



ENCADERNACIONES ARTESANAS, S.L.

Periodista Badia, 5

46010-VALENCIA

V. JORNET

Tel. 961 34 74  
Fax 961 34 74

ENCADERNACIONES ARTESANAS, S.L.

Periodista Badia, 5

46010-VALENCIA

V. JORNET



10001231894  
Biblioteca Depòsit

T. 4552

ENCADERNACIONES ARTESANAS, S.L.

Periodista Badia, 5

ENCADERNACIONES ARTESANAS, S.L.

Periodista Badia, 5

46010-VALENCIA

V. JORNET

Tel. 961 34 74

Fax 961 34 74

BID. 74552

**FACULTAD:** MEDICINA y ODONTOLOGIA. VALENCIA

**DEPARTAMENTO:** MEDICINA

**Autor:** CARLOS SOLANO VERCET

**Título completo de la Tesis:**

RECONSTITUCION INMUNE EN EL TRASPLANTE AUTOLOGO DE CELULAS GERMINALES  
HEMATOPOYETICAS.

**Calificación:** APTO CUM LAUDEM

**Fecha de Lectura:** 18-10-1996

**Tribunal (Nombre y apellidos completos de los componentes):**

ANTONIO TORRES GOMEZ  
VICENTE ALBEROLA CANDEL  
ANA LLUCH HERNANDEZ  
ALBERTO GRAÑENA BATISTA  
RAFAEL FERNANDEZ-DELGADO CERDA



RESERVA  
BIBLIOTECA

**Director/es. de la Tesis:**

JAVIER GARCIA-CONDE BRU

**Dirección particular y teléfono del Autor:**

GRAN VIA RAMON y CAJAL, 1 Pta.9  
46007 VALENCIA  
(96) 3410257

UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

RECOMENDACIONES PARA EL TRÁNSITO AUTOCORRECTIVO  
DE LOS DATOS DE LOS PROYECTOS

TEMA DE TESIS

Presentado por

D. Carlos Martínez

Valencia, 1997

D. 1231890  
L. 1231899



T 1009

BID.T 4552

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**RECONSTITUCION INMUNE EN EL TRASPLANTE AUTOLOGO**  
**DE CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**D. Carlos Solano Vercet**

**Valencia, 1996**



**Director**

**Prof. Dr. D. Javier García-Conde Bru**

UMI Number: U602941

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U602941

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



UNIVERSITAT DE VALENCIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Avda. Blasco Ibañez 17. Telf. 34-6-386.41.68.  
FAX 34-6-386.47.67  
46010 - VALENCIA (ESPAÑA)

JAVIER GARCIA-CONDE, CATEDRATICO DE MEDICINA DEL  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA DE VALENCIA

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de tesis doctoral: " RECONSTITUCION INMUNE EN EL  
TRASPLANTE AUTOLOGO DE CELULAS GERMINALES  
HEMATOPOYETICAS, que presenta el licenciado *D. Carlos Solano Vercet*, ha  
sido realizado en este Departamento bajo mi dirección, con la supervisión del material de  
trabajo, estando de acuerdo con su presentación para optar al grado de Doctor en  
Medicina y Cirugía.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Valencia a  
catorce de junio de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: JAVIER GARCIA-CONDE BRU

Director de la Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Garcia-Conde Bru', written over the printed name and title.





**A mis padres**

**A María José, Carlos y Guillermo**

## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr.D. Javier García-Conde Bru, Catedrático de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Jefe del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por su constante e inestimable capacidad de estímulo diario y su ayuda en el diseño y discusión del presente trabajo.

Al Dr. Miguel López-Botet, Sección de Inmunología, Hospital de la Princesa de Madrid, por su ayuda y valiosa discusión del diseño inicial del proyecto.

A la Dra. Isabel Marugán de la Concha, Profesor Asociado y Médico Adjunto del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por su discusión crítica y dedicación de tiempo y esfuerzo en el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Isabel Benet Monforte, Profesor Asociado y Médico Adjunto del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por su generosidad y ayuda en la obtención de los datos y su discusión.

Mi agradecimiento y aprecio por todos miembros del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por la calidad de su trabajo diario que ha permitido la recopilación de los datos que forman parte de la presente tesis. En particular a Concepción Ivars, Milagros Ordoñez y Elena Cervelló, su trabajo riguroso y esfuerzo diario en el laboratorio, han sido imprescindibles para la obtención de los datos. A Fernando Jarque y Antonio Gutiérrez que han dedicado horas y esfuerzo en el análisis de los datos.

A D. Vicente Girbes, Centro de Cálculo, Servicio de Informática, Universidad de Valencia, por la revisión de los aspectos estadísticos de este trabajo.

Al personal del Servicio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de Valencia por su colaboración.

A nuestros pacientes, con la esperanza de que este trabajo ayude a mejorar su tratamiento.

## INDICE DE MATERIAS

## PAGINA

|   |           |
|---|-----------|
| <b><u>I. INTRODUCCION</u></b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>I.1. TRASPLANTE DE CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS</b>  |           |
| <b>I.1.1. Concepto y antecedentes históricos</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>I.1.2. Mecanismos de curación del trasplante</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>I.1.3. Valoración de las CGH para el trasplante</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>I.1.4. Trasplante de médula ósea</b>   |           |
| <b>I.1.4.1. Técnica de extracción y procesamiento de médula</b><br><b>ósea</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>I.1.4.2. Criopreservación</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>I.1.5. Trasplante de células germinales de sangre periférica</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>I.1.5.1. Obtención y procesamiento de CGSP</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>I.1.5.2. Criopreservación</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>I.1.6. Preparación del paciente y bases del tratamiento</b><br><b>quimio-radioterápico intensivo</b> .....                                 | <b>24</b> |
| <b>I.1.7. Injerto medular</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>I.1.8. Complicaciones infecciosas</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>I.1.9. Indicaciones de trasplante de CGH</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>I.2. INMUNODEFICIENCIA ASOCIADA AL TRASPLANTE DE</b><br><b>CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS</b>  |           |
| <b>I.2.1. Ontogenia linfoide normal</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>I.2.2. Caracterización de la inmunodeficiencia y recuperación</b><br><b>inmune tras trasplante de célula germinal hematopoyética</b> ..... | <b>56</b> |
| <b>I.2.3. Posibles intervenciones para acelerar la recuperación</b><br><b>inmune: inmunoterapia</b> .....                                     | <b>65</b> |
| <b>I.3. LA CITOMETRIA DE FLUJO COMO METODO DE ESTUDIO DE</b><br><b>COMPONENTES Y FUNCIONALISMO DEL SISTEMA INMUNE</b> .....                   | <b>68</b> |
| <b>I.3.1. Bases y método de la citofluorometría</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>I.3.2. Significado funcional de las poblaciones identificadas</b> .  | <b>77</b> |
| <b><u>II. HIPOTESIS DE TRABAJO</u></b> .....  | <b>85</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>III. OBJETIVOS</b>  | 89  |
| <b>IV. METODOLOGIA</b>   | 91  |
| IV.1. DISEÑO DEL ESTUDIO   | 92  |
| IV.2. POBLACION ESTUDIADA  | 95  |
| IV.3. GRUPO CONTROL  | 112 |
| IV.4. ESQUEMAS DE MOVILIZACION DE CGSP   | 114 |
| IV.5. TRATAMIENTOS DE ACONDICIONAMIENTO  | 114 |
| IV.6. CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS INFUNDIDAS                              | 116 |
| <b>IV.7. METODOS DE ESTUDIO</b>  |     |
| IV.7.1. Hematimetría convencional  | 118 |
| IV.7.2. Citofluorometría   | 118 |
| IV.7.2.1. Técnica  | 118 |
| IV.7.2.1.1. Muestras   | 118 |
| IV.7.2.1.2. Técnica de marcaje directo   | 118 |
| IV.7.2.1.3. Análisis de poblaciones linfocitarias                                | 119 |
| IV.7.2.2. Descripción de los anticuerpos monoclonales<br>utilizados              | 122 |
| IV.7.3. Inmunoglobulinas séricas   | 124 |
| IV.7.4. Complemento sérico   | 124 |
| IV.7.5. Tests cutáneos de inmunidad celular                                      | 124 |
| <b>IV.8 METODOLOGIA ESTADISTICA Y PROCESAMIENTO<br/>INFORMATICO DE LOS DATOS</b> | 128 |
| IV.8.1. Estadística descriptiva  | 129 |
| IV.8.2. Estadística analítica  | 130 |
| IV.8.3. Procesamiento informático de los datos                                   | 134 |
| <b>V. RESULTADOS</b>   |     |
| V.1. Comparación de regeneración inmune tras TAMO y TCSP                         | 136 |
| V.1.1. Grupo global de pacientes   | 136 |
| V.1.2. Grupo de pacientes con carcinoma de mama de alto<br>riesgo de recaída     | 144 |
| V.2. Comparación de la reconstitución inmune en el grupo de                      |     |

|   |     |
|---|-----|
| neoplasias hematológicas con la recuperación de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída .....   | 147 |
| V.3. Relación entre la población con fenotipo citotóxico y control de la enfermedad neoplásica tras TCGH en el subgrupo de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída .....      | 148 |
| V.3.1. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo que han recibido MO y en pacientes que han recibido CGSP .....          | 148 |
| V.3.2. Estudio de influencia de la reconstitución inmune de las poblaciones celulares con fenotipo NK y T supresora/citotóxica, en la evolución de la enfermedad neoplásica ..... | 149 |
| <b><u>VI. DISCUSION</u></b> .....   | 194 |
| VI.1. Comparación de la recuperación inmune tras TAMO y TCSP ....   | 198 |
| VI.2. Comparación de la recuperación inmune tras TCSP en pacientes con tumores sólidos y neoplasias hematológicas .....   | 215 |
| VI.3. Estudio de la influencia de la diferente reconstitución inmune en el control de la enfermedad .....   | 216 |
| <b><u>VII. CONCLUSIONES</u></b> .....   | 221 |
| <b><u>VIII. BIBLIOGRAFIA</u></b> .....  | 224 |

| <b>INDICE DE TABLAS</b>  | <b>PAGINA</b> |
|--|---------------|
| TABLA 1. DOSIS Y TOXICIDAD DE LOS FARMACOS UTILIZADOS EN EL TRASPLANTE DE<br>CÉLULA GERMINAL HEMATOPOYÉTICA.....   | 27            |
| TABLA 2. PROTOCOLOS DE ACONDICIONAMIENTO MÁS UTILIZADOS EN TRASPLANTE DE<br>CÉLULAS GERMINALES HEMATOPOYÉTICAS.....  | 28            |
| TABLA 3. INDICACIONES DEL TRASPLANTE DE MÉDULA OSEA.....   | 35            |
| TABLA 4. INDICACIONES DE TCGH REALIZADO EN EUROPA EN 1994.....   | 40            |
| TABLA 5. ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN B.....  | 44            |
| TABLA 6. COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LINFOCITOS B CD5+ Y LINFOCITOS<br>B CONVENCIONALES.....   | 47            |
| TABLA 7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL TOTAL DE PACIENTES ESTUDIADO.....  | 96            |
| TABLA 8. ORIGEN DE LAS CÉLULAS GERMINALES HEMATOPOYÉTICAS E INMUNOTERAPIA<br>UTILIZADAS EN EL TRASPLANTE.....  | 97            |
| TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DEL TOTAL DE PACIENTES TRATADOS CON TRASPLANTE<br>AUTÓLOGO, QUE RECIBIERON EXCLUSIVAMENTE MÉDULA ÓSEA O CGSP.....   | 98            |
| TABLA 10. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE<br>CARCINOMA DE MAMA TRATADAS CON TRASPLANTE AUTÓLOGO CON REINFUSIÓN<br>EXCLUSIVA DE MÉDULA ÓSEA O CGSP.....  | 100           |
| TABLA 11. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE<br>CARCINOMA DE MAMA METASTÁSICO.....   | 101           |
| TABLA 12. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO<br>RIESGO DE RECAÍDA TRASPLANTADAS CON MO O CGSP, EXCLUYENDO EL<br>GRUPO DE $\geq 4$ GANGLIOS AFECTOS AL DIAGNÓSTICO.....                             | 103           |
| TABLA 13. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE<br>NEOPLASIAS SÓLIDAS DIFERENTES DE CARCINOMA DE MAMA, TRATADOS CON<br>TRASPLANTE AUTÓLOGO CON REINFUSIÓN DE MÉDULA ÓSEA O CGSP,<br>EXCLUSIVAMENTE..... | 106           |
| TABLA 14. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE<br>LEUCEMIA Y MIELOMA, TRATADOS CON TRASPLANTE AUTÓLOGO CON REINFUSIÓN<br>DE MÉDULA ÓSEA O CGSP, EXCLUSIVAMENTE.....                                    | 108           |

|   |     |
|---|-----|
| TABLA 15. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO LNH, TRATADOS CON TRASPLANTE AUTÓLOGO CON REINFUSIÓN DE MÉDULA ÓSEA O CGSP, EXCLUSIVAMENTE. ....                      | 109 |
| TABLA 16. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE HODGKIN, TRATADOS CON TRASPLANTE AUTÓLOGO CON REINFUSIÓN DE MÉDULA ÓSEA O CGSP, EXCLUSIVAMENTE. .... | 110 |
| TABLA 17. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS CON TESTS CUTÁNEOS DE INMUNIDAD CELULAR.....  | 111 |
| TABLA 18. VALORES DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS, INMUNOGLOBULINAS Y COMPLEMENTO, DEL GRUPO CONTROL. ....  | 113 |
| TABLA 19. ESQUEMAS DE ACONDICIONAMIENTO UTILIZADOS. ....  | 115 |
| TABLA 20. CÉLULAS GERMINALES HEMATOPOYÉTICAS INFUNDIDAS EN EL GRUPO DE TAMO Y DE TCSP .....   | 117 |
| TABLA 21. ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS Y ANTÍGENOS DE MEMBRANA QUE IDENTIFICAN. ....   | 123 |

## INDICE DE FIGURAS

## PAGINA

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 1. TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS EN EUROPA. EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DESDE 1973 HASTA 1994 .....   | 3   |
| FIGURA 2. ORIGEN DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS PARA TRASPLANTE AUTÓLOGO EN EUROPA DESDE 1991 HASTA 1994. ....   | 5   |
| FIGURA 3. INTERACCIONES ANTIGENO-ESPECÍFICAS ENTRE LAS CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENOS (CPA) Y LINFOCITOS T .....   | 55  |
| FIGURA 4A. ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES MARCADAS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES UNIDOS A FLUOROCROMOS, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....                         | 76  |
| FIGURA 4B. ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE POBLACIONES LINFOCITARIAS .....   | 121 |
| FIGURA 5. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE LINFOCITOS TOTALES (A), CELULAS CD2+ (B) Y CELULAS CD3+ (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....           | 162 |
| FIGURA 6. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD5+ (A), CELULAS CD5+CD19+ (B) Y CELULAS CD19+ (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....           | 163 |
| FIGURA 7. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD4+ (A), CELULAS CD8+ (B) E INDICE CD4/CD8 (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....               | 164 |
| FIGURA 8. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS HLA-DR+ (A), CELULAS CD25+ (B), ENTRE TAMO Y TCSP .....                                | 165 |
| FIGURA 9. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD3+CD16+CD56+ (A), CELULAS CD8+CD57+ (B) Y CELULAS CD57+ (C), ENTRE TAMO Y TCSP ..... | 166 |
| FIGURA 10. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD3-CD16+CD56+ (A), CELULAS CD56+ (B) Y CELULAS CD16+ (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....    | 167 |



|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 11. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN<br>POSTRASPLANTE DE CELULAS CD19+ (A), NIVELES SERICOS DE IgG (B),<br>NIVELES SERICOS DE IgA (C) Y NIVELES SERICOS DE IgM (D), ENTRE TAMO Y<br>TCSP ..... | 168 |
| FIGURA 12. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN<br>POSTRASPLANTE DE NIVELES SERICOS DE C3 (A), NIVELES SERICOS DE C4 (B)<br>Y DE CH50 (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....  | 169 |
| FIGURA 13. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE LINFOCITOS TOTALES<br>(A), CELULAS CD2+ (B) Y CELULAS CD3+ (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....                 | 170 |
| FIGURA 14. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD5+ (A),<br>CELULAS CD5+CD19+ (B) Y CELULAS CD19+ (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....                 | 171 |
| FIGURA 15. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD4+ (A),<br>CELULAS CD8+ (B) E INDICE CD4/CD8 (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....                     | 172 |
| FIGURA 16. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS HLA-DR+ (A),<br>CELULAS CD25+ (B), ENTRE TAMO Y TCSP .....                                      | 173 |
| FIGURA 17. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS<br>CD3+CD16+CD56+ (A), CELULAS CD8+CD57+ (B) Y CELULAS CD57+ (C), ENTRE<br>TAMO Y TCSP .....    | 174 |
| FIGURA 18. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD3-<br>CD16+CD56+ (A), CELULAS CD56+ (B) Y CELULAS CD16+ (C), ENTRE TAMO Y<br>TCSP .....       | 175 |
| FIGURA 19. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO.<br>COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD19+ (A),  |     |

|  |     |
|--|-----|
| NIVELES SERICOS DE IgG (B), NIVELES SERICOS DE IgA (C) Y NIVELES SERICOS DE IgM (D), ENTRE TAMO Y TCSP .....   | 176 |
| FIGURA 20. GRUPO DE PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE NIVELES SERICOS DE C3 (A), NIVELES SERICOS DE C4 (B) Y DE CH50 (C), ENTRE TAMO Y TCSP .....                           | 177 |
| FIGURA 21. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE LINFOCITOS TOTALES (A), CELULAS CD2+ (B) Y CELULAS CD3+ (C) .....  | 178 |
| FIGURA 22. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD5+ (A), CELULAS CD5+CD19+ (B) Y CELULAS CD19+ (C) .....  | 179 |
| FIGURA 23. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD4+ (A), CELULAS CD8+ (B) E INDICE CD4/CD8 (C) .....  | 180 |
| FIGURA 24. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS HLA-DR+ (A), CELULAS CD25+ (B) .....   | 181 |
| FIGURA 25. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD3+CD16+CD56+ (A), CELULAS CD8+CD57+ (B) Y CELULAS CD57+ (C) .....                                  | 182 |
| FIGURA 26. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD3-CD16+CD56+ (A), CELULAS CD56+ (B) Y CELULAS CD16+ (C) .....                                      | 183 |
| FIGURA 27. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE CELULAS CD19+ (A), NIVELES SERICOS DE IgG (B), NIVELES SERICOS DE IgA (C) Y NIVELES SERICOS DE IgM (D) ..... | 184 |
| FIGURA 28. RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR. EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE DE NIVELES SERICOS DE C3 (A), NIVELES SERICOS DE C4 (B) Y DE CH50 (C) .....                                     | 185 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 29. COMPARACION DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO, ENTRE TAMO Y TCSP .....                                    | 186 |
| FIGURA 30. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD3+CD16+CD56+ $\geq$ PERCENTIL 80 ..... | 187 |
| FIGURA 31. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD3+CD16+CD56+ $\geq$ PERCENTIL 90 ..... | 188 |
| FIGURA 32. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD8+CD57+ $\geq$ PERCENTIL 90 .....      | 189 |
| FIGURA 33. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD57+ $\geq$ PERCENTIL 90 .....          | 190 |
| FIGURA 34. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD3-CD16+CD56+ $\geq$ PERCENTIL 90 ..... | 191 |
| FIGURA 35. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD16+ $\geq$ PERCENTIL 90 .....          | 192 |
| FIGURA 36. COMPARACION DE SLE DESDE MASTECTOMIA EN PACIENTES CON CA DE MAMA DE ALTO RIESGO TRATADAS CON TCSP, EN FUNCION DEL NIVEL DE LA POBLACION CD56+ $\geq$ PERCENTIL 90 .....          | 193 |

## **Abreviaturas utilizadas en el texto:**

Ac: anticuerpo

Ac Mo: anticuerpo monoclonal

Ag: antígeno

ATG: globulina antitimocítica

CCDA: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

Células NK: células natural killer.

CGH: célula germinal hematopoyética

CGHP: célula germinal hematopoyética pluripotencial

CMLA: cáncer de mama localmente avanzado

DMSO: dimetilsulfóxido

EE: enfermedad estable

EICH: enfermedad injerto contra huésped

EMR: enfermedad mínima residual

Epo: eritropoyetina

G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocito-macrofágica.

ICL: reacción o efecto injerto-contra-leucemia

ICT: irradiación corporal total

Ig: inmunoglobulina

IL: interleukina

LAL: leucemia aguda linfoide

LAM: leucemia aguda mieloide

LGL: linfocito grande granular

LIF: factor inhibidor de la leucemia

LNH: linfoma No Hodgkin

M-CSF: factor estimulante de colonias monocito-macrófago

MM: mieloma múltiple

NS: no estadísticamente significativa

PG: progresión de enfermedad

PHA: fitohemaglutinina

PWM: pokeweed mitogen

QAD: quimioterapia en dosis altas

RC: remisión completa

RNT: recaída no tratada

RP: respuesta parcial

SCF: stem cell factor

TCGH: trasplante de células germinales hematopoyéticas

TCSP: trasplante de células germinales de sangre periférica

TMO: trasplante de médula ósea

TPO: trombopoyetina

**RECONSTITUCION INMUNE EN EL TRASPLANTE AUTOLOGO  
DE CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS**

## I. INTRODUCCION

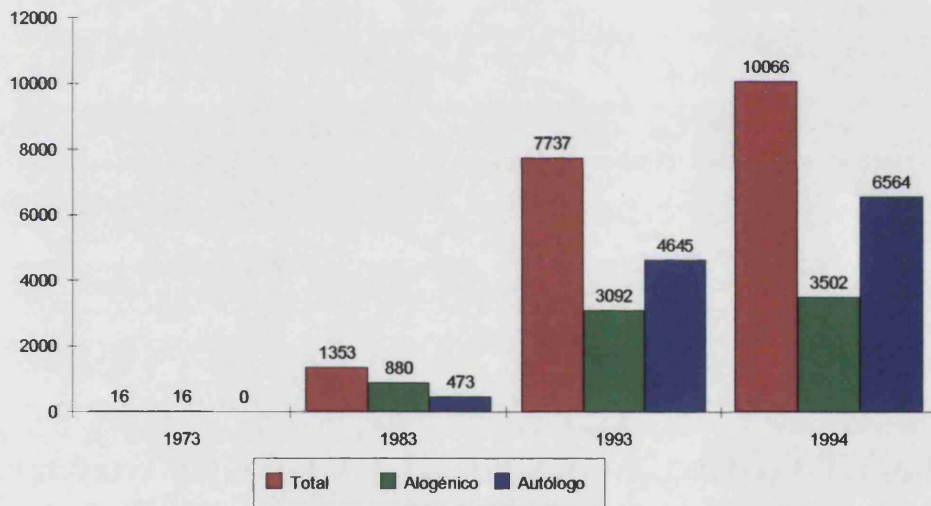
## I. INTRODUCCION

El trasplante de médula ósea es un procedimiento terapéutico que ha pasado de ser un tratamiento experimental en los años 70, a estar totalmente integrado en los esquemas de tratamiento de gran número de enfermedades, entre las que se incluyen las inmunodeficiencias y otros trastornos congénitos, aplasia medular, neoplasias hematológicas y tumores sólidos. El número de trasplantes que se realizan anualmente ha crecido de forma muy importante, de modo que el número total de trasplantes realizados en Europa ha aumentado 10 veces en los últimos 10 años, siendo en 1994 de 10.066<sup>1</sup>. La evolución de la actividad europea en trasplantes de precursores hematopoyéticos se resume en la Figura 1.

La eficacia de este procedimiento está condicionada por múltiples factores entre los que destacan los relacionados con la resistencia de las células tumorales a la quimio-radioterapia, en el caso de enfermedades neoplásicas, y los relacionados con el desarrollo de la reacción enfermedad injerto contra huésped (EICH), en el caso de TMO alogénico. Sin embargo, la recuperación de un sistema inmune funcional es imprescindible para una supervivencia prolongada después de un trasplante de médula ósea, ya que la inmunodeficiencia adquirida postrasplante puede influir no sólo en la frecuencia y gravedad de las infecciones, sino en el control de la posible enfermedad neoplásica residual.

**FIGURA 1**

**Trasplante de precursores hematopoyéticos en Europa.  
Evolución de la actividad desde 1973 hasta 1994.**





En los últimos años se han producido tales avances en el plano biológico y de aplicación clínica en relación con el trasplante de médula ósea, que ha hecho necesario redefinir términos y conceptos. El término trasplante de médula ósea se ha reemplazado por el de trasplante de células germinales hematopoyéticas (TCGH) para incluir células germinales de otro origen como es la sangre periférica o la sangre de cordón umbilical. La evolución del tipo de célula germinal utilizada en los últimos años en Europa <sup>1</sup>, se resume en la Figura 2.

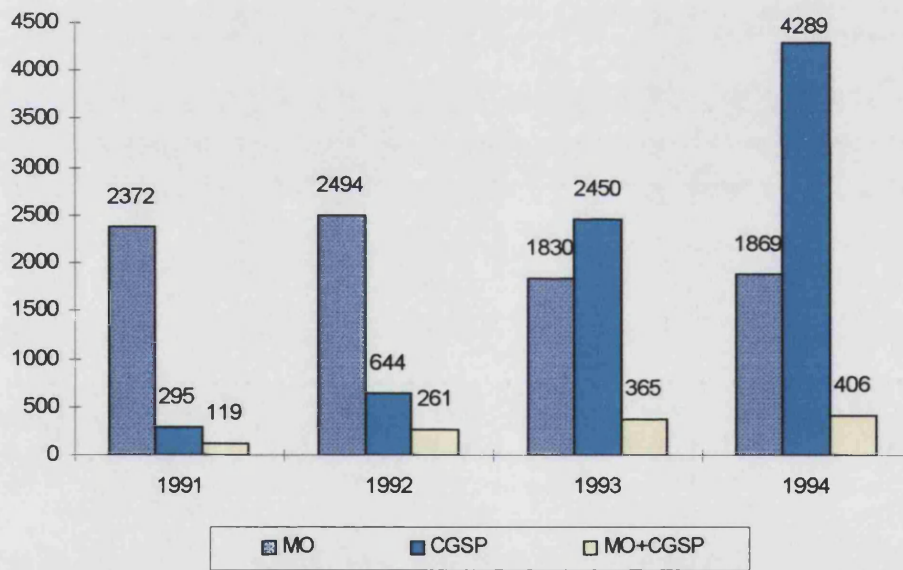
La recuperación hematológica es diferente dependiendo del origen de las células germinales hematopoyéticas utilizadas y del tipo de donante (autólogo y alogénico con o sin diferencias antigénicas HLA), y existen datos preliminares que indican que también puedan existir diferencias en la recuperación inmune.

Tras la identificación parcial de la estructura y función de los diferentes componentes del sistema inmune post-TCGH, en los últimos años, se han iniciado estudios para determinar los diferentes patrones de recuperación inmune en función del tipo de donante y origen de las CGH, su influencia en la frecuencia de infecciones y recaída de la enfermedad, así como en la posibilidad de manipular el sistema inmune para no sólo prevenir infecciones, sino también prevenir o tratar las recaídas postrasplante y las neoplasias secundarias.

El TCGH autólogo constituye un modelo más idóneo que el trasplante alogénico, para el estudio de la reconstitución inmune ya que intervienen un menor número de factores que pueden provocar alteración inmune añadida.

**FIGURA 2**

**Origen de los precursores hematopoyéticos para trasplante autólogo en Europa desde 1991 hasta 1994<sup>1</sup>.**



Este estudio ha tenido como objetivos establecer el patrón de reconstitución inmune tras trasplante autólogo de células germinales hematopoyéticas de diferente origen (MO y CGSP) en el grupo global de pacientes y en el subgrupo de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo, tratado con TCGH autólogo en nuestro Servicio, estudiando su posible influencia en el desarrollo de recidiva neoplásica y estudiar las posibles diferencias en el ritmo de recuperación inmune de pacientes con diagnóstico de enfermedad hematológica con la de tumores sólidos.

## **I.1. TRASPLANTE DE CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS.**

### **I.1.1. Concepto y antecedentes históricos.**

El TCGH, consiste en la administración de células progenitoras hematopoyéticas de un donante HLA total o parcialmente compatible (allogénico) o la del propio paciente (autólogo) previamente extraída, con el fin de recuperar la actividad hematopoyética e inmunológica que ha sido destruida por efecto secundario de un tratamiento citotóxico con dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia que intentan la erradicación de un proceso neoplásico o inducir una inmunosupresión que permita el injerto de dichas células.

El uso de quimio-radioterapia en dosis altas en procesos neoplásicos se basa, en la relación demostrada entre la dosis de fármacos y el efecto citotóxico antitumoral. La máxima dosis tolerada de muchos agentes está limitada por su toxicidad sobre las células medulares normales. La dosis de quimio/radioterapia

se puede aumentar considerablemente si es seguida de un TCGH con el fin de restaurar la hemopoyesis.

El tratamiento quimio-radioterápico citotóxico tiene los siguientes objetivos:

- a) producir una inmunosupresión del huésped necesaria para que injerte la médula ósea HLA parcial o completamente compatible.
- b) la destrucción del clon celular tumoral o con alteración genética que permita la erradicación de la enfermedad.
- c) crear un espacio libre de células tumorales y células hematopoyéticas previas que permita la implantación de células germinales hematopoyéticas normales.

La administración de CGH posterior tiene como objetivo el aportar células con capacidad de autorenovación previamente reducidas por el propio trastorno hematopoyético como ocurre en la aplasia medular o en algunos tipos de inmunodeficiencia severa, o reducidas por la administración del tratamiento citotóxico previo.

El desarrollo del TMO se inicia tras la segunda guerra mundial. Los efectos hematológicos producidos por la irradiación en los supervivientes de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki, estimularon la investigación del potencial radioprotector de la médula ósea en animales de experimentación. Los avances en el desarrollo de la técnica de TMO se deben a la aplicación de los resultados obtenidos en estudios experimentales en roedores, perros y monos y a los procedentes de la investigación clínica <sup>2</sup>. La irradiación corporal total (ICT) en dosis de 5 a 7 Gy, produce una insuficiencia medular letal sin toxicidad intestinal ni neurológica.

