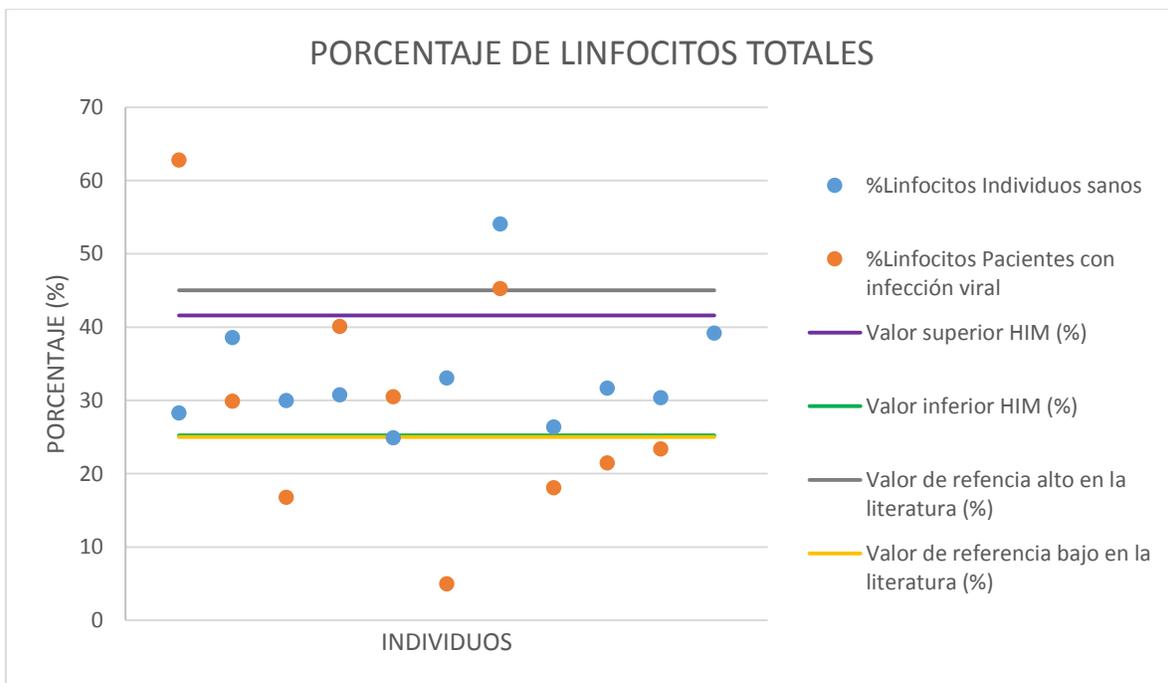


Tabla 29. Porcentaje de linfocitos T

No. de muestra	%Linfocitos T CD3 Individuos sanos	%Linfocitos T CD3 Pacientes con infección viral
1	18.3	54.8
2	20.1	23.9
3	20.5	26.9
4	17	27.4
5	14.7	20.3
6	14.2	3.8
7	27.4	27.2
8	15.1	14
9	26.1	11
10	21.4	16
11	20.4	

Gráfica 19. Porcentaje de linfocitos T

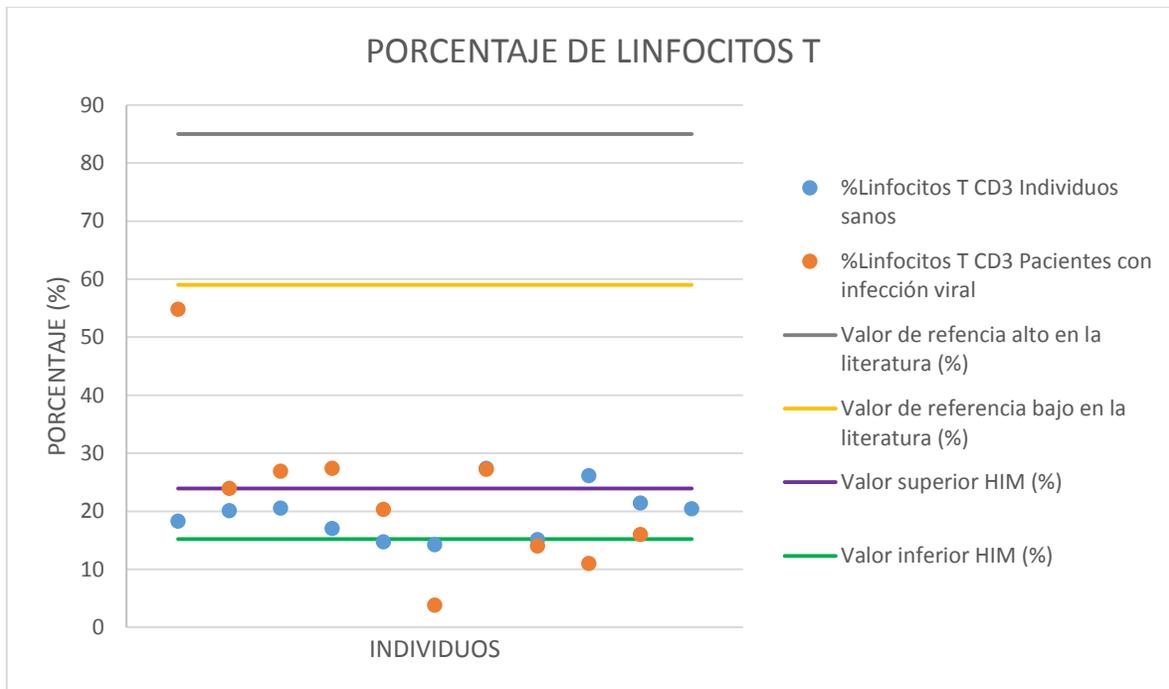


Tabla 30. Porcentaje de linfocito T CD4

No. de muestra	%Linfocitos T CD4 Individuos sanos	%Linfocitos T CD4 Pacientes con infección viral
1	68.9	3.7
2	52.4	22.9
3	55.3	52.4
4	55.8	54.6
5	41.4	51.7
6	48.5	23.8
7	60	46.4
8	51.7	59.4
9	43.9	59.4
10	58.8	52
11	60.2	

Gráfica 20. Porcentaje de linfocitos T CD4

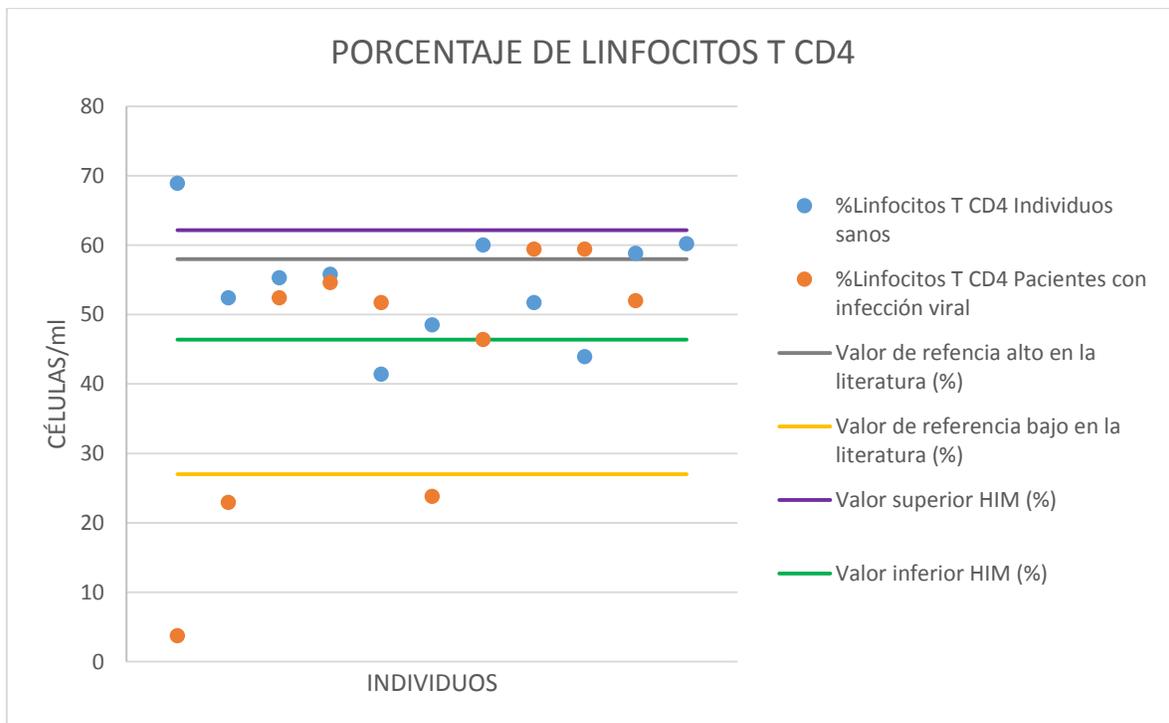


Tabla 31. Porcentaje de linfocitos T CD8

No. de muestra	%Linfocitos T CD8 Individuos sanos	%Linfocitos T CD8 Pacientes con infección viral
1	30.9	95.9
2	47.5	76.8
3	44.4	45.7
4	52.9	44.5
5	58.1	47.9
6	50.8	76.1
7	39.6	53
8	48.1	39.6
9	55.6	40.1
10	40.9	47.1
11	39.7	

Gráfica 19. Porcentaje de linfocitos T CD8

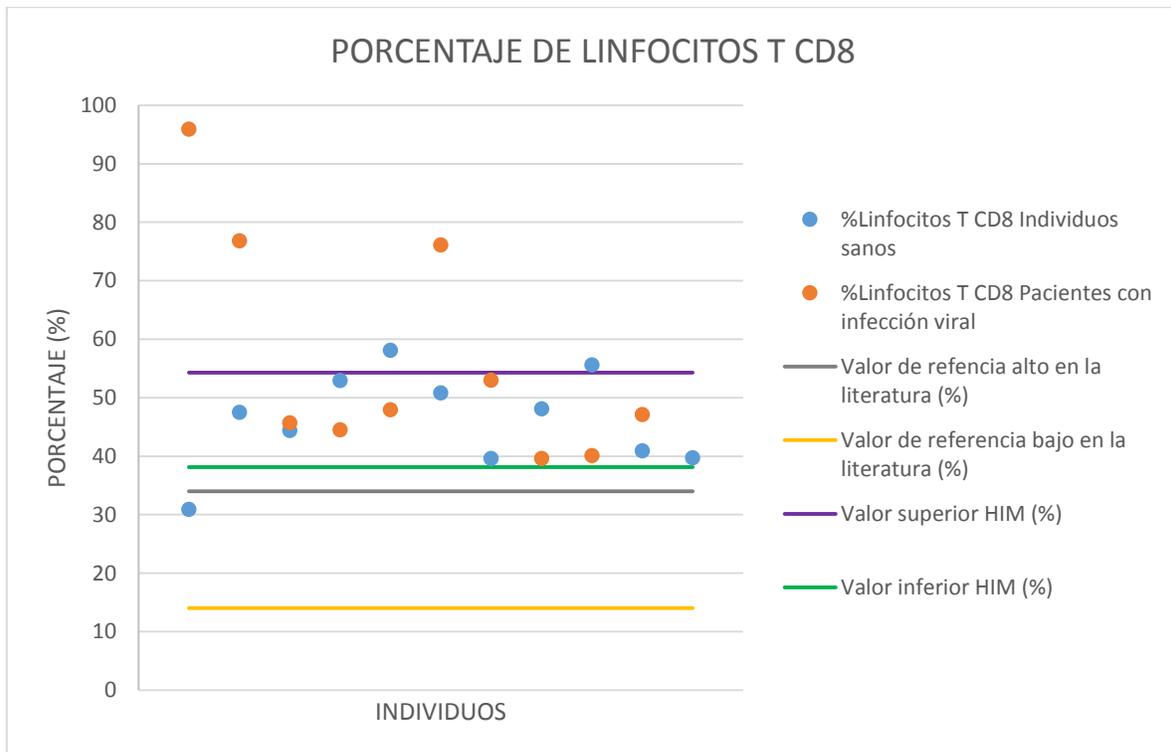


Tabla 32. Porcentaje de linfocitos T CD4 vírgenes

No. de muestra	%Linfocitos T vírgenes CD4 Individuos sanos	%Linfocitos T vírgenes CD4 Pacientes con infección viral
1	94.6	39
2	93.6	26
3	86.2	25.3
4	92.6	38.8
5	87	45.7
6	86.8	12
7	93.4	87.5
8	92.5	85.8
9	85.1	4.6
10	95.7	23
11	96.1	