Sin embargo, ya a principios del presente siglo, en 1922, un investigador danés, llevó a cabo estudios intentando modificar el daño inducido por radioterapia en animales de experimentación <sup>3</sup>. La protección de los miembros inferiores prevenía el desarrollo de trombopenia y complicaciones hemorrágicas.

Algunos años más tarde, en 1.949, Jacobson demostró que ratones irradiados letalmente se podían recuperar si se protegía el bazo, sirviendo posiblemente éste como un injerto hematopoyético <sup>4</sup>.

En 1.951 Lorenz demostró que la hematopoyesis podía ser restaurada en ratones radiados con dosis letales mediante la administración parenteral de médula singénica <sup>5</sup>.

En 1.957 E.D. Thomas demostró en humanos que se podían infundir con seguridad grandes cantidades de células hematopoyéticas obteniendo un injerto medular transitorio <sup>6</sup>. Este autor junto con Mathé, son los pioneros en el desarrollo clínico del TMO. En 1963 Mathé describió por primera vez el cuadro clínico de EICH agudo y aportó la primera evidencia de supervivencia duradera con prendimiento completo del injerto en una paciente con leucemia aguda <sup>7,8</sup>. Asimismo propuso la necesidad de administrar grandes dosis de ICT con objetivo antitumoral y la aplicación de técnicas estériles en el manejo de este tipo de pacientes.

En 1.967, Van Bekum y De Vries describen la EICH, caracterizada por pérdida de peso, adelgazamiento, grave diarrea y muerte en un grupo de ratones que habían recibido células del bazo de otra especie, e interpretada como un fenómeno de agresión inmunológica de los linfocitos del donante frente a tejidos del receptor <sup>9,10</sup>.

A pesar de los casos esporádicos realizados durante la década de los 60, la incorporación del trasplante de médula ósea como parte habitual del tratamiento tuvo que esperar al desarrollo de diferentes áreas de la medicina. La más importante de ellas fue el descubrimiento y caracterización progresiva del sistema de histocompatibilidad básico para la selección del donante de médula ósea. También necesario fue el desarrollo de las medidas de soporte de pacientes en situación de pancitopenia durante varias semanas, entre ellas las de mayor impacto clínico fueron el desarrollo de antibióticos y antifúngicos más eficaces y de técnicas de recolección de plaquetas de donantes normales.

Hasta finales de 1.960 los resultados fueron desalentadores, por una parte por realizar las indicaciones en pacientes con enfermedad avanzada y resistente y por otra por la dificultad para controlar la EICH, fatal en la mayoría de las ocasiones, debido a la utilización de médula no histocompatible así como por la gravedad de las infecciones en pacientes neutropénicos e inmunodeprimidos.

Es a partir del año 1.975 en que convergen los desarrollos señalados y E.D. Thomas y colaboradores, del Fred Hutchinson Research Cancer Center en Seattle, precisan la tecnología del TMO iniciando la era del desarrollo clínico del TMO <sup>11</sup>. El estudio de la recuperación inmune postrasplante se inicia a mediados de los años 80, al constatarse el aumento de la frecuencia de infecciones y la persistencia de alteraciones del funcionalismo inmune durante varios meses e incluso años después del trasplante <sup>12,13,14</sup>.

### **I.1.2. Mecanismos de curación del trasplante**

Los resultados actuales del TCGH en el seno de la estrategia de tratamiento de diversas neoplasias, indican que la radio-quimioterapia de acondicionamiento, puede no ser suficiente para eliminar la población tumoral en cierto número de casos <sup>15,16</sup>.

El mecanismo de curación del TCGH no está totalmente aclarado. A pesar de que se relaciona fundamentalmente con el efecto antileucémico de la quimio/radioterapia en altas dosis, existe evidencia de la contribución de la reacción inmunológica denominada injerto-contra-leucemia (ICL) asociado al TCGH alogénico ejercida por los linfocitos del donante de forma relativamente paralela a la reacción que induce la enfermedad injerto contra huésped (EICH) <sup>17</sup>.

Está demostrado que la reacción ICL es un mecanismo de curación de gran importancia en el trasplante alogénico en leucemia aguda<sup>18</sup> y linfoma<sup>19</sup>. La ausencia de esta reacción es la razón fundamental de la mayor tasa de recaída tras trasplante singénico y autólogo. Esta reacción de injerto frente a tumor puede ser operativa también en diferentes neoplasias hematológicas y en tumores sólidos.

Ciertos tumores sólidos, entre los que se incluye el carcinoma de mama, expresan en una proporción importante, antígenos HLA-DR <sup>20,21,22</sup> y, por tanto, con capacidad de ser la célula diana en reacciones de citotoxicidad mediada por linfocitos que requieren la presencia de dichos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Tras diversos estudios experimentales que

demonstraron el efecto antitumoral de la inmunoterapia postrasplante con ciclosporina y/o interferón <sup>23,24,25</sup>, algunos estudios recientes han demostrado que ciertas formas de inmunoterapia pueden inducir el desarrollo de una reacción GVL, tras trasplante autólogo en pacientes con linfoma <sup>26</sup>, leucemia <sup>27,28,29</sup> y con cáncer de mama <sup>30,31,32,33</sup>. El desarrollo de GVL se correlacionó con la presencia de linfocitos citotóxicos frente a linfocitos de pacientes obtenidos pretrasplante.

Recientemente ha sido demostrado que la actividad NK en humanos (al igual que en ratones), es regulada por la expresión de múltiples receptores de membrana para diferentes especificidades de moléculas de clase I del CMH, con distribución clonal <sup>34,35,36,37,38,39,40</sup>. Por tanto, esta actividad citotóxica parece ejercerse a través de antígenos de clase I (HLA-B y HLA-C).

A pesar de que esta reacción ICL no existe en el trasplante autólogo, el estudio de la recuperación inmune demostró que en la fase precoz se produce una elevación transitoria de células con fenotipo y actividad citotóxica de amplio espectro, que puede ser de utilidad para defensa frente a infecciones desde un periodo inicial y tener influencia en el control de la enfermedad neoplásica residual.

Después del TCGH, las células NK recuperan niveles normales en un tiempo escaso (21-40 días) <sup>41</sup>. Se ha descrito que tras TAMO o TMO alogénico realizado con deplección de células T como profilaxis de EICH, la recuperación de células LGL tiene actividad LAK espontánea (sin asociación aparente a infección viral o EICH) durante 2-3 meses, para luego desaparecer <sup>42,43</sup>.



Esta actividad citotóxica natural puede ser de gran importancia como actividad antiviral y antitumoral mientras que se recupera la función inmunológica más específica. De hecho, existen datos preliminares que relacionan una mayor frecuencia de recidiva neoplásica con persistencia de baja actividad citotóxica natural postransplante de médula ósea <sup>44</sup>.

En un estudio de 50 pacientes sometidos a TMO, se observó correlación entre actividad NK baja y déficit de producción de interferón e infección viral de curso fatal, frente a la mejor evolución de aquellos pacientes con actividad NK normal <sup>45</sup>.

Tanto estudios en animales de experimentación como estudios preliminares en humanos, parecen indicar que la reconstitución inmune es más rápida en el TCSP que en el TAMO <sup>46,47</sup>, probablemente en relación con diferencias cuantitativas y cualitativas de la población linfoide administrada. Estas diferencias pueden ser de importancia, dado su actividad inmunoterapica potencial. El aumento de la actividad natural killer (NK) o subtipos de linfocitos T de forma temprana tras trasplante autólogo con CGSP, se puede asociar con un efecto ICL y pueden ser potencialmente manipulados mediante su activación adicional con la administración de agentes inmunomoduladores.

En este contexto, la inmunoterapia adoptiva con diversas citocinas entre las que se incluyen interferón, interleucina-2 o GM-CSF, puede tener gran interés como terapia adyuvante en pacientes con cáncer. Diversos autores han demostrado, mediante estudios *in vitro* que la función NK está considerablemente disminuida en pacientes portadores de diversas hemopatías malignas <sup>48,49</sup> y

neoplasias sólidas, normalizándose, con frecuencia, con la administración de IL-2<sup>50</sup>. Por otra parte, la acción inmunológica antitumoral puede ser más eficaz cuando la masa tumoral residual es escasa como debe ocurrir tras la quimio-radioterapia intensiva seguida de trasplante<sup>51</sup>.

### **I.1.3. Valoración de las CGH para el trasplante**

En el campo de la aplicación clínica las células para trasplantar ya sean de MO, SP movilizada o de cordón umbilical, deben ser capaces de producir una recuperación rápida y estable. Se valoran mediante la determinación de las CFU-GM y las CD34+. Las CFU-GM representan un estudio funcional aunque tienen la desventaja de la variabilidad entre los centros, en este tipo de cultivo, por los diferentes medios de condicionamiento (linfocitos estimulados, placenta, STF), así como la necesidad de esperar de 10-14 días para obtener el resultado. Las determinaciones de CD34 mediante citofluorometría han demostrado ventajas en cuanto a sencillez, rapidez en la determinación, así como mayor reproducibilidad entre los centros siguiendo las recomendaciones indicadas para su determinación<sup>52</sup>.

En el TAMO<sup>53,54</sup> y en el TCSP<sup>55,56,57,58</sup>, el número de CD34+ se correlaciona con el de CFU-GM y con la recuperación hematológica. Los casos en los que la correlación no es tan buena, probablemente sea debido a las dificultades y la variabilidad de las técnicas.

Sutherland ha demostrado la capacidad de determinar células CD34+ a niveles de 0,01-0,1%, esto permite la monitorización diaria de las CD34+ en SP

durante la movilización con QT y/o FCH para determinar el momento óptimo para comenzar las aféresis. La movilización de CGH a SP inducida por QT puede incrementar hasta 100 veces en número de CFU-GM respecto a la fase estable. El momento en el que aparece mieleemia y monocitosis es predictivo del aumento de CGH, este intervalo es poco duradero. La combinación de FCH y QT aumenta de 5-10 veces los CGH circulantes y el número de CD34+ obtenidas de SP movilizada es de 10-20 veces superior a las que se obtienen de MO. La administración de QT y FCH precisa de un seguimiento aproximadamente de dos semanas con recuentos de leucocitos y neutrófilos o determinaciones de CD34+ para detectar el momento del incremento de CGH y comenzar las aféresis, existiendo variabilidad entre los pacientes. Es conveniente realizar un seguimiento de CD34+ diario a partir de los 10 días de la QT. Hay datos que sugieren que las CGH mas inmaduras, responsables de la reconstitución a largo plazo, son las primeras en aparecer. Las CD34+ comienzan a aparecer 24-48 h antes que las CFU-GM y el pico de ambas coincide. Cuando la movilización se realiza con G-CSF sin QT este incremento se produce entre el 5º-7º día del inicio.

El número de CGH adecuado para transplantar no se encuentra totalmente definido. Considerando una buena recuperación hematológica cuando se alcanzan  $0.5 \times 10^9/l$  neutrófilos en 11 días y  $50 \times 10^9/l$  plaquetas a los 14 días, Gianni encuentra que el 95% de los pacientes trasplantados con CGSP que contiene  $50 \times 10^4$  CFU-GM y  $8 \times 10^6$  CD34, consiguen dicha recuperación. La cantidad mínima segura, se encuentra en torno a  $2 \times 10^6$  CD34 y  $10 \times 10^4$  CFU-GM. Teniendo en cuenta la variabilidad de los centros en las determinaciones, las

características clínicas de los pacientes como edad, QT previa, afectación de MO, tipo de QT de intensificación o los diferentes tipos de movilización, estas cifras deben ser consideradas en las diferentes situaciones, ya que todo ello puede influir en la cinética de la recuperación. Valores relativamente bajos de CD34+ alargan la recuperación de neutrófilos de 1-2 días, mientras que la recuperación de plaquetas se alarga más.

La recuperación precoz se produce a partir de las CGH comprometidas como lo demuestran estudios que presentan una buena correlación entre CFU-GM, CD34+/CD33+ y la recuperación <sup>59</sup>.

#### **I.1.4. Trasplante de médula ósea.**

##### **I.1.4.1. Técnica de extracción y procesamiento de médula ósea.**

La técnica de extracción de médula ósea sigue siendo básicamente la descrita por E.D. Thomas en 1970. El paciente (en el caso de un trasplante autólogo) o el donante ( en el caso de un trasplante alogénico o singénico), se someten a anestesia general o epidural y se extrae la médula mediante punciones múltiples de las dos crestas ilíacas posteriores y, si fuese necesario, de las crestas ilíacas anteriores y el esternón. En cada punto se extrae un máximo de 3 ml. para evitar una dilución excesiva con sangre periférica y reducir el número de linfocitos en el aspirado. El volumen aproximado extraído mediante 100 punciones es entre 600 y 1.200 ml (10 ml/Kg), de donde debe obtenerse una cantidad mínima de  $2 \times 10^8$  células mononucleadas/Kg de peso del paciente.

Estas cifras deben ser estrictamente respetadas o incluso ser superiores cuando la médula se somete a crioconservación o tratamiento *ex vivo*, debido a la reducción de la viabilidad celular que se produce durante estos procesamientos puede alcanzar hasta el 50%, aunque generalmente no sobrepasa el 10-15%. La médula ósea se filtra y se coloca en una bolsa de transfusión para administrarla al paciente por vía intravenosa en 1 hora.

Cuando la médula ósea procede del propio paciente y se va a realizar un trasplante autólogo se concentra para aumentar la proporción de células germinales, reducir el volumen de hematíes y polinucleares, facilitar la crioconservación y el tratamiento *ex vivo* si fuese necesario <sup>60</sup>.

En realidad no se conoce con exactitud el papel de la posible contaminación medular en la inducción de la recaída tumoral. Sin embargo, dado que la recidiva es la principal causa de fallo de TMO, se han intentado diversos tipos de tratamiento *in vitro* de la médula ósea con el fin de eliminar las células tumorales clonogénicas residuales de la médula ósea autóloga <sup>61</sup>. Los métodos utilizados son químicos (derivados de la ciclofosfamida: mafosfamida o ASTA-Z), inmunológicos (anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos para la célula tumoral asociados a complemento), biológicos (interferón, interleucina-2), físicos (separación con lectinas o mediante centrifugación) y métodos combinados (inmunoquímicos e inmunofísicos).

Sin embargo, el tratamiento *in vitro* tiene 2 grandes dificultades: 1.- No existen grandes diferencias en el metabolismo ni en las características

antigénicas entre la mayoría de las células tumorales y las CGH; 2.- No existe un método *in vitro* efectivo para la valoración de la eficacia de este proceder.

#### **I.1.4.2. Criopreservación.**

Tiene como finalidad mantener la viabilidad de las células germinales a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido) tras un proceso de congelación progresivo. En esta situación pueden conservarse durante varios años, ya que se detienen todas las reacciones metabólicas y enzimáticas. Para la congelación se añade a la médula dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración final del 10%, que actúa como crioprotector. Este producto es tóxico para las células hemato-poyéticas a temperaturas superiores a  $4^{\circ}\text{C}$ , por lo que tanto la congelación como la descongelación se debe hacer de forma rápida limitando el tiempo de exposición. La descongelación de la médula se realiza de forma rápida a  $37-40^{\circ}\text{C}$  y se administra inmediatamente al paciente.

#### **I.1.5. Trasplante con células germinales de sangre periférica (TCSP).**

Hasta hace aproximadamente 10 años la única fuente de CGH utilizada para trasplante ha sido la médula ósea. Ya previamente, en 1.951 se había demostrado la existencia de CGH circulantes en sangre mediante la observación que las células mononucleadas de sangre periférica podían proteger a ratones irradiados de una aplasia medular mortal. La presencia de estas células en el hombre fue demostrada en 1.971 por Chervenick y Boggs.

Las células primitivas, tanto los progenitores comprometidos como las células madre, se pueden detectar en la circulación sanguínea durante toda la vida. Sin embargo el número y la composición de las mismas varía en los diferentes estadios de la vida<sup>62,63</sup>. Durante la época fetal, la hematopoyésis está localizada inicialmente en el hígado, trasladándose luego al bazo y por último a la médula ósea; durante todo este periodo grandes cantidades de células primitivas (CD34+) se encuentran en la circulación y van disminuyendo progresivamente con el desarrollo fetal. En el momento del parto, la proporción y número total de células CD34+ encontradas en el cordón umbilical es similar al que existe en la médula ósea de adulto.

En la vida adulta, la sangre periférica en situación basal, contiene aproximadamente un  $0,2 \pm 0,1\%$  de células CD34+, es decir, una décima parte de las contenidas en la médula ósea ( $1,8 \pm 0,9\%$ ). Este número aumenta varias veces durante la fase de recuperación siguiendo al tratamiento con QT citotóxica, así como durante el tratamiento con diversos factores de crecimiento hematopoyético, como el G-CSF, GM-CSF y la interleukina-3<sup>64,65,66</sup>.

El fenómeno de movilización se define como la entrada de gran cantidad de progenitores en sangre periférica, a diferencia de lo que ocurre durante la fase basal de la hematopoyesis, y se considera inverso al fenómeno de "homing" observado durante el desarrollo fetal, y tras la infusión de las células madre en el trasplante.

Los progenitores, tanto las células madre responsables de la hemopoyesis a largo plazo, como los precursores comprometidos hacia líneas celulares

determinadas se localizan en la capa de células mononucleadas de la sangre periférica y pueden obtenerse por técnicas de aféresis.

La detección del fenómeno de movilización, junto con el desarrollo de la tecnología para la recolección diferencial de células sanguíneas, ha permitido el desarrollo del trasplante a partir de CGH de sangre periférica.

Las ventajas potenciales del trasplante con CGSP son básicamente tres:

1.- Las CGSP se pueden obtener sin el requisito de una médula ósea pélvica normal, 2. Elimina la necesidad de anestesia general o epidural, 3.- La reconstitución hematológica es substancialmente más rápida que cuando se utiliza médula ósea. La posible menor contaminación tumoral de la SP no ha sido demostrado clínicamente con la reducción de las recaídas.

No existen dudas de que las CGH de SP son capaces de conseguir una reconstitución hematológica precoz completa tras una quimio-radioterapia mieloablativa. En animales de experimentación existe evidencia amplia de que las CGH de SP reconstituyen la hemopoyesis de forma permanente. Los estudios con seguimiento más prolongado parecen confirmar en humanos que estas células pueden mantener la hematopoyesis a largo plazo al mismo nivel que la MO. Los estudios de marcaje genético de las células reinfundidas podrán demostrar el origen de la hematopoyesis a largo plazo en el paciente trasplantado.

La concentración de las distintas subpoblaciones de células hematopoyéticas primitivas es diferente en MO y en sangre periférica. En la MO existe una proporción progresiva continua de precursores progresivamente más diferen-



ciados. En sangre periférica la relación entre progenitores más inmaduros e intermedios es más bajo que en MO, es decir, predominan los más diferenciados, responsables de la recuperación hemopoyética temprana tras trasplante pero con potencialmente menor capacidad de mantener la hemopoyesis de forma tardía (permanente).

En comparación con MO, el producto obtenido de la SP contienen 3 veces más células CD34+, 7-10 veces más linfocitos T (con predominio de linfocitos CD4+) y 20 veces más células NK.

El número de células mononucleadas de sangre periférica, CFU-GM y células CD34 positivas que se recomienda administrar para asegurar un prendimiento medular estable, es mayor que cuando se utiliza médula ósea, siendo de  $7 \times 10^8/\text{Kg}$  y  $1-10 \times 10^6/\text{Kg}$  peso del paciente, respectivamente.

#### **I.1.5.1. Obtención y procesamiento de CGSP.**

Actualmente se utilizan básicamente 3 métodos de movilización:

1. Quimioterapia, 2. Factores de crecimiento hematopoyético (FCH) y 3. Asociación de quimioterapia y FCH.

El fenotipo de las células CD34+ movilizadas es muy similar al de las CD34 de MO en situación basal, aunque existen ciertas diferencias significativas: Cualquiera que sea el método de movilización, las células CD34+ movilizadas a SP tienen menor expresión de c-kit y CD71, y menor retención de rodamina (Rh123).

**Mecanismos de movilización.-** Las bases moleculares que condicionan la liberación de las células progenitoras a la sangre periférica no están

completamente comprendidas y al parecer pueden estar implicados varios mecanismos y dependen del método usado para movilizarlas. Las células hematopoyéticas poseen un número importante de receptores para las moléculas de adhesión, cuyos ligandos se demuestran en el estroma medular; parece que esta interacción (célula hematopoyética-molécula de adhesión-celula estromal) constituye el mecanismo principal de retención de las células progenitoras en la médula ósea en situación basal, y por tanto la ruptura de dichas interacciones originaría la liberación de las células progenitoras a la sangre <sup>67</sup>.

Los diversos factores de crecimiento ejercen un papel fundamental en el control de las interacciones a través de las moléculas de adhesión, regulando su expresión, activación, síntesis o degradación. Se ha podido observar que el 75% de las células CD34+ de la médula ósea expresan el c-kit, y se adhieren a los fibroblastos a través de su interacción con el SCF, sin embargo, las células CD34+ de la sangre periférica movilizadas con ciclofosfamida solo lo expresan en un 18%, por ello se puede considerar que el cambio producido en la expresión de dicha molécula de adhesión facilitaría la liberación de las células progenitoras <sup>68</sup>.

Otros mecanismos que pueden explicar la movilización son el aumento de la circulación de las células progenitoras expandidas en médula ósea (como ocurre en la fase embrionaria), estímulo no fisiológico de la hematopoyésis tras daño subletal de la médula secundaria a QT, o modificaciones del microambiente y/o de las integrinas.

#### **Contaminación tumoral del inoculo de células germinales.**

Inicialmente, una de las ventajas atribuidas a los trasplantes con células

germinales de sangre periféricas fue la menor posibilidad de contaminación tumoral de la SP sobre la médula ósea. Estudios de enfermedad mínima residual utilizando técnicas de análisis citogenético, reordenamientos de genes por Southern blot o PCR, análisis inmunológico de diferenciación antigénica o ensayos clonogénicos, han demostrado que la contaminación tumoral de la SP es más frecuente de lo que habitualmente se detecta con métodos histológicos de rutina <sup>69,70,71</sup>, aunque la cantidad o carga tumoral de la SP medida por PCR o cultivos celulares es menor que la detectada en MO.

Parece que en determinadas enfermedades, si existe afectación de la médula por tumor, las técnicas de movilización son capaces de inducir la liberación de dichas células junto con los progenitores hematopoyéticos, y que esto se produce fundamentalmente tras los primeros ciclos de QT administrados al paciente, cuando la masa tumoral es todavía alta <sup>72</sup>. Esto obliga a que optimizar el momento de la recolección para minimizar la posibilidad de contaminación tumoral. Los riesgos de mayor contaminación tumoral, al igual que en la médula ósea, se presentan en enfermos afectados de leucemias agudas o crónicas, mieloma múltiple y linfomas de bajo grado. Con menor probabilidad de afectación tumoral, están los linfomas de alto grado, la enfermedad de Hodgkin y los tumores sólidos como el cáncer de mama y el cáncer de pulmón de células pequeñas.

Se desconoce cual es el significado biológico de la reinfusión de cantidades limitadas de células tumorales viables ya que la presencia de estas células en el injerto puede ser un marcador indirecto de la persistencia de una

masa tumoral alta en el paciente. A pesar de existir trabajos <sup>73,74</sup> que demuestran mediante técnicas de marcaje genético que la recaída de la enfermedad puede estar originada por las células tumorales presentes en el producto a trasplantar, en la mayoría de los casos y sobre todo en tumores sólidos el origen más común de la recidiva postrasplante autólogo parece estar en la enfermedad residual endógena resistente a la QT.

Se está determinando cual es el valor de las técnicas de purgado tumoral y de selección positiva de células CD34+ como métodos de reducir entre 2-4 log la contaminación tumoral.

El proceso de movilización supone la salida de progenitores desde la MO hacia territorios extramedulares (bazo e hígado). En base a la reducción del contenido de progenitores en MO, se ha calculado un eflujo de un 0.5-3% CFU-S/hora durante los 6 días de administración de G-CSF.

En la movilización inducida por quimioterapia la movilización parece relacionarse con lesión del microambiente medular. En el caso de la movilización por FCH, se relaciona con modificación del fenotipo por la diferente expresión de moléculas de adhesión. La menor expresión de c-kit en las células CD34+ movilizadas (sea cual sea el método de movilización) y la interrelación de stem cell factor (SCF) y c-kit, sugiere que esta relación ligando/receptor puede ser el modulador crucial de la relación de la célula germinal y el estroma hematopoyético y del proceso de movilización.

#### **I.1.5.2. Criopreservación.**

El proceso de criopreservación hasta el momento de la reinfusión, es

similar al descrito para la médula ósea. Las células progenitoras una vez recolectadas van a ser almacenadas en nitrógeno líquido hasta su reinfusión para lo cual, sin mayor manipulación, se mezclan con plasma autólogo o una solución albuminosa y dimetilsulfoxido (DMSO) como agente crioprotector, a una concentración final del 10%, y son congeladas con un aparato de velocidad de congelación programable (1-3 °C/min). Como alternativa válida se puede utilizar la congelación no programada a -80 °C, usando como crioprotector la mezcla de DMSO al 10% y HES al 6% <sup>75</sup>. La reinfusión se realiza tras la descongelación rápida de la bolsa mediante inmersión en baño a 37 °C, sin eliminación del crioprotector ni uso de filtros, usando un catéter central.

#### **I.1.6. Preparación del paciente y bases del tratamiento quimio-radioterápico intensivo.**

Antes de la infusión de CGH es necesario administrar un tratamiento de preparación o acondicionamiento que tiene como objetivos la inmunosupresión del paciente y erradicar el clon celular tumoral. Ello se realiza con radioterapia y quimioterapia a dosis letales para la médula ósea.

En los casos en que el TCGH se realiza en enfermedades malignas, el tratamiento de intensificación es únicamente una parte de un esquema terapéutico que intenta la erradicación de la enfermedad. El tratamiento con quimioterapia de inducción inicial (específica para cada enfermedad) con el objetivo de alcanzar la remisión completa (RC), la intensificación con radioterapia y/o quimioterapia previa al TCGH y el eventual efecto del injerto contra la leucemia,

reducen progresivamente logaritmos celulares tumorales para obtener la curación de la enfermedad.

Los resultados del TCGH realizado en diferentes momentos evolutivos de diversas enfermedades neoplásicas muestra claramente la importancia de practicar el tratamiento intensivo en situación de RC, por el menor volumen tumoral que ello supone y, por constituir un subgrupo de pacientes relativamente quimiosensible. La utilidad del TMO realizado en fases avanzadas de la enfermedad, es generalmente marginal.

La aplicación de dosis elevadas de quimioterapia se basa en la teoría de Goldie y Goldman que indica que las células tumorales son más sensibles a concentraciones más elevadas de fármacos y cuando el tiempo de duplicación de éstas es además más corto y por lo tanto hay más células en ciclo. Por otra parte, la posibilidad de desarrollo de un clon celular resistente es proporcional al número de divisiones celulares y por este motivo los tumores más grandes tienen más probabilidad de tener más clones resistentes que los pequeños. El efecto dosis-respuesta se ha demostrado para diversos fármacos, especialmente los agentes alquilantes, únicamente en ciertos tumores denominados quimiosensibles como son los LNH, enfermedad de Hodgkin y las leucemias agudas.

El efecto-dosis tiene como límite para su aplicación en clínica la toxicidad extrahematopoyética.

La selección de los fármacos para intensificación en TMO debe efectuarse con arreglo a los siguientes criterios: a) sinergismo demostrado en animales de experimentación o en clínica; b) curva dosis-respuesta en líneas celulares línea

descendente; c) no resistencia cruzada; d) posibilidad de utilizar dosis al menos 5 veces superior a la estándar; e) no potenciación del efecto tóxico extramedular por los fármacos; f) rápida eliminación para permitir el injerto de médula ósea <sup>76</sup>.

Los fármacos más utilizados son los alquilantes (ciclofosfamida, melfalán, busulfán, tiotepa) por su amplitud antitumoral, intensidad de su efecto y mayor dificultad para generar resistencias. Otros fármacos usados son el etopósido, carboplatino, cisplatino, arabinósido de citosina y BCNU. En la Tabla 1 se exponen la dosis y toxicidad de estos agentes.

**Tabla 1. Dosis y toxicidad de los fármacos utilizados en el trasplante de célula germinal hematopoyética.**

| Fármaco        | Dosis convencional<br>(mg/m <sup>2</sup> ) | Máxima dosis tolerada<br>(mg/m <sup>2</sup> ) |                               | Dosis habitual en el<br>TMO autólogo | Toxicidad no hematológica        |
|----------------|--|---|-------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
|                |  | Sin rescate de<br>médula ósea                 | Con rescate de<br>médula ósea |                                      |                                  |
| Ciclofosfamida | 50-1.000                                   | 7.500   | 7.500                         | 120-200 mg/Kg                        | Cardiaca, vesical, GIT           |
| Ifosfamida     | 5.000                                      | -   | 18.000                        | 12.000 mg/m <sup>2</sup>             | Renal, mucositis                 |
| Melfalán       | 40   | 140   | 260                           | 140-200 mg/m <sup>2</sup>            | Renal, mucositis                 |
| BCNU           | 200  | 600   | 1.200                         | 800-1.600 mg/m <sup>2</sup>          | Hepática, pulmonar               |
| Etopósido      | 300-600                                    | 600   | 2.400                         | 1.000-2.100 mg/m <sup>2</sup>        | Mucositis, hepática,<br>pulmonar |
| Tiotepa        | 30   | 240   | 1.135                         | 900 mg/m <sup>2</sup>                | GIT, hepática                    |
| CDDP           | 100  | 200   | 220                           | 200 mg/m <sup>2</sup>                | Renal, neuropatía periférica     |
| Carboplatino   | 400  | 2.000   | 2.000                         | 8.00-1.000 mg/m <sup>2</sup>         | Hepática, renal                  |
| Busulfán       | -  | -   | -                             | 16 mg/Kg                             | Pulmonar                         |



En el trasplante alogénico para el tratamiento de hemopatías la combinación más utilizada es la propuesta por el grupo de Seattle con ciclofosfamida 60 mg/Kg/día en 2 días consecutivos e irradiación corporal total (ICT) entre 10 y 14 Gy, en una sola dosis o fraccionada. Según el tipo de tratamiento y los fármacos utilizados, su administración se inicia entre 5 y 8 días antes de la infusión de la médula ósea. En la Tabla 2 se resumen las combinaciones de quimio-radioterapia utilizadas con mayor frecuencia.