Gráfica 22. Porcentaje de linfocitos T CD4 vírgenes

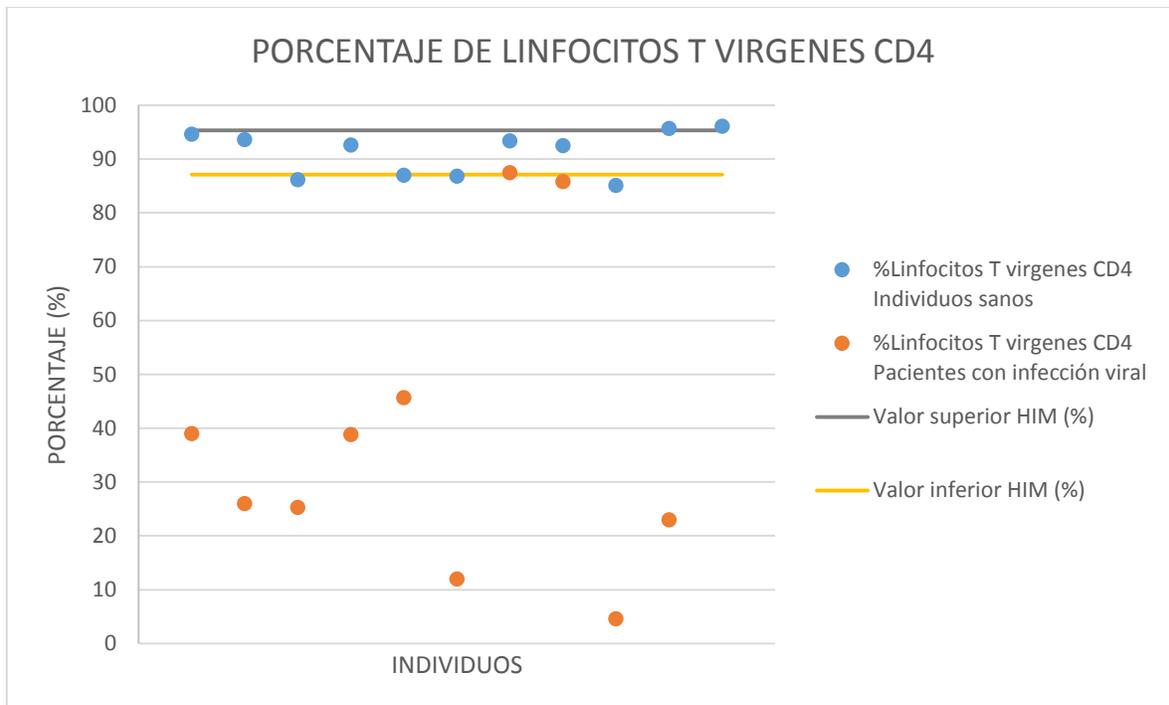


Tabla 33. Porcentaje de linfocitos T CD4 efectores

No. de muestra	%Linfocitos T efectores CD4 Individuos sanos	%Linfocitos T efectores CD4 Pacientes con infección viral
1	2.5	11
2	4.3	17.8
3	11	6.5
4	0.3	10.4
5	9.2	2.1
6	10.6	8.7
7	3.8	8.3
8	5.5	5.5
9	3.2	5
10	3.3	33.9
11	2.8	

Gráfica 23. Porcentaje de linfocitos T CD4 efectores

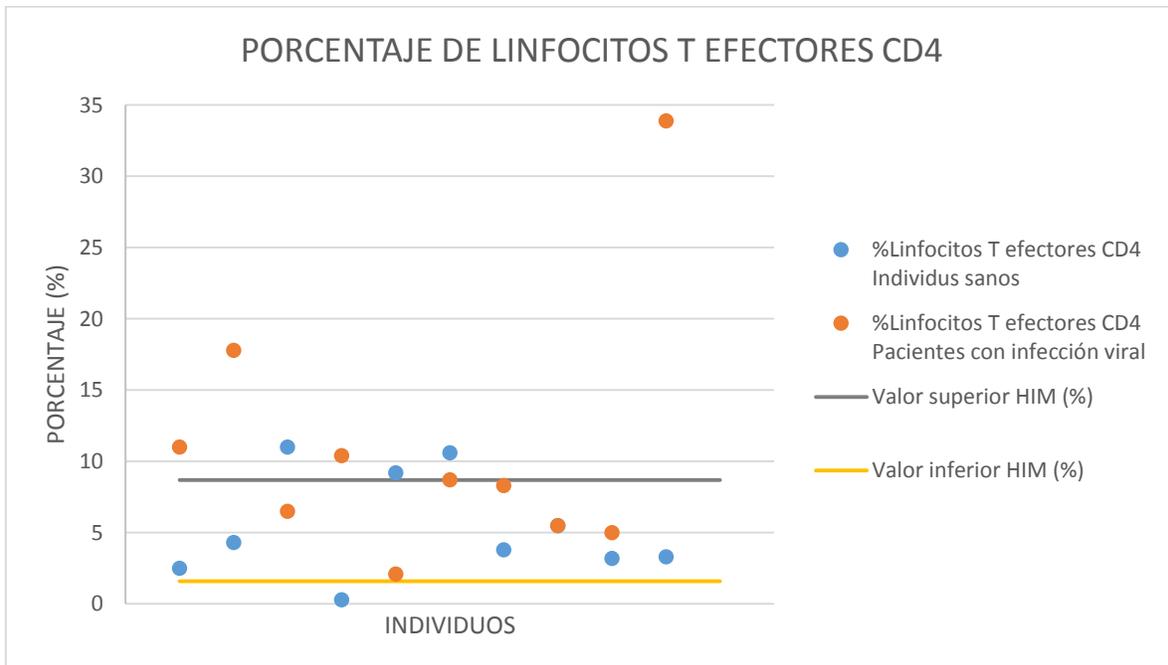


Tabla 34. Porcentaje de linfocitos TCM CD4

No. de muestra	%Linfocitos TCM CD4 Individuos sanos	%Linfocitos TCM CD4 Pacientes con infección viral
1	63.9	64.6
2	71.3	6.1
3	62.3	19.8
4	52.9	23.2
5	5.4	3.8
6	44.8	18.4
7	45.1	4.5
8	18.7	48.6
9	23.4	15.1
10	62.7	6.9
11	57.5	

Gráfica 24. Porcentaje de linfocitos TCM CD4

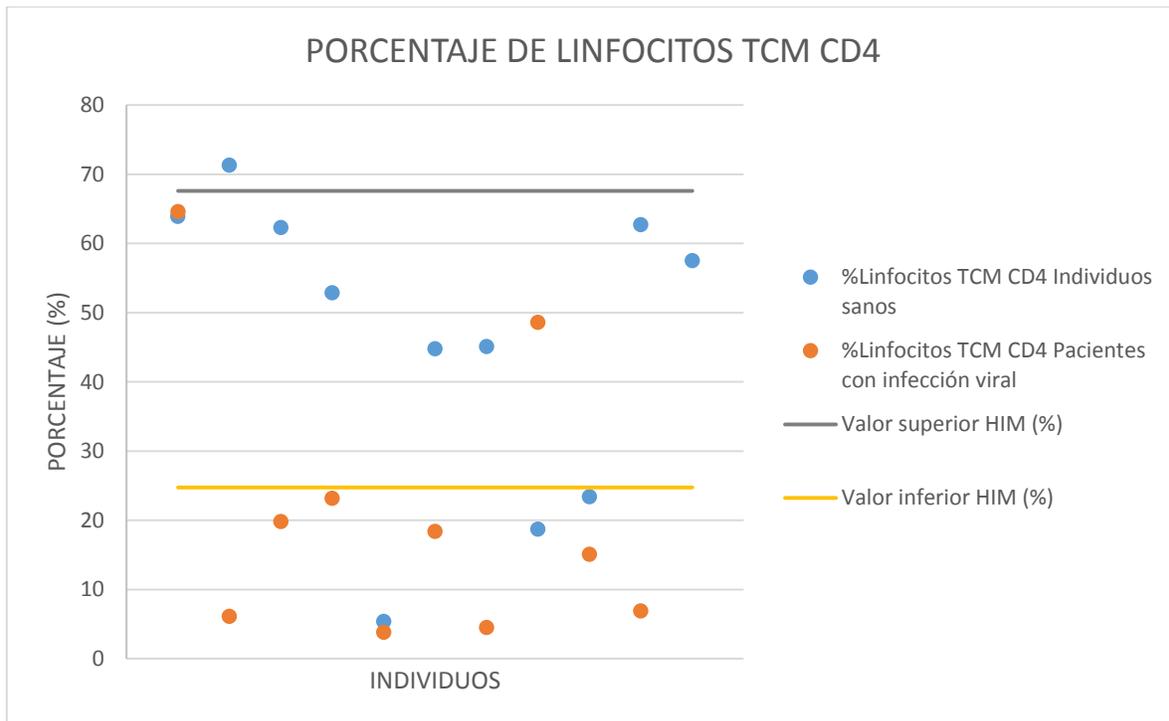


Tabla 35. Porcentaje de linfocitos TEM CD4

No. de muestra	%Linfocitos TEM CD4 Individuos sanos	%Linfocitos TEM CD4 Pacientes con infección viral
1	35.7	18.8
2	25.3	89.8
3	35.2	72.9
4	42.7	69
5	45.9	59.8
6	39.5	72.4
7	41.9	63.9
8	41.1	31.5
9	44	75
10	37.1	71.6
11	32.7	

Gráfica 25. Porcentaje de linfocitos TEM CD4

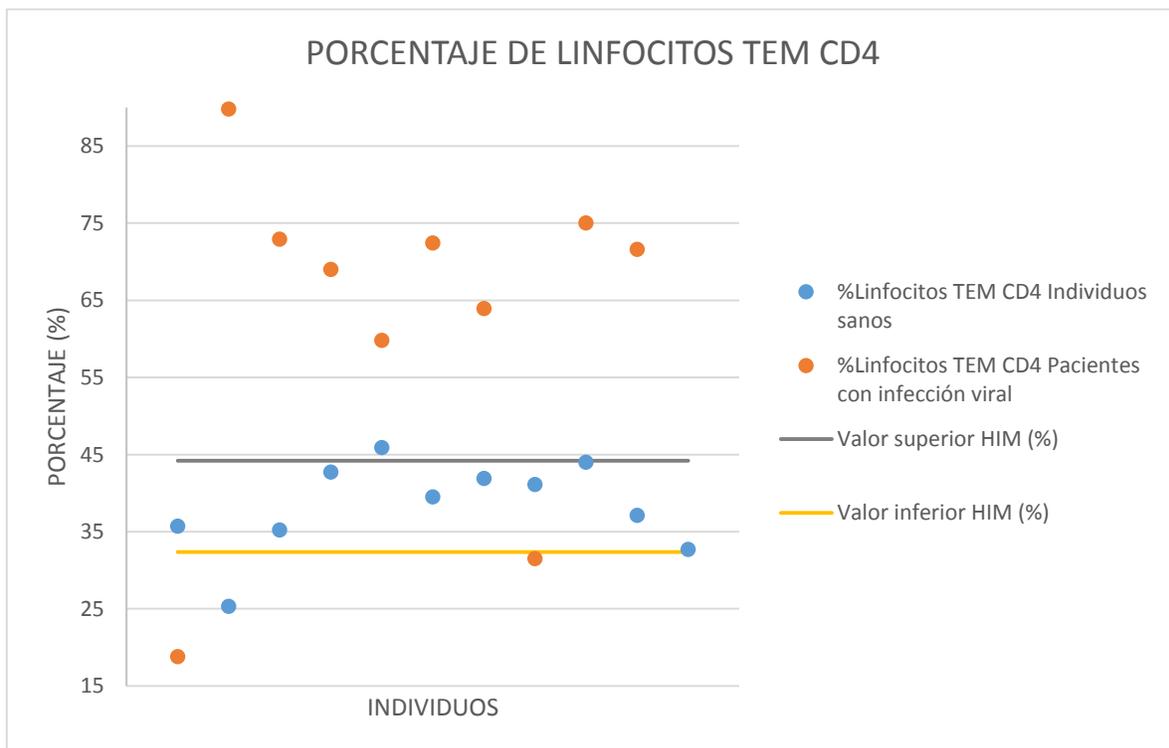


Tabla 36. Porcentaje de linfocitos T CD8 vírgenes

No. de muestra	%Linfocitos T vírgenes CD8 Individuos sanos	%Linfocitos T vírgenes CD8 Pacientes con infección viral
1	68.1	8.6
2	76.3	2.9
3	43.4	6.2
4	41.5	8
5	56.4	23.9
6	67.8	5.3
7	70	26.7
8	81.3	86.3
9	34.4	14.8
10	61.1	10.4
11	78.7	