**Tabla 2. Protocolos de acondicionamiento más utilizados en trasplante de células germinales hematopoyéticas.**

| Protocolo   | Dosis  | Enfermedad                              |
|---|--|---|
| Ciclofosfamida<br>ICT                                       | 60 mg/Kg/día x 2<br>10-14 Gy (1-8 fracciones)  | Leucemia Aguda<br>Linfoma linfoblástico |
| <b>BuCy</b><br>Busulfán<br>Ciclofosfamida                   | 4 mg/Kg/día x 4<br>50 mg/Kg/día x 4  | Leucemia Aguda<br>LMC                   |
| <b>CBV</b><br>Ciclofosfamida<br>BCNU<br>VP-16               | 1,5 g/Kg/día x 4<br>300 mg/m <sup>2</sup> /día<br>250 mg/m <sup>2</sup> x 3  | E. Hodgkin                              |
| <b>BEAM</b><br>BCNU<br>VP-16<br>Ara-C<br>Melfalán           | 300 mg/m <sup>2</sup><br>200 mg/m <sup>2</sup> /día x 4<br>200 mg/m <sup>2</sup> /día x 4<br>140 mg/m <sup>2</sup> | E. Hodgkin<br>LNH                       |
| Ara-C<br>Ciclofosfamida<br>ICT                              | 2 g/m <sup>2</sup> /12 h x 8 dosis<br>60 mg/Kg/día x 2<br>9,9 Gy ( 3 fracciones )                                  | Leucemia Aguda                          |
| <b>STAMP-V</b><br>Ciclofosfamida<br>Carboplatino<br>Tiotepa | 6 gr/m <sup>2</sup><br>800 mg/m <sup>2</sup><br>500 mg/m <sup>2</sup>  | Cáncer de mama                          |

La extracción de la médula ósea o de CGSP para un trasplante autólogo se suele realizar cuando el paciente ha alcanzado la situación de RC en la masa tumoral residual es de  $10^6$  células y la médula contiene 1 célula leucémica por  $10^4$  células normales <sup>77</sup>. Estudios previos sugieren que sólo el 1% de las células clonogénicas sobreviven al proceso de la crioconservación, por lo tanto sólo se reinfunden 15-150 células leucémicas con capacidad clonogénica. Así mismo, estos mismos autores han calculado que la dosis de células que induce recaída en el 50% de los pacientes es de 1.000 a 10.000 células clonogénicas y por ello la posibilidad de reinfundir células leucémicas que puedan inducir recaída es del 1-10%.

Los regímenes terapéuticos más eficaces son las combinaciones de ciclofosfamida o arabinósido de citosina con ICT, busulfán y ciclofosfamida a altas dosis, que pueden reducir en más de 10 logaritmos de células leucémicas.

Las recaídas, después de obtener una RC clínica de cualquier proceso tumoral, se deben a un fenómeno de resistencia no controlado pese a las dosis elevadas de quimioterapia. Por otra parte, la remisión completa clínica de una leucemia se diagnostica pese a poder existir  $10^{10}$  células tumorales residuales. Recientemente se han introducido métodos que permiten estudiar la enfermedad residual subclínica (EMR) mediante técnicas inmunológicas, citogenéticas, reordenamiento de genes y estudio de oncogenes. El diagnóstico de EMR permitirá planificar tratamientos *ex vivo* y controlar los resultados.

### **I.1.7. El injerto medular.**

El prendimiento del injerto se realiza después de un período de neutropenia y trombopenia profunda. La recuperación de la hematopoyesis requiere la administración de una cantidad adecuada de CGH que varía en función de que el origen sea médula ósea alogénica o autóloga o con CGSP. El fracaso en el prendimiento puede depender de la administración de un número reducido de CGH, de un proceso de rechazo por incompatibilidad antigénica donante-receptor, por un tratamiento de acondicionamiento insuficiente o por deplección de linfocitos T en la médula ósea del donante con un intento de evitar la enfermedad injerto contra huésped (EICH).

Existe una cierta relación entre la generación de colonias CFU-GM a partir de la MO o SP extraída y la recuperación de la hematopoyesis.

La recuperación habitual de un TMO alogénico se inicia por una elevación de reticulocitos a partir del 10º día que coincide con la aparición en médula ósea de algunos precursores granulocíticos y eritroblásticos aislados entre los días 5º y 10º, los cuales forman islotes mielo-eritroides regenerativos entre los días 9º y 15º indicando la presencia de injerto de la médula. Los neutrófilos alcanzan cifras de  $0.1 \times 10^9/l$  hacia el día 16º y  $1 \times 10^9/l$  sobre el día 26º y el recuento de plaquetas por encima de  $20 \times 10^9/l$ . se alcanza una semana después de la elevación de los neutrófilos, entre el día 20º y 25º.

Entre los días 15º y 30º, la médula adquiere mayor celularidad, aunque permanece hipoplásica durante un tiempo que en ocasiones puede ser prolongado.

El trasplante con CGSP o la administración de G-CSF o GM-CSF postrasplante suelen acortar en 1 semana el período de recuperación por aportar o estimular a precursores intermediarios de la granulopoyesis. Por el contrario, los tratamientos *ex vivo* de la médula ósea retrasan la recuperación hematopoyética.

La confirmación de la implantación de un injerto de médula ósea alogénico se realiza por técnicas que definen la existencia de una quimera hematopoyética con características del donante como son el cariotipo, el tipaje de antígenos eritrocitarios, las isoenzimas eritrocitarias y linfocitarias, el tipaje HLA en los TMO que no son idénticos, el alotipo de las inmunoglobulinas y el análisis de polimorfismos del ADN.

#### **I.1.8. Complicaciones infecciosas.**

Por su relación con la inmunodeficiencia postrasplante, se resumen a continuación las principales complicaciones infecciosas que pueden aparecer postrasplante:

En función del tipo de infección se suelen diferenciar tres fases post-TMO:

La 1ª fase que se extiende generalmente entre los días 0 al +20. El factor de riesgo infeccioso más importante en esta fase es la neutropenia y por tanto, las infecciones más frecuentes son bacterianas y fúngicas. Los lugares de infección, agentes causales y medidas preventivas y de tratamiento son similares

a las de todo paciente neutropénico. También son frecuentes las infecciones víricas por herpes simple.

La 2ª fase se inicia con el injerto hematológico y se extiende hasta el día +100. Constituye la fase en la que existe una inmunodepresión celular más profunda por la cinética de reconstitución inmune pos-TMO y por la frecuente aparición de EICH aguda y su tratamiento. Durante esta fase es especialmente frecuente y grave la infección por citomegalovirus (CMV) en forma de neumonía intersticial bilateral (NI). También se observan con frecuencia infecciones bacterianas y por hongos.

La infección por CMV es la causa más frecuente de muerte infecciosa tras TMO alogénico. Ocurre más frecuentemente en pacientes CMV-seropositivos, edad avanzada y aquellos que desarrollan EICH aguda. La infección por CMV se produce a través del inoculo de médula ósea o transfusiones sanguíneas, o resulta de la reactivación del virus latente en el paciente. En ausencia de tratamiento profiláctico, la frecuencia de neumonía por CMV en TMO, es del 15-20%. La mortalidad hasta recientemente era superior al 80% <sup>78</sup>.

El tipo de prevención de la infección por CMV depende de la situación serológica del paciente y del donante previo al TMO. En pacientes CMV-seronegativos, con donante seronegativo, la prevención se puede realizar mediante la transfusión de productos sanguíneos seronegativos. Con esta medida se ha observado un descenso de frecuencia de infección desde el 40%, con el uso de sangre sin estudio CMV, hasta el 1-3% con la utilización de hemoterapia seronegativa. Cuando el donante es seropositivo, el beneficio de la hemoterapia

seronegativa persiste aunque es menor. La administración profiláctica de inmunoglobulinas intravenosas inespecíficas (IGIV) puede ser de utilidad.

La 3ª fase o tardía, se inicia en el día +100 y su duración se prolonga en caso de existir EICH crónica. Se caracteriza por la frecuencia de infecciones víricas por herpes zóster, que aumenta en caso de incompatibilidad HLA, e infecciones bacterianas por gérmenes grampositivos encapsulados de vías respiratorias y senos paranasales que se han relacionado con el déficit de la subclase IgG2.

La neumonía intersticial (NI) constituye la complicación infecciosa que por sí sola causa la mayor mortalidad en pacientes sometidos a TMO alogénico.

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de NI son la edad del paciente, el EICH agudo grave y la utilización de ICT en el tratamiento de acondicionamiento.

Aunque su frecuencia ha descendido en los últimos años en relación con las distintas medidas de prevención de la infección por CMV, aparece en el 20-40% de los pacientes con TMO-alogénico. El CMV es el agente causal del 50% de los casos. El resto se relaciona con la ICT, otros virus y *Pneumocystis carinii*. La frecuencia es mucho menor en el TAMO (3%) a pesar de que la incidencia de infección por CMV es similar (40%-50%) en ambos tipos de trasplante. Es excepcional en TMO singénico.

Los avances en el tratamiento de la NI han conseguido reducir la mortalidad desde el 90% hasta un 50%. El tratamiento se basa en la combinación de IGIV inespecífica o IGIV con títulos altos frente a CMV (IGIV-CMV) y ganciclovir.

El tratamiento consta de dos fases, una primera de inducción utilizando ganciclovir (5 mg/Kg/12 horas) e IGIV (500 mg/Kg/48 horas) o IGIV-CMV (200-400 mg/Kg, 5 dosis), de duración que varía en los distintos ensayos entre 10 y 21 días. Se continúa con una fase de mantenimiento con ganciclovir (5 mg/Kg/día) e IGIV durante 1-6 meses. La utilización de IGIV-CMV no ha demostrado diferencia en la supervivencia respecto a la IGIV estándar.

#### **I.1.9. Indicaciones de trasplante de CGH.**

La intención en la indicación del TCGH es curativa. Para que sea eficaz es importante y, en ocasiones necesario, que el tumor sea quimiosensible, que la masa tumoral sea reducida y que la situación clínica del enfermo sea aceptable. La edad del paciente es un factor importante, sobre todo en el TCGH alogénico en donde por encima de 40-50 años se origina una mayor mortalidad. En la **Tabla 3** se incluyen las principales indicaciones del TCGH.

La marcada quimiosensibilidad de ciertos tumores sólidos y la obtención de un número de RC superior al 50% con quimioterapia a altas dosis y TMO autólogo ha hecho previsible la posibilidad de curación de forma similar a lo que ocurre en los tumores hematopoyéticos.

**Tabla 3. Indicaciones del Trasplante de Médula Osea.**

**A.- Trasplante alogénico.**

**A.1. Enfermedades Hereditarias.**

**A.1.1. Déficits de la Inmunidad.**

**A.1.1.1. Déficits inmunitarios mixtos y graves.**

Inmunodeficiencia severa combinada

Disgenesia reticular.

Ausencia de precursores de linfocitos T.

Síndrome de Wiskott-Aldrich.

Síndrome de Di George

**A.1.2. Enfermedad de células fagocitarias.**

Agranulocitosis de Kostmann.

Granulomatosis séptica crónica.

Enfermedad de Chediak-Higashi.

**A.1.3. Enfermedades de la línea eritrocitaria.**

$\beta$ -talasemia mayor.

Drepanocitosis.

Enfermedad de Blackfan-Diamond.

**A.1.4. Aplasia medular.**

Enfermedad de Fanconi.

Disqueratosis congénita.

**A.1.5. Enfermedades Metabólicas Enzimopáticas.**

**A.1.5.1. Osteopetrosis maligna.**

**A.1.5.2. Mucopolisacaridosis.**

**A.1.5.3. Otras.**

Enfermedad de Gaucher.

Leucodistrofia metacromática.

**A.2. Enfermedades Adquiridas.**

Leucemias Agudas.

Leucemia Mieloide Crónica.

Mieloma Múltiple.

Leucemia linfática crónica.

Síndromes mielodisplásicos.

Hemoglobinuria paroxística nocturna.

Aplasia medular.

**B.- Trasplante Autólogo.**

Leucemias Agudas.

Leucemia mieloides crónica.

Mieloma múltiple.

Enfermedad de Hodgkin.

Linfomas no-Hodgkin.

Tumores sólidos.



Los resultados actuales no permiten definir el TMO autólogo como forma estándar de tratamiento en ningún tumor sólido. Sin embargo, algunos resultados contrastados permiten suponer un posible efecto beneficioso en algunos tumores.

Las indicaciones más establecidas son:

1. El cáncer de mama metastásico en RC tras el tratamiento de inducción.
2. Cáncer de mama de alto riesgo de recaída:
  - $\geq 10$  ganglios axilares afectados al diagnóstico.
  - $\geq 4$  ganglios axilares afectados tras quimioterapia neoadyuvante.
  - carcinoma inflamatorio.
3. Tumores de células germinales con respuesta parcial al tratamiento inicial o en 1ª recaída.
4. Neuroblastoma en estadio IV.
5. Sarcoma de Ewing.
6. Cáncer de ovario en respuesta clínica completa con enfermedad residual microscópica.

El aumento observado en los últimos años en el número de trasplantes de médula ósea realizado en tumores sólidos se debe a la demostración de efecto dosis-respuesta en los TS señalados aunque no siempre este efecto dosis-respuesta se ha acompañado de demostrado aumento de la tasa de curación.

El carcinoma de mama es la indicación que más ha aumentado en los últimos años. El efecto curativo de la quimioterapia adyuvante, su eficacia en relación con la dosis y la posibilidad de utilizar fármacos a dosis altas activos en

este tumor, fue la base, junto a los estudios de laboratorio, para el uso de quimioterapia intensiva con soporte de células germinales.

El subgrupo de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo constituye en nuestro Centro, uno de los grupos de pacientes más numeroso y con un tratamiento más homogéneo, motivo por el que se ha seleccionado en este estudio para analizar la recuperación inmune y la influencia de la recuperación inmune en la supervivencia libre de enfermedad. Por este motivo se revisa brevemente las bases del tratamiento intensivo en estas pacientes.

El número de ganglios afectados por el tumor es el factor pronóstico más importante para predecir el tiempo de progresión a la recaída en cáncer de mama en estadio no avanzado. En el grupo de pacientes con 10 o más ganglios afectados al diagnóstico, el tratamiento adyuvante más activo, que incluye la combinación de cirugía, poliquimioterapia con antraciclinas, radioterapia locoregional y hormonoterapia, sigue siendo insuficiente para gran parte de los pacientes, de modo que la SLE a largo plazo (7 años) oscila entre un 30% y un 40%. Aunque los resultados preliminares de varias formas de tratamiento intensivo sugieren un beneficio significativo con SLE a 5 años del 60-70%. La confirmación de esta eficacia del tratamiento intensivo adyuvante, procederá de ensayos clínicos comparativos, actualmente en curso, desarrollados por los grupos CALG-B/SWOG y ECOG.

En cuanto al grupo de carcinoma de mama localmente avanzado (CMLA), se define según la versión más reciente de la clasificación TNM, como las pacientes con cáncer de mama estadios IIIA, IIIB, algunas con estadio IV (afectación de

ganglios supraclaviculares, sin otras metástasis a distancia) y algunas con estadios IIB (T3N0M0). Son formas de presentación del cáncer de mama que tienen un peor pronóstico en cuanto a supervivencia libre de recaída (SLE) y supervivencia global (SG). En España la incidencia supera el 20% de los casos de carcinoma de mama. Está claramente establecido que la mayoría de pacientes diagnosticadas de CMLA desarrollarán metástasis a distancia cuando se tratan solamente con terapias locorregionales, lo que sugiere que en el momento del diagnóstico existe enfermedad micrometastásica que justificaría un tratamiento sistémico con objeto de mejorar los resultados terapéuticos. Los factores pronósticos de mayor relevancia en CMLA es la masa tumoral (tamaño tumoral inicial, afectación ganglionar tras QT preoperatoria), respuesta clínica al tratamiento inicial y QT adyuvante tras tratamiento local, ya que se correlacionan estrechamente con un mayor riesgo de metástasis a distancia y peor probabilidad de supervivencia. Los receptores hormonales tumorales también conllevan significado pronóstico, ya que las pacientes con receptores hormonales positivos tienen mejor supervivencia global que las pacientes con receptores negativos. El tratamiento del CMLA ha evolucionado en los últimos años, ya que se han adoptado estrategias de tratamiento combinado con 2 objetivos principales: control de la enfermedad local y de la enfermedad micrometastásica en el momento del diagnóstico, para conseguir una mayor tasa de curación y supervivencia global, pero sin olvidar el control locorregional y efecto cosmético de la terapia. El tratamiento quirúrgico en CMLA consigue una tasa de supervivencia a 5 años que oscila entre el 3 al 45%. Aunque la mastectomía radical es técnicamente posible en la mayoría de los casos de

CMLA, el fallo en el control local y los pobres resultados obtenidos condujo a la utilización de la radioterapia como tratamiento local predominante. El empleo de quimioterapia neoadyuvante, se inició en la década de los 70 en los estadios III, obteniéndose mejores resultados que con la utilización de tratamientos locorregionales. Posteriormente se suscitó la idea de utilizar quimioterapia preoperatoria en estadios II y III en tumores no subsidiarios de cirugía conservadora para conseguir un mayor número de intervenciones quirúrgicas conservadoras. En conjunto, los tratamiento multidisciplinarios en este grupo de pacientes, consigue SLE inferior al 30% a los 5 años (13%-35%), motivo por el que se ha planteado el tratamiento quimioterápico intensivo.

En la **Tabla 4** se muestra el número de trasplantes en cada indicación realizado en Europa en el año 1994<sup>1</sup>.

**Tabla 4. Indicaciones de TCGH realizado en Europa en 1994.**

| <b>Indicación</b>          | <b>Alogénico</b> | <b>Autólogo</b> | <b>Total</b> |
|----------------------------|------------------|-----------------|--------------|
| Leucemia Aguda Mieloide    | 900              | 718             | 1618         |
| Leucemia Aguda Linfoide    | 702              | 318             | 1010         |
| Leucemia Mieloide Crónica  | 819              | 174             | 993          |
| Síndrome Mielodisplásico   | 196              | 20              | 216          |
| Leucemia Linfática Crónica | 18               | 16              | 34           |
| Mieloma Múltiple           | 99               | 943             | 1042         |
| Enf. Hodgkin               | 22               | 800             | 822          |
| Linfoma No Hodgkin         | 124              | 1772            | 1896         |
| Neuroblastoma              | 3                | 173             | 176          |
| Glioma                     | -                | 49              | 49           |
| Sarcoma de partes blandas  | -                | 83              | 83           |
| Tumores germinales         | 1                | 271             | 272          |
| Carcinoma de mama          | 1                | 844             | 845          |
| Sarcoma de Ewing           | 6                | 104             | 110          |
| Otros tumores sólidos      | 2                | 263             | 265          |
| Anemia aplásica y Fanconi  | 248              | 2               | 250          |
| Talasemia                  | 147              | -               | 147          |
| Inmunodeficiencia          | 68               | 1               | 69           |
| Otros                      | 146              | 13              | 159          |
| <b>TOTAL</b>               | <b>3502</b>      | <b>6564</b>     | <b>10066</b> |

## **I.2 INMUNODEFICIENCIA ASOCIADA AL TRASPLANTE DE CELULAS GERMINALES HEMATOPOYETICAS**

### **I.2.1. ONTOGENIA LINFOIDE NORMAL.**

La reconstitución inmune postrasplante constituye un intento de recapitulación de la ontogenia linfoide normal. Esto lo consigue sólo en parte ya que existen numerosos factores que modifican el desarrollo normal entre los que figuran la ausencia de timo en pacientes adultos, la presencia EICH o de diversos tratamientos con influencia en el sistema inmune. Sin embargo, reviso a continuación la ontogenia linfoide normal ya que el recuerdo de este desarrollo es de utilidad para interpretar los cambios postrasplante.

En el momento del nacimiento, las células linfoides son incapaces de reconocer a ningún agente infeccioso invasor. Estos linfocitos, a través de una serie de selecciones clonales inducidas por antígenos, llegan a ser capaces de producir una respuesta adaptativa.

En el desarrollo linfocitario es de destacar tres aspectos fundamentales:

1. Desarrollo programado que permite que un progenitor no comprometido llegue a transformarse en un linfocito con un único receptor, común en cada especie, que al mismo tiempo garantiza la monoespecificidad de cada célula.
2. Eliminación de aquellas células creadas por reordenamiento del gen del receptor del antígeno, que tienen potencial autoreactivo, asegurando la tolerancia a antígenos propios.

Ambos procesos, se llevan a cabo en microambientes especializados (la médula ósea en el caso de los linfocitos B y en el timo en el caso de los linfocitos T), dan lugar a células maduras específicas para antígenos no propios.

3. Proceso denominado selección positiva, que afecta únicamente a linfocitos T y tiene lugar en el timo. Este proceso selecciona para la exportación sólo aquellos linfocitos T cuyos receptores pueden reconocer péptidos presentados por moléculas del CMH propias.

Los receptores de antígenos de los linfocitos B y T son homólogos en términos de su estructura y organización genética y en el sentido de que se genera un amplio repertorio para cada receptor a partir de una información genética limitada. Las proteínas asociadas al receptor, encargadas de transducir las señales generadas por el receptor, también son homólogos en ambos tipos de receptores. Una de las diferencias funcionales más importantes entre los receptores B y T se encuentra en las regiones constantes. Mediante un "splicing" (rotura e interposición de nuevo material) alternativo de la región constante de un gen de inmunoglobulina, puede cambiar un gen de inmunoglobulina, de modo que se produce un receptor o un anticuerpo secretado, mientras que los receptores de las células T se sintetizan siempre como proteínas de transmembrana. Las regiones constantes de las inmunoglobulinas pueden ser variadas mediante el cambio de isotipo, para dar lugar a moléculas con diferentes funciones.

La mayor diferencia entre los receptores B y T reside en la naturaleza de los ligandos que reconoce. Los linfocitos B pueden unirse a moléculas de cualquier forma y de cualquier

composición química. Los linfocitos T, en cambio, reconocen un número de moléculas más limitada, siempre en forma de péptidos de pequeño tamaño obtenidos por fraccionamiento de proteínas y unidos de forma firme a la molécula del CMH. Debido a que el área de unión al antígeno de la molécula del CMH es un lugar de gran polimorfismo genético, diferentes individuos responden a diferentes péptidos de un mismo antígeno, y algunos o responden a ningún antígeno, haciéndolo susceptible a la enfermedad. Los diferentes modos de reconocimiento de las células B y T asegura que los anticuerpos interaccionen con agentes infecciosos extracelulares, mientras que los receptores T detectan infección intracelular y antígenos captados por células y degradados a péptidos.

Las células progenitoras linfoides más inmaduras tanto B como T derivan de la célula germinal hematopoyética pluripotencial en un estadio muy precoz previo a su diferenciación hacia la línea mieloide.




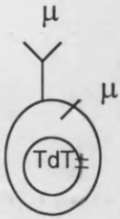


### **1. Desarrollo de linfocitos B.**

La diferenciación de los linfocitos B desde una célula germinal hasta un linfocito B maduro con expresión de inmunoglobulinas de superficie se produce a través de una serie de estadios condicionados por el reordenamiento sucesivo de los genes de inmunoglobulina, cada uno de los cuales está regulado por el producto proteico del estadio previo. La médula ósea constituye un microambiente esencial para el desarrollo de los linfocitos B.

La diferenciación B se puede dividir en cuatro etapas. La primera da lugar a la producción de una célula pro-B precoz, que se caracteriza por la ausencia de reordenamiento de los genes de Igs y por la expresión nuclear de TdT y otras moléculas de superficie que se resumen en la Tabla 5.



Tabla 5. Etapas de la diferenciación B.

|                                | Célula stem   | Pro-B precoz  | Pro-B tardía  | Pre-B   | B inmadura  | B madura  |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|
|                                |  |  |  |  |  |  |
| <b>Genes</b>                   |   |   |   |   |   |   |
| <b>cadena H</b>                | No reordena.  | Reordena D-J  | Reordena V-DJ   | Reordena VDJ  | Reordena VDJ  | Reordena VDJ  |
| <b>Genes</b>                   |   |   |   |   |   |   |
| <b>cadena L</b>                | No reordena.  | No reordena.  | No reordena.  | Reordena V-J  | Reordena VJ   | Reordena VJ   |
| <b>Ig superficie</b>           | Ausente   | Ausente   | Ausente   | Cadena H μ en citoplasma y superf.  | Expresión IgM en superficie   | IgM e IgD en superficie   |
| <b>Moléculas de superficie</b> | CD45R<br>HLA-DR<br>CD10<br>CD19<br>CD38<br>CD34                                   | CD45R<br>HLA-DR<br>CD19<br>CD38<br>CD40   | CD45R<br>HLA-DR<br>CD19<br>CD38<br>CD40   | CD45R<br>HLA-DR<br>μ<br>CD19<br>CD20<br>CD38<br>CD40                              | CD45R<br>HLA-DR<br>IgM<br>CD19<br>CD20<br>CD21<br>CD40                              | CD45R<br>HLA-DR<br>IgM, IgD<br>CD19<br>CD20<br>CD21<br>CD40                         |

Todas las etapas tienen lugar en la MO y son dependientes de las células del estroma. En los estadios precoces, los precursores linfoides deben estar en contacto directo con las células del estroma. Esta unión se lleva a cabo mediante la unión de una molécula de adhesión presente en la superficie del precursor linfoide CD44, con el ácido hialurónico sobre la célula del estroma, lo que promueve la unión de c-kit con stem cell factor (SCF) o IL-1, que provoca proliferación de la célula linfoide. En el estadio de células pro-B tardías aparecen receptores para un segundo factor de crecimiento, la interleucina-7 (IL-7), que junto con la unión de CD44-Ac.hialurónico y c-kit-SCF, son necesarios para mantener la diferenciación. Posteriormente, en el estadio pre-B dejan de expresar c-kit y pierden su dependencia de SCF y se liberan de las células del estroma medular, manteniendo la dependencia de IL-7, que se pierde en el estadio siguiente de célula B inmadura.

Uno de los marcadores más precoces de linfocitos B en desarrollo es la expresión de la isoforma de la tirosín-fosfatasa de membrana CD45 (CD45R). CD45 puede modular la respuesta de las tirosin-quinazas como es c-kit, pero se desconoce su papel preciso en el desarrollo de la célula B.

El desarrollo de las células B está marcado por la expresión de diversas proteínas de superficie que intervienen en la activación de las células B por las células T colaboradoras, entre las que se incluyen CD19, HLA-DR Y CD40.

Tras su maduración en la médula ósea los linfocitos B emigran, vía sangre periférica a los órganos linfoides periféricos. Los linfocitos B son muy heterogéneos en su morfología, localización y expresión de moléculas de

superficie, que en parte se deben a la respuesta al estímulo antigénico. Existe una subpoblación diferente al resto en cuanto a que se origina de un precursor distinto que se separa del resto de forma precoz en la ontogenia linfoide y presenta un receptor y unas características funcionales diferentes. Estas células se identifican por su expresión de la proteína CD5 y la expresión de IgM de superficie, con escasa o nula IgD. La molécula CD5 se une a otra molécula de superficie linfoide denominada CD72, sin embargo, se desconoce el papel funcional.

Existe un número relativamente escaso de linfocitos B CD5+ en ganglios linfáticos y bazo, en cambio es la población predominante en la cavidad peritoneal. Aunque contribuyen de forma escasa a la inmunidad adaptativa, tienen un papel significativo en generar respuesta de anticuerpos que no requieren la colaboración de linfocitos T. Dado que su actividad es alta, gran parte de las inmunoglobulinas detectadas en un suero normal están producidas por este subgrupo de linfocitos B.

La especificidad de los receptores de las células B CD5+ es diferente de los linfocitos B convencionales. Los receptores y los anticuerpos producidos por estas células tienden a unir múltiples diferentes ligandos, una propiedad denominada como poliespecificidad, con una preferencia por los polisacáridos bacterianos comunes. Estos linfocitos tienen capacidad de autorenovación que ocurre en tejidos periféricos.

Las diferencias entre los linfocitos B CD5+ y los linfocitos B convencionales se resume a continuación en la Tabla 6.