Gráfica 26. Porcentaje de linfocitos T CD8 vírgenes

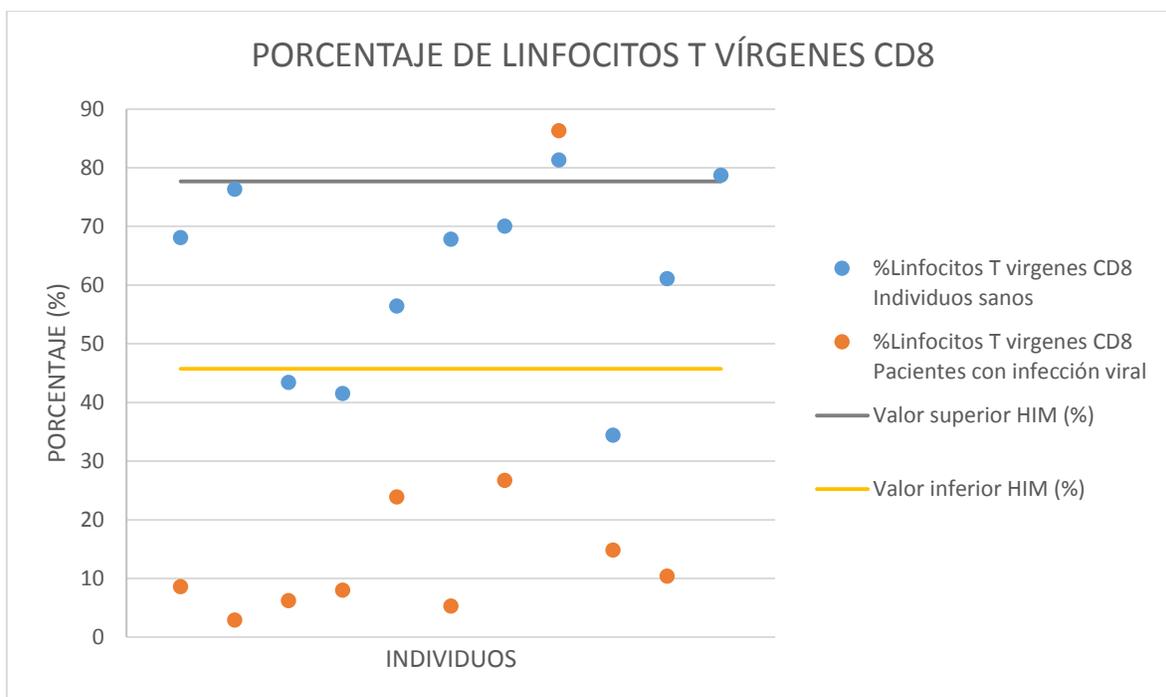


Tabla 37. Porcentaje de linfocitos T CD8 efectores

No. de muestra	%Linfocitos T efectores CD8 Individuos sanos	%Linfocitos T efectores CD8 Pacientes con infección viral
1	13.2	6.5
2	12.6	6.7
3	17.7	10.3
4	26	25.5
5	20.2	20.5
6	19.4	13.5
7	15.1	27
8	6.7	8.4
9	20.1	7.5
10	16.4	16.7
11	10.2	

Gráfica 27. Porcentaje de linfocitos T CD8 efectores

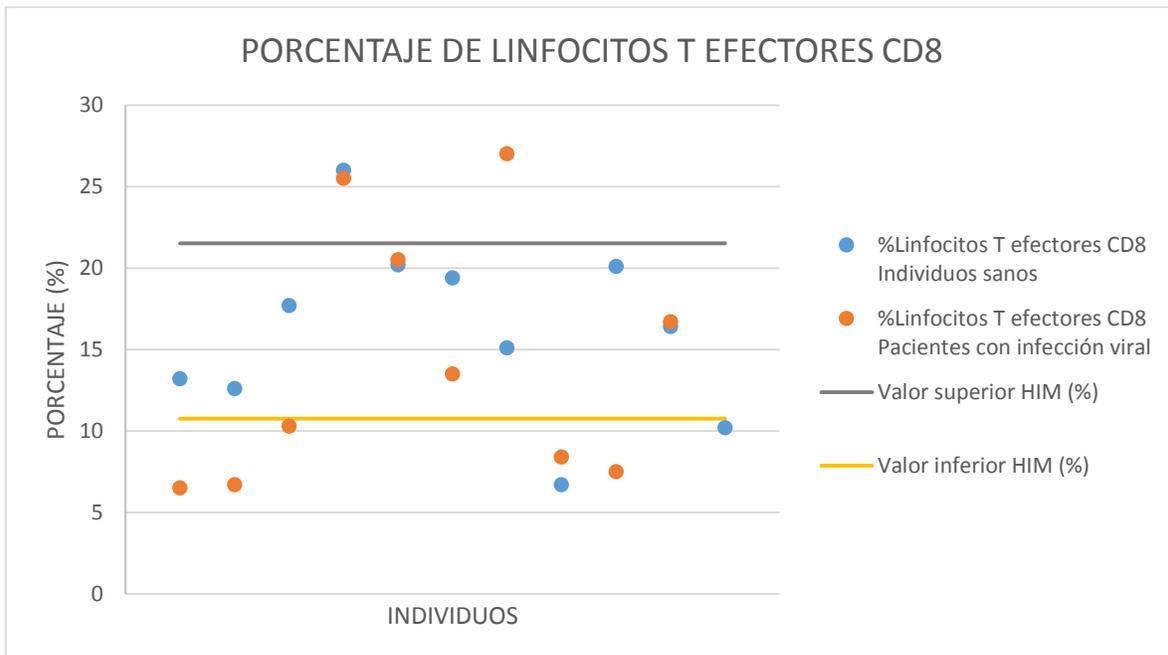


Tabla 38. Porcentaje de linfocitos TCM CD8

No. de muestra	%Linfocitos TCM CD8 Individuos sanos	%Linfocitos TCM CD8 Pacientes con infección viral
1	56.1	1.1
2	74.1	1.7
3	65.7	6.4
4	4.4	5
5	45.2	1.5
6	52.1	0.6
7	55	2.9
8	45.8	11
9	57.8	2.9
10	33.8	0.9
11	76.1	

Gráfica 28. Porcentaje de linfocitos TCM CD8

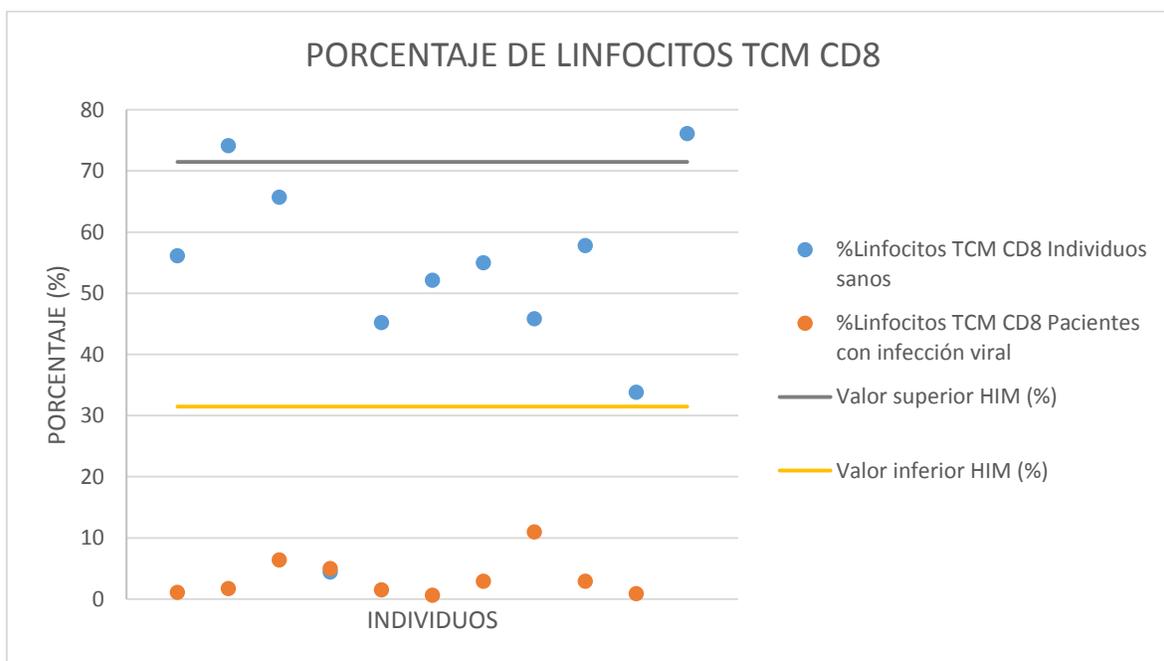


Tabla 39. Porcentaje de linfocitos TEM CD8

No. de muestra	%Linfocitos TEM CD8 Individuos sanos	%Linfocitos TEM CD8 Pacientes con infección viral
1	4.8	93.3
2	3.5	74.4
3	13.9	85.5
4	71.2	76.7
5	1.8	82.6
6	4.3	87.4
7	1.9	81.4
8	7.9	61
9	0.9	80
10	42.3	83.1
11	4.2	

Gráfica 29. Porcentaje de linfocitos TEM CD8

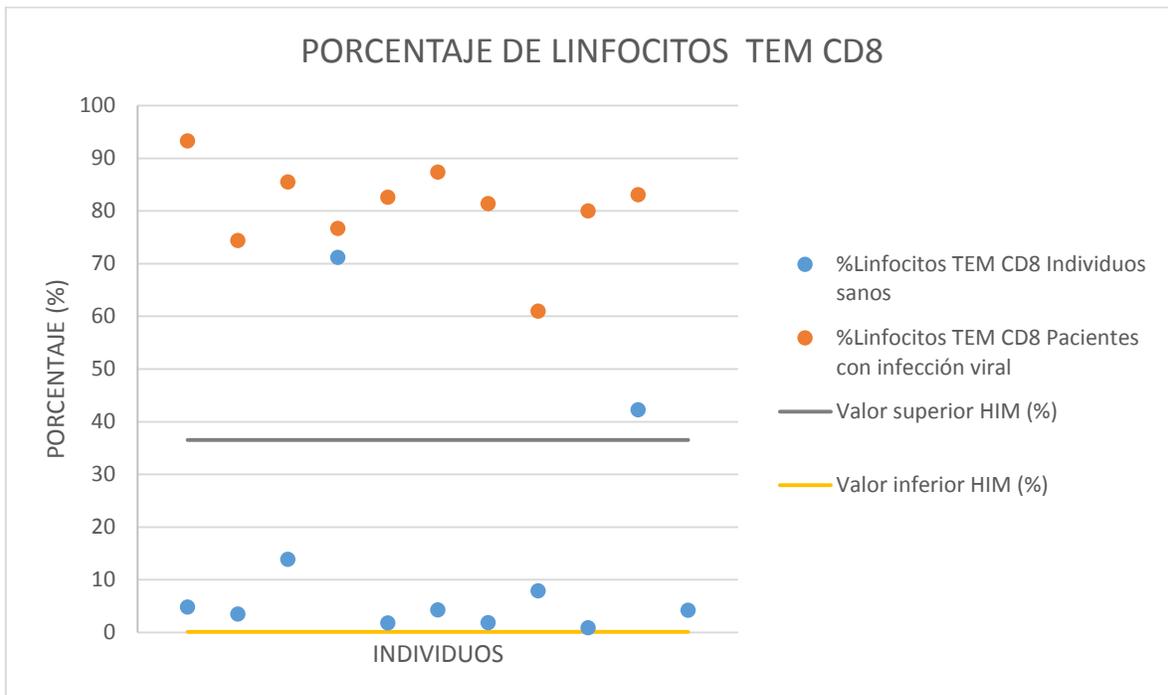


Tabla 40. Porcentaje de linfocitos T CD4 activados

No. de muestra	%Linfocitos T CD4 ACTIVADOS Individuos sanos	%Linfocitos T CD4 ACTIVADOS Pacientes con infección viral
1	1.1	73.5
2	1.6	4.7
3	0.4	10.9
4	2	3.2
5	1.2	1.5
6	3.7	2.5
7	2.5	0.7
8	1.4	24.5
9	1	4.5
10	1.1	9.6
11	1.4	

Gráfica 29. Porcentaje de linfocitos T CD4 activados

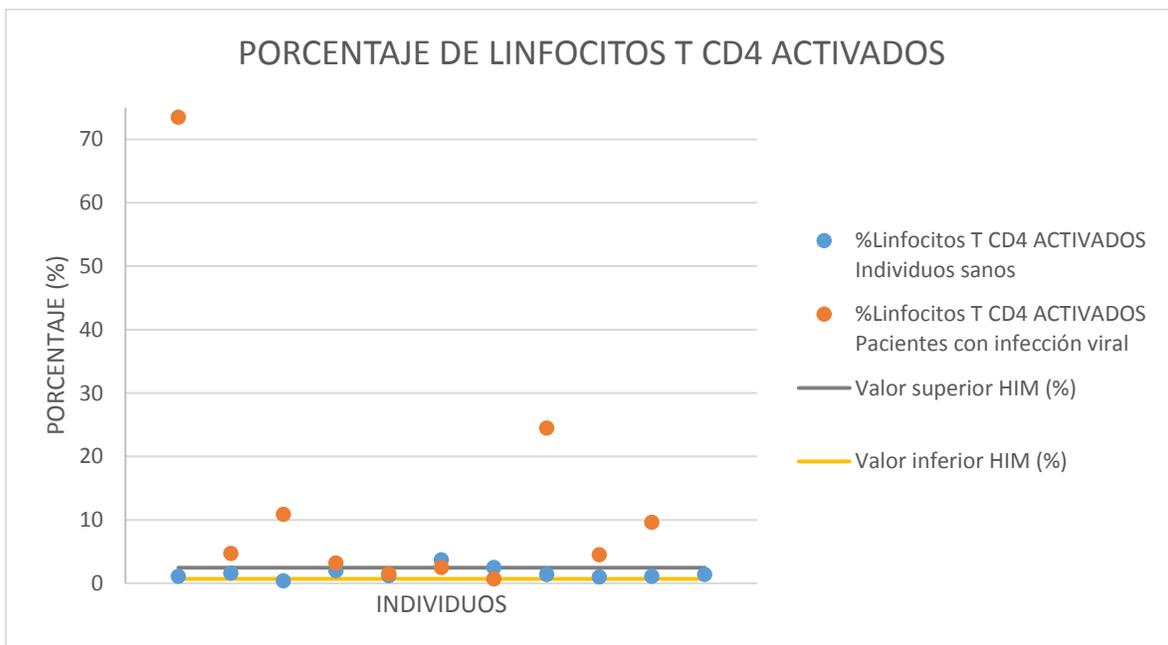


Tabla 41. Porcentaje de linfocitos T CD8 activados

No. de muestra	%Linfocitos T CD8 ACTIVADOS Individuos sanos	%Linfocitos T CD8 ACTIVADOS Pacientes con infección viral
1	4.2	1.7
2	10.9	5.1
3	2.4	29.7
4	5.6	7.3
5	4	20.4
6	9.7	4.4
7	4.6	6.4
8	7.7	24.5
9	5	15.3
10	4.5	15.2
11	7.8	