**Tabla 6. Comparación de las propiedades de linfocitos B CD5+ y linfocitos B convencionales.**

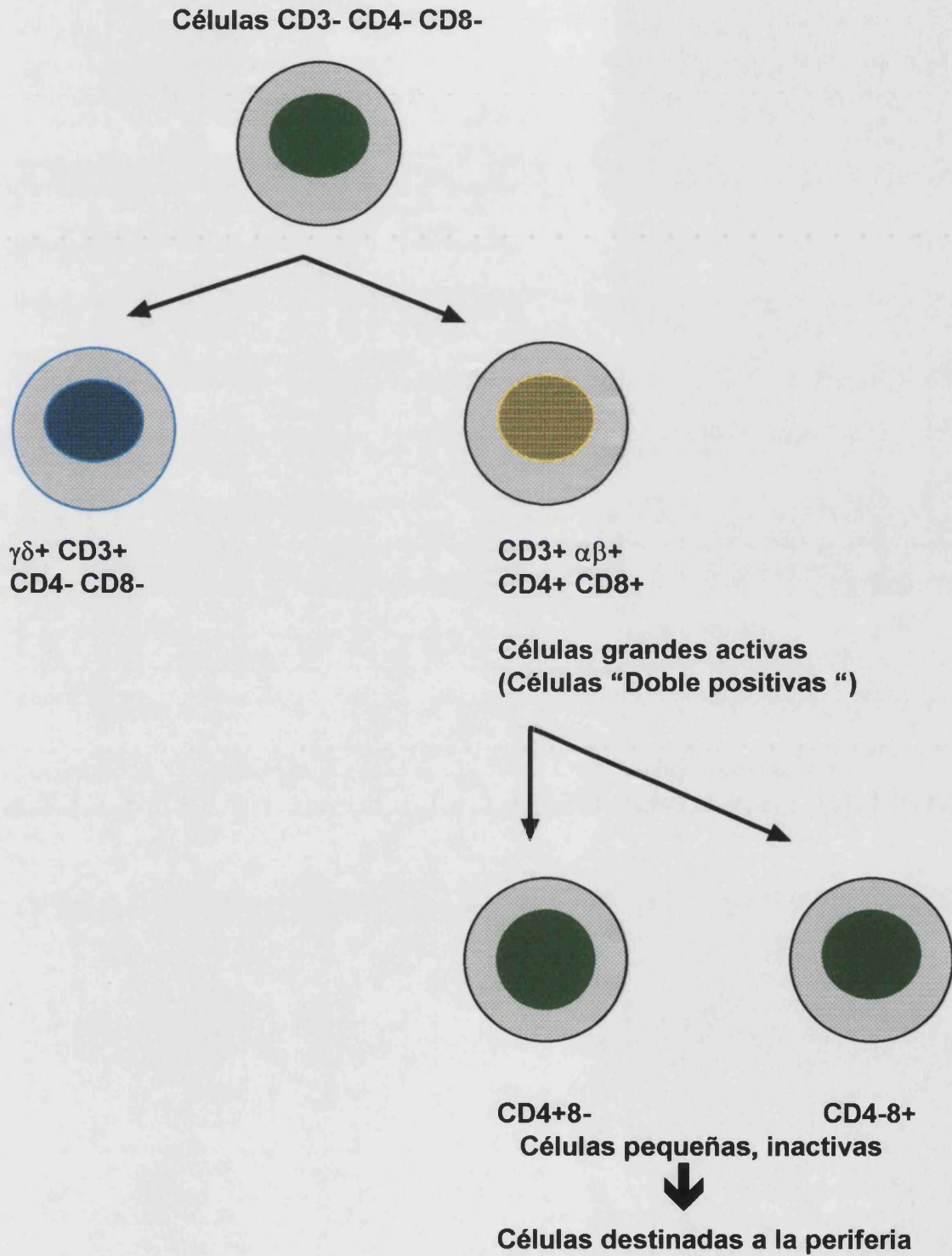
| <b>Propiedad</b>                      | <b>Células B CD5+</b>             | <b>Células B convencionales</b> |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Ontogenia                             | Precoz                            | Tardía                          |
| Renovación                            | Autorenovación                    | Renovación en médula ósea       |
| Producción de Ig                      | Alta                              | Baja                            |
| Especificidad                         | Degenerada<br>(Poliespecificidad) | Precisa                         |
| Isotipos secretados                   | IgM >> IgG                        | IgG > IgM                       |
| Hipermutación somática                | Baja o nula                       | Alta                            |
| Respuesta a antígenos hidrocarbonados | Si                                | Posible                         |
| Respuesta a antígenos proteicos       | Posible                           | Sí                              |

## **2. Desarrollo de linfocitos T.**

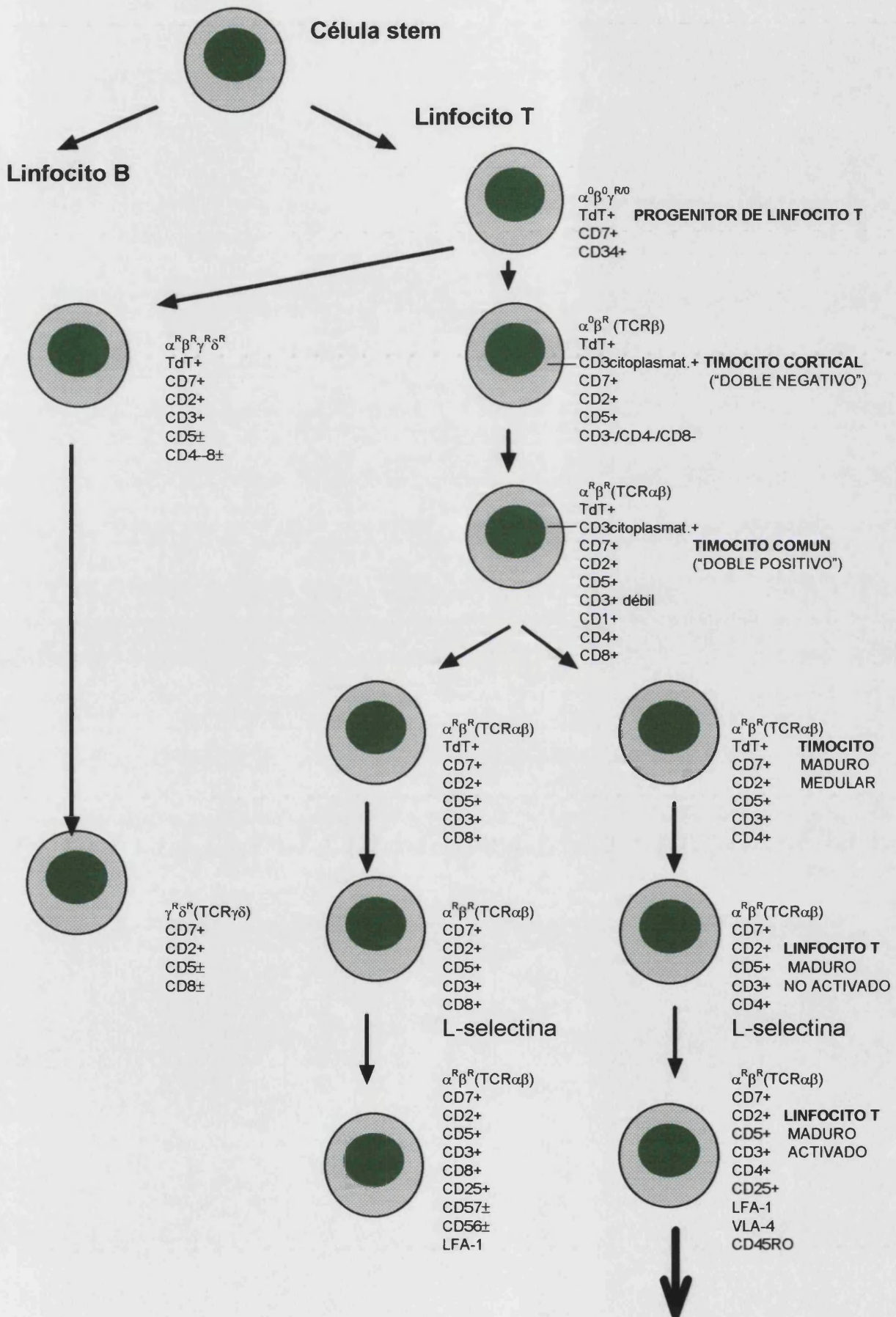
Los precursores T que llegan al timo procedentes de la MO, entran en una fase de intensa proliferación. Sin embargo, sólo una pequeña parte (aproximadamente el 2%) de estas saldrán del timo como células T maduras, ya que la mayor parte de los timocitos (98%) generados cada día mueren en el timo mediante el proceso de apoptosis. Esta gran proliferación y selección celular es una parte crucial del desarrollo de la célula T, que refleja el intenso proceso de testado a que es sometido cada célula T para restringir su reconocimiento al CMH propio y a la tolerancia inmune propia.

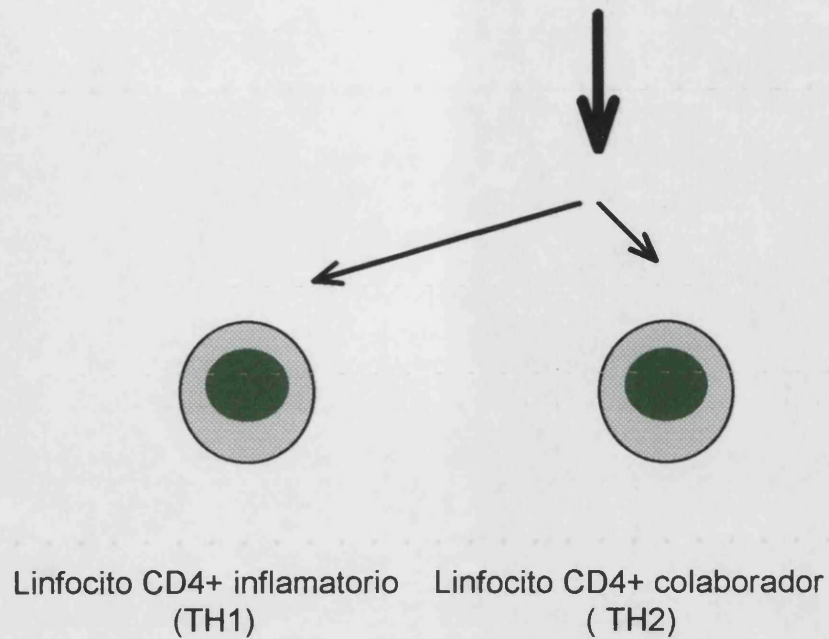
La proliferación y maduración de timocitos hacia linfocitos T maduros se realiza a través de una serie de etapas marcadas por cambios de los genes y la expresión del receptor T, los co-receptores CD4 y CD8, y de las otras moléculas de superficie que reflejan el estado funcional y madurativo de las células. Por tanto, es posible utilizar combinaciones de estas moléculas de superficie como marcadores de los diferentes estadios de diferenciación. Los cambios madurativos secuenciales en las moléculas de superficie de los timocitos que permiten su identificación y el esquema de la diferenciación linfoide T normal se resumen en el esquema siguiente:

**CAMBIOS MADURATIVOS SECUENCIALES EN LAS MOLECULAS DE SUPERFICIE DE LOS TIMOCITOS QUE PERMITEN SU IDENTIFICACION.**



ESQUEMA DE LA DIFERENCIACION LINFOIDE T NORMAL.





La célula linfoide T reconocible más inmadura expresa CD7 como antígeno de superficie<sup>79</sup>. En la vida fetal, se detectan células con fenotipo CD34+, CD7+ en el saco de Yolk y el hígado fetal entre la 7<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> semana de gestación. Entre la semana 8 y 9 de vida fetal, se detecta la presencia de CD3+ citoplasmática, seguido de CD2+ de superficie. Tras la expresión de CD2, se detecta simultáneamente el reordenamiento de los genes del receptor T  $\alpha\beta$  (TCR- $\alpha\beta$ ) y del TCR- $\gamma\delta$ <sup>80,81,82,83,84,85</sup>.

En las fases más precoces de la diferenciación tímica, las células TCR- $\alpha\beta$  expresan niveles muy bajos de TCR y CD3, y sin embargo, no expresan CD4 ni CD8 (estadio **doble negativo** de la diferenciación tímica). Estos linfocitos pasan por un periodo de expresión baja de CD8 (CD8<sup>low</sup>), para pasar a timocitos con expresión simultánea de CD4+ y CD8+ (timocito **doble positivo**). En esta última



fase se producen los fenómenos denominados selección positiva y negativa<sup>86,87,88</sup>. La selección positiva es el resultado de la interacción entre el receptor TCR- $\alpha\beta$  y el epitelio tímico, que provoca una proliferación y expansión clonal de linfocitos T con especificidad para antígenos exógenos. Tras la selección positiva, los timocitos doble positivos se diferencian en timocitos maduros CD3+, CD4+, TCR- $\alpha\beta$  ó CD3+, CD8+, TCR- $\alpha\beta$ .

En el estadio de timocito doble positivo, también se produce la selección negativa. La interacción del timocito TCR- $\alpha\beta$  con antígenos propios, expresados en células dendríticas derivadas de médula ósea, presentes en el timo, genera una señal apoptótica que induce la muerte celular, y la delección clonal de las células con capacidad autoinmune.

En la vida fetal, la frecuencia de timocitos TCR- $\gamma\delta$  es igual a la de células TCR- $\alpha\beta$ , sin embargo, su proceso de diferenciación de esta subpoblación se conoce mal. Se sabe que estas células migran selectivamente a órganos epiteliales, fundamentalmente piel, útero e intestino, aunque no se conoce su función en estas localizaciones.

Además de los cambios fenotípicos y moleculares, se producen cambios funcionales que se han evaluado mediante la cuantificación de la proliferación tras la estimulación con mitógenos. En la ontogenia linfoide normal aparecen células que expresan antes receptores de citoquinas, que timocitos capaces de su producción. La aparición de células respondedoras a PHA dependientes del aporte exógeno de IL-2 precede a la de células PHA respondedoras, productoras de IL-2. Tras su salida a sangre periférica, los linfocitos T pueden ser

sensibilizados tras la exposición a antígenos específicos. Los linfocitos antígeno-específico, IL-2 dependiente se desarrollan antes que los linfocitos antígeno específico productores de IL-2.

Las células vírgenes CD8+ que salen del timo están predestinadas a ser células citotóxicas, aunque no expresen aún las funciones de células efectoras. Sin embargo, las células CD4+ serán células inflamatorias (TH1), o colaboradoras (TH2). Las células CD4+ TH1, se encargarán de activar a macrófagos mediante la síntesis de IL-2, IFN- $\gamma$ , y TNF, y activan a que se encargan de la activación de células T citotóxicas. Las células CD4+ TH2, sintetizan IL-4, IL-5 e IL-10, y se encargan de activar a las células B. Los factores que determinan la evolución a uno u otro tipo no están aclaradas, pero se decide cuando la célula se encuentra por primera vez con un antígeno.

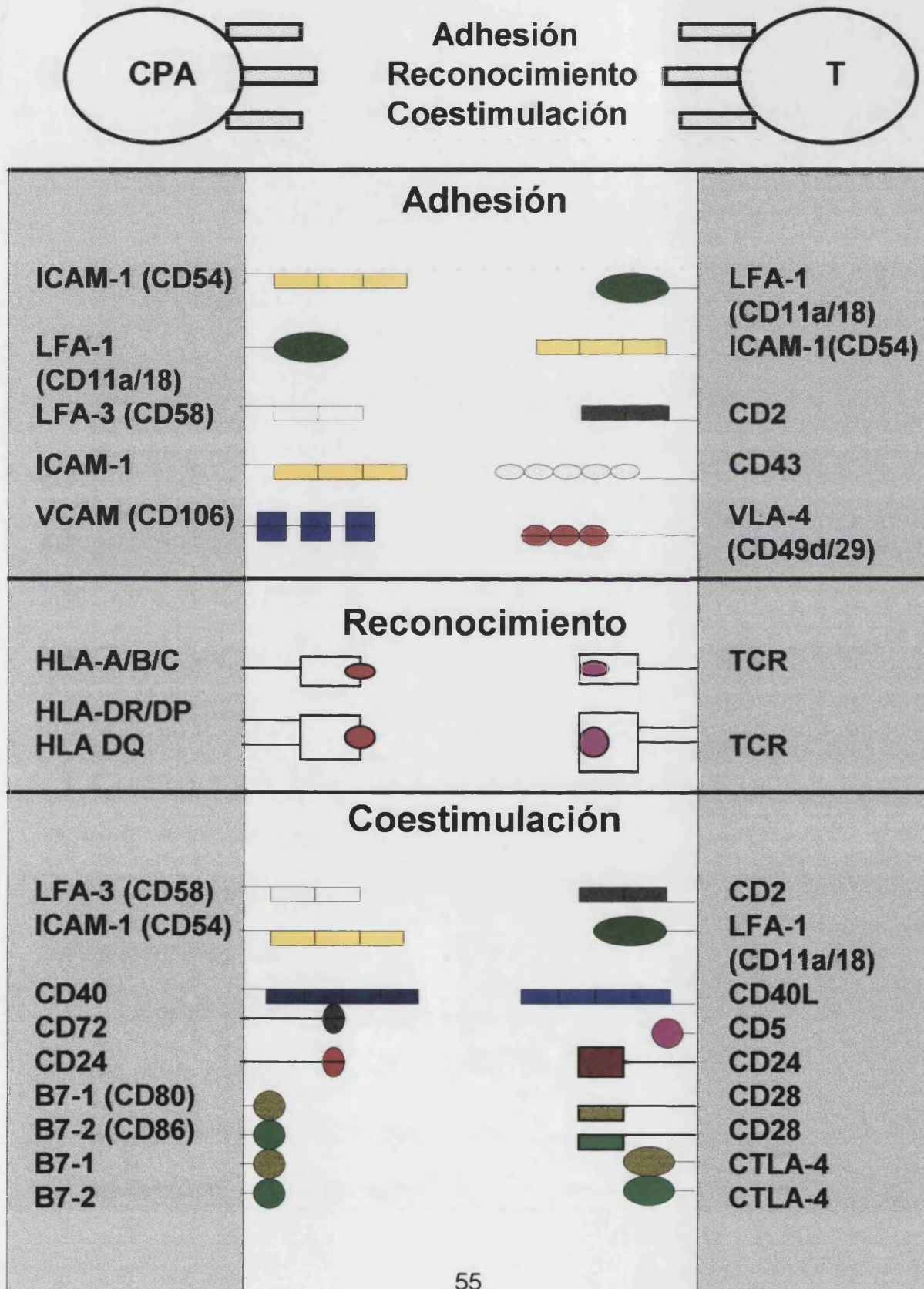
La activación del sistema inmune requiere no solamente la presencia del antígeno, sino también, interacciones coestimuladoras con otras células especializadas en las que interviene moléculas de superficie celular y moléculas secretadas. Las células especializadas que estimulan a las células T son las células presentadoras de antígeno (CPA) entre las que se incluyen los macrófagos, células dendríticas y células B, que expresan moléculas coestimuladoras y presentan péptidos extraños unidos a moléculas del CMH en su superficie. Los linfocitos T vírgenes encuentran estas células en las áreas T de los órganos linfoides. Para las células B, las señales coestimuladoras proceden de los linfocitos T colaboradores (TH2). En ausencia de señales coestimuladoras, el antígeno de forma aislada inactiva al linfocito (anergia).

Tras la activación, tanto los linfocitos B como T, entran en una fase de proliferación con expansión clonal de células específicas frente a un antígeno, que se diferencian en células efectoras. Existen tres tipos de células T efectoras: linfocitos T CD8+ citotóxicos, que destruyen directamente a las células infectadas con patógenos citoplasmáticos; linfocitos T CD4+ inflamatorios (TH1), que activan a macrófagos para que destruyan patógenos incluidos en vesículas intracelulares, y liberen diversas citocinas; y linfocitos T CD4+ colaboradores, que activan a linfocitos B.

Las células B activadas por linfocitos CD4+ colaboradores, proliferan en los centros germinales en donde se unen a los antígenos mostrados en la superficie de las células dendríticas foliculares. Estas células se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpo, que en su mayoría emigran a la médula ósea, o pueden permanecer en los cordones medulares de los ganglios linfáticos.

En la Figura 3, se resumen las diferentes moléculas de superficie que se expresan en las células presentadoras de antígeno y linfocitos durante los procesos de adhesión, reconocimiento y activación.

**FIGURA 3. INTERACCIONES ANTIGENO-ESPECÍFICAS ENTRE LAS CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENOS (CPA) Y LINFOCITOS T.**



## **I.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNODEFICIENCIA. RECONSTITUCIÓN INMUNE POSTRASPLANTE**

La quimio-radioterapia en dosis altas (QDA) asociada a trasplante autólogo de células germinales (TA) induce una profunda y prolongada inmunosupresión humoral y celular responsable de la alta incidencia de infección postrasplante y puede además, influir en el control a largo plazo de la enfermedad neoplásica.

La reconstitución inmune postrasplante ha sido estudiada de forma extensa desde 1975, y es revisado por diversos autores <sup>41,89,90,91,92,99</sup>.

El periodo de inmunodeficiencia se prolonga más allá del tiempo necesario para el prendimiento del injerto hemopoyético. Durante este periodo de inmunodeficiencia los pacientes son altamente sensibles a diversos tipos de infecciones oportunistas que ponen en grave riesgo su vida. Incluso en pacientes que no desarrollan infecciones, la recuperación completa puede tardar varios años, detectándose de forma prolongada anomalías funcionales de linfocitos. La inmunodeficiencia se agrava ante la presencia de otros factores, entre los que se incluyen: desarrollo de enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda y/o crónica y el uso de drogas para su prevención o tratamiento, en el caso de trasplante alogénico.

La destrucción de la mayor parte de las células que componen el sistema inmune por la quimio-radioterapia obliga a que también este sistema se recupere fundamentalmente a partir de las células infundidas que deben sufrir un proceso de proliferación y diferenciación similar a la ontogenia linfoide normal. Sin

embargo, existen factores que modifican este normal desarrollo, entre los que se incluyen la relación entre donante y receptor (TMO autólogo, singénico, alogénico relacionado o no, HLA totalmente compatible o no), la presencia o no de enfermedad injerto contra huésped (EICH) agudo o crónico en el TMO alogénico y presencia de infecciones intercurrentes. La edad del paciente es de importancia por su relación con la involución del timo que se produce en la adolescencia. Existe una relación inversa entre la edad del paciente y el recuento de linfocitos T CD4+ a los 6 meses postrasplante. La recuperación rápida de linfocitos CD4+ se produce a expensas de la población CD45RA+ en pacientes que mantienen funcional el timo<sup>93</sup>.

Los recuentos de monocitos y células NK se recuperan de forma precoz, generalmente en el primer mes postrasplante. La recuperación de la cifra total de linfocitos T ocurre en los primeros 6 meses postrasplante; sin embargo, persiste alteración de la relación CD4/CD8 durante más de 6-12 meses postrasplante. La cifras de células B se recuperan generalmente a los 3-8 meses postrasplante. La recuperación de la función B y T es incluso más lenta que la recuperación cuantitativa.

La reconstitución inmune tras la infusión de células germinales hematopoyéticas autólogas o de un donante compatible, se caracteriza por la falta de transferencia mantenida, clínicamente significativa de inmunidad B o T derivada del donante o que el propio paciente poseía previamente. La administración de la quimioradioterapia en dosis altas destruye la totalidad de las células responsables de la inmunidad T y la gran mayoría de las responsables de la inmunidad B.

Cuando se administran CGH no manipuladas alogénicas o autólogas, se administran linfocitos B y T específicos de antígenos que pueden contribuir a la recuperación de la inmunocompetencia del paciente.

Por tanto, cuando se analiza la recuperación inmune postrasplante mediante el análisis del fenotipo inmune, es preciso tener en cuenta que los linfocitos detectados pueden derivar de los linfocitos maduros presentes en el inoculo infundido o de las células germinales hematopoyéticas pluripotentes trasplantadas. En este sentido, la valoración más precisa de la ontogenia linfoide postrasplante se observaría en pacientes que reciben MO o CGSP con deplección de linfocitos T, en los que no existe contribución significativa de los linfocitos maduros.

Se resumen a continuación, las alteraciones que se producen sobre los diferentes componentes del sistema inmune y los datos existentes en relación con la recuperación inmune estudiada mediante análisis de fenotipo inmune y estudios funcionales:

**Defectos inespecíficos:**

*Lesión y recuperación de piel y mucosas:*

La integridad física y funcional de piel y mucosas, junto con la presencia de IgA secretora, linfocitos y macrófagos residentes en la superficie mucosa, constituyen un mecanismo fundamental de prevención de la invasión de microorganismos que colonizan estas superficies. Los tratamientos de acondicionamiento para trasplante lesionan estos mecanismos de defensa,

predisponiendo a episodios de bacteriemia y fungemia durante las primeras semanas postrasplante. En pacientes sin EICH, la mucositis se resuelve y las lesiones se recuperan en 4 semanas a 3 meses. La presencia de EICH aguda puede lesionar de forma adicional el epitelio intestinal manteniendo la susceptibilidad a la infección de estos pacientes. La existencia de EICH crónica puede originar sialoadenitis con reducción de la producción de saliva e IgA, facilitando las infecciones orales.

### **Alteración de los componentes celulares del sistema inmune:**

#### *Granulocitos:*

Coincidiendo con la rotura de las barreras mucosas, se produce la caída de los neutrófilos circulantes, facilitando la rápida invasión y proliferación de microorganismos. Este periodo de neutropenia se ha reducido de forma significativa desde la introducción de los factores de crecimiento mieloide (G-CSF y GM-CSF) y de células germinales de sangre periférica como sustitución de la médula ósea.

#### *Sistema monocito/macrófago:*

La recuperación cuantitativa y funcional del sistema monocítico es más rápida que la de otras líneas celulares. En el caso del TCGH alogénico, durante el primer mes postrasplante ya se detectan monocitos derivados del donante. Los macrófagos tisulares del receptor son sustituidos por los del donante de forma progresiva durante los primeros meses postrasplante <sup>94,95</sup>. La producción de citocinas derivadas de monocitos (IL-1, IL-6 y TNF), se pueden inducir desde el día 10-14 postrasplante <sup>96,97</sup>. No parece influir la presencia de EICH o de



tratamiento inmunosupresor, ni existir diferencias entre el TCG alogénico y el autólogo. Los niveles de lisozima no se modifican en el periodo postrasplante alogénico y a pesar de la normalidad de gran parte de las funciones, se ha observado defecto de quimiotaxis, fagocitosis y actividad citotóxica de macrófagos alveolares <sup>98</sup>. Estas alteraciones pueden ser, al menos en parte, responsables del aumento de infecciones pulmonares.

### *Células Natural Killer (NK):*

Las células NK, definidas como linfocitos grandes granulares (LGL) efectores de reacciones citolíticas no restringidas al CMH, con fenotipo generalmente CD3-CD56+CD16+, son las células que primero se recuperan tras trasplante <sup>99,100</sup>. En la mayoría de los pacientes, el número de células con fenotipo NK normal aumenta hasta un máximo entre los días +45 y +90 postrasplante para posteriormente normalizarse. Otro subgrupo de células NK (CD3-CD16-CD56+bright), con marcadores de activación diferentes (IL-2R, CD2R, CD26), son el tipo de célula NK predominante en el 30% de los pacientes. Estas células tienen menos actividad NK y actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo, pero puede ser activada por IL-2 e interferón  $\gamma$  <sup>101</sup>. Durante la recuperación precoz postrasplante, mientras que no se han recuperado la inmunidad específica, las células NK pueden constituir un importante mecanismo de defensa frente a la infección o la recaída tumoral. Se ha observado una relación inversa entre la actividad NK frente a fibroblastos infectados y la gravedad de la infección por CMV <sup>102</sup>. No existe evidencia directa de que intervengan en la prevención de la recaída de enfermedad. Sin embargo, se ha

descrito la presencia de clones celulares de fenotipo NK derivadas del donante, con intensa actividad citotóxica frente a células blásticas de un paciente <sup>103</sup>. Sin embargo, otros estudios no han encontrado correlación entre actividad NK postrasplante y la recaída tumoral <sup>104</sup>. En algunos ensayos clínicos, la administración de IL-2 tras trasplante ha inducido un aumento del número y de la actividad NK <sup>105</sup>. Este tipo de inmoestimulación puede ser responsable de la reducción de la frecuencia de recaída por leucemia tras trasplante autólogo y tratamiento con IL-2 postrasplante <sup>106</sup>.

#### *Células B e inmunidad humoral:*

Al contrario que la inmunidad T, es posible detectar actividad B de forma precoz postrasplante producción de anticuerpos sintetizados por linfocitos del donante <sup>107,108,109,41,110,111,112</sup>. La producción de anticuerpos se incrementa si el donante o el receptor son inmunizados antes del TMO. Si el paciente no es inmunizado, la producción de anticuerpos específicos no se mantiene y desciende de forma progresiva hasta desaparecer después del primer año de trasplante. El origen de esta respuesta precoz (linfocitos residuales del paciente o linfocitos que forman parte de las CGH infundidas) no se conoce con seguridad ya que no se han realizado estudios de idiotipo. Esta respuesta normal o aumentada de anticuerpos puede ser secundaria a transferencia de linfocitos B del donante, de células presentadoras de antígeno (CPA) estimuladas previamente, o linfocitos T del donante o del receptor que cooperan con linfocitos B específicos de Ag.

Las infecciones características de la inmunodeficiencia humoral no son frecuentes en el TCGH. Los niveles bajos de inmunoglobulinas se asocian con

presencia de complicaciones derivadas de la EICH crónica <sup>113</sup>, e infecciones neumocócicas <sup>114</sup> en el periodo tardío postrasplante (a partir del día +100). Su duración se prolonga en caso de existir EICH crónica. Se caracteriza por infecciones bacterianas por gérmenes grampositivos encapsulados de vías respiratorias y senos paranasales que se han relacionado con el déficit de la subclase IgG2.

El número absoluto de linfocitos B circulantes tras TCGH autólogo se normaliza a los 4-8 meses, siendo con TCGH autólogo algo más reducido que tras TCGH alogénico <sup>115</sup>. Fenotípicamente, tras el TMO se produce un aumento de células B que expresan CD1c, CD38, CD5 y CD23 <sup>116,117</sup>, similar a lo que ocurre en el periodo neonatal. Sin embargo, la normalización en el número de linfocitos no se refleja en la función de linfocitos B. Durante la fase precoz postrasplante, la linfopoyesis es oligoclonal <sup>118</sup>, lo que se refleja en un desbalance clonal de inmunoglobulinas y disociación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas totales y la de anticuerpos específicos. Los niveles séricos de IgM suelen alcanzar cifras normales entre 2 y 6 meses, pero las IgG y las IgA pueden persistir en valores inferiores durante años <sup>119,120</sup>. Incluso con niveles normales de IgG total, se ha observado deficiencia de subtipos de IgG, especialmente IgG2 e IgG4, durante más de 1 año postrasplante <sup>121</sup>, con aumento compensador de IgG1. Se pueden obtener respuestas a antígenos de recuerdo al final del primer año postrasplante, pero el tipo de respuesta es más propia de una respuesta inmune primaria que de secundaria, y es necesaria una dosis de recuerdo para mantener a inmunidad a largo plazo <sup>122,123,124</sup>. Los pacientes sin EICH pueden ser

inmunizados frente a sarampión, rubéola y polio tras 1-2 años tras TMO. *In vitro*, la respuesta proliferativa y secretora ante diferentes activadores policlonales de linfocitos B (anti-Ig, anti-Ig e IL-2, y anti-Ig e IL-4), se normaliza después del 3º mes postrasplante.