Gráfica 30. Porcentaje de linfocitos T CD8 activados

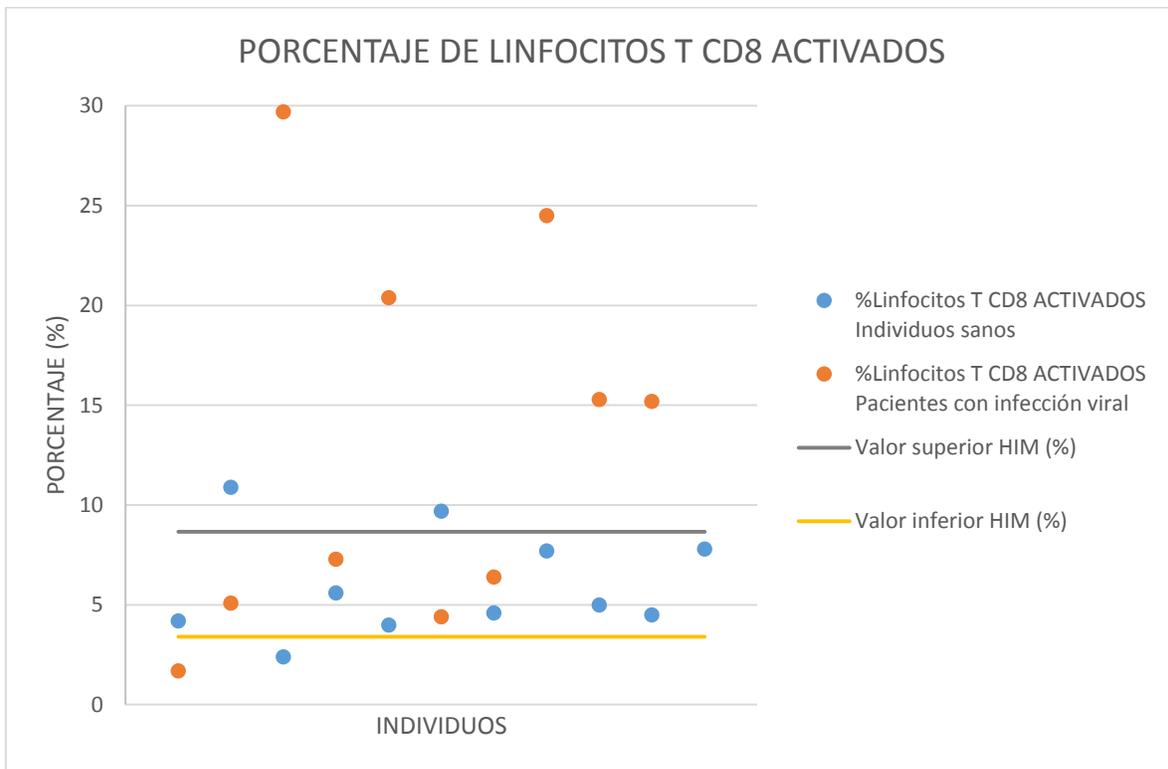
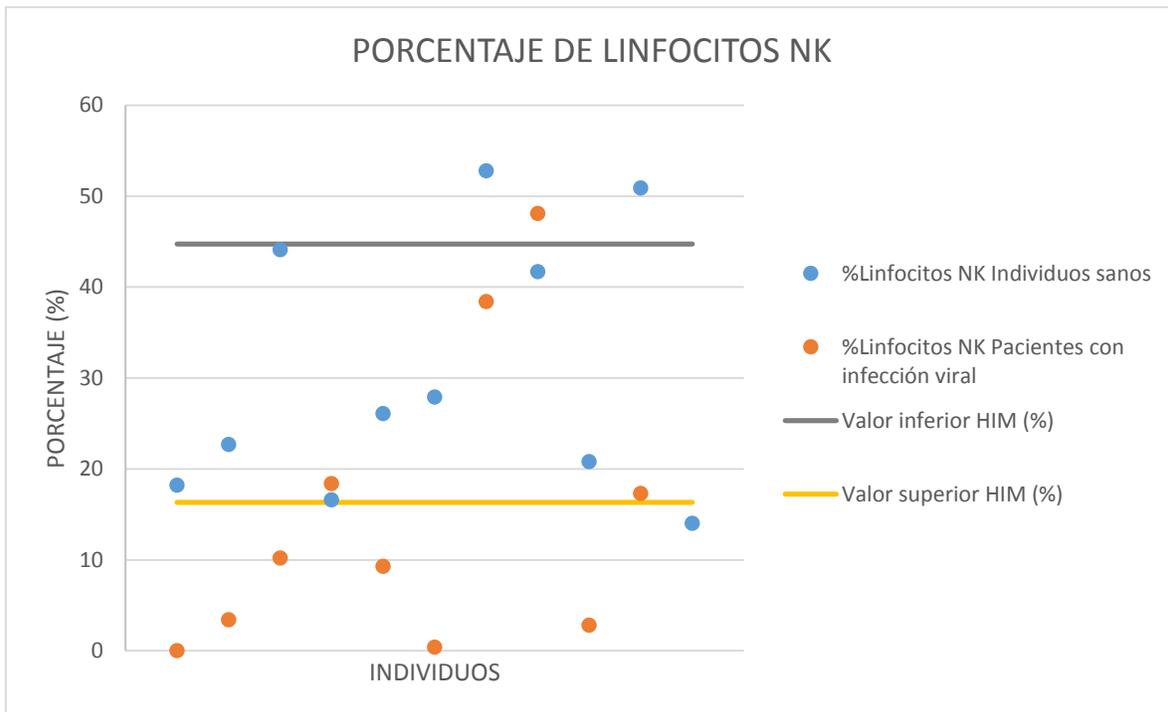


Tabla 42. Porcentaje de linfocitos NK

No. de muestra	%Linfocitos NK Individuos sanos	%Linfocitos NK Pacientes con infección viral
1	18.2	0
2	22.7	3.4
3	44.1	10.2
4	16.6	18.4
5	26.1	9.3
6	27.9	0.4
7	52.8	38.4
8	41.7	48.1
9	20.8	2.8
10	50.9	17.3
11	14	

Gráfica 31. Porcentaje de linfocitos NK



### 5.4.6 MFI de las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria

Tabla 43. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 vírgenes

No. de muestra	Linfocitos T vírgenes CD4 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos T vírgenes CD4 (MFI) Pacientes con infección viral
1	152	5306
2	656	384
3	448	6694
4	60	2621
5	674	519
6	532	2688
7	285	72
8	215	172
9	645	564
10	448	316
11	476	

Gráfica 32. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 vírgenes

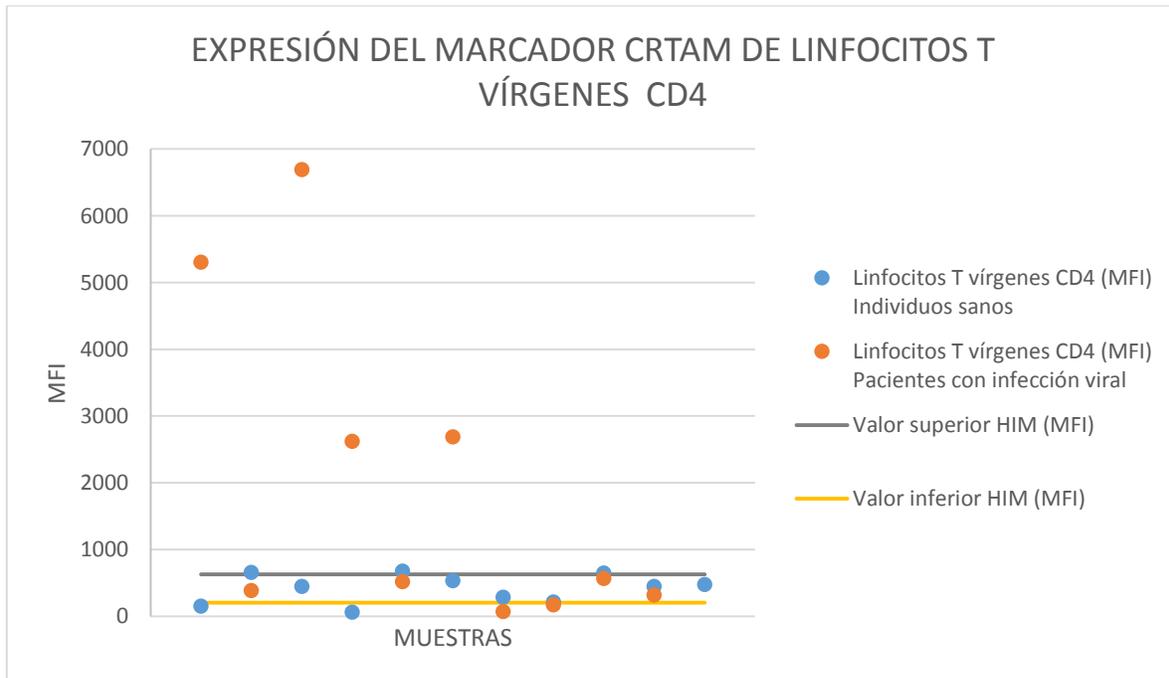


Tabla 44. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 efectores

No. de muestra	Linfocitos T Efectores CD4 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos T Efectores CD4 (MFI) Pacientes con infección viral
1	81	931
2	982	727
3	307	8185
4	17	603
5	9.2	205
6	299	93
7	214	49
8	222	108
9	341	575
10	250	174
11	333	

Gráfica 33. MFI del marcador CRTAM en linfocitos T CD4 efectores

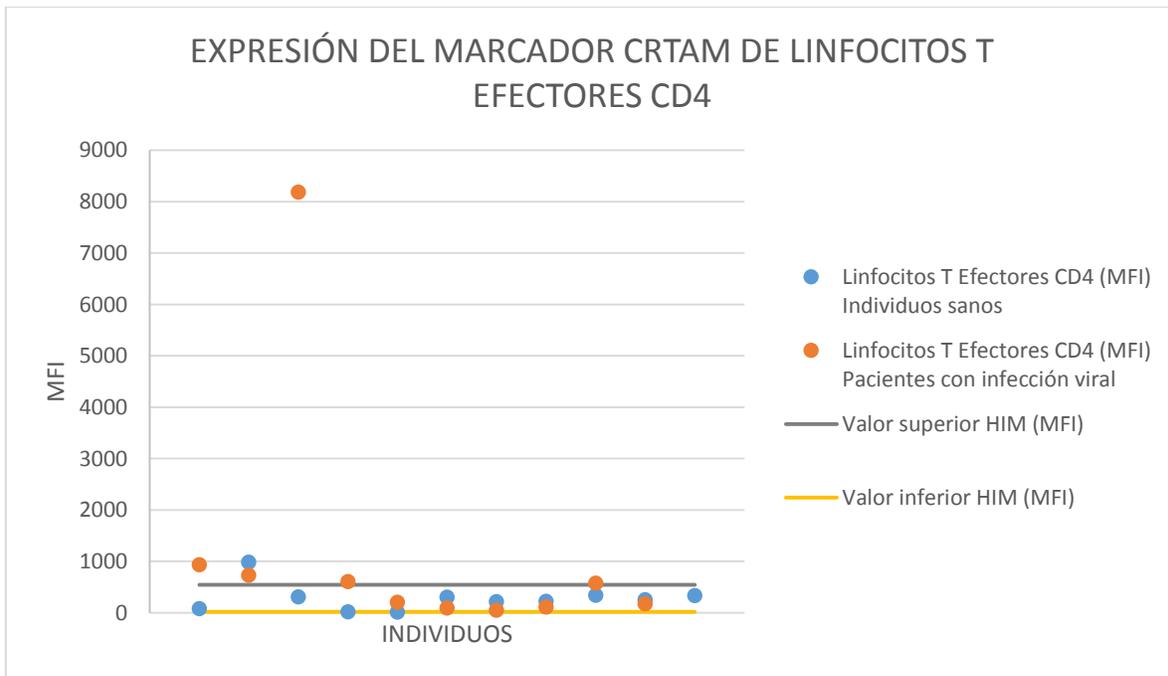


Tabla 45. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TCM CD4

No. de muestra	Linfocitos TCM CD4 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos TCM CD4 (MFI) Pacientes con infección viral
1	180	4596
2	1012	2195
3	288	8185
4	203	3065
5	1849	4488
6	441	1206
7	355	602
8	224	741
9	718	340
10	330	956
11	512	

Gráfica 34. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TCM CD4

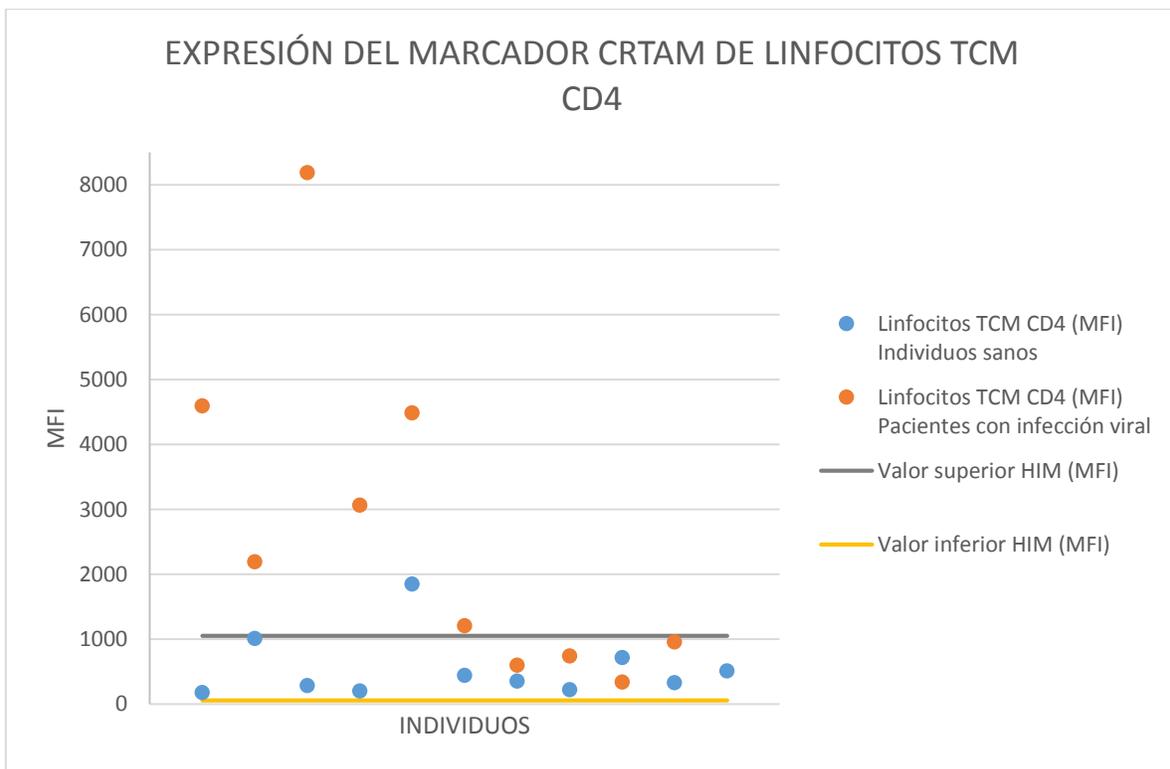


Tabla 46. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TEM CD4

No. de muestra	Linfocitos TEM CD4 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos TEM CD4 (MFI) Pacientes con infección viral
1	68	471
2	67	441
3	56	130
4	37	132
5	55	87
6	110	39
7	48	44
8	48	79
9	55	65
10	48	65
11	135	

Tabla 35. MFI del marcador CRTAM en linfocitos TEM CD4

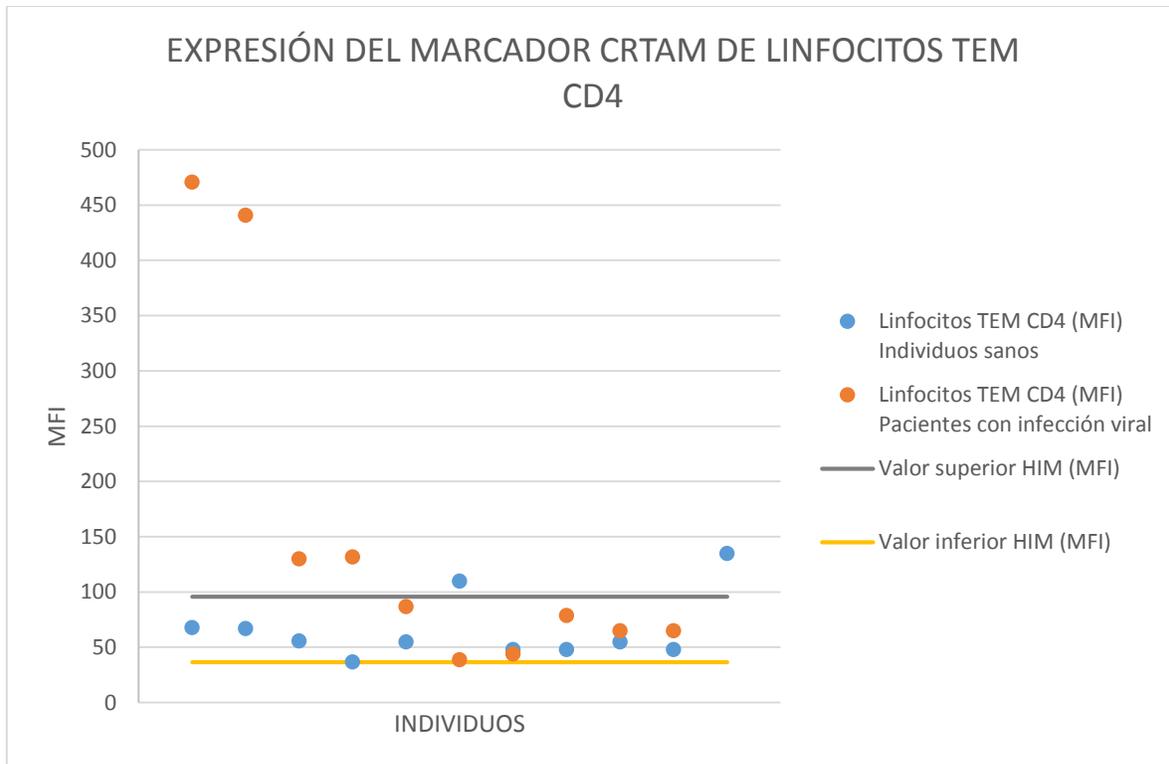


Tabla 47. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 vírgenes

No. de muestra	Linfocitos T vírgenes CD8 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos T vírgenes CD8 (MFI) Pacientes con infección viral
1	225	628
2	570	1388
3	627	1843
4	132	2524
5	671	319
6	689	178
7	248	66
8	258	186
9	651	256
10	492	311
11	478	

Gráfica 36. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 vírgenes

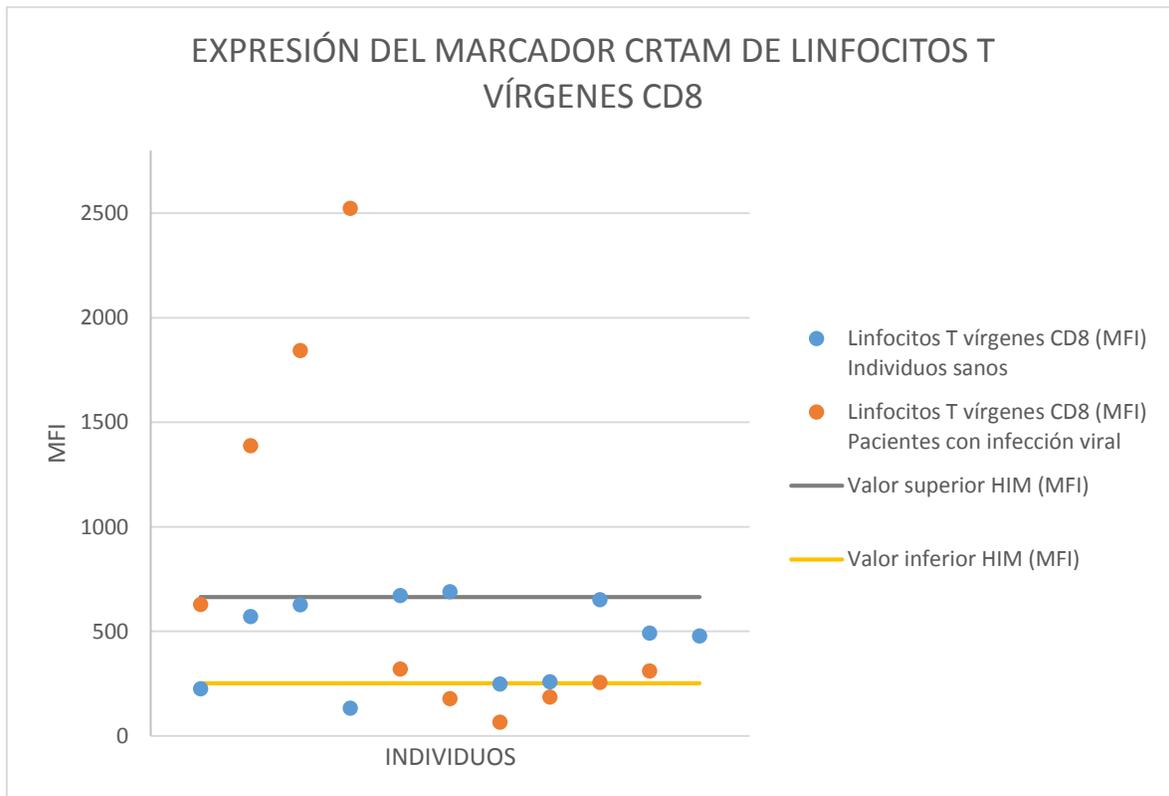


Tabla 48. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 efectores

No. de muestra	Linfocitos T Efectores CD8 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos T Efectores CD8 (MFI) Pacientes con infección viral
1	163	1215
2	695	659
3	243	265
4	80	406
5	397	179
6	372	129
7	204	118
8	162	733
9	253	341
10	269	208
11	290	

Gráfica 37. MFI del marcador CRTAM en linfocito CD8 efectores

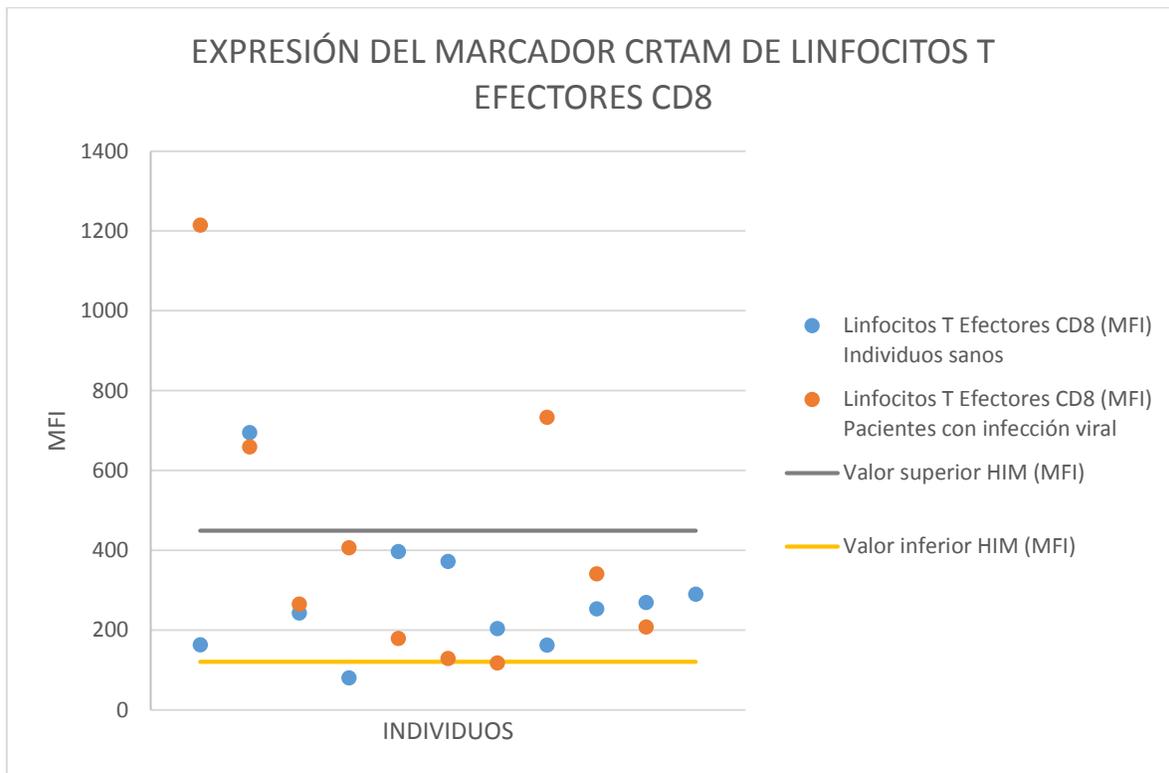


Tabla 49. MFI del marcador CRTAM en linfocito TCM CD8

No. de muestra	Linfocitos TCM CD8 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos TCM CD8 (MFI) Pacientes con infección viral
1	726	2273
2	1102	1225
3	1189	3835
4	2201	8922
5	2212	2422
6	1938	837
7	930	928
8	641	6677
9	1253	1584
10	252	609
11	632	