*Células T e inmunidad celular:*

La inmunidad T es necesaria para el control de las infecciones por virus RNA y DNA, protozoos y hongos. A través de su participación en la síntesis de anticuerpos específicos, también es necesaria para el control de bacterias encapsuladas causantes de infecciones respiratorias. Tras el trasplante no se demuestra inmunidad T antígeno específica frente a microorganismos a los que previamente existía inmunidad <sup>125,126,127,128</sup>. Esta inmunidad sólo se recupera hasta la reactivación viral que induce la formación de nuevos linfocitos T antígeno específico. La normalización de los linfocitos T de sangre periférica es un proceso lento. El nadir de linfocitos absolutos se observa durante la primera y segunda semana. Al final de la tercera semana el número de linfocitos comienza a elevarse, aunque en ocasiones no alcanza cifras normales hasta pasado el primer año postrasplante. El retraso de la recuperación de la cifra de linfocitos CD4+ respecto a los linfocitos CD8+, tiene como resultado un cociente CD4/CD8 invertido de forma prolongada. Por el contrario, se produce un incremento rápido de los linfocitos CD8+, con valores superiores a lo normal durante 3 meses. Con frecuencia, los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, tienen morfología de LGL y expresan CD11b, CD29, CD57 y CD45RO, con reducción de CD45RA. Asimismo,

en el periodo precoz de trasplante se observa aumento de células con expresión de marcadores de activación (OKT10+, HLA-DR+ y HNK-1+), coincidiendo en ocasiones, con expresión normal de otros marcadores de activación (CD25).

Las distintas subpoblaciones linfocitarias tienden a normalizarse a partir de los primeros 6 meses. En los supervivientes sin EICH crónica, el índice CD4/CD8 suele ser normal a partir de los 18 meses.

Durante los primeros meses post-TMO, no sólo existe alteración cuantitativa de linfocitos sino que también están reducidas la mayor parte de las funciones de inmunidad celular. La respuesta proliferativa a antígenos no específicos como fitohemaglutinina (PHA), concanavalina-A y pokeweed mitogen (PWM), se normalizan progresivamente a partir de los 6 meses. De forma paralela se normalizan las funciones antígeno específicas (actividad proliferativa, colaboradora y supresora). La disminución de la activación de células T con mitógenos, antígenos, anticuerpos monoclonales (anti-CD3 o anti-CD2) o ionofóros de  $Ca^{2+}$ , se ha atribuido a disminución de la síntesis de IL-2<sup>129,130</sup>. Sin embargo, la disminución del funcionalismo T no parece deberse exclusivamente al déficit de IL-2 ya que en ocasiones, la adición de IL-2 exógena no es capaz de restaurar la función completamente<sup>131</sup>.

Según algunos autores, estas alteraciones ocurren independientemente del tipo de enfermedad que motiva este tratamiento, el tipo de trasplante (autólogo, singénico o alogénico) y del régimen de acondicionamiento utilizado. Los factores que más influencia ejercen en la recuperación inmunológica son el tiempo transcurrido post-TMO y la presencia o ausencia de EICH crónica. Los

pacientes que no desarrollan EICH crónica recuperan las funciones inmunes en uno a cuatro años.

A pesar de todos los estudios realizados, existe una gran heterogeneidad en cuanto a las características de los pacientes estudiados, tipo de trasplante (autólogo, alogénico y singénico), tratamiento de acondicionamiento (quimioterapia o asociación de quimio y radioterapia), profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped utilizado (ciclosporina, metotrexate, asociación de ambas, deplección parcial o total de linfocitos T) y origen de las células hematopoyéticas utilizadas (médula ósea o sangre periférica). Por otra parte, el método de estudio utilizado ha sido en ocasiones poco específico para la identificación de ciertas poblaciones celulares o se ha dirigido al estudio de una subpoblación celular.

La mayor parte de los estudios se han realizado tras trasplante alogénico de médula ósea y la mayoría de los trabajos que incluyen pacientes tratados con trasplante autólogo el número de pacientes estudiado es muy limitado, especialmente cuando se utiliza célula germinal de sangre periférica. En ninguno de estos estudios la población de pacientes estudiado es homogénea en cuanto al diagnóstico.

### **I.2.3. POSIBLES INTERVENCIONES PARA ACELERAR LA RECUPERACION INMUNE: INMUNOTERAPIA.**

Durante la última década, el progreso de la inmunología tumoral, ha dado lugar a numerosos intentos de activar el sistema inmune del paciente, con la

intención de que las células tumorales sean reconocidas como extrañas y sean eliminadas. Estos procedimientos utilizan modificadores de la respuesta biológica (MRB) y/o células inmunes activadas, para inducir una respuesta inmune antitumoral. Entre los MRB se incluyen linfoquinas y citoquinas. Tras las observaciones de que diversos MRB podían aumentar de forma significativa la actividad antitumoral *in vitro*, se iniciaron los ensayos preliminares *in vivo* con la utilización de interferón (IFN) e inductores de interferón. Las respuestas clínicas alcanzadas estimularon la investigación subsiguiente con otros MRB. Los ensayos clínicos con inmunoterapia adoptiva con IL-2 y linfocitos activados killer (células LAK), en melanoma y carcinoma renal metastásico, mostraron respuestas significativas y han sido la base para la aplicación en otras neoplasias sólidas y hematológicas <sup>132</sup>. La mayoría de las células LAK son células NK activadas.

Las células NK (natural killer), se describieron en el año 1978 durante estudios de citotoxicidad celular contra células tumorales <sup>133</sup>. Desde entonces, diversos trabajos han permitido asociar esta población celular con la subpoblación denominada linfocitos grandes granulares (LGL) <sup>134</sup> así como establecer las características de las células NK, su posible relación con las células T y macrófagos <sup>135,136</sup> y algunos de los posibles mecanismos de ejercer la citotoxicidad <sup>137</sup>. Los estudios se han dirigido a establecer su importancia *in vivo*, específicamente, en relación, con su papel en la vigilancia inmune para la detección y establecimiento de resistencia al crecimiento y extensión de tumores <sup>138,139</sup>. Las células que median la actividad NK parecen tener también funciones antibacterianas y antivirales.

Hasta la actualidad se han descrito tres grandes tipos de actividad citotóxica que se asocian con diferente fenotipo inmune:

1. Citotoxicidad clásica mediada por células  $CD3^+CD4^+$  o  $CD3^+CD8^+$ , que se ejerce de forma específica frente a células que expresan antígenos de Clase II y I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), respectivamente <sup>140,141</sup>.

2. Células NK, con actividad citotóxica no restringida por el CMH, o como se ha demostrado recientemente y se ha comentado en el apartado de mecanismo de curación del trasplante (I.1.2.), relacionada a antígenos de Clase I de CMH.

3. Células  $CD3$  que presentan aparentemente actividad citotóxica no restringida al CMH. En este grupo se incluyen células T con receptor gamma-delta y células que ejercen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

Otro tipo de células utilizadas como inmunoterapia adoptiva, es la obtención y expansión de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). Al contrario que las células LAK, la mayoría de los TIL son linfocitos T, que parecen tener una mejor movilidad y acceso al tejido tumoral.

Entre otras formas de inmunoterapia antitumoral se incluye: combinación de inmunoterapia con radioterapia previa, transfección de genes en TIL para aumentar su actividad antitumoral (genes de  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ , IL-2, IL-6), transfección de genes a las células tumorales que aumenten su inmunogenicidad (IL-4, IL-2,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ , GM-CSF, antígenos HLA de Clase I)<sup>142</sup>.



### **I.3. LA CITOMETRIA DE FLUJO COMO METODO DE ESTUDIO DE COMPONENTES Y FUNCIONALISMO DEL SISTEMA INMUNE.**

La citometría de flujo es uno de los métodos de estudio que en los últimos años ha aportado más información acerca de los componentes y el funcionalismo del sistema inmune.

La citofluorometría es un sistema de estudio que, junto con el uso de anticuerpos específicos y reactivos fluorocromos, permite el estudio de la superficie, citoplasma y contenido de DNA de células, para determinar su estirpe y estimar su actividad biológica potencial.

El punto clave de la utilización de la citometría de flujo esta en la disponibilidad de la tecnología de anticuerpos monoclonales, lo que permite asegurar una especificidad de la molécula detectada.

La interacción antígeno-anticuerpo es un proceso complejo debido al número de variables que intervienen. La mayor parte de los antígenos tienen múltiples estructuras antigénicas (denominadas determinantes antigénicos o epitopos), frente a los que se pueden formar diferentes anticuerpos específicos. Cada determinante antigénico puede estimular diferentes clones de linfocitos B que evolucionan (diferencian) a células productoras de anticuerpos. El anticuerpo producido por cada uno de estos clones varia en su estructura y en la capacidad de unión a cada epitopo.

La afinidad del anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno no unido en la solución.

### **I.3.1. Bases y método de la citofluorometría**

La citometría de flujo es un método analítico que permite realizar mediciones rápidas y objetivas de propiedades físicas y fluorescentes de poblaciones no homogéneas constituidas por partículas o células en suspensión monodispersa. Las células son teñidas con moléculas fluorescentes (fluorocromos) que se unen preferente o específicamente al constituyente celular que se desea medir. Las células se hacen desfilan una a una arrastradas por un flujo portador, a través de un punto iluminado con luz de alta intensidad: cada célula absorbe y emite una señal fluorescente que es proporcional a su contenido en fluorocromo, y también produce cierta dispersión de la luz de excitación que es función de su tamaño y estructura interna. Varios detectores recogen estas señales que son ordenadas en distribuciones de frecuencia o histogramas. Algunos instrumentos son capaces de separar partículas de la suspensión en función de valores de los parámetros medidos (fluorescence-activated cell sorter FACS®).

La citometría de flujo proporciona información acerca de la estructura y función de células y partículas de modo preciso, rápido y objetivo.

Además de la fluorescencia, otras medidas a realizar sobre las células en flujo, son las siguientes:

1. Luz dispersada por una célula, que se relaciona con las propiedades reflectivas, refractivas y difractivas de las características internas y externas de las células.

2. Volumen electrónico, determinado por la medición de los cambios de resistencia eléctrica cuando una célula pasa a través de una pequeña apertura.

3. Pérdida de la luz axial. Es la reducción de la intensidad de la luz causada por una célula al pasar a través del rayo de excitación en la región de medición.

4. Información morfológica, obtenida a partir de la sombra o de la duración de las señales de fluorescencia o de luz dispersada.

La citometría utiliza el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes unidas a anticuerpos monoclonales, que se unen de forma específica a moléculas celulares.

Los citómetros de flujo se componen de las unidades básicas que se esquematiza en la Figura 4A y se resume a continuación:

**1. Sistema hidráulico:** es el responsable del flujo de líquidos que tiene como objetivo mantener la muestra en una suspensión monodispersa. Además, las muestras deben filtrarse para extraer partículas contaminantes y grupos de células que pudieran obstruir los pequeños orificios de la cámara. Este sistema produce una corriente de flujo de líquido isotónico a una presión determinada que dirige el líquido hacia la cámara de flujo

**2. Sistema de iluminación:**

Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros utilizan luz láser por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida. La característica de monocromática, indica que posee una sola longitud de onda o frecuencia. Existen láser de estado líquido y sólido, pero los más útiles son los gaseosos, que producen un rayo más potente y uniforme. Entre los gaseosos, el más utilizado es el de argón, que emite a 480 nm excitando a diversos fluorocromos. Las células han sido previamente teñidas con uno o varios marcadores fluorocromos específicos según los parámetros que se deseen estudiar.

Al pasar las células a través de un rayo de excitación se provoca fluorescencia, es decir, captación y emisión de luz. Varios detectores recogen la fluorescencia secundaria de las células, con diferentes longitudes de onda por una serie de filtros y espejos.

Fluorocromos y fluorescencias. La luz láser es monocromática, mientras que los fluorocromos tienen un espectro de absorción y otro de emisión. Para que un fluorocromo pueda ser utilizado en citofluorometría es necesario que la longitud de onda a la que emite el láser se encuentre dentro de su espectro de excitación. Para que sea útil un fluorocromo, su longitud de onda de excitación debe estar lo más separada posible de la de emisión para que así pueda ser eliminada la luz del láser residual con los filtros selectivos. Cuando se utilizan varios fluorocromos, han de tener la misma longitud de onda de excitación para no ser necesario un segundo láser, mientras que lo ideal es que las longitudes de onda de emisión se encuentren lo más separadas posibles para que no se

solapen (Stoke's shift). Sin embargo, con frecuencia no es posible eliminar este solapamiento mediante filtros ópticos. Cuando la sobreexposición o solapamiento es pequeña, es posible corregirla mediante un método electrónico denominado compensación, que detrae un porcentaje de señal fluorescente determinado empíricamente.

Las fluorescencias más frecuentemente utilizadas son el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la ficoeritrina (PE). Ambas se excitan a 488 nm y emiten a 530 y 580 nm respectivamente. En ocasiones se utiliza un tercer fluorocromo, el propidio de yoduro que se excita a 488 nm y emite a 620 nm.

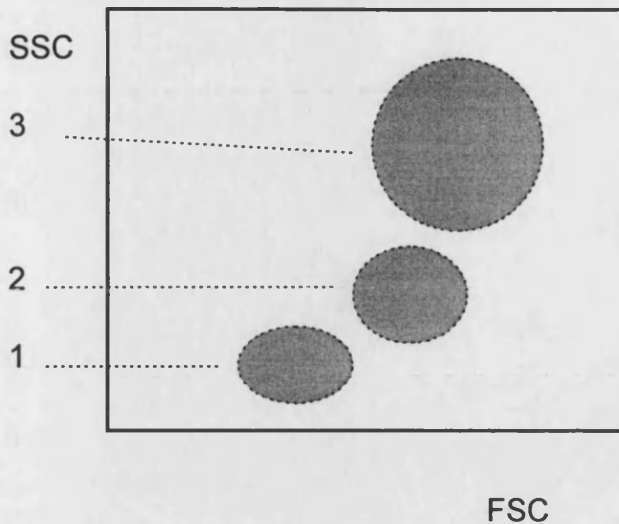
Cuando las células están marcadas por fluorocromos absorben la luz del láser y la emiten con menor energía y mayor longitud de onda, esta propiedad denominada fluorescencia se emite por la partícula fluorescente, lo hace por el mismo sistema óptico de dispersión de la luz de 90°. La luz emitida lo hace a mayores longitudes de onda. La luz multicolor es separada en diferentes longitudes de onda o colores que son recogidos cada uno por un detector. Además existen filtros de paso largo o corto, selectivos de longitudes de onda largas o cortas, junto a espejos dicróicos que reflejan la luz que puede atravesar y envían la luz de un determinado color a un determinado detector. De esta forma se puede utilizar varias fluorescencias simultáneamente.

**3. Sistema óptico:** la cámara de flujo: la muestra pasa por un embudo que produce un capilar de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro con superficies ópticas. El líquido pasa a un flujo con una presión y velocidad controlada de 10 m/seg, de esta forma se

produce un flujo laminar que coloca a las células alineadas de forma única en el centro de la corriente y a una velocidad adecuada.

El citómetro de flujo con fuente de luz láser, usa normalmente una geometría ortogonal, es decir, la dirección del flujo, el rayo láser y el eje óptico del sistema de detección de la fluorescencia son perpendiculares entre sí. De esta forma se generan impulsos eléctricos o señales analógicas que se transforman en señales digitales que son ordenadas en distribuciones de frecuencia o histogramas.

Zona de medición. Es aquí donde el rayo de luz incide sobre la corriente de células. La luz del rayo láser es dispersada por la célula en un ángulo de  $360^\circ$  y esta se denomina "forward-angle light scatter" (FSC) y la cantidad de luz es proporcional al tamaño de las células. Cuando la luz dispersada es recogida ortogonalmente al ángulo recto del rayo de luz, el parámetro resultante se denomina "90° light scatter o side scatter" (SSC). Esta dispersión a  $90^\circ$  está formada por luz reflejada por las estructuras internas de la célula o las ondulaciones de las membranas. Por tanto, este parámetro se relaciona con la granularidad celular. Estas propiedades FSC y SSC, se denominan propiedades intrínsecas porque son medidas por el instrumento sin la necesidad de añadir reactivos. La equivalencia es la siguiente:



1 (Bajo FSC y SSC) = linfocitos: poco tamaño, escasa granularidad

2 (Intermedio FSC y SSC) = monocitos: mayor tamaño, mayor granularidad.

3 (Alto FSC y SSC) = granulocitos: mayor tamaño, máxima granularidad.

**4. El sistema electrónico e informático.** Los fotones de luz son convertidos en impulsos eléctricos de forma proporcional y estos son procesados de varias formas. Las señales se pueden recoger de forma logarítmica o lineal. La forma logarítmica es más sensible con intensidades de fluorescencia bajas, mientras que la lineal es más sensible para valorar diferencias entre una población. Las señales analógicas son transformadas en digitales y distribuidas en canales del 0 al 256 o de forma más sensible del 0 al 1024. El sistema procesador de señales recogidas de una sola partícula se atribuye a una sola partícula permitiendo un estudio multiparamétrico. A velocidades de 10 m/seg de flujo, se pueden analizar 10.000 células en 1 seg. Los datos digitalizados son recogidos y almacenados informáticamente. De esta forma se pueden analizar en

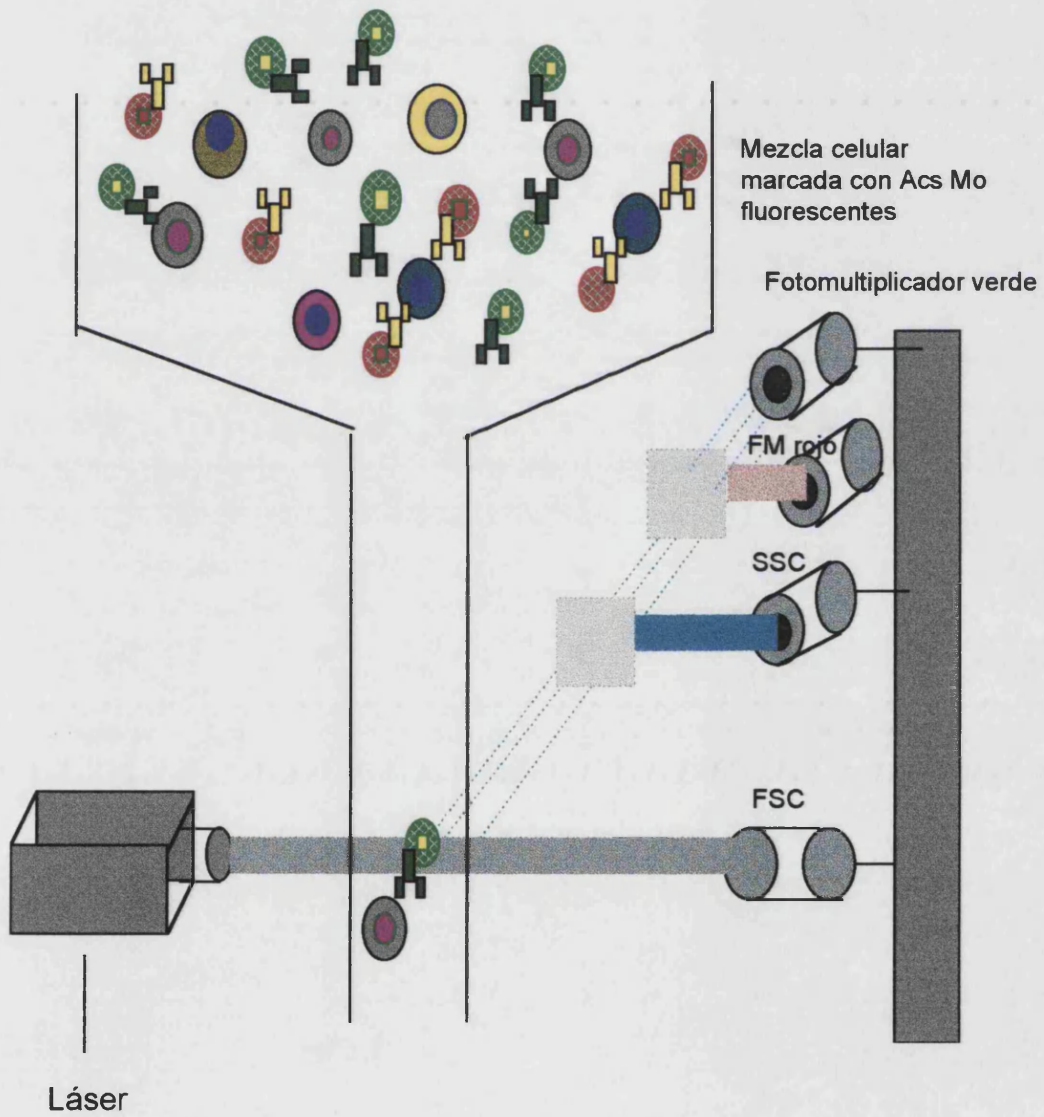
el momento y siempre que se desee. Cada célula estudiada se puede clasificar según sus características de FSC o tamaño, SSC o granularidad y las distintas fluorescencias FL1, FL2, o FL3, más frecuentemente utilizadas.

**“Gating”**: es un método muy útil para el análisis de las distintas subpoblaciones que componen la muestra. Es un recurso del sistema informático del citómetro que permite seleccionar una población celular en base a unos parámetros y analizar las características de esta población. En una muestra de SP es posible utilizar la distribución de tamaño y granularidad para incluir sólo la población de linfocitos para analizar la distribución de fluorescencia en esta población.



**FIGURA 4A**

**ESQUEMA DE ANALISIS DE POBLACIONES CELULARES MARCADAS  
CON ANTICUERPOS MONOCLONALES UNIDOS A FLUOROCROMOS,  
MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO**



### **I.3.2. Significado funcional de las poblaciones celulares identificadas mediante citofluorometría.**

La utilización de diferentes combinaciones de Ac monoclonales y la técnicas de doble marcaje permite identificar diversas poblaciones celulares. A continuación se resume la información relacionada con los anticuerpos que se utilizaron en este estudio y que se detallan más tarde en la Tabla a continuación:

**CD2+:** Identifica al receptor de hematíes de carnero (rosetas E), ligando natural de la molécula de adhesión general CD58 (LFA-3). Forma parte de la superfamilia de inmunoglobulinas. La unión de CD2 a la molécula de adhesión LFA-3 (CD58) de la célula presentadora de antígeno (CPA), sinergiza la unión de LFA-1 a ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 de la CPA. La misma interacción adhesiva ocurre entre la célula T efectora y la célula diana.

Se expresa en: 1. Las células T más precoces (protimocitos), generalmente, junto a CD7 y a la expresión citoplasmática de CD3.

2. Linfocitos T maduros

3. Células NK.

Se considera marcador de población T global (madura e inmadura).

**CD3+:** forma parte del complejo TCR-CD3. Es complejo molecular de 7 cadenas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ), con componentes variables y constantes. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , forman la subunidad de unión al antígeno (Ti), que es responsable del reconocimiento del antígeno unido a la molécula del CMH. El complejo CD3

contiguo al T<sub>i</sub>, está compuesto por dos cadenas de heterodímeros ( $\gamma\epsilon$  y  $\epsilon\delta$ ). CD3 y el homodímero citoplásmico asociado  $\zeta$ , son los responsables de la transducción de la señal originada en TCR. Dado que el TCR-CD3 no posee un dominio con actividad tirosin-kinasa (PTK) intrínseca, la activación del linfocito T requiere una segunda señal (co-estimulación) a través de la unión de la molécula B7 (B7-1 y B7-2) de la CPA, a su receptor en la célula T, CD28. La actividad sinérgica de las dos uniones, origina respuestas transcripcionales y postranscripcionales hacia el núcleo, a través de actividad PTK citoplasmática.

Su presencia indica maduración funcional. En la gran mayoría de las células T se expresa el heterodímero formado por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (TCR- $\alpha\beta$ ). Se acompaña de expresión de CD5 y el antígeno común timocítico CD1. En la fase precoz de la ontogenia linfoide, las células T expresan niveles bajos de CD3 y son CD4 y CD8 negativo (estadio doble negativo), para posteriormente ser CD4 y CD8 positivo negativo (estadio doble positivo) y, en último lugar, CD4 o CD8 positivo.

Existe una mayor proporción de linfocitos CD3+/TCR  $\gamma\delta$  3-5% en SP, piel e intestino, que parecen estar especializados en el reconocimiento de células lesionadas en piel e intestino. Expresan CD4 y CD8.

**CD5+:** molécula de 67 kDa, que se expresa de forma precoz en timocitos corticales, células T y en una pequeña subpoblación de linfocitos B. Su función es la unión a la molécula CD72 expresada en la célula presentadora de antígenos, que tiene lugar en la fase de coestimulación.

**CD5+CD19+:** Constituye una subpoblación diferente al resto en cuanto a que se origina de un precursor distinto que se separa del resto de forma precoz en la ontogenia linfoide B y presenta un receptor y unas características funcionales diferentes, tal como se ha comentado previamente . Estas células se caracterizan por la expresión de IgM de superficie, con escasa o nula IgD.

**CD4+:** junto con CD8, son denominados **co-receptores** por su participación junto al complejo TCR-CD3, en el reconocimiento del antígeno. La molécula CD4 es un monómero con 4 dominios de los que D1 y D2, forman el lugar de unión a regiones constantes de moléculas clase II del CMH, facilitando la unión entre las células (linfocito T y CPA o linfocito B). Está presente en la membrana de las células T con actividad cooperadora (actividad restringida por antígenos CMH clase II) que constituyen el 60-70% del total de linfocitos T. Todas las funciones reguladoras y efectoras directas que realiza lo hace mediante la secreción de citoquinas. Existen dos subpoblaciones de células T CD4+: las células CD4 inflamatorias (TH1), encargadas de la activación de macrófagos, producen IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$  y  $\beta$ , IL-3 e IL-2 (cuando se activa la célula CD4+TH1). Son las responsables de la respuesta inmune mediada por células. Las células CD4+ cooperadoras (TH2), se encargan de la activación de linfocitos B. Producen IL4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-3, GM-CSF, TGF- $\beta$ , estimulando la producción de mastocitos, eosinófilos e IgG1.

**CD8+:** La molécula co-receptora CD8 es un heterodímero formado por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , unidas por un puente disulfuro.

Está presente en la superficie celular de células T con actividad citotóxica-supresora (CTL o LTC)). Actividad restringida por antígenos CMH clase I. El reconocimiento específico del complejo antígeno (péptido)-CMH en una célula diana, induce la muerte de la célula por apoptosis fundamentalmente a través de la liberación del contenido de sus gránulos. Existe un segundo mecanismo de citotoxicidad inducida por CD8+, que supone la activación del receptor fas en la célula diana, que constituye un receptor de TNF, induciendo apoptosis.

Estos mecanismos de activación de apoptosis son opuestos y regulados por productos de bcl-2, proteínas expresadas por el gen bcl-x y la proteína Bax.

**CD25+:** receptor de la cadena  $\alpha$  de la IL-2. Se expresa en linfocitos B y T activados y monocitos. La mayor parte de las NK de SP expresan sólo el receptor de IL-2 de afinidad intermedia. Sin embargo, las células NK CD16-CD56<sup>bright</sup> es la única célula de sangre periférica que expresa en reposo, de forma natural, un receptor funcional de alta afinidad para la IL-2.

La activación del linfocito T induce la secreción de IL-2 y la producción de su receptor (IL-2r o CD25). Es un heterotrímero ( $\alpha, \beta$  y  $\gamma$ ) que tiene una alta afinidad por la IL-2 y permite la respuesta a concentraciones muy bajas. Está asociado a la tirosin-kinasa citoplasmática lck.

La producción de IL-2 y de su receptor es inhibida por drogas como la ciclosporina-A o el FK506.

**HLA-DR+:** molécula de clase II del CMH que se expresan en parte de las células hematopoyéticas (linfocitos T o B inmaduros, linfocitos T activados, macrófagos y otras células presentadoras de antígeno) y en células epiteliales del timo. Es negativo en el resto de las células nucleadas del organismo a excepción de la microglia, células que están relacionadas con macrófagos.

**CD3+CD16+CD56+:** subpoblación de linfocitos T maduros con actividad reguladora supresora o citotóxica en experimentos de generación de células LAK.

**CD8+CD57+:** La expansión de esta población de linfocitos se ha comunicado en el periodo postrasplante alogénico y/o asociado a infecciones persistentes o recurrentes por citomegalovirus o por VIH <sup>143,144,145,146</sup>. Estudios *in vitro*, han demostrado que estas células ejercen una actividad supresora de la proliferación B y T inducida por mitógenos, lo que sugiere su papel de regulación de la reactividad linfoide frente a antígenos virales o de un estado de tolerancia inmune en pacientes trasplantados.

En contraste, otro estudio *in vitro* demostró que pueden actuar como precursores de células LAK en estudios de estimulación con IL-2 <sup>147</sup>.

Sin embargo, no se conoce con claridad su mecanismo de acción y su posible efecto inhibitor de otras funciones inmunes. Más recientemente, se ha comunicado el papel de esta subpoblación de linfocitos de sangre periférica en la inhibición de la actividad citolítica mediada por células, no restringida por la

presencia de moléculas del CMH, y mediado por la liberación de un factor soluble con un coeficiente de sedimentación inferior a 1S, que inhibe la unión de concanavalina A <sup>148</sup>. El 95% al 100% de esta población expresa los antígenos pan-T, CD2+, CD5+, CD7+, en el 92% al 94% expresan el complejo CD3-TCR $\alpha\beta$ . En contraste, la gran mayoría de estas células (92%-93%), no expresan el marcador de células NK, CD56, lo cual concuerda con el hecho de que estas células no exhiben actividad NK espontánea.

En conjunto, los linfocitos CD8+CD57+ detectados en SP, en el periodo postrasplante alogénico, no solo no presentan actividad citolítica espontánea, sino que claramente inhiben la actividad citolítica celular HLA-específica y antígeno inespecífica. Por tanto, posiblemente interaccionan con las células efectoras en un paso común del proceso citolítico, independiente del reconocimiento del antígeno.