Gráfica 38. MFI del marcador CRTAM en linfocito TCM CD8

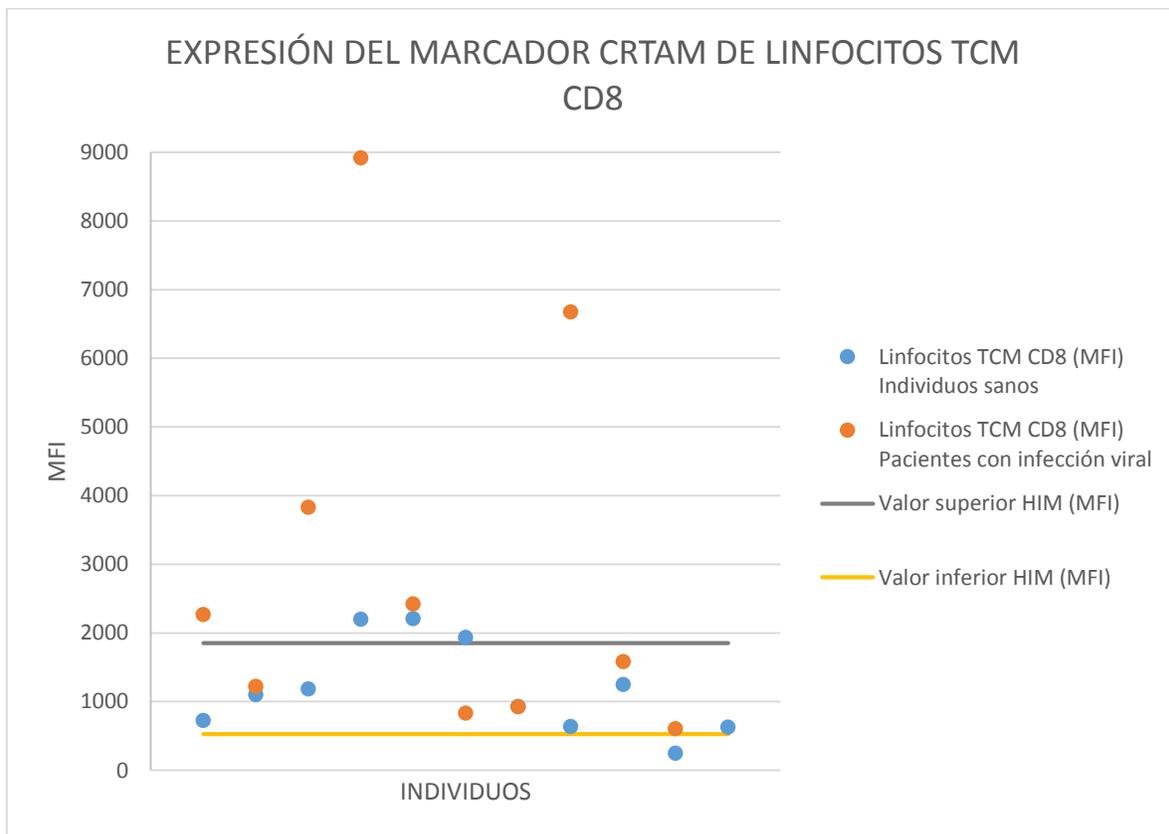
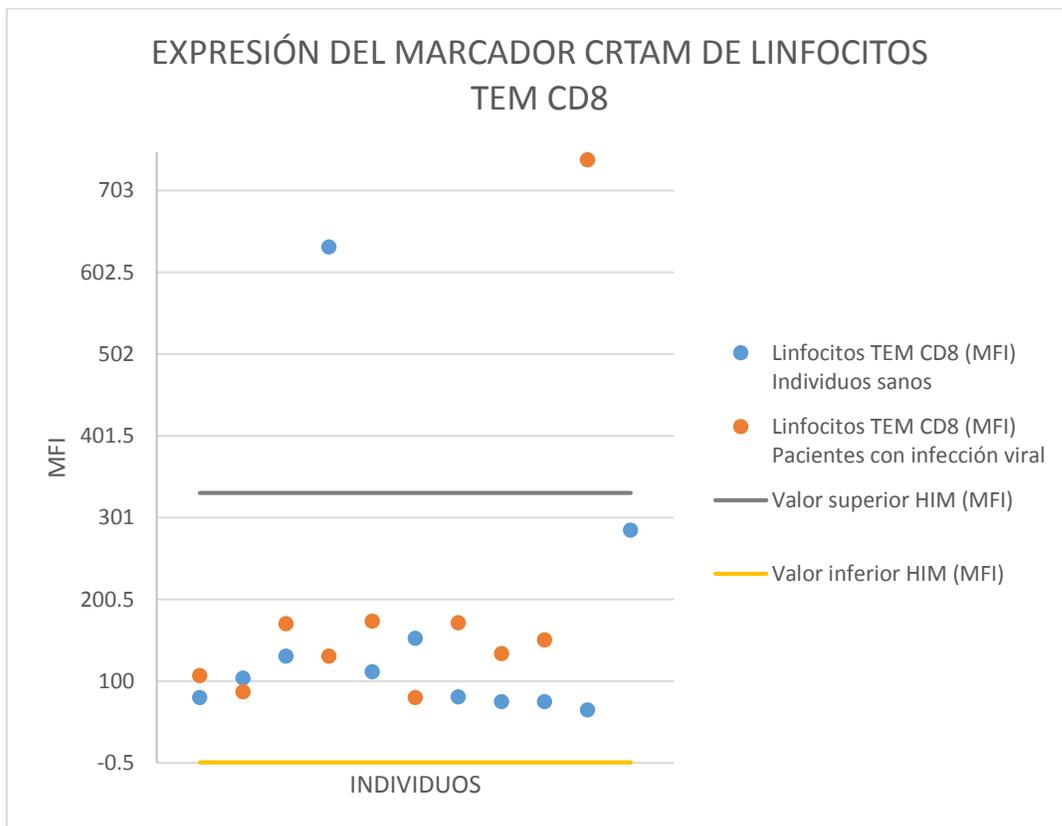


Tabla 50. MFI del marcador CRTAM en linfocito TEM CD8

No. de muestra	Linfocitos TEM CD8 (MFI) Individuos sanos	Linfocitos TEM CD8 (MFI) Pacientes con infección viral
1	80	107
2	104	87
3	131	171
4	634	131
5	112	174
6	153	80
7	81	172
8	75	134
9	75	151
10	65	741
11	286	

Gráfica 39. MFI del marcador CRTAM en linfocito TEM CD8



### 5.4.7 Análisis estadístico de las subpoblaciones de linfocitos T en individuos clínicamente sanos y pacientes con infección viral.

Tabla 51. Análisis estadístico comparativo de los parámetros analizados en los dos grupos de individuos estudiados

Parámetro	Individuos sanos				Pacientes con infección viral				Resultado de la Prueba estadística t de Student	Significancia estadística
	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Mínimo	Máximo		
<b>Leucocitos totales (cel./ml)</b>	7409090.91	7400000	6000000	10100000	7310000	6400000	2700000	18100000	P=0.4616	$p \geq 0.05 = ns$
<b>Linfocitos totales (cel./ml)</b>	2465009.1	2317000	1716000	3959200	1750500	1728450	724000	3624000	P=0.0426	$p \leq 0.05 = si$
<b>Linfocitos T CD3 totales (cel./ml)</b>	495049.12	455100	259116	889404	421728.63	342271.2	34390	985728	P=0.1901	$p \geq 0.05 = ns$
<b>Linfocitos T CD4 totales (cel./ml)</b>	273432.61	260483.13	115167.68	533642.4	164488.45	128899.88	8184.82	457377.79	P=0.1904	$p \geq 0.05 = ns$
<b>Linfocitos T CD8 totales (cel./ml)</b>	220143.89	202064.4	116820.45	352203.98	254354.15	169315.66	26170.79	924095.47	P=0.0803	$p \geq 0.05 = ns$
<b>%Linfocitos totales</b>	33.41	30.8	24.9	54.1	29.34	26.65	5	62.8	P=0.2628	$p \geq 0.05 = ns$

<b>%Linfocitos T CD3</b>	19.56	20.1	14.2	27.4	22.53	22.1	3.8	54.8	P=0.4043	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos T CD4</b>	54.26	55.3	41.4	68.9	42.63	51.85	3.7	59.4	P=0.0785	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos T CD8</b>	46.23	47.5	30.9	58.1	56.67	47.5	39.6	95.9	P=0.0546	p≥0.05 = ns
<b>Relación CD4/CD8</b>	1.24	1.10	0.71	2.23	0.91	1.09	0.04	1.5	P=0.0566	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos T CD4 vírgenes (cel./ml)</b>	91.24	92.6	85.10	96.10	38.77	32.40	4.60	87.50	P=0.1086	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos T CD4 efectores</b>	5.14	3.80	0.30	11.00	10.92	8.5	2.1	33.9	P=0.1571	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos TCM CD4</b>	46.18	52.9	5.4	71.3	21.1	16.75	3.8	64.6	P=0.4300	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos TEM CD4</b>	38.28	39.5	25.3	45.9	62.47	70.3	18.8	89.8	P=0.2510	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos T CD4 vírgenes totales (cel./ml)</b>	133715	102395.6	37172.67	329884.7	41055.38	23352.26	503.86	201703.6	P=0.0585	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos T CD4 efectores totales (cel./ml)</b>	6105.52	4326.27	415.46	13066.72	9543.88	2801.207	365.29	42339.83	P=0.4658	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos TCM CD4</b>	56977.53	64302.78	3669.24	117272.6	11307.29	8117.41	822.28	43591.05	P=0.2840	p≥0.05 = ns

<b>totales (cel./ml)</b>										
<b>Linfocitos TEM CD4 totales (cel./ml)</b>	43923.62	36568.71	26208.04	80718.22	53003.59	4547.04	3235.49	139994. 7	P=0.3561	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocito s T CD8 vírgenes</b>	61.72	67.8	34.4	81.3	19.31	9.5	2.9	86.3	P=0.1008	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocito s T CD8 efectores</b>	16.15	16.4	6.7	26.0	14.26	11.9	6.5	27.0	P=0.0610	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocito s TCM CD8</b>	51.46	55.0	4.4	76.1	3.4	2.3	0.6	11.0	P=0.3564	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocito s TEM CD8</b>	14.24	4.3	0.9	71.2	80.54	82.0	61.0	93.3	P=0.3948	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos T CD8 vírgenes totales (cel./ml)</b>	81590.76	59039.88	41202.54	192038.1 5	21199.55	11516.75	600.6	108384. 01	P=0.0294	p≤0.05 = si
<b>Linfocitos T CD8 efectores totales (cel./ml)</b>	21595.39	23497.87	3824.54	40794.45	23776.41	6394.73	1529.81	109601. 82	P=0.3168	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos TCM CD8 totales (cel./ml)</b>	7754.58	2356.76	761.99	56071.99	2425.73	1702.81	92.33	9860.09	P=0.2911	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos TEM CD8</b>	53804.64	49979.77	12330.46	122308.4 7	121100.28	42991.97	8740.97	836315. 64	P=0.1406	p≥0.05 = ns

<b>totales (cel./ml)</b>										
<b>%Linfocitos T CD4 activados</b>	1.58	1.4	0.4	3.7	13.56	4.6	0.7	73.5	P=0.2017	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos T CD8 activados</b>	6.04	5.0	2.4	10.9	13.0	11.25	1.7	29.7	P=0.1078	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos T CD4 activados totales (cel./ml)</b>	2160.08	1601.17	460.14	6728.78	3766.88	2549.27	113.29	8383.57	P=0.4290	p≥0.05 = ns
<b>Linfocitos T CD8 activados totales (cel./ml)</b>	4283.23	3472.11	572.99	17750.35	5683.66	4500.63	727.25	12000.46	P=0.2377	p≥0.05 = ns
<b>%Linfocitos NK</b>	30.53	26.1	14.0	52.8	14.83	9.75	0.1	48.1	P=0.0259	p≤0.05 = si
<b>Linfocitos NK totales (cel./ml)</b>	78202.2	69507.9	26319.57	274222.1	17331.0	120302.9	27448.2	485616.0	P=0.0496	p≤0.05 = si
<b>MFI de CRTAM Linfocitos T CD4 vírgenes</b>	417.36	448.0	60.0	674.0	1933.6	541.5	72.0	6694.0	P=0.2041	p≥0.05 = ns
<b>MFI de CRTAM Linfocitos</b>	277.75	250.0	92.0	982.0	1165.0	390.0	49.0	8185.0	P=0.4217	p≥0.05 = ns

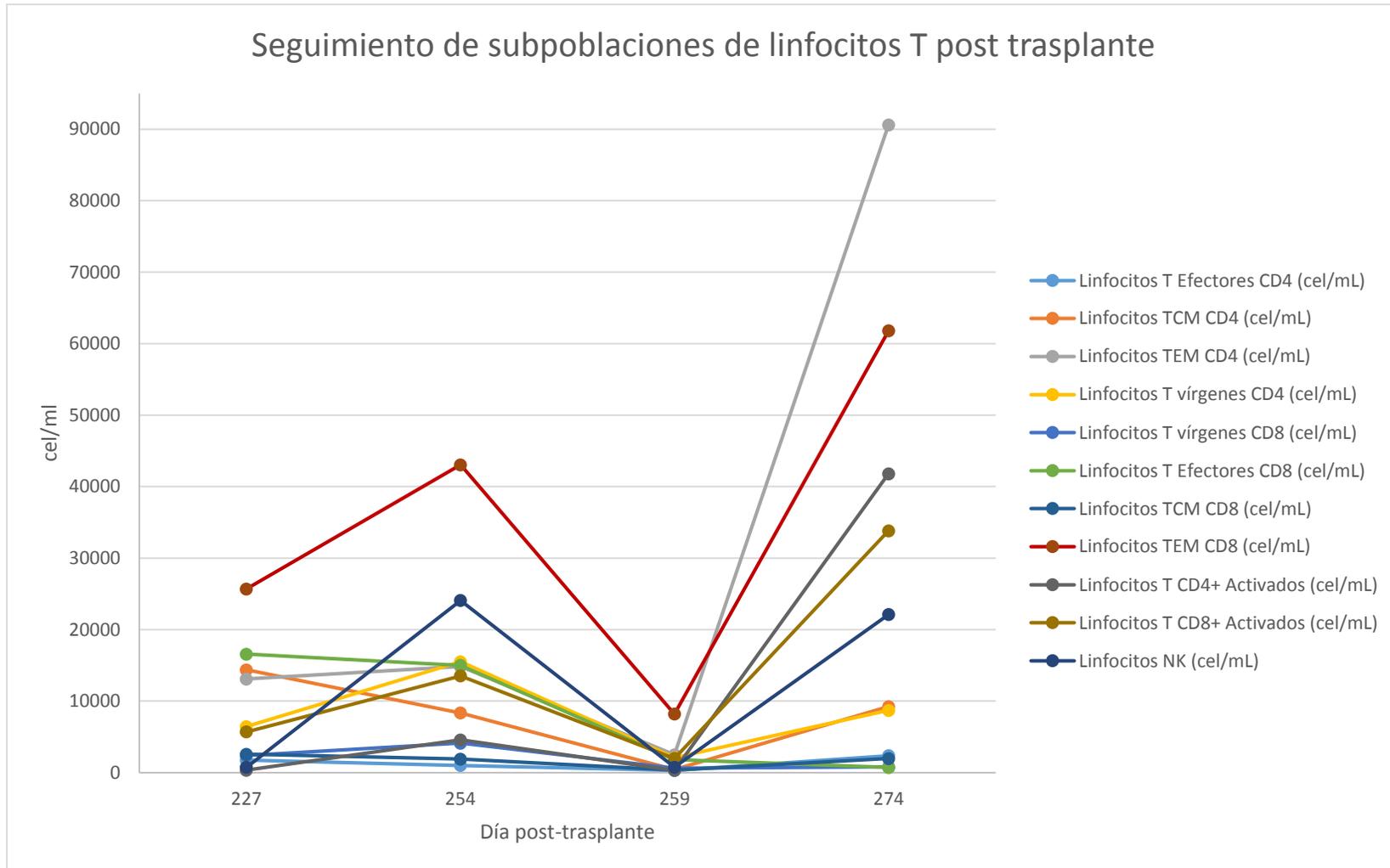
<b>T CD4 efectores</b>										
<b>MFI de CRTAM Linfocitos TCM CD4</b>	555.63	355.0	180.0	1849.0	2637.4	1700.5	340.0	8185.0	P=0.4052	p≥0.05 = ns
<b>MFI de CRTAM Linfocitos TEM CD4</b>	66.09	55.0	37.0	135.0	155.3	83.0	39.0	471.0	P=0.3718	p≥0.05 = ns
<b>MFI de CRTAM Linfocitos T CD8 vírgenes</b>	458.27	492.0	132.0	689.0	769.9	315.0	66.0	2524.0	P=0.2670	p≥0.05 = ns
<b>MFI de CRTAM Linfocitos T CD8 efectores</b>	284.36	253.0	80.0	695.0	425.3	303.0	118.0	1215.0	P=0.4003	p≥0.05 = ns
<b>MFI de CRTAM Linfocitos TCM CD8</b>	1188.72	1102.0	252.0	2212.0	2931.2	1928.5	609.0	8922.0	P=0.2038	p≥0.05 = ns
<b>MFI de CRTAM Linfocitos TEM CD8</b>	163.27	104.0	65.0	634.0	194.95	142.5	80.0	741.0	P= 0.3043	p≥0.05 = ns

### 5.4.8 Aplicación del perfil de subpoblaciones de linfocitos T en un paciente post-trasplantado

Tabla 52. Seguimiento de las subpoblaciones de linfocitos T en un paciente post trasplante.

Día de trasplante	Linfocitos T vírgenes CD4 (cel/mL)	Linfocitos T Efectores CD4 (cel/mL)	Linfocitos TCM CD4 (cel/mL)	Linfocitos TEM CD4 (cel/mL)	Linfocitos T vírgenes CD8 (cel/mL)	Linfocitos T Efectores CD8 (cel/mL)	Linfocitos TCM CD8 (cel/mL)	Linfocitos TEM CD8 (cel/mL)	Linfocitos T CD4+ Activados (cel/mL)	Linfocitos T CD8+ Activados (cel/mL)	Linfocitos NK (cel/mL)
<b>227</b>	6426.28848	1743.30166	14380.4082	13091.7362	2396.81954	16559.8441	2571.71995	25681.4811	338.859589	5688.47876	740.8282
<b>254</b>	15515.6521	1004.77867	8343.00832	14824.0577	4123.92032	14996.0739	1884.02451	43047.1055	4582.5666	13520.5427	24084
<b>259</b>	2081.90089	308.429762	414.275122	2500.99425	593.392988	1822.56418	365.054424	8179.19237	316.695406	1984.36757	745.28
<b>274</b>	8700.04794	2363.78661	9227.06176	90604.6204	793.649285	717.458954	1964.44071	61804.327	41798.0703	33820.4351	22116.38

Grafica 40. Seguimiento de las subpoblaciones de linfocitos T de un paciente post trasplante.



## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La leucemia es una de las principales causas de muerte infantil a nivel mundial y el cáncer que ataca con mayor frecuencia tanto a la población infantil como a los adolescentes. <sup>(43)</sup>

En diversas ocasiones el TCPH no tiene éxito como tratamiento por ello es importante en el Hospital Infantil de México (HIM) contar con una herramienta que ayude al médico a monitorear al paciente después del TCPH, para evaluar la reconstitución inmunológica del paciente a lo largo del tiempo, en nuestro caso específicamente de los linfocitos T y células NK, ya que son importantes para la defensa del organismo, para la activación de linfocitos B y en el efecto injerto contra tumor, para de esta forma lograr un TCPH exitoso. <sup>(43)</sup>

En el diseño del perfil el grupo control de individuos clínicamente sanos nos permitió identificar a las subpoblaciones de linfocitos T y evaluarlas mediante su inmunofenotipo, así mismo se logró implementar una forma de medir la expresión del marcador CRTAM, lo cual podrá ayudar a la investigación de este marcador, ya que es una molécula poco estudiada.

Para la elaboración de este perfil se eligieron muestras de individuos sanos, los cuales nos permitieron evaluar su funcionalidad, lo primero en analizarse fueron los valores de leucocitos los cuales se encontraron dentro de los valores de referencia que oscila entre 4 000 000-11 000 000 células/ml que nos da un indicador de la salud de los pacientes, estos valores de referencia fueron tomados de los valores utilizados en el área de Hematología del Laboratorio clínico del HIM; a continuación se analizó el porcentaje de linfocitos totales y pudimos observar que los resultados de la mayoría de los pacientes se encuentra dentro de los valores de referencia que van de 25-45% (estos valores también fueron tomados del área de hematología del laboratorio clínico del HIM), en cambio en el conteo absoluto de linfocitos pudimos observar que todos los datos obtenidos están entre 1 000 000-4 800 000 linfocitos/ml que son los valores de referencia utilizados en el HIM; así mismo en la mayoría de los datos obtenidos en el grupo pacientes con infección viral observamos estos dos parámetros dentro de los valores de referencia.

Al analizar la cantidad de linfocitos T CD3+ se observaron algunas diferencias en cuanto a los valores obtenidos en individuos sanos en comparación con los PIV, cabe resaltar que los PIV fueron sometidos a trasplantes hepáticos o renales, por lo que la cantidad de células era menor a la de un individuo sano debido a la inmunosupresión a la que son sometidos, sin embargo sus muestras fueron ideales, ya que tenían cargas virales elevadas.

Así mismo se notó una diferencia en los resultados de linfocitos T CD3 a causa que la cantidad de los mismos varía de acuerdo a la edad de los individuos. En nuestro grupo de individuos clínicamente sanos las edades oscilan entre los 8-28 años, se eligió esta población, ya que en el HIM la población de pacientes trasplantados con la que se plantea ocupar el perfil realizado alcanza los 18 años, mientras que los donadores de CPH pueden pertenecer a distintas edades (lactantes, escolares, adolescentes o adultos), por lo que hay una variación, ya que de acuerdo a la edad el sistema inmunológico del paciente tiene diferente madurez, sin embargo, al realizar la prueba de t de Student se observó que no hay una diferencia significativa entre estos 2 grupos de individuos.

La cantidad de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en Individuos clínicamente sanos tiene un patrón de comportamiento similar al reportado en la literatura, esto debido a que se puede comparar la relación CD4/CD8, esta relación esta reportada con un valor de entre 1-2 <sup>(44)</sup>, este dato es importante, porque cuando esta relación se ve afectada se aumenta la cantidad de linfocitos TCD8 ya que actúan como un potente brazo efector del sistema inmunológico al eliminar células potencialmente patógenas (tumoraes, infectadas por virus, bacterias o protozoarios) <sup>(45)</sup>; y en este caso los PIV presentan 2 factores por los cuales la relación CD4/CD8 se ve invertida.

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes, TCM y TEM, se encontraron disminuidos en los pacientes con infección viral y los linfocitos T CD4 y CD8 efectores aumentados ya que los virus son parásitos intracelulares obligados, puesto que no tienen metabolismo propio y esta característica obliga al sistema inmunológico a poner en marcha sus mecanismos más especializados para reconocer y eliminar, tanto a los virus libres, como a las células infectadas<sup>(45)</sup>; de

esta forma el sistema inmunológico reduce la cantidad de linfocitos vírgenes al tener que activarlos contra el virus al cual se enfrentan y en dado caso contra el tumor también. En los ICS se ve todo lo contrario, ya que los linfocitos T vírgenes tienen mayor proporción que los linfocitos efectores, así mismo de acuerdo a la edad la cantidad de linfocitos TCM y TEM cambia; ya que en los adultos se espera encontrar más células de memoria que vírgenes, esto debido a que a lo largo de su vida han tenido mayor contacto a patógenos, y en este caso en un individuo se espera encontrar más células TEM, ya que estas se encuentra en mayor cantidad en sangre periférica y las células TCM están en mayor proporción en ganglios y bazo. <sup>(46)</sup>

Por la misma razón la cantidad de linfocitos T activados tanto CD4+ y CD8+ se vio aumentada en los PIV, especialmente los linfocitos T CD8+ citotóxicos y también encontramos que la expresión del marcador CRTAM se observó aumentada sin significancia estadística, esto debido a que este marcador esta descrito como parte de la activación de linfocitos T, sin embargo, no todos los linfocitos T activados lo expresan.

En consecuencia con el propósito de obtener mayor información sobre este marcador se implementó la medición de la MFI en toda las subpoblaciones de linfocitos T y se encontró que cada una de ellas expresa este marcador en diferentes proporciones, en general podemos concluir que este marcador se mostró elevado en los PIV en las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes, efectores, TCM y en los linfocitos TEM CD4+, la subpoblación de linfocitos TCM CD8 mostró una diferencia apreciable en la gráfica ; sin embargo al realizar la prueba de t de Student no se observó una diferencia estadística significativa en los datos de los dos grupos de individuos.

La innovación en la medición de la expresión de la molécula CRTAM en las subpoblaciones de linfocitos es una de las razones por la cual este perfil ayudara a su aplicación en la investigación en cuanto a este marcador y en un futuro al diagnóstico clínico.

En el último panel se analizaron los linfocitos NK, en estos datos se observaron variaciones en la cantidad que cada individuo posee, pero sobre todo entre los

grupos de individuos esto debido a que éstas células tienen la capacidad de producir lisis en células tumorales y células infectadas con virus o parásitos intracelulares <sup>(47)</sup> y en los pacientes con infección viral hay una diferencia más notable, encontrando mayor cantidad de estas células, ya que se encuentran actuando contra la infección viral, recordando que estos pacientes fueron seleccionados por tener cargas virales altas para observar el efecto de mejor manera.

En el análisis estadístico de t de Student en la mayoría de las poblaciones no se obtuvo una diferencia significativa, sin embargo, en los parámetros como Linfocitos totales, linfocitos TCD8+ vírgenes y linfocitos NK si la hay.

En los linfocitos totales se puede atribuir a que varían de individuo a individuo por la cantidad de leucocitos totales y en el caso de los PIV por su estado de inmunocompetencia al cual han sido sometidos en el régimen de tratamiento seguido.

En los linfocitos T CD8+ vírgenes se ve reflejada una diferencia significativa porque hay una continua activación de estos, aumentando la cantidad de linfocitos T CD8 efectores y disminuyendo la cantidad de linfocitos T CD8 vírgenes en los pacientes infectados.

En los linfocitos NK hay una notable diferencia por la variación de edad de nuestro grupo control y por el inmunocompromiso en los PIV.

Por último pudimos determinar un mínimo y un máximo para cada subpoblación con ayuda del grupo control; tampoco se puede determinar si el individuo goza de perfecta salud o no en cuanto a su sistema inmunológico, ya que cada individuo ha estado expuesto a diferentes condiciones, patógenos, enfermedades a lo largo de su vida por lo que cada individuo es su propio control y de esta forma se puede ver el estado de su sistema inmunológico, al comparar la cantidad de células que tiene de cada subpoblación a lo largo del tiempo y de esta forma llevar un seguimiento, que es el método que se plantea en los pacientes sometidos a TCPH.