**CD57+:** constituye un oligosacárido, presente en numerosas glicoproteínas de superficie celular, que identifica subpoblaciones de células NK, linfocitos T, linfocitos B, y monocitos. El anticuerpo que identifica a este antígeno se le denominó anteriormente HNK-1 y Leu-7. Expresado simultáneamente con CD8, identifica una subpoblación de linfocitos T con actividad supresora.

**CD3-CD16+CD56+:** Constituye el fenotipo más característico de célula NK en sangre periférica. La mayor parte de las NK de SP expresan sólo el receptor de

IL-2 de afinidad intermedia. Sin embargo, las células NK CD16-CD56+ <sup>bright</sup> expresan en reposo, un receptor funcional de alta afinidad para la IL-2.

**CD16+:** constituye el receptor del Fc de la IgG tipo IIIA (FcγRIIIA) que interviene en el reconocimiento de las subclases IgG1 e IgG3 y estimula el ataque citotóxico en reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Es uno de los marcadores más selectivos de célula NK en una población mononuclear.

Se expresa en neutrófilos, macrófagos y células NK.

**CD56+:** molécula de 175-185 Kda, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, forma isómera de la molécula de adhesión celular neural, presenta actividad de molécula de adhesión. Se expresa en células NK y de forma aislada en algunos linfocitos y monocitos.

La función NK se activa por la presencia en la célula de antígenos de clase I del CMH extraños o por la falta de expresión de estos antígenos, liberando el contenido de sus gránulos ( que incluye perforina y granzina) e IL-12, citoquina capaz de lisar células tumorales. La capacidad de algunos tumores de evitar esta lisis es atribuible a sobrecrecimiento de clones celulares con alteración de lugares de reconocimiento o mediante la liberación de prostaglandinas, IL-4 (factor de crecimiento de linfocitos B, que inactiva la estimulación de la célula NK por la IL-2) o IL-10 (que bloquea la estimulación de la célula NK por el IFN-γ).



**CD19+**: molécula de 95 kDa, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Es expresada de forma precoz y se mantiene posteriormente en todos los linfocitos B, hasta el estadio de célula plasmática

Forma un complejo con CD21 (CR2) y CD81 (TAPA-1). Tiene actividad de co-receptor para las células B.

## II. HIPOTESIS DE TRABAJO

## II. HIPOTESIS DE TRABAJO

La quimioterapia en dosis altas seguida de trasplante de células germinales hematopoyéticas (TCGH), es un procedimiento terapéutico de enfermedades neoplásicas, capaz de superar la resistencia a fármacos en dosis convencionales. Este hecho se basa en la relación demostrada entre dosis de fármaco y efecto citotóxico antitumoral, de diversos agentes antineoplásicos en numerosas enfermedades neoplásicas <sup>149,150</sup>.

A pesar de que el mecanismo de curación del TCGH se relaciona fundamentalmente con el efecto antileucémico de la quimio/radioterapia en altas dosis, existen datos experimentales de laboratorio y resultados clínicos que indican que, en cierto número de casos, este efecto no es suficiente para eliminar la población tumoral <sup>151,152</sup>. Existe evidencia de la contribución de la reacción inmunológica denominada injerto-contraleucemia (ICL) asociada al TCGH alogénico, ejercida por linfocitos del donante estimulados de forma inespecífica por aloantígenos del paciente<sup>17</sup>, frente a células portadoras de antígenos tumorales específicos y/o antígenos HLA.

Esta reacción de injerto frente a tumor, demostrada en leucemia y linfoma, puede ser operativa también en diferentes neoplasias hematológicas y en tumores sólidos, ya que pueden expresar en una proporción importante, antígenos tumorales y HLA que, potencialmente las hace ser susceptibles de ser reconocidas en reacciones de citotoxicidad.

A pesar de que esta reacción ICL no existe en el trasplante autólogo, estudios previos parecen indicar que la reconstitución inmune postrasplante es más rápida cuando se utilizan CGH obtenidas tras su movilización a sangre periférica (TCSP), que cuando se infunde MO sin estimulación previa (TAMO)<sup>153,154</sup>. El marcado aumento en fases precoces post-TCSP de subpoblaciones con fenotipo y actividad citotóxica de amplio espectro ( células NK y linfocitos T citotóxicos ), puede ejercer un efecto ICL y por tanto influenciar en el control de la enfermedad neoplásica<sup>155,156,157</sup>.

Sobre estos hechos hemos planteado la siguiente hipótesis de trabajo:

1. Existen diferencias cuantitativas y cualitativas en la reconstitución inmune postrasplante de células germinales de sangre periférica y de médula ósea. El estudio de la recuperación inmune puede ser útil para establecer el modelo básico de recuperación y determinar el momento más adecuado para asociar una terapia de base inmune.
2. En la medida en que las enfermedades hematológicas presentan alteraciones de la células germinal hematopoyéticas y de su reactividad, la reconstitución inmune postrasplante puede ser diferente en enfermedades hematológicas y en tumores sólidos.

3. Las diferencias en el patrón de reconstitución inmune entre TAMO y TCSP, pueden influir, junto con otros factores, en el control de la enfermedad neoplásica.

### III. OBJETIVOS

### III. OBJETIVOS

1/ Determinar si existen diferencias en la reconstitución inmune tras quimioterapia en dosis altas seguido de trasplante autólogo de médula ósea obtenida sin estimulación previa (TAMO), o de trasplante autólogo con células germinales hematopoyéticas obtenidas tras su movilización a sangre periférica (TCSP).

2/ Determinar si existen diferencias entre la reconstitución inmune postrasplante de pacientes con neoplasias hematológicas y neoplasias sólidas.

3/ Estudiar si la diferente reconstitución inmune de las poblaciones celulares que tienen fenotipo citotóxico, asociado al tipo de trasplante de células hematopoyéticas (TAMO o TCSP), tiene influencia en el control de la enfermedad, en el grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída.

**IV. METODOLOGIA**



## **IV. METODOLOGIA**

### **IV.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio prospectivo, de la recuperación inmunológica en todos los pacientes con diagnóstico de neoplasia sólida o hemopatía maligna, tratados con TCGH durante los años 1992-1996 en el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El diseño relativo a cada uno de los objetivos, se resume a continuación:

1. Cuantificación secuencial de las diferentes subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, pretrasplante y los días 14, 21, 30, 60, 90, 180 y 360 postrasplante, mediante estudio de citofluorometría, en el grupo global de pacientes trasplantados y en el subgrupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída, que reciben QAD + TAMO y de aquellos que reciben TCSP. En cada paciente, la determinación de cada subpoblación celular, tiene como referencia su propio valor pretrasplante y el valor medio determinado en un grupo control.

Estudio funcional de inmunidad celular *in vivo* mediante la realización en un subgrupo de pacientes, de tests cutáneos de inmunidad celular pretrasplante y tras el primer año.

Comparación estadística de los resultados de ambos grupos (TAMO y TCSP) mediante comparación de la distribución en cada uno de los puntos por

separado (U de Mann-Whitney) y comparación de perfil de las curvas (modelo de MANOVA para muestras repetidas).

2/ Para determinar si existen diferencias entre la reconstitución inmune postrasplante de pacientes con neoplasias hematológicas y neoplasias sólidas, mediante la cuantificación citofluorométrica secuencial de las diferentes subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, pretrasplante y los días 14, 21, 30, 60, 90, 180 y 360 postrasplante, en pacientes con diagnóstico de leucemia y mieloma múltiple con la de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída, en ambos casos utilizando TCSP. Comparación estadística de los resultados de ambos grupos (neoplasias hematológicas y carcinoma de mama), mediante comparación de la distribución en cada uno de los puntos por separado (U de Mann-Whitney) y comparación de perfil de las curvas (modelo de MANOVA para muestras repetidas).

3/ Estudiar si las diferencias en reconstitución inmune de las poblaciones celulares que tienen fenotipo citotóxico asociadas a TAMO o CGSP, tienen influencia en el control de la enfermedad neoplásica, mediante:

3.1. Comparación de las curvas de supervivencia libre de enfermedad de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída, de los dos grupos de pacientes ( TAMO y TCSP ).

3.2. Estudio de influencia de la reconstitución inmune de las poblaciones celulares con fenotipo NK y T supresor/citotóxico, como posible factor pronóstico de recaída postrasplante en pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída: se determinará la posible relación entre el valor absoluto alcanzado por diversas poblaciones celulares con fenotipo NK y T supresor/citotóxico, y la frecuencia de recaída de la enfermedad.

Se utilizará el modelo estadístico de regresión múltiple de Cox, que permite determinar cuál de las variables incluidas en el análisis, tiene relación independiente con el suceso en estudio, en este caso la recaída de la enfermedad (supervivencia libre de enfermedad). Tras un primer análisis utilizando variables cuantitativas, y con la intención de identificar un valor dintel de la variable que identifique a un grupo de pacientes con una determinada SLE, se han transformado en variables categóricas en base a diferentes niveles absolutos utilizando los establecidos por los percentiles (dada la distribución no normal de las variables de la muestra) 50 (mediana), 80 y 90, en el día +30 postrasplante, por ser éste el momento de máxima elevación de las poblaciones con fenotipo NK y ser máxima la diferencia entre los grupos de TAMO y TCSP. Las variables a incluir serán las siguientes:

1. Poblaciones con fenotipo NK: CD3-CD16+CD56+, CD16+ total, CD16+CD2-, CD56+.
2. Poblaciones con fenotipo supresor/citotóxico: CD3+CD16+CD56+, CD8+CD57+, CD57+.
3. Población linfoide total: sin actividad exclusiva, como variable control.

Dado que el resultado del análisis uni o bivalente de estas poblaciones puede estar influido por otros factores pronósticos conocidos, tras un primer análisis univariante, se incluirán en el análisis multivariante los factores pronósticos clínicos conocidos en el carcinoma de mama.

## **IV.2. POBLACION ESTUDIADA**

Se han estudiado 232 pacientes de un total de 264 pacientes tratados con transplante autólogo de células germinales hematopoyéticas (TCGH) de forma consecutiva, entre Enero 1992 y Abril 1996 en el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se han excluido del análisis, 18 por muerte precoz peritrasplante (primeros 45 días postrasplante), 11 por dificultad técnica en la realización del estudio que provocó la disponibilidad de datos insuficientes y 3 pacientes por presencia de expresión periférica de síndrome linfoproliferativo en actividad en el momento del TCGH. Los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple (8 pacientes), han sido excluidos para el análisis de recuperación de inmunoglobulinas séricas.

En la Tabla 7 se resumen las características del total de pacientes. Como se puede observar la edad mediana es de 43 años con unos extremos de 15 y 63 años. Existe una mayor presencia de pacientes de sexo femenino condicionado por el número de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama tratadas e incluidas en el estudio. Por este mismo motivo, el número de neoplasias sólidas es el doble que el de neoplasias hematológicas.

Tabla 7. Características clínicas del total de pacientes estudiado.

|                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| <b>Número de pacientes</b>            | <b>232</b>        |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>      | <b>43 (15-63)</b> |
| <b>Sexo (V/M)</b>                     | <b>66/166</b>     |
| <b>Diagnósticos</b>                   |                   |
| <b>Neoplasias hematológicas</b>       | <b>71</b>         |
| <b>Linfoma No Hodgkin</b>             | <b>26</b>         |
| <b>Enfermedad de Hodgkin</b>          | <b>25</b>         |
| <b>Leucemia Aguda Mieloide</b>        | <b>9</b>          |
| <b>Leucemia Mieloide Crónica</b>      | <b>3</b>          |
| <b>Mieloma Múltiple</b>               | <b>8</b>          |
| <b>Tumores sólidos</b>                | <b>161</b>        |
| <b>Carcinoma de mama</b>              | <b>130</b>        |
| <b>Tumor de células germinales</b>    | <b>12</b>         |
| <b>Astrocitoma de alto grado</b>      | <b>8</b>          |
| <b>Carcinoma de ovario</b>            | <b>4</b>          |
| <b>Melanoma metastásico</b>           | <b>3</b>          |
| <b>Carcinoma microcítico pulmonar</b> | <b>2</b>          |
| <b>Sarcoma de partes blandas</b>      | <b>1</b>          |
| <b>Sarcoma de Ewing</b>               | <b>1</b>          |

En la Tabla 8 se resume el origen de las células germinales hematopoyéticas utilizadas en el total de pacientes. Igualmente se detalla el número de pacientes (todas ellas con diagnóstico de carcinoma de mama metastásico en respuesta parcial al tratamiento de inducción), que recibieron inmunoterapia (ciclosporina A e interferón- $\alpha$ ) en el periodo postrasplante, y que se analiza como grupo independiente.

**Tabla 8. Origen de las células germinales hematopoyéticas e inmunoterapia utilizadas en el trasplante.**

|   |            |
|---|------------|
| <b>Número total de pacientes</b>  | <b>232</b> |
| <b>Médula ósea</b>  | <b>81</b>  |
| <b>Células germinales de sangre periférica</b>                                | <b>125</b> |
| <b>Médula ósea + sangre periférica</b>  | <b>18</b>  |
| <b>Células germinales de sangre periférica e inmunoterapia postrasplante.</b> | <b>8</b>   |

En la Tabla 9, se resumen las características clínicas del total de pacientes tratados con trasplante autólogo, que han recibido exclusivamente médula ósea o células germinales hematopoyéticas de sangre periférica (CGSP), como rescate hemopoyético. En conjunto, el grupo de pacientes que han recibido CGSP constituyen un número más numeroso que aquellos que recibieron MO (125 y 81,

respectivamente), debido al cambio a lo largo del tiempo de estudio, del esquema estándar de tipo de CGH, debido a reconocimiento de la más rápida recuperación hematológica. Este hecho es más evidente en el carcinoma de mama.

**Tabla 9. Características del total de pacientes tratados con trasplante autólogo, que recibieron exclusivamente médula ósea o CGSP.**

|   | MO                | CGSP              |
|---|-------------------|-------------------|
| <b>Nº pacientes</b>                             | <b>81</b>         | <b>125</b>        |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>                | <b>39 (15-59)</b> | <b>45 (15-63)</b> |
| <b>Sexo (V/M)</b>                               | <b>31/50</b>      | <b>32/93</b>      |
| <b>Diagnósticos</b>                             |                   |                   |
| <b>Neoplasias hematológicas</b>                 | <b>28</b>         | <b>38</b>         |
| <b>Linfoma No Hodgkin</b>                       | <b>12</b>         | <b>12</b>         |
| <b>Enf. Hodgkin</b>                             | <b>15</b>         | <b>7</b>          |
| <b>Leucemia Aguda Mieloide</b>                  | <b>-</b>          | <b>9</b>          |
| <b>Leucemia Mieloide Crónica</b>                | <b>-</b>          | <b>3</b>          |
| <b>Mieloma Múltiple</b>                         | <b>1</b>          | <b>7</b>          |
| <b>Tumores sólidos</b>                          | <b>53</b>         | <b>87</b>         |
| <b>Carcinoma de mama</b>                        | <b>29</b>         | <b>81</b>         |
| <b>Metastásico</b>                              | <b>1</b>          |                   |
| <b>Alto riesgo de recaída</b>                   | <b>1</b>          | <b>7</b>          |
| <b>Tumor de células germinales</b>              | <b>8</b>          | <b>4</b>          |
| <b>Astrocitoma alto grado</b>                   | <b>8</b>          | <b>-</b>          |
| <b>Carcinoma de ovario</b>                      | <b>2</b>          | <b>1</b>          |
| <b>Melanoma</b>                                 | <b>3</b>          | <b>-</b>          |
| <b>Carcinoma microcítico de pulmón</b>          | <b>2</b>          | <b>0</b>          |
| <b>Sarcoma de partes blandas</b>                | <b>1</b>          | <b>-</b>          |
| <b>Sarcoma de Ewing</b>                         | <b>-</b>          | <b>1</b>          |
| <b>Mediana de seguimiento desde TCG (meses)</b> | <b>43</b>         | <b>13</b>         |

En la Tabla 10, se resumen las características clínicas básicas de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama trasplantadas con MO o CGSP exclusivamente. Como ya ha sido comentado, el número de pacientes que recibieron CGSP es dos veces más numeroso como consecuencia del cambio de la estrategia del Servicio ante la evidencia de una recuperación hematológica precoz asociada al TCSP. Como se puede observar, en este grupo global están incluidas las pacientes con  $\geq 4$  ganglios axilares afectados al diagnóstico, que por motivo de haberse incluido esta indicación de forma más reciente, están todas ellas incluidas en el grupo de TCSP. Este grupo de  $\geq 4$  ganglios afectados al diagnóstico, aunque de mal pronóstico, se sabe que es significativamente mejor que el del grupo de  $\geq 10$  ganglios diagnóstico, el carcinoma inflamatorio y el de  $\geq 4$  ganglios tras quimioterapia neoadyuvante. Por este motivo, han sido excluidas del análisis de factores pronósticos de supervivencia libre de enfermedad (Tabla 10).



**Tabla 10. Características clínicas de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama tratadas con trasplante autólogo con reinfusión exclusiva de médula ósea o CGSP.**

|   | MO                | CGSP              |
|---|-------------------|-------------------|
| <b>Nº total de pacientes</b>  | <b>29</b>         | <b>81</b>         |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>  | <b>39 (15-59)</b> | <b>45 (15-63)</b> |
| <b>Carcinoma de mama de alto riesgo de recaída</b>  | <b>14</b>         | <b>75</b>         |
| <b>Nº pacientes con <math>\geq 4</math> ganglios axilares<br/>afectos al diagnóstico</b>  | <b>0</b>          | <b>7 (9%)</b>     |
| <b>Nº pacientes con <math>\geq 10</math> ganglios axilares<br/>afectos al diagnóstico</b> | <b>6 (43%)</b>    | <b>42 (56%)</b>   |
| <b>Nº pacientes con <math>\geq 4</math> ganglios tras<br/>quimioterapia neoadyuvante</b>  | <b>7 (50%)</b>    | <b>12 (16%)</b>   |
| <b>Inflamatorio</b>   | <b>1 (7%)</b>     | <b>14 (19%)</b>   |
| <b>Carcinoma de mama metastásico</b>  | <b>15</b>         | <b>6</b>          |

En la Tabla 11, se detallan las características clínicas del grupo de pacientes con carcinoma de mama metastásico tratadas con trasplante autólogo con reinfusión exclusiva de médula ósea o CGSP.

**Tabla 11. Características clínicas de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama metastásico.**

|  | <i>MO</i> | <i>CGSP</i> |
|--|-----------|-------------|
| <b>Número de pacientes</b>                     | <b>15</b> | <b>6</b>    |
| <b>Estado hormonal</b>                         |           |             |
| <i>Premenopáusicas</i>                         | <b>13</b> | <b>4</b>    |
| <i>Postmenopáusicas</i>                        | <b>2</b>  | <b>2</b>    |
| <b>Receptores estrógeno</b>                    |           |             |
| <i>Positivos</i>                               | <b>4</b>  | <b>1</b>    |
| <i>Negativos</i>                               | <b>4</b>  | <b>5</b>    |
| <i>No determinados</i>                         | <b>7</b>  | <b>0</b>    |
| <b>Receptores progesterona</b>                 |           |             |
| <i>Positivos</i>                               | <b>5</b>  | <b>1</b>    |
| <i>Negativos</i>                               | <b>3</b>  | <b>5</b>    |
| <i>No determinados</i>                         | <b>7</b>  | <b>0</b>    |
| <b>Respuesta a quimioterapia previa a TCGH</b> |           |             |
| <i>RC</i>                                      | <b>0</b>  | <b>6</b>    |
| <i>RP</i>                                      | <b>13</b> | <b>0</b>    |
| <i>EE/PG</i>                                   | <b>2</b>  | <b>0</b>    |

En la Tabla 12, se detallan las características clínicas de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída, trasplantadas con MO o CGSP exclusivamente, excluyendo el grupo de  $\geq 4$  ganglios axilares afectos al diagnóstico. La exclusión de este grupo tiene la intención de lograr homogeneidad de los grupos a analizar (TAMO y TCSP) en uno de los factores pronósticos conocidos más importantes, como es el número de ganglios afectos al diagnóstico.

A pesar de la diferencia en términos absolutos, no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las características clínicas más importantes, entre ambos grupos (Intervalo de confianza del 95%). El estudio multivariante de factores pronósticos llevado a cabo en este grupo de pacientes, tiene en cuenta la diferencia en el tiempo de seguimiento entre ambos grupos, que es claramente superior en el grupo de TAMO.

**Tabla 12. Características de las pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída trasplantadas con MO o CGSP, excluyendo aquellas con < 10 ganglios axilares afectos al diagnóstico.**

|  | MO           | CGSP         | P               |
|--|--------------|--------------|-----------------|
| <b>Nº pacientes</b>  | 14           | 68           |                 |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>   | 39.5 (28-59) | 46.5 (28-62) |                 |
| <b>Grupos de alto riesgo:</b>  |              |              |                 |
| <b>1. Pacientes con <math>\geq 10</math> G+ al diagnóstico</b>                 | 6 (43%)      | 42 (62%)     | NS*             |
| <b>Nº de ganglios afectos (mediana y extremos)</b>                             | 16 (13-23)   | 14 (10-27)   | NS <sup>U</sup> |
| <b>2. Pacientes con <math>\geq 4</math> G+ tras quimioterapia neoadyuvante</b> | 7 (50%)      | 12 (18%)     | NS*             |
| <b>Nº de ganglios afectos (mediana y extremos)</b>                             | 5 (4-19)     | 6 (4-10)     | NS <sup>U</sup> |
| <b>3. Inflamatorio</b>   | 1 (7%)       | 14 (20%)     | NS*             |
| <b>Estado hormonal</b>   |              |              |                 |
| <b>Premenopausia (%)</b>   | 13 (93%)     | 47 (69%)     | NS*             |
| <b>Postmenopausia (%)</b>  | 1 (7%)       | 21 (31%)     | NS*             |
| <b>Estadio</b>   |              |              |                 |
| <b>II</b>  | 5 (36%)      | 35 (51%)     | NS*             |
| <b>III</b>   | 9 (64%)      | 33 (49%)     | NS*             |
| <b>Receptores estrógeno</b>  |              |              |                 |
| <b>Positivo (<math>\geq 10</math> fmol/mg)</b>                                 | 5 (36%)      | 18 (26%)     | NS*             |
| <b>Negativo (<math>&lt; 10</math> fmol/mg)</b>                                 | 4 (28%)      | 27 (40%)     | NS*             |
| <b>No determinado</b>  | 5 (36%)      | 23 (34%)     | NS*             |

|   | MO      | CGSP     | P   |
|---|---------|----------|-----|
| <b>Receptores progesterona</b>                          |         |          |     |
| <b>Positivo (<math>\geq 10</math> fmol/mg)</b>          | 3 (21%) | 15 (22%) | NS* |
| <b>Negativo (<math>&lt; 10</math> fmol/mg)</b>          | 6 (43%) | 30 (44%) | NS* |
| <b>No determinado</b>                                   | 5 (36%) | 23 (34%) | NS* |
| <b>Grado histológico (Scarff-Bloom)</b>                 |         |          |     |
| <b>1</b>  | 0       | 2 (3%)   | NS* |
| <b>2</b>  | 4 (28%) | 15 (22%) | NS* |
| <b>3</b>  | 8 (57%) | 30 (44%) | NS* |
| <b>No determinado</b>                                   | 2 (14%) | 21 (31%) | NS* |
| <b>Mediana de seguimiento desde mastectomía (meses)</b> | 54      | 20       |     |

NS= No diferencia estadísticamente significativa

\* Prueba exacta de Fisher.

□ U de Mann-Whitney.

**Tratamiento inicial (pre-TCGH) y postrasplante de las pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída:**

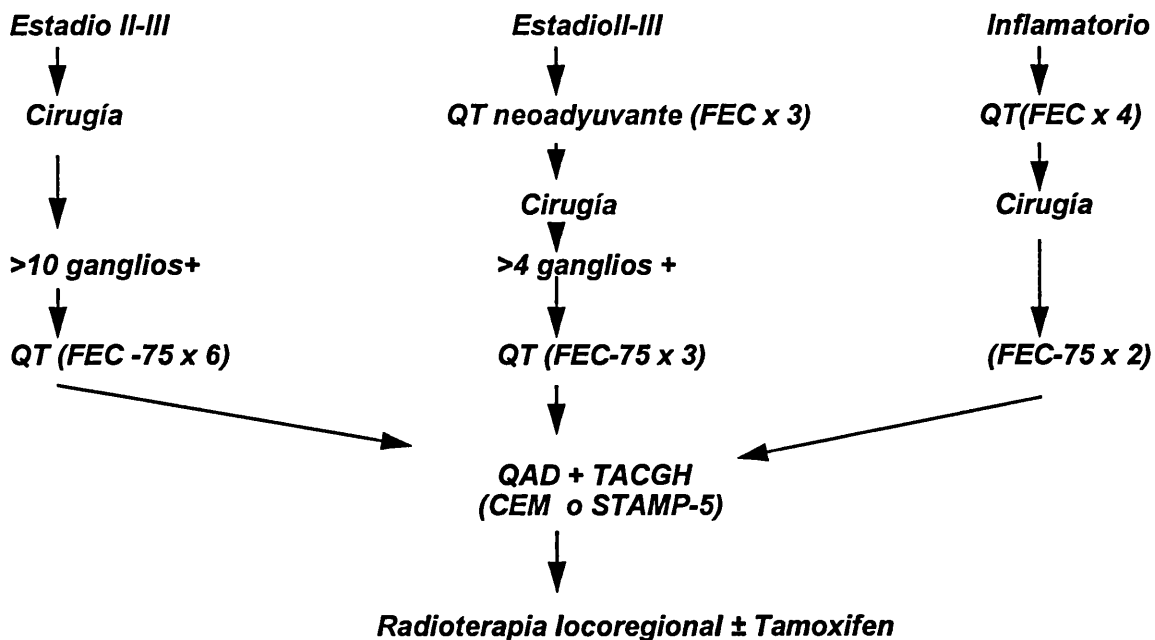
Las pacientes con  $\geq 10$  ganglios afectados, tras la cirugía inicial (mastectomía radical modificada), se realizó un tratamiento con un total de 6 ciclos de poliquimioterapia que incluye antracíclicos (FAC o FEC), administrados cada 21 días. Posteriormente, y en el plazo de 10 semanas desde el último ciclo se administró tratamiento intensivo, seguido de radioterapia loco-regional (45 Gy) que se inicia entre el día +45 y +60 postrasplante, y hormonoterapia con

tamoxifén (10 mg/12h, durante 5 años) si los receptores hormonales eran positivos o desconocidos.

En las pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado e inflamatorio, se administraron 3-4 ciclos de quimioterapia neoadyuvante tipo FEC o FAC. Las pacientes en las que se evidenció respuesta clínica, fueron incluidas en el protocolo de tratamiento intensivo, realizándose cirugía radical o conservadora y, posteriormente, 2-3 ciclos de quimioterapia adicional. A continuación se realizó tratamiento intensivo y postrasplante igual al grupo anterior.

El tratamiento, se resume en el esquema siguiente:

**ESQUEMA DEL TRATAMIENTO EN EL CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO**



En la Tabla 13, se detallan las características clínicas de los pacientes con diagnóstico de neoplasia sólida diferente de carcinoma de mama. Como se puede observar, este grupo es más numeroso en el grupo de TAMO, y predominan las neoplasias de células germinales y el astrocitoma de alto grado.

**Tabla 13. Características clínicas de los pacientes con diagnóstico de neoplasias sólidas diferentes de carcinoma de mama, tratados con trasplante autólogo con reinfusión de médula ósea o CGSP, exclusivamente.**

|  | <i>MO</i>         | <i>CGSP</i>       |
|--|-------------------|-------------------|
| <b>Nº pacientes</b>                            | <b>24</b>         | <b>6</b>          |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>               | <b>42 (18-59)</b> | <b>23 (17-49)</b> |
| <b>Sexo (V/M)</b>                              | <b>16/8</b>       | <b>5/1</b>        |
| <b>Diagnóstico</b>                             |                   |                   |
| <i>Tumor de células germinales</i>             | <b>8</b>          | <b>4</b>          |
| <i>Astrocitoma alto grado</i>                  | <b>8</b>          | <b>-</b>          |
| <i>Carcinoma de ovario</i>                     | <b>2</b>          | <b>1</b>          |
| <i>Melanoma</i>                                | <b>3</b>          | <b>-</b>          |
| <i>Carcinoma microcítico de pulmón</i>         | <b>2</b>          | <b>-</b>          |
| <i>Sarcoma de partes blandas</i>               | <b>1</b>          | <b>-</b>          |
| <i>Sarcoma de Ewing</i>                        | <b>-</b>          | <b>1</b>          |
| <b>Respuesta a quimioterapia previa a TCGH</b> |                   |                   |
| <i>RC</i>                                      | <b>6</b>          | <b>3</b>          |
| <i>RP</i>                                      | <b>18</b>         | <b>2</b>          |
| <i>EE/PG</i>                                   | <b>0</b>          | <b>1</b>          |

Las características clínicas de los pacientes con leucemia y mieloma se han resumido en la Tabla 14. Como se puede observar, prácticamente todos los pacientes incluidos en este estudio lo han sido en el grupo de TCSP. La gran mayoría de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda se encontraba en RC en el momento del trasplante. Los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), se encontraban en fase acelerada, mientras que la mayoría de los pacientes con mieloma múltiple se encontraban en RC o RP.

En las Tablas 15 y 16, se resumen las características de los pacientes con linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin, respectivamente. En ambos grupos de pacientes, se realizó radioterapia complementaria postrasplante en aquellos que previamente habían presentado masa tumoral voluminosa ("bulky" , > 7 cm en su diámetro mayor), en dosis de 30-40 Gy, iniciándose tras la recuperación hematológica entre el 1º y 3º mes postrasplante.