En la gráfica 40 podemos observar un seguimiento de un paciente post trasplante, en el cual podemos observar que con ayuda del panel se pueden observar

variaciones en la cantidad cel/ml de cada subpoblación de linfocitos T, así como la detección de linfocitos activados, no sólo por infección viral.

Con la estandarización realizada en los individuos control se pudieron identificar las subpoblaciones de linfocitos T en individuos trasplantados, ya que al tener una hematopoyesis menor a la de un individuo clínicamente sano, se necesitó que los paneles tuvieran la capacidad de detectar bajas cantidades de células y con ayuda de los monoclonales elegidos y del citómetro utilizado se logró obtener una buena resolución y cuantificación de éstas.

Con ello comprobamos que el panel es eficiente, ya que con ayuda de éste se pueden detectar variaciones que sirven de herramienta para el tratamiento del paciente, e incluso sirven de monitoreo de su avance y eficacia del tratamiento.

## 7. CONCLUSIONES

Se lograron estandarizar tres paneles para la evaluación de subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo utilizando un citómetro BD FACS CANTO II de 8 colores; con los cuales se determinaron los linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes, efectores, efectores de memoria, centrales de memoria y activado; adicionalmente linfocitos NK.

Se seleccionaron los diferentes marcadores a utilizar, en los tres paneles, combinados con solo 8 fluorocromos y se estandarizo una técnica de tinción con ellos.

Se implementó aunado a esto la medición del marcador CRTAM en las subpoblaciones de linfocitos T, sirviendo de herramienta para la investigación de este marcador celular; utilizando un grupo control y un grupo de pacientes con infección viral para observar la diferencia entre ellos. Observamos que cada subpoblación expresa en diferente cantidad este marcador.

En los dos grupos de individuos se obtuvieron diferencias en las determinaciones principalmente en los linfocitos T CD8+ y NK, esto debido a las cargas virales altas que poseían estos pacientes y al estado de inmunocompromiso en el que se encontraban después del trasplante hepático o renal.

Por último, se comprobó la eficacia del panel tras su uso en individuos trasplantados con CPH, logrando detectar variaciones en la cantidad de células de cada subpoblación de linfocitos T en relación al tiempo; es por ello que es importante resaltar que esta herramienta será de gran utilidad a futuro para monitorear a los individuos post trasplante en el avance de la reconstitución de la hematopoyesis, ya que cada individuo es su propio control en relación al tiempo; así mismo puede ayudar en datos para el tratamiento de los pacientes y la eficacia de éste; de esta forma se puede considerar que este perfil es una herramienta a implementar a futuro en el HIM en pacientes sometidos a TCPH.

## 8. REFERENCIAS

- 1) Eyrich M, Leiler C, Lang P, Schilbach K, Schumm M, Bader P, Greil J, Klingebiel T, et al. prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transp.* 2003 32, 379–390.
- 2) Pelayo, R, Santa J, Velasco I. Células troncales y medicina regenerativa. UNAM. México 2011.
- 3) Averso F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998; 339:1186-93.
- 4) Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 201- 223.
- 5) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173. 30. Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6): 2976-2981
- 6) Storek J. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97:3380-3389.
- 7) Kassiotis G, Garcia S, Simpson E, Stockinger B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* 2002; 3(3): 244- 250.)
- 8) Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220.
- 9) Leucemia. National Cancer Institute EUA 2014 pág. 1-7. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/>.
- 10) La leucemia. Leukemia & lymphoma society fighting blood cancers. EUA. 2012 pág.: 2-10

- 11) Leucemia. Revisado el 14 de marzo del 2017. American cancer society. Publicado el 4 de febrero del 2016. Recuperado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-en-ninos/acerca/estadisticas-clave.html>.
- 12) Estadísticas del cáncer. Revisado el 14 de marzo del 2017. Instituto nacional del cáncer. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>.
- 13) Gaytán Morales F. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en pediatría. *Gac Mex Oncol*. 2013; 12:174-181.
- 14) Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Biol Blood Marrow Transplant* .2016; 22: 195-206
- 15) Jaime Fagundo JC, Dorticós Balea E, Pavón Morán V, Jauma Rojo AE, Cortina Rosales LD. Aspectos inmunológicos del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2006; 22(3).
- 16) Benny J. Chen, Xiuyu Cui, Gregory D. Sempowski, Jos Domen, and Nelson J. Chao Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. *Blood*. 2004; 103:4344-4352.
- 17) Chao NJ, Liu CX, Rooney B, et al. Nonmyeloablative regimen preserves “niches” allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8:249-256.
- 18) Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:191-20
- 19) Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Association between anti-thymocyte globulin (ATG) exposure and CD4+ immune reconstitution predicting overall survival in paediatric haematopoietic cell transplantation: a multicentre retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol*. 2015;2: e194-e203.
- 20) Burgos R, Bullorsky E, Foncuberta MC, Formisano S, Garcia JJ, Jaimovich G, Martínez J, Milovic V, Remaggi G, Riera L, Rivas MM, Saslavsky M,

- Shanley C, Yantorno S. Indicaciones de trasplante de células hematopoyéticas. Sociedad Argentina de Hematología. Pág. 419-423.
- 21) Woods WG, Neudorf S, Gold S, et al.: A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. *Blood* 97 (1): 56-62, 2001.
  - 22) Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Urbano-Ispizua AL. Bone marrow transplantation activity in Europe 1999. Report from the European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:899-916.
  - 23) Stephanie JL. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 11:4200-4206
  - 24) Booth C, Lawson S, Veys P. The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2013; 162:177-190.
  - 25) Baron, F., Labopin, M., Niederwieser, D., Vigouroux, S., et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia.* 2012; 26, 2462–2468.
  - 26) Olkinuora H, von Willebrand E, Kantele JM, et al. The impact of early viral infections and graft-versus-host disease on immune reconstitution following paediatric stem cell transplantation. *Scand J Immunol.* 2011; 73:586-593.
  - 27) Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am.* 2010; 24:257-72.
  - 28) Melenhorst JJ, Tian X, Xu D, et al. Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuations after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2012;97: 867-873.
  - 29) Sugita K, Soiffer RJ, Murray C, Schlossman SF, Ritz J, Morimoto C. The phenotype and reconstitution of immunoregulatory T cell subsets after T cell

- depleted allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994;57:1465-1473.
- 30) Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 5º Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. 2004.
  - 31) Brenner MK, Wimperis JZ, Reittie JE. Recovery of immunoglobulin isotypes following T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1986; 64:125-32.
  - 32) Farag S, Fehniger L. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; 10:1935-1947.
  - 33) Bøyum, A. (1976) Asolación of lymphocytes and macrophages. En: *Lymphocytes, isolation, fractionation and characterization*, p 9. (Natvig, J.B., Perlmann, P. y Wigzell, H., Eds.) Supl. No. 5, *Scand. J. Immunol.* 5, 9.
  - 34) Brain, P., Gordon, J. y Willets, W. A. (1970) Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 6, 681.
  - 35) Bonner, W. A.; Hulett, H.R.; Sweet, R.G. y Herzenberg, L.A. 1972. Fluorescence Activated Cell Sorting. *The Review of Scientific Instruments*, 43(3): 404-409.
  - 36) Crossland-Taylor, P.J. 1952. A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube. *Nature*, 171: 37-38.
  - 37) Sweet, R.G. 1965. High frequency recording with electrostatically deflected Ink jets. *The Review of Scientific Instruments*, 36: 131.
  - 38) Parks, D.R. y Herzenberg, L.A. 1984. Fluorescence-Activated Cell Sorting: Theory, Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid Cell Biology. *Methods in Enzymology*, 108: 197-241.
  - 39) Herzenberg, L.A.; De la Rosa, S.C. y Herzenberg, L.A. 2000. Monoclonal Antibodies and the FACS: complementary tools for the immunobiology and medicine. *Immunology Today*, 21(8): 383-390.
  - 40) Lomonte B. técnicas de laboratorio en inmunología clínica. Facultad de microbiología. Instituto Clodomiro Picado. Costa Rica: 2009; 1-21.
  - 41) Beckton Dickinson Immunocytometry Systems. 1995. FACS Training Manual. Módulos: 1, 5-6.

- 42) Salgado M. Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Universidad Nacional Autónoma De México. Instituto De Biotecnología. México. 2002.
- 43) Pérez Saldívar ML. et al. BMC Cancer 2011 11:355-366, Rivera Luna et al. BMC Cancer 2014 14:790-798.
- 44) Unidad de patología clínica. Revisado el: 02 de abril del 2017. Recuperado de: <http://www.upc.com.mx/examen/v/527>
- 45) Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science 1996; 272(5258): 54-60.
- 46) Foulds KE, Zenewicz LA, Shedlock DJ, Jiang J, Troy AE, Shen H. Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. J Immunol 2002; 168(4): 1528-1532.
- 47) Hiserodt JC, Britvan LJ, Targan SR. Characterization of the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer (NK) lymphocyte: resolution into binding, programming, and killer cell-independent steps. J Immunol 1982; 129: 1782-7.



AGRUPACION MEXICANA  
PARA EL ESTUDIO  
DE LA HEMATOLOGIA

Mesa Directiva 2015-2017

† Dr. Luis Sánchez Medel Fundador  
Dr. J. Ramón Rivas Llamas Presidente  
Dra. Nidia P. Zapata Canto Secretaria  
Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado Vocal de Act. Académicas  
Dr. Adolfo Borja G. Vicepresidente  
Dr. Ignacio J. Aguayo Aguirre Tesorero  
Dr. Jorge Dupas Rodríguez Vocal de Membresías

Tiene el honor de entregar la presente

### CONSTANCIA

a:

Ortiz-Navarrete Vianney<sup>1</sup>, Parra Ortega Israel<sup>2</sup>, López-Martínez Briceida<sup>3</sup>, Najera-Martinez Noemi<sup>3</sup>, Gaytan-Morales Felix<sup>3</sup>, Salceda-Rangel Karen Sarahi<sup>3</sup>, Angeles-Floriano Tania<sup>2</sup>, Vilchis-Ordoñez Armando<sup>3</sup>, Mendoza-García Emma Rosario<sup>3</sup>, Olvera-Gómez Irlanda<sup>4</sup>. 1 Centro De Investigación y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional, 2 Hospital Infantil de México Federico Gómez, 3 Hospital Infantil de México Federico Gómez 4 Universidad Anáhuac; Hospitales Federales De Referencia, HNH

Por su participación con el trabajo en presentación en Cartel:

### "ESTANDARIZACIÓN DE UN PERFIL PARA LA EVALUACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA SOMETIDOS A TCPH".

Presentado en el "LVIII" Congreso Anual de la **Agrupación**, evento realizado del 26 al 29 de abril de 2017, en la Ciudad de León, Guanajuato, México

**Ramón Rivas Llamas**  
Presidente

**Dra. Nidia P.- Zapata Canto**  
Secretaria

**Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado**  
Vocal de Act. Científicas



## Estandarización de un perfil para la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes pediátricos con leucemia aguda sometidos a TCPH

Vianney Ortiz-Navarrete, Israel Parra-Ortega, Briceida López-Martínez, Noemí Najera-Martínez, Félix Gaytan-Morales, Karen Sarah Salceda-Rangel, Tania Angeles-Flotano, Armando Vilchis-Ordoñez, Emma Rosario Mendoza-García, Irlanda Olivera-Gómez.

Hospital Infantil de México Federico Gómez

**Introducción:** El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un tratamiento alternativo para los niños con leucemia con el objetivo principal de reconstituir la hematopoyesis y potenciar el efecto injerto contra tumor a través de los linfocitos T del donador. Por lo que es indispensable monitorear la reconstitución inmunológica utilizando una metodología capaz de analizar moléculas de expresión de los fenotipos de activación, naïve y de memoria de los linfocitos T a través de citometría de flujo en un equipo certificado para uso diagnóstico.

**Objetivo:** Estandarizar un perfil celular para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos T: naïve, activados y de memoria en sangre periférica de pacientes con leucemia aguda sometidos a TCPH.

**Material y métodos:** Se analizaron muestras de sangre periférica de 3 grupos de individuos (individuos clínicamente sanos, pacientes con infecciones diagnosticadas (CMV, VEB, VIK) y pacientes con leucemia aguda sometidos a TCPH) en un citómetro de flujo FACS CANTO II de 8 colores; realizándose 3 paneles de tinción; con el panel 1 se analizaron los linfocitos T naïve, con el panel 2 se analizaron los linfocitos activados y con el panel 3 se analizaron los linfocitos NK. Se titularon cada uno de los anticuerpos utilizados y se realizaron calibración y compensación del equipo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**Resultados:** En los 3 grupos de muestra se lograron caracterizar las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, obteniendo valores porcentuales y absolutos de la siguientes células T: naïve, efectoras, centrales de memoria y efectoras de memoria tanto CD4+ como CD8+; CD4+ y CD8+ activadas y linfocitos NK. Al comparar el grupo de individuos clínicamente sanos con los pacientes con infección viral se observó un aumento en el número de células CD8+ activadas.

**Conclusiones:** Se logró establecer un panel para evaluar la reconstitución inmune de los pacientes sometidos a TCPH, dicho panel servirá para que junto con los datos clínicos y pruebas adicionales ayuden a realizar la valoración del injerto.