**Tabla 14. Características clínicas de los pacientes con diagnóstico de leucemia y mieloma, tratados con trasplante autólogo con reinfusión de médula ósea o CGSP, exclusivamente.**

|                                      | MO  | CGSP       |
|--------------------------------------|-----|------------|
| <b>Nº pacientes</b>                  | 1   | 19         |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>     | 37  | 49 (22-63) |
| <b>Sexo (V/M)</b>                    | 0/1 | 14/5       |
| <b>Diagnóstico</b>                   |     |            |
| <b>Leucemia Aguda Mieloide</b>       | -   | 9          |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>     |     | 50 (22-54) |
| <b>Sexo (V/M)</b>                    |     | 7/2        |
| <b>Situación enfermedad pre-TCGH</b> |     |            |
| <b>1ª RC</b>                         |     | 7          |
| <b>3ª RC</b>                         |     | 1          |
| <b>Recaída incipiente</b>            |     | 1          |
| <b>Leucemia Mieloide Crónica</b>     | -   | 3          |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>     |     | 56 (39-63) |
| <b>Sexo (V/M)</b>                    |     | 3/0        |
| <b>Situación enfermedad pre-TCGH</b> |     |            |
| <b>Fase acelerada</b>                |     | 3          |
| <b>Mieloma Múltiple</b>              | 1   | 7          |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>     | 37  | 48 (35-51) |
| <b>Sexo (V/M)</b>                    | 0/1 | 4/3        |
| <b>Estadio inicial</b>               |     |            |
| <b>I-A</b>                           | -   | 1          |
| <b>II-A</b>                          | -   | 1          |
| <b>III-A</b>                         | 1   | 4          |
| <b>III-B</b>                         | -   | 1          |
| <b>Situación enfermedad pre-TCGH</b> |     |            |
| <b>RC</b>                            | -   | 4          |
| <b>RP</b>                            | 1   | 2          |
| <b>EE</b>                            | -   | 1          |

**Tabla 15. Características clínicas de los pacientes con diagnóstico LNH, tratados con trasplante autólogo con reinfusión de médula ósea o CGSP, exclusivamente.**

|   | MO          | CGSP        |
|---|-------------|-------------|
| <b>Nº pacientes</b>                                 | 12          | 13          |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>                    | 40 (18-59)  | 43 (15-55)  |
| <b>Sexo (V/M)</b>                                   | 6/6         | 8/5         |
| <b>Clasificación histológica (WF<sup>158</sup>)</b> |             |             |
| L. Folicular célula pequeña                         | 0           | 1           |
| L. Folicular mixto                                  | 1           | 3           |
| L. Difuso mixto                                     | 1           | 2           |
| L. Difuso de célula grande                          | 6           | 4           |
| L. Inmunoblástico                                   | 2           | 1           |
| L. Linfoblástico                                    | 2           | 0           |
| Linfoma del manto                                   | 0           | 1           |
| Linfoma anaplásico                                  | 0           | 1           |
| <b>Estadio inicial (Ann Arbor<sup>159</sup>)</b>    |             |             |
| IIE-A   | 2           | 1           |
| II-B  | 0           | 1           |
| III-A   | 1           | 0           |
| III-B   | 3           | 2           |
| IV-A  | 2           | 1           |
| IV-B  | 4           | 8           |
| <b>IPI (1/2/3/4/5/Desc)</b>                         | 0/0/3/5/0/4 | 0/3/3/5/0/2 |
| <b>TS (1/2/3/4/5/Desc)</b>                          | 0/0/1/5/3/3 | 1/2/3/3/1/3 |
| <b>Masa voluminosa ("bulky")</b>                    | 7           | 7           |
| Enfermedad abdominal                                | 3           | 4           |
| Enfermedad mediastínica                             | 3           | 2           |
| Enfermedad extraganglionar                          | 8           | 7           |
| <b>LDH elevada pre-trasplante</b>                   | 1           | 0           |
| <b>B2-microglobulina elevada pre-TCGH</b>           | 2           | 0           |
| <b>Situación de enfermedad pre-TCGH</b>             |             |             |
| RC  | 4           | 5           |
| RP1   | 4           | 3           |
| RP2   | 3           | 5           |
| RNT   | 1           | 0           |
| <b>Mediana de seguimiento desde TCGH</b>            | 55          | 13.5        |

**Tabla 16. Características clínicas de los pacientes con diagnóstico de enfermedad de Hodgkin, tratados con trasplante autólogo con reinfusión de médula ósea o CGSP, exclusivamente.**

|  | MO      | CGSP       |
|--|---------|------------|
| <b>Nº pacientes</b>                              | 15      | 6          |
| <b>Edad (mediana y extremos)</b>                 | (15-54) | 45 (27-55) |
| <b>Sexo (V/M)</b>                                | 9/6     | 5/1        |
| <b>Clasificación histológica</b>                 |         |            |
| <i>Predominio linfocitario</i>                   | 2       | 2          |
| <i>Celularidad mixta</i>                         | 5       | 2          |
| <i>Esclerosis nodular</i>                        | 6       | 2          |
| <i>Deplección linfocitaria</i>                   | 2       | 0          |
| <b>Estadio inicial</b>                           |         |            |
| I-B  | 1       | 0          |
| II-A   | 3       | 0          |
| II-B   | 2       | 0          |
| III-A  | 3       | 0          |
| III-B  | 4       | 1          |
| IV-A   | 0       | 1          |
| IV-B   | 2       | 4          |
| <b>Masa voluminosa ("bulky")</b>                 | 7       | 4          |
| <i>Enfermedad abdominal</i>                      | 1       | 0          |
| <i>Enfermedad mediastínica</i>                   | 6       | 4          |
| <i>Enfermedad extraganglionar</i>                | 2       | 3          |
| <i>LDH elevada pre-trasplante</i>                | 2       | 2          |
| <i>B2-microglobulina elevada pre-TCGH</i>        | 0       | 1          |
| <b>Situación de enfermedad pre-TCGH</b>          |         |            |
| RC1-3  | 1       | 3          |
| RP1  | 9       | 2          |
| RP2/3  | 4       | 0          |
| EE   | 1       | 1          |
| <b>Mediana de seguimiento desde TCGH (meses)</b> | 34.5    | 18         |

Para determinar la evolución de la inmunidad celular *in vivo*, medido con los tests cutáneos, se han estudiado un total de 58 pacientes, con un estudio en el momento pretrasplante y tras el 1º año de trasplante. En las Tabla 17, se resumen las características de los pacientes en función del tipo de célula germinal hematopoyética que recibieron.

**Tabla 17. Características de los pacientes estudiados con tests cutáneos de inmunidad celular.**

|                                    | MO                | CGSP              | Total             |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Nº pacientes</b>                | <b>35</b>         | <b>23</b>         | <b>58</b>         |
| <b>edad (mediana y extremos)</b>   | <b>37 (18-59)</b> | <b>36 (15-60)</b> | <b>37 (15-60)</b> |
| <b>exo (V/M)</b>                   | <b>8/27</b>       | <b>9/14</b>       | <b>17/41</b>      |
| <b>diagnósticos</b>                |                   |                   |                   |
| <b>Neoplasias hematológicas</b>    | <b>13</b>         | <b>8</b>          | <b>21</b>         |
| <i>Linfoma No Hodgkin</i>          | <b>3</b>          | <b>3</b>          | <b>6</b>          |
| <i>Enf. Hodgkin</i>                | <b>9</b>          | <b>2</b>          | <b>11</b>         |
| <i>Leucemia Aguda Mieloide</i>     | <b>-</b>          | <b>2</b>          | <b>2</b>          |
| <i>Mieloma Múltiple</i>            | <b>1</b>          | <b>1</b>          | <b>2</b>          |
| <b>Tumores sólidos</b>             | <b>22</b>         | <b>15</b>         | <b>37</b>         |
| <b>Carcinoma de mama</b>           | <b>16</b>         | <b>13</b>         | <b>29</b>         |
| <i>Metastásico</i>                 | <b>8</b>          | <b>1</b>          | <b>9</b>          |
| <i>Alto riesgo de recaída</i>      | <b>8</b>          | <b>12</b>         | <b>20</b>         |
| <i>Tumor de células germinales</i> | <b>3</b>          | <b>-</b>          | <b>3</b>          |
| <i>Astrocitoma alto grado</i>      | <b>1</b>          | <b>-</b>          | <b>1</b>          |
| <i>Carcinoma de ovario</i>         | <b>1</b>          | <b>1</b>          | <b>2</b>          |
| <i>Sarcoma de partes blandas</i>   | <b>1</b>          | <b>-</b>          | <b>1</b>          |
| <i>Sarcoma de Ewing</i>            | <b>-</b>          | <b>1</b>          | <b>1</b>          |

### **IV.3. GRUPO CONTROL**

Como grupo control se ha utilizado el resultado de los estudios de las poblaciones celulares analizadas, inmunoglobulinas y factores del complemento en un grupo de 30 donantes de sangre altruistas, a los que se les realiza sistemáticamente un cuestionario de preguntas que excluyen la presencia de enfermedad conocida, toma de medicación y el haber recibido transfusión sanguínea e intervenciones quirúrgicas recientes.

En la Tabla 18, se detallan la media y desviación típica (DT) de cada población celular, inmunoglobulinas y complemento del grupo control. En las gráficas de resultados, como referencia se señala con un área sombreada el valor de la media  $\pm$  el valor de la desviación típica.

**Tabla 18. Valores de subpoblaciones linfocitarias, inmunoglobulinas y complemento, del grupo control.**

N= 30

Edad ( mediana y extremos)= 34.5 (21-50)

| <b>Valor estudiado</b>    | <b>Media <math>\pm</math> DT</b>  | <b>Unidades</b>           |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| <b>Linfocitos totales</b> | <b>2.127 <math>\pm</math> 643</b> | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD2+</b>               | <b>1.739 <math>\pm</math> 544</b> | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD3+</b>               | <b>1.534 <math>\pm</math> 487</b> | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD4+</b>               | <b>922 <math>\pm</math> 313</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD8+</b>               | <b>683 <math>\pm</math> 269</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>Indice CD4/CD8</b>     | <b>1,44 <math>\pm</math> 0.52</b> | <b>-</b>                  |
| <b>CD4+Leu8+</b>          | <b>782 <math>\pm</math> 282</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD5+</b>               | <b>1580 <math>\pm</math> 478</b>  | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD3+HLA-DR+</b>        | <b>189 <math>\pm</math> 170</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>HLA-DR+</b>            | <b>299 <math>\pm</math> 133</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD25+</b>              | <b>219 <math>\pm</math> 169</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD3+CD16+CD56+</b>     | <b>118 <math>\pm</math> 108</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD8+CD57+</b>          | <b>246 <math>\pm</math> 155</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD57+</b>              | <b>324 <math>\pm</math> 196</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD3-CD16+CD56+</b>     | <b>256 <math>\pm</math> 169</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD56+</b>              | <b>351 <math>\pm</math> 182</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD16+</b>              | <b>229 <math>\pm</math> 222</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD16+CD2+</b>          | <b>165 <math>\pm</math> 157</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD19+</b>              | <b>264 <math>\pm</math> 122</b>   | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |
| <b>CD19+CD5+</b>          | <b>43 <math>\pm</math> 40</b>     | <b>x 10<sup>6</sup>/L</b> |

| <b>Valor estudiado</b> | <b>Media <math>\pm</math> DE</b> | <b>Unidades</b> |
|------------------------|----------------------------------|-----------------|
| <b>IgG sérica</b>      | <b>981 <math>\pm</math> 239</b>  | <b>mg/dl</b>    |
| <b>IgA sérica</b>      | <b>212 <math>\pm</math> 86</b>   | <b>mg/dl</b>    |
| <b>IgM sérica</b>      | <b>111 <math>\pm</math> 48</b>   | <b>mg/dl</b>    |
| <b>C3</b>              | <b>103 <math>\pm</math> 14</b>   | <b>mg/dl</b>    |
| <b>C4</b>              | <b>24 <math>\pm</math> 4</b>     | <b>mg/dl</b>    |
| <b>CH50</b>            | <b>155 <math>\pm</math> 39</b>   | <b>Unidades</b> |

#### IV.4. ESQUEMAS DE MOVILIZACIÓN DE CGSP

El esquema de movilización básico ha sido la utilización de G-CSF en dosis de 10  $\mu$ g/Kg/día, vía subcutánea, durante 4 días, iniciando las aféresis el 5º día.

#### IV.5. ESQUEMAS DE ACONDICIONAMIENTO UTILIZADOS

En la Tabla 19, se resumen los esquemas de tratamiento intensivo utilizados en cada enfermedad o grupo de enfermedades.

Tabla 19. Esquemas de acondicionamiento utilizados.

| <b>Enfermedad</b>                                   | <b>Protocolo</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Dosis</b>                   |
|---|------------------|--------------------|--------------------------------|
| Leucemia Aguda Mieloide y Leucemia Mieloide Crónica | BUCY             | Busulfán           | 4 mg/Kg/día x 4                |
|   |                  | Ciclofosfamida     | 50 mg/Kg/día x 4               |
| E. Hodgkin  | BEAM             | BCNU               | 300 mg/m <sup>2</sup>          |
|   |                  | VP-16              | 200 mg/m <sup>2</sup> /día x4  |
|   |                  | Ara-C              | 200 mg/m <sup>2</sup> /día x4  |
|   |                  | Melfalán           | 140 mg/m <sup>2</sup>          |
| LNH y EH  | BEAC             | BCNU               | 300 mg/m <sup>2</sup>          |
|   |                  | VP-16              | 200 mg/m <sup>2</sup> /día x4  |
|   |                  | Ara-C              | 200 mg/m <sup>2</sup> /día x4  |
|   |                  | Ciclofosfamida     | 1.4 g/m <sup>2</sup> /día x 4  |
| Mieloma múltiple                                    | BUMEL            | Busulfán           | 16 mg/Kg                       |
|   |                  | Melfalán           | 140 mg/m <sup>2</sup>          |
| Carcinoma de mama                                   | CEM              | Ciclofosfamida     | 50 mg/Kg/día x 2               |
|   |                  | Etoposido          | 7 mg/Kg/día x 3                |
|   |                  | Melfalán           | 140 mg/m <sup>2</sup>          |
|   | STAMP-V          | Ciclofosfamida     | 6 gr/m <sup>2</sup>            |
|   |                  | Carboplatino       | 800 mg/m <sup>2</sup>          |
| Tumores de células germinales                       |                  | Tiotepa            | 500 mg/m <sup>2</sup>          |
|   |                  | Etoposido          | 250 mg/m <sup>2</sup> /día x 5 |
|   |                  | Carboplatino       | 300 mg/m <sup>2</sup> /día x 5 |
|   |                  | Ciclofosfamida     | 1.6 g/m <sup>2</sup> /día x 4  |
| Astrocitoma de alto grado                           |                  | BCNU               | 800 mg/m <sup>2</sup>          |
| Carcinoma de ovario                                 |                  | Carboplatino       | 300 mg/m <sup>2</sup> /día x 4 |
|   |                  | VP-16              | 200 mg/m <sup>2</sup> /día x 4 |
|   |                  | Melfalán           | 140 mg/m <sup>2</sup>          |
| Melanoma metastásico                                |                  | Melfalán           | 200 mg/m <sup>2</sup>          |
| Sarcoma de partes blandas y Sarcoma de Ewing        |                  | Ifosfamida         | 2 gr/m <sup>2</sup> /día x 5   |
|   |                  | Carboplatino       | 300 mg/m <sup>2</sup> /día x 4 |



#### **IV.6. CÉLULAS GERMINALES HEMATOPOYÉTICAS INFUNDIDAS**

Para el análisis de la reconstitución inmune, se han excluido los pacientes los pacientes en los que se utilizó MO y CGSP conjuntamente.

En la Tabla 20 se resume el número de células germinales hematopoyéticas infundidas en los 3 grupos de pacientes en los que se analiza la reconstitución inmune:

1. Grupo global de pacientes, independientemente del diagnóstico, en los que se ha utilizado MO o CGSP exclusivamente.
2. Grupo de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída trasplantada con MO o CGSP.
3. Grupo de pacientes con neoplasias hematológicas con mayor grado de lesión de célula germinal hematopoyética inmadura o de células del estroma, inducida por la propia enfermedad.

Tabla 20. Células germinales hematopoyéticas infundidas en el grupo de TAMO y de TCSP

| GRUPO DE PACIENTES | Tipo CGH | N   | CMN de MO<br>(x 10 <sup>8</sup> /Kg) | CFU-GM de MO<br>(x 10 <sup>4</sup> /Kg) | CMN CGSP<br>(x 10 <sup>8</sup> /Kg) | CFU-GM CGSP<br>(x 10 <sup>4</sup> /Kg) | Células CD34+<br>(x 10 <sup>6</sup> /Kg) |
|--------------------|----------|-----|--------------------------------------|---|-------------------------------------|--|--|
| GLOBAL             | MO       | 81  | 2.65 ± 1.29                          | 0.39 ± 0.78                             | -                                   | -                                      | -  |
|                    | CGSP     | 125 | -                                    | -                                       | 7.12 ± 2.43                         | 33.9 ± 65.22                           | 7.76 ± 14.72                             |
| CA. MAMA AR        | MO       | 14  | 2.37 ± 1.21                          | 0.21 ± 0.29                             | -                                   | -                                      | -  |
|                    | CGSP     | 68  | -                                    | -                                       | 6.91 ± 2.03                         | 38.80 ± 77.08                          | 6.07 ± 5.14                              |
| Leucemia-MM        | CGSP     | 19  | -                                    | -                                       | 8.53 ± 3.13                         | 35.61 ± 57.71                          | 17.22 ± 34.43                            |

MM= Mieloma Múltiple

## **IV.7. METODOS DE ESTUDIO:**

### **Momento e**

**n que se realizan:** Los estudios se realizan pre-trasplante y en los siguientes días postrasplante: 14, 21, 30, 60, 90, 180 y 360.

### **IV.7.1. HEMATIMETRIA CONVENCIONAL: Cuantificación de numero de linfocitos totales.**

Estudio hematimétrico completo convencional en sangre periférica mediante el autoanalizador Technicon H3<sup>®</sup>, que incluye el recuento de linfocitos, cifra utilizada para el cálculo de la cifra absoluta de todas las subpoblaciones linfocitarias.

### **IV.7.2. CITOFUOROMETRIA:**

#### **IV.7.2.1. Técnica**

##### **IV.7.2.1.1. Muestras.**

En todos los casos se ha utilizado sangre periférica (SP) anticoagulada con EDTA procesándose en la misma mañana de la extracción al paciente. Esta misma muestra es la utilizada para realizar los recuentos hematológicos mediante un contador H3 de Technicon. Seguidamente se realiza el análisis citofluorimétrico con marcaje directo.

##### **IV.7.2.1.2. Técnica del marcaje directo.**

A 50 µl de SP recién extraída se le añaden 10 µl del Ac monoclonal

marcado con FITC o PE. Se incuban 10 min. en la oscuridad a temperatura ambiente. Se añaden 2 ml de solución lisante Ortho y se mantiene 10 min. en la oscuridad. Se centrifuga 5' a 1400 rpm. Se decanta y se lava 2 veces con PBS (tampón fosfato) más azida de sodio al 0,2%. Después del último lavado las células se reconstituyen con 0,5 ml de PBS azida de sodio y se adquieren 4.000 células de cada muestra en el citómetro FACScan (Beckton-Dickinson®).

#### IV.7.2.1.3. Análisis de poblaciones linfocitarias

Se ha realizado mediante los programas de análisis Lysis II y el CELLquest de FACScan de Becton-Dickinson (B-D). Ambos programas permiten analizar las características de FSC y SSC y fluorescencias de cada célula. En función de las características de granularidad y tamaño (FSC y SSC), las células adquiridas se distribuyen en diferentes zonas. En este momento se delimita (gating) una región R1 sobre la zona de linfocitos.

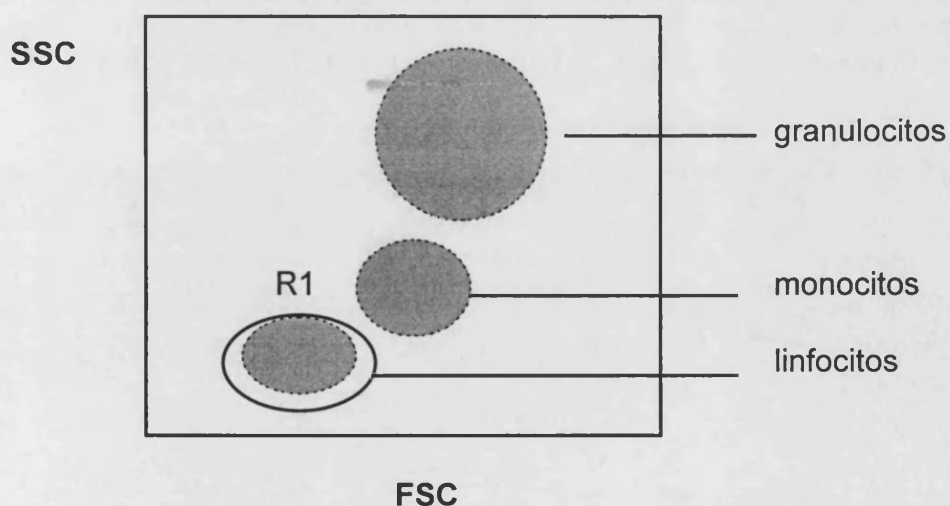


Figura A

En una nueva imagen se seleccionan los linfocitos con sus características de fluorescencia (Figura B). El primer tubo de cada paciente es el control de fluorescencia inespecífica marcado con (Fab)' de Ig G1 FITC + IgG2 PE de ratón. De esta forma se establecen los límites o "markers" de la fluorescencia inespecífica (Figura B), a partir de la cual se considerara fluorescencia correspondiente al Ac monoclonal que se une al Ag de superficie que presente la célula (Figura C). La estadística del programa nos indica el porcentaje de células que expresan el antígeno determinado.

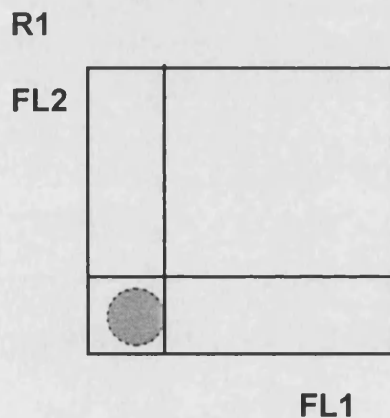


Figura B

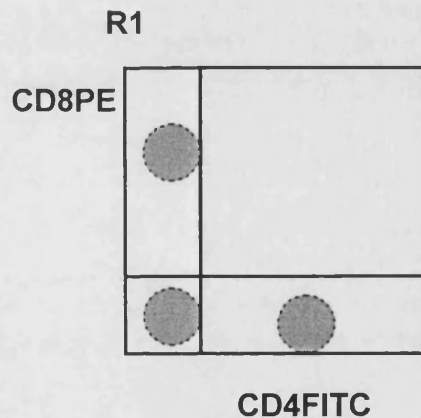
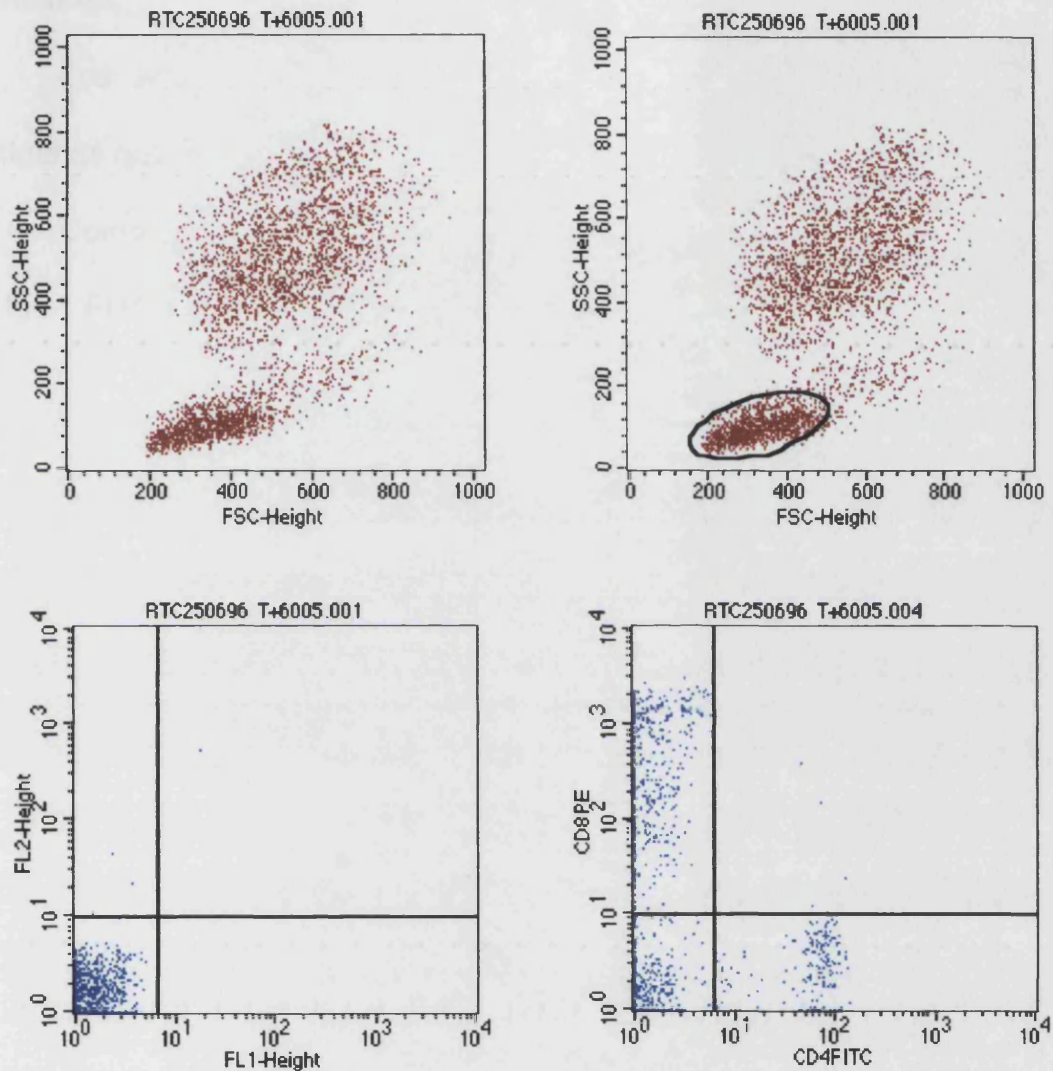


Figura C

En la Figura 4B, se pueden observar las imágenes de una análisis real.

**Figura 4B**

**Esquema del analisis de poblaciones linfocitarias mediante citofluorometria**



Quadrant Statistics

|                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| File: RTC250696 T+6005.004     | Log Data Units: Linear Values    |
| Sample ID:                     | Patient Name: RTC250696 T+60     |
| Case Number:                   | Acquisition Date: 25-Jun-96      |
| Gate: G4                       | Gated Events: 985                |
| Total Events: 4000             | X Parameter: FL1-H CD4FITC (Log) |
| Y Parameter: FL2-H CD8PE (Log) | Quad Location: 6, 10             |

| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
|------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|
| UL   | 429    | 43.55   | 10.73   | 1.67   | 1.49       | 647.17 | 307.68     |
| UR   | 5      | 0.51    | 0.12    | 78.84  | 74.32      | 112.79 | 43.17      |
| LL   | 375    | 38.07   | 9.38    | 1.56   | 1.41       | 2.08   | 1.71       |
| LR   | 176    | 17.87   | 4.40    | 66.66  | 55.06      | 3.37   | 2.78       |

**IV.7.2.2. Descripción de los anticuerpos monoclonales utilizados.**

Los anticuerpos monoclonales utilizados con sus características y los antígenos que identifican se detallan en la Tabla 21.

Como control de fluorescencia inespecífica se utilizaron los controles de B-D, IgG1-FITC (clon X40) e IgG2a-PE (clon X39).

**Tabla 21. Anticuerpos monoclonales utilizados y antígenos de membrana que identifican.**

| Ac Monoclonal (B-D <sup>®</sup> ) | Antígeno | Clon   | Tipo Ig ratón | Fluorocromo | Función del Ag detectado         | Expresión del Ag  |
|-----------------------------------|----------|--------|---------------|-------------|----------------------------------|---|
| Leu 5b                            | CD2      | S5.2   | IgG2          | FITC        | Ligando de CD58                  | Células T y la mayoría de las NK                                      |
| Leu 4                             | CD3      | SK7    | IgG1          | FITC        | Parte del complejo TCR-CD3       | Células T   |
| Leu 3                             | CD4      | SK3    | IgG1          | FITC        | Unión moléculas clase II de CMH  | Mayoría de células T, timocitos, monocitos y macrófagos               |
| Leu 1                             | CD5      | L17F12 | IgG2a         | FITC        | Unión a CD72                     | Todas las células T y timocitos, pequeña población en área del manto. |
| Leu 2a                            | CD8      | SK1    | IgG1          | PE          | Unión moléculas clase I de CMH   | Minoría de células T y timocitos; mayoría de monocitos y macrófagos.  |
| Leu 11c                           | CD16     | B73.1  | IgG1          | PE          | Receptor baja afinidad de Fc IgG | Células NK, monocitos, algunas células T.                             |
| Leu 12                            | CD19     | 4G7    | IgG1          | PE          |                                  | Todas las células pre-B y B, excepto células plasmáticas.             |
| HLA-DR                            | HLA-DR   | L243   | IgG2a         | PE          |                                  |   |
| IL2R                              | CD25     | 2A3    | IgG1          | FITC        | Receptor IL-2 (50Kd)             |   |
| Leu 19                            | CD56     | MY31   | IgG1          | PE          |                                  | Células NK, escasas células T, monocitos.                             |
| Leu 7                             | CD57     | HNK1   | IgM           | FITC        |                                  | Algunas células NK, subpoblaciones T, células B, monocitos.           |

CD= "Cluster Designations" para antígenos leucocitarios. CMH= complejo mayor de histocompatibilidad



#### **IV.7.3. INMUNOGLOBULINAS SERICAS.**

Cuantificación de inmunoglobulinas séricas IgG, IgA, IgM, mediante nefelometría ( QM300™ Antibody Pack, Kallestad ™ QM330 Protein Analysis System, Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc. Chaska, MN, USA ).

#### **IV.7.4. COMPLEMENTO SERICO.**

Niveles de C3, C4 mediante nefelometría ( QM300™ Antibody Pack, Kallestad ™ QM330 Protein Analysis System, Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc. Chaska, MN, USA ) y nivel de complemento hemolítico (CH50) mediante técnica de lisis de eritrocitos carnero ( Diamedix Corporation, Miami, Florida, USA ).

#### **IV.7.5. TESTS CUTANEOS DE INMUNIDAD CELULAR.**

El estudio de la respuesta a los tests cutáneos de inmunidad celular es un procedimiento clínico básico, originalmente diseñado para el diagnóstico de infección. Posteriormente, los tests cutáneos con una batería de antígenos, se han extendido como un método de evaluación de la reactividad inmune celular en pacientes con neoplasias malignas o trasplante de órganos o tejidos<sup>160,161,162</sup>. En contraste con los tests cutáneos de reacción inmediata (minutos tras la inyección del Ag), mediada por anticuerpos, las respuestas retardadas dependen de la reactividad celular y se desarrollan más lentamente. Tras varias horas después de la administración, se puede observar infiltración por células mononucleares en el sitio de inyección. La reacción inflamatoria aumenta progresivamente durante

un periodo de 1 a 4 días, produciendo eritema persistente e induración. Las células responsables de este tipo de reacciones son linfocitos y monocitos, aunque, también se pueden observar granulocitos neutrófilos en el infiltrado.

Cuando el test se utiliza para la valoración de la función inmunitaria, es necesario utilizar antígenos frente a los que existe una probabilidad alta de que los sujetos a estudiar estén previamente sensibilizados. Estos antígenos pueden variar de una a otra área geográfica y entre diferentes grupos de pacientes a estudiar. En nuestro medio, los antígenos probablemente más útiles para este fin son el antígeno de parotiditis, estreptoquinasa-estreptodornasa, tuberculina, candidina, tricofitina y toxoide tetánico. Al testar la tuberculina con el fin evaluar la inmunocompetencia, se debe utilizar diferentes concentraciones (al menos, 10 U.T. y 100 U.T.) ya que algunos individuos normales sólo reaccionan a mayor concentración. En particular, los individuos que han sido sensibilizados por la vacuna BCG, en lugar de por infección natural con *Mycobacterium tuberculosis*, pueden no reaccionar a una dosis baja de antígeno.

#### Metodología:

1. Valoración de respuesta positiva. La valoración de la respuesta es la principal causa de no reproducibilidad de esta técnica. Muchos autores definen un test positivo si aparece una induración de al menos 5 mm. Generalmente, se asocia el desarrollo de eritema e induración, sin embargo, en ocasiones, sólo se observa eritema. La presencia de eritema sin induración se considera como respuesta positiva al antígeno de la parotiditis. El hecho de observar respuesta

eritematosa a la tuberculina tras la vacunación, cuando previamente habían sido negativas, demuestra que el eritema se debe valorar como una manifestación de hipersensibilidad y como una reacción inflamatoria inespecífica.

Para la lectura de las respuestas se mide el eritema y la induración en 2 diámetros en ángulo recto y se anota la media de ambas medidas. Para la medida de la induración se ha utilizado la técnica descrita por Sokal <sup>163</sup>: se traza una línea con un bolígrafo de punta "normal" (no fina), desde 2 cm fuera del margen eritematoso de la reacción cutánea, hacia el centro, ejerciendo una presión moderada contra la piel, moviendo el bolígrafo lentamente. Si el individuo ha perdido la turgencia normal de la piel, se realiza una ligera tracción en sentido inverso al del bolígrafo. Cuando la punta del bolígrafo alcanza el margen del área indurada, se aprecia una clara dificultad al avance, momento en que se debe detener el movimiento. Este procedimiento se repite desde el lado contrario de la reacción. Las líneas pintadas delimitan de forma visible los límites de la induración, y se mide de forma precisa la distancia entre las líneas opuestas. Este método reduce de forma substancial la variación subjetiva del observador.

## 2. Momento de desarrollo y evolución de la respuesta.

Existe considerable variabilidad en el momento de máxima respuesta (24-36 h para el antígeno de parotiditis frente a 72h para la tuberculina) y su duración, en función del antígeno, el individuo y el número de tests cutáneo previamente realizados.

Por otra parte, la mayoría de individuos que son testados de forma repetida, desarrollan respuestas rápidas que desaparecen también de forma rápida. Este hecho es especialmente evidente cuando la inyección del antígeno se realiza exactamente en el mismo sitio. En estos casos la reacción puede ser tan rápida que en ocasiones la reacción máxima se adelanta, resultando valoraciones de intensidad inferior al real o incluso falsos negativos. Por estos motivos, la primera lectura se debe realizar a las 24h o bien tener presente que la inyección del antígeno se realice a cierta distancia del anterior.

### 3. Clasificación de la respuesta a los tests cutáneos de inmunidad:

Para la descripción cualitativa de las respuestas se ha utilizado la siguiente clasificación <sup>163</sup>:

0 Ausencia de reacción.

+ Tuberculina positiva a alta concentración (100 UT) pero negativa a intermedia y baja.

Otros antígenos: eritema de 1 cm o más sin induración, o bien, induración de 0.5 a 0.9 cm.

++ Tuberculina positiva a la dilución intermedia (10 UT) con 0.5 a 2 cm de induración.

Otros antígenos: induración de 1 a 2 cm.

+++ Tuberculina positiva a baja concentración (1 UT) o bien más de 2 cm de induración con la concentración intermedia.

Otros antígenos: induración de 2.1 a 4 cm.

++++ Tuberculina con más de 1.5 cm a débil concentración.

Otros antígenos: más de 4 cm de induración.

La respuesta de los pacientes se ha agrupado en 3 niveles de respuesta:

0 = Anergia.

+ y ++ = Afectación moderada de la inmunidad celular.

+++ y ++++ = Inmunidad celular adquirida normal.

Para el presente estudio se han utilizado 2 métodos diferentes de evaluación:

1. Técnica convencional: consiste en la inyección intradérmica de 0.1 ml de los siguientes antígenos concentrados: tuberculina 1 U.T., tuberculina 10 U.T., tuberculina 100 U.T., estreptoquinasa, candidina, tricofitina y toxoide tetánico.

2. Multitest ® Laboratorios Beringer que incluye los siguientes antígenos concentrados: tuberculina, estreptoquinasa, cándida, tricofitina, toxoide tetánico, difteria, próteus y glicerina.

#### **IV.8. METODOLOGIA ESTADISTICA Y PROCESAMIENTO INFORMATICO DE DATOS.**

Tras la tabulación de los datos se llevó a cabo la depuración de los datos que consiste básicamente, en identificar para cada variable los valores anómalos,

incorrectamente transcritos en la base de datos, e identificar los datos ausentes. Todo ello se analizó mediante las tablas de distribuciones de frecuencias, diagramas de barras, histogramas y la valoración de los estadísticos descriptivos.

#### **IV.8.1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA**

En primer lugar se ha realizado un análisis exploratorio de la muestra de datos clínicos y biológicos, como técnica complementaria de la estadística inferencial, para estudiar las condiciones de aplicación necesarias para las pruebas de hipótesis, estudiando la distribución de la variable en distintos grupos y comprobar si se cumple la normalidad de las distribución. Esto se ha realizado mediante el estudio de frecuencias absolutas, frecuencias relativas, medidas de tendencia central (media, mediana), valores percentiles, medidas de dispersión (valor mínimo, máximo, rango, varianza y desviación típica) y distribución (asimetría y curtosis).

Se realizó el análisis de normalidad de todas las variables mediante los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks (prueba de Goodness of fit), demostrando que la gran mayoría de variables biológicas estudiadas no presentan una distribución normal, por lo que los resultados se expresan como mediana y para la comparación de distribuciones se han utilizado tests no paramétricos .

Con el fin de utilizar modelos estadísticos de aplicación con variables cualitativas (Kaplan-Meier), a variables cuantitativas, y dado que el rango de estas variables es amplio, se han categorizado utilizando los valores de los percentiles con el fin de conseguir que el peso de las distintas clases o categorías sea equivalente.

### **V.8.2. ESTADISTICA ANALITICA**

Dada la distribución no normal de las variables de la muestra, la comparación de la distribución de los niveles absolutos de las distintas subpoblaciones celulares en cada punto de estudio postrasplante, se ha realizado mediante el estadístico U de Mann-Whitney, para variables independientes no paramétricas, y efectuando la correspondiente corrección para el número de comparaciones con el fin de controlar el error de tipo I. Este análisis compara cada punto de la curva por separado y pero no proporciona información en cuanto al perfil de la curva en su conjunto.

Para determinar si los perfiles de las curvas de recuperación de los grupos estudiados (TAMO y TCSP; grupo con tumores sólidos y neoplasias hematológicas), son diferentes a lo largo del tiempo, se utilizó el análisis de la varianza (MANOVA) para muestras repetidas, utilizando el diseño factorial mixto, intersujeto, intrasujeto y su interacción. Debe tenerse en cuenta que el análisis de la varianza utilizado, sólo incluye en el estudio los pacientes que tienen todos los

valores en cada uno de los puntos de estudio. Las diferencias se valoran con el estadístico F y su nivel de significación.

Para la comparación de proporciones se utilizó la prueba exacta de Fisher, con intervalo de confianza del 95%.

Para el análisis de la supervivencia libre de enfermedad acumulativa, se ha utilizado el método de Kaplan-Meier<sup>164</sup>. El significado estadístico de las diferencias observadas en la distribución de la supervivencia libre de enfermedad se valoró utilizando el log-rank test<sup>165</sup>. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el error alfa era menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

Para el cálculo de la posible influencia de la(s) diferentes variables en la supervivencia libre de enfermedad, se ha utilizado el método de regresión de Cox o modelo de riesgo proporcional<sup>166</sup>, con un intervalo de confianza del 95%. Este modelo es similar a los modelos de regresión logística habituales en cuanto a que se puede predecir una variable dependiente ( periodo de tiempo hasta el desarrollo de un suceso ), en función de una serie de variables independientes. Sin embargo, el modelo de regresión de Cox, al contrario que los modelos de regresión convencionales, se puede utilizar cuando existen casos censurados (casos en los que el evento en estudio, no ha ocurrido durante el periodo de observación).

El intervalo de tiempo que transcurre entre dos sucesos, casi con toda seguridad depende de diversos factores. Cuando se utilizan los métodos actuarial o el método de Kaplan-Meier, para determinar la influencia de variables predictoras del tiempo de supervivencia, se pueden calcular distribuciones de



supervivencia independientes para cada categoría de una variable predictora. Los valores de variables predictoras continuas, como la edad, se pueden agrupar en categorías. Sin embargo, los análisis que requieren subdividir los casos en grupos basados en los valores de las variables predictoras, son frecuentemente no adecuados, ya que el número de casos de cada grupo disminuye rápidamente conforme aumenta el número de variables. Por este motivo, las técnicas de regresión lineal múltiple son de gran ayuda para el estudio de las interrelaciones entre una variable dependiente (tiempo hasta el suceso) y una serie de variables independientes. Sin embargo, las técnicas de regresión lineal múltiple no pueden ser utilizadas para el análisis de datos de tiempo hasta el suceso, debido a que no es posible manejar observaciones censuradas, es decir, casos en los que el suceso o evento aún no ha ocurrido (como por ejemplo recaída de la enfermedad, muerte), que no pueden ser ignorados y deben ser incluidos en el análisis. El modelo de regresión de Cox, permite analizar datos que contienen observaciones censuradas.

En su forma más simple (con solo una variable predictora o independiente, que en el modelo de Cox se suelen denominar covariables) y, siendo la función de supervivencia acumulativa ( la proporción de casos que sobreviven en un tiempo determinado), la variable dependiente, este modelo se describe en la siguiente ecuación:

$$S(t) = \{ S_0(t) \}^p, \text{ en donde } p = e^{(B \times \text{valor de variable independiente})}$$

Para cada valor de la variable independiente, la proporción de pacientes que sobreviven en el momento  $t$  depende de dos valores. El primero, denominado

**función de supervivencia basal** se designa en la ecuación con  $S_0(t)$ , que depende sólo del tiempo, no de la variable independiente. Esta función es el valor de referencia que aumenta o disminuye dependiendo de los valores de la variable independiente y de su relación con la variable dependiente. La segunda parte de la ecuación, el término denominado  $p$  en el modelo, depende no del tiempo sino de la covariable a través del **coeficiente de regresión  $B$** . Utilizando estos dos valores, se puede estimar la función de supervivencia acumulativa para diferentes valores de las covariables. Si el valor del exponente al que hay que elevar la función de supervivencia basal es mayor de 1, los tiempos de supervivencia calculados son menores que los de la función basal. Si el exponente al que se eleva la curva de supervivencia basal es menos de 1, los tiempos de supervivencia resultante son mayores que los basales. Esto significa que variables con coeficientes de regresión positivos se asocian con tiempos de supervivencia reducidos, mientras que variables con coeficientes negativos se asocian con tiempos de supervivencia prolongados.

El estadístico R (coeficiente de correlación), se utiliza para observar la correlación parcial entre la variable dependiente y cada una de la variables independientes. Su valor oscila entre +1 y -1. Un valor positivo indica que cuando se incrementa el valor de la variable independiente, también se incrementa la probabilidad de que ocurra el suceso dependiente en estudio. Valores pequeños de R indican que la variable tiene una contribución pequeña en el modelo.

Ejemplo de resultado estadístico realizado por SPSS:

----- Variable en la ecuación -----

| Variable | B     | S.E.  | Wald   | df | Sig   | R     | Exp (B) |
|----------|-------|-------|--------|----|-------|-------|---------|
| Edad     | .0301 | 0.115 | 6.8034 | 1  | .0091 | .1474 | 1.0306  |

B: coeficiente de regresión.

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación parcial.

Exp (B)=  $e^B$

df: grados de libertad

El coeficiente para la edad de 20 es 0.03, con un nivel de significación de 0.009. Basado en el nivel de significación, se puede rechazar la hipótesis nula de que el valor del coeficiente para la población es 0.

El método de selección controla la entrada del bloque de covariables en el modelo. En la selección forward conditional stepwise (adelante condicional por pasos), se utiliza una puntuación estadística para la entrada de variables. Las variables que no cumplen unos parámetros de probabilidad estimada mínima, salen del análisis.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el error alfa fue menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

#### IV.8.3. PROCESAMIENTO INFORMATICO DE LOS DATOS

Como base de datos se han utilizado los programas Dbase III Plus<sup>®</sup> y Microsoft Acces 2<sup>®</sup>.

El procesamiento estadístico se ha realizado con el paquete estadístico SPSS<sup>®</sup> para Windows, versión 6.1.2.

## VI. RESULTADOS

## V. RESULTADOS

### V.1. COMPARACION DE LA REGENERACION INMUNE TRAS TAMO Y

#### TCSP:

Los resultados respecto al primer objetivo, es decir, determinar si existen diferencias en la reconstitución inmune tras quimioterapia en dosis altas seguido de trasplante autólogo de médula ósea obtenida sin estimulación previa (TAMO), o de trasplante autólogo con células germinales de sangre periférica (TCSP), son los siguientes:

#### V.1.1. GRUPO GLOBAL DE PACIENTES:

##### **1. Linfocitos totales:**

En Figura 5A, se observa la evolución de los linfocitos totales durante el primer año postrasplante. En primer lugar señalar que en el momento pretrasplante ambos grupos de pacientes (MO y CGSP), presentan linfopenia. El nadir de linfocitos absolutos se observa durante la primera y segunda semana. Como se puede observar, la recuperación de la cifra de linfocitos es paralela en ambos grupos, aunque significativamente más rápida con TCSP hasta el día +60, momento en el que se alcanzan cifras superiores a las pretrasplante, en el límite inferior de la normalidad. El grupo TAMO sólo alcanza cifra similares a partir del 1º año.

A partir del día +60, en ambos grupos, se produce un descenso transitorio moderado, en el que puede influir la administración de radioterapia complementaria en pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto

riesgo de recaída y en pacientes con diagnóstico de linfoma. A partir del día +90 se produce una nueva recuperación hasta cifras pretrasplante al finalizar el primer año.

El análisis de las curvas mediante el test MANOVA para muestras repetidas, demuestra que existe diferencia significativa en el perfil de recuperación de linfocitos totales entre el grupo de pacientes TAMO y TCSP ( $F=4.05$ ;  $p=0.002$ ).

### **2. Linfocitos T: Células CD2+, CD3+ y CD5+:**

En la Figura 5B y 5C, se resume la evolución de las poblaciones CD2+ y CD3+, que es en todo paralela a la de linfocitos totales, con cifras totales inferiores. La presencia en superficie de este complejo molecular CD3+, indica que las células expresan ya el receptor para antígeno (TCR), y son por tanto, de fenotipo maduro, aunque con un ligero retraso respecto a la expresión de CD2+. Sin embargo, únicamente el grupo TCSP alcanza niveles absolutos en el límite de la normalidad dentro del primer año con una diferencia significativa respecto al grupo TAMO en el día +60.

La evolución y cifras absolutas de las células CD5+ (Figura 6A), es igual a la de CD2+ y CD3+. La población CD5+ muestra una rápida recuperación de niveles pretrasplante durante el primer mes y, en el caso de TCSP, de forma llamativa llega hasta valores que duplican el valor pretrasplante.

Una minoría de estas células (<10%), expresan simultáneamente CD5+CD19+ (Figura 7B), lo que señala su estirpe B, por lo que parece tratarse de células B inmaduras en un estadio transicional.

El análisis de las curvas mediante el test MANOVA, muestra que existen diferencias significativas en el perfil de recuperación de células CD2+ ( $F= 3.88$ ;  $p= 0.002$ ) y células CD3+ ( $F= 2.69$ ;  $p= 0.02$ ), alcanzando niveles absolutos significativamente superiores en el grupo TCSP que en TAMO. En cambio, no existen diferencias significativas en la evolución de las poblaciones CD5+, CD5+CD19+ y CD19+.

### **3. Subpoblaciones T: Células CD4+, CD8+, índice**

#### **CD4/CD8:**

En las Figuras 7A, 7B y 7C, se resume la evolución de estas poblaciones y su relación. Como se puede observar, previo al procedimiento, ambos grupos presentan valores de CD4 y CD8 inferiores a la normalidad. En el caso del grupo TAMO, las células CD4+ descienden hasta valores que son un 50% inferiores a los del grupo TCSP, con recuperación lenta posterior hasta el día +90. A partir de este momento, se igualan a las cifras alcanzadas por TCSP. En ambos grupos, la cifra de CD4+ sigue siendo baja al finalizar el primer año, aproximadamente, el 50% del valor pretrasplante ( $200 \text{ células CD4+} \times 10^6/\text{L}$ ).

Por el contrario, en ambos grupos, se produce un incremento rápido de los linfocitos CD8+, con valores en el límite superior de lo normal entre el 1º y 3º mes, aunque superior de forma estadísticamente significativa en el TCSP respecto al

TAMO, durante el primer mes postrasplante. Como se detalla más tarde (Figura 9B), la mayor parte de estas células coexpresan CD57+ y parece identificar una subpoblación T descrita con actividad supresora y/o activada.

El retraso de la recuperación de la cifra de linfocitos CD4+ respecto a los linfocitos CD8+, tiene como resultado un cociente CD4/CD8 invertido de forma prolongada en ambos grupos, con recuperación lenta en ambos grupos, algo más rápida en el grupo TCSP, que se mantiene al finalizar el primer año (Figura 7C).

Las diferencias en la recuperación de CD8+, se confirman en el test MANOVA ( $F= 4.96$ ;  $p < 0.001$ ).

A pesar de la aparente diferencia en la recuperación de la población CD4+, el análisis de las curvas mediante el test MANOVA, demuestra que no existe diferencia significativa en el perfil de recuperación entre TAMO y TCSP ( $F= 0.64$ ;  $p= 0.66$ ). Tampoco existe diferencia en la recuperación del índice CD4/CD8 ( $F= 0.72$ ;  $p= 0.60$ ).

#### **4. Subpoblaciones con marcadores de activación:**

En el periodo precoz de trasplante (día +14 a +30), se observa aumento de células con expresión de marcadores de activación celular, como es la expresión de HLA-DR+ (Figura 8A), que en el presente estudio, no coincide con expresión aumentada de otros marcadores de activación, como es la población CD25+ que no muestra modificaciones durante el periodo de estudio (Figura 8B).

El test MANOVA no ha detectado diferencias significativas en el perfil de recuperación de ambas poblaciones entre TAMO y TCSP.



### **5. Linfocitos T con fenotipo supresor/citotóxico :**

En las Figuras 7B, 9A, 9B y 9C, se resume la evolución de las subpoblaciones de linfocitos T con fenotipo supresor/citotóxico.

Los linfocitos T, con fenotipo supresor/citotóxico (CD8+, CD3+CD16+CD56+, CD8+CD57+, CD57+), recuperan los niveles pretrasplante de forma muy precoz (día +21). La población CD3+CD16+CD56+, recupera niveles pretrasplante de forma más rápida en el grupo de TCSP que en el TAMO, aunque las diferencias no son significativas en MANOVA ( $F= 0.69$ ;  $p= 0.63$ ). Posteriormente, se igualan totalmente los niveles en ambos grupos.

Tal como se observa en la Figura 9B, la recuperación de la población CD8+CD57+, es paralela y sin diferencias entre ambos grupos hasta el día +30, momento a partir del cual se produce una marcada elevación, significativamente mayor el grupo de TAMO ( $F= 4.60$ ;  $p= 0.001$ ), que se mantiene al final del 1º año.

La evolución de la población CD57+ se observa en la Figura 9C. Alcanza un valor pico en el día +60, en cifras superiores a las de CD8+CD57+, lo que parece indicar que identifica células T y en parte a otra subpoblación. El análisis de las curvas mediante el test MANOVA, muestra que existen diferencias significativas en el perfil de recuperación ( $F= 4.33$ ;  $p= 0.001$ )

### **6. Células NK:**

La recuperación de esta subpoblación linfoide es marcadamente diferente en ambos grupos. En el grupo de TCSP, todas las poblaciones con fenotipo de célula NK, entre las que se incluye CD3-CD16+CD56+ (Figura 10A), CD56+ (Figura 10B) y células CD16+ (Figura 10C), recuperan niveles pretrasplante de forma precoz (día +21), manteniendo el ritmo de aumento y llegando a alcanzar el valor pico en el día +30 (aproximadamente 2 veces el valor basal pretrasplante). Esta elevación se mantiene durante 2-3 meses postrasplante, retornando posteriormente, a los niveles pretrasplante.

A pesar de esta marcada elevación respecto a los niveles pretrasplante, los niveles de esta subpoblación se encuentran en límites de la normalidad.

El análisis de las curvas mediante el test MANOVA, muestra que existen diferencias significativas en el perfil de recuperación de células CD3-CD16+CD56+ ( $F= 4.11$ ;  $p= 0.001$ ) y especialmente en la recuperación de las células CD56+ ( $F= 5.54$ ;  $p< 0.001$ ), siendo significativamente más rápida con TCSP que con TAMO. La población CD16+ también muestra diferencias significativas con presencia de paralelismo entre las curvas ( $F= 4.52$ ;  $p= 0.04$ ).

### **7. Linfocitos B:**

La evolución de la recuperación de linfocitos CD19+ y de los niveles séricos de inmuoglobulinas se puede observar en las Figuras 11A a 11D.

Es de destacar la marcada linfopenia B previa al trasplante en ambos grupos de pacientes (TCSP y TAMO). Las células con fenotipo B (CD19+), se elevan de forma progresiva, recuperan niveles pretrasplante aproximadamente a

los 2 meses, pero mantienen niveles disminuidos durante más de 6 meses. El número absoluto de células CD19+ se normaliza en ambos grupos en el control anual.

El análisis de las curvas mediante el test MANOVA, muestra que no existen diferencias significativas en el perfil de recuperación ( $F= 0.96$ ;  $p= 0.44$ )

### **8. Inmunoglobulinas séricas:**

En las Figuras 11B, 11C y 11D, se resume la evolución de los niveles de inmunoglobulinas séricas.

Los niveles de IgG e IgM se reducen durante el primer mes postransplante. Sin embargo, a pesar de que las células B son indetectables durante el 1º mes, los niveles séricos de inmunoglobulinas no se reducen de forma marcada.

Los niveles de IgG se normalizan entre el 1º y 2º mes postrasplante, mientras que los de IgM lo hacen entre el 3º y el 6º mes. Los niveles de IgA permanecen dentro de límites normales durante el periodo de estudio.

No existen diferencias significativas en el nivel de recuperación entre ambos tipos de trasplante (IgG:  $F= 1.40$ ;  $p= 0.24$ ; IgA:  $F= 0.62$ ;  $p= 0.68$ ; IgM:  $F= 2.37$ ;  $p= 0.054$ ). Por tanto, se confirma, a nivel funcional, la igual recuperación de la línea B en ambos grupos.

### **9. Factores del complemento y CH50:**

En las Figuras 12A, 12B y 12C, se resume la evolución de los niveles séricos de C3, C4 y CH50. No existen diferencias significativas en la evolución de estos factores entre ambos grupos de pacientes. Los niveles de C3 y C4 se elevan durante el 1º mes postrasplante, y se normalizan posteriormente los de C3, mientras que se mantienen ligeramente elevados los de C4. El nivel de CH50 se mantiene dentro de límites de la normalidad.

#### 10. Tests cutáneos de inmunidad celular:

En el grupo global de pacientes que se detalla en la Tabla 17, se han observado los siguientes resultados:

|                            | TAMO        | TCSP        | P    |
|----------------------------|-------------|-------------|------|
| <b>Pretrasplante</b>       |             |             |      |
| Afectación severa          | 2/35 (5%)   | 2/23 (8%)   | N.S. |
| Afectación moderada        | 10/35 (29%) | 10/23 (43%) | N.S. |
| Inmunidad normal           | 23/35 (66%) | 11/23 (49%) | N.S. |
| <b>Control tras 1º año</b> |             |             |      |
| Afectación severa          | 3/25 (12%)  | 3/15 (20%)  | N.S. |
| Afectación moderada        | 12/25 (48%) | 7/15 (47%)  | N.S. |
| Inmunidad normal           | 10/25 (40%) | 5/15 (33%)  | N.S. |

Como se puede observar, previo al trasplante existe una proporción importante de pacientes con afectación moderada o severa de los tests de inmunidad celular en ambos grupos. En el estudio realizado al año, la proporción de pacientes con afectación moderada o severa aumenta en ambos grupos (TAMO 60%, TCSP 77%), no siendo estadísticamente significativa la diferencia entre proporciones (prueba exacta de Fisher con intervalo de confianza del 95%).

#### **V.1.2. GRUPO DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO:**

La recuperación inmune en pacientes con carcinoma de alto riesgo se resume en las Figuras 13 a 20.

El número de células pretrasplante es similar a los de el grupo global y por tanto, una situación inmune alterada de forma significativa y similar a los pacientes con neoplasias hematológicas.

En conjunto, los resultados en este grupo homogéneo de pacientes en cuanto a diagnóstico, pronóstico y tratamiento de inducción, acondicionamiento y postrasplante, en cuanto a la comparación de las distribuciones de frecuencias de las cifras absolutas de las diferentes poblaciones linfocitarias en los momentos postrasplante ya referidos, muestra una gran similitud a la descrita para el grupo global, y confirma el patrón de recuperación inmune tras TAMO y tras TCSP. El test MANOVA para muestras repetidas indica que existen diferencias

significativas en el perfil de recuperación de linfocitos totales ( $F= 3.82$ ,  $p= 0.003$ ), células CD2+ ( $F= 3.69$ ,  $p= 0.004$ ) y células CD3+ ( $F= 4.02$ ,  $p= 0.002$ ).

No existen diferencias en la recuperación de las células CD5+, CD5+CD19+, CD4+.

El análisis del perfil de recuperación de las células CD8+, indica que existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $F= 4.41$ ;  $p= 0.001$ ) de forma similar al grupo global. Sin embargo, a diferencia del grupo global de pacientes, tras una recuperación inicialmente más rápida en el grupo de TCSP, se observa un entrecruzamiento de las curvas en el control del día +60, con una elevación más acusada de células T CD8+ (superior a valores normales), en el grupo de MO (Figura 15B). La gran mayoría de estas células expresan simultáneamente CD57+ (Figura 17B), de forma semejante al grupo global, aunque con cifras absolutas inferiores.

No existe diferencia en el perfil de recuperación del índice CD4/CD8 entre ambos grupos ( $F= 1.18$ ;  $p= 0.32$ ). Ambos permanecen en valores muy inferiores al normal en el control realizado al finalizar el primer año.

Al igual que en el grupo global, la presencia de células HLA-DR+ parece indicar células B o T, inmaduras (Figura 16A). La población CD25+ permanece en límites de la normalidad en el grupo TCSP, mientras que en el grupo TAMO se normalizan únicamente al finalizar el periodo de estudio (Figura 16B). El test MANOVA no ha detectado diferencias significativas en el perfil de recuperación de ambas poblaciones entre TAMO y TCSP.

En cuanto a la recuperación de las poblaciones T con fenotipo supresor/citotóxico existe un paralelismo absoluto con la población global. Aunque cuando se analizan las diferencias punto a punto, la población CD3+CD16+CD56+, recupera niveles pretrasplante de forma aparentemente más rápida en el grupo de TCSP que en el TAMO, el estudio con MANOVA indica que estas diferencias no son significativas en MANOVA ( $F= 0.33$ ;  $p= 0.89$ ). Posteriormente, se igualan totalmente los niveles en ambos grupos.

El análisis de la recuperación de las poblaciones CD8+CD57+ y CD57+ con MANOVA, muestra diferencias significativas ( $F= 2.70$ ,  $p= 0.026$  y  $F= 2.51$ ,  $p= 0.037$ , respectivamente).

La semejanza en la recuperación de las poblaciones con fenotipo NK es absoluta (Figuras 18A, 18B y 18C). El análisis MANOVA, muestra diferencias en la recuperación de CD3-CD16+CD56+ ( $F= 2.96$ ,  $p= 0.016$ ), CD56 ( $F= 3.54$ ,  $p= 0.006$ ) y CD16+ ( $F= 2.25$ ,  $p= 0.043$ ).

En cuanto a la recuperación de la población CD19+, a pesar de un aparente ritmo de recuperación más rápido aparente en el grupo de MO, el test MANOVA no detecta diferencias significativas en el perfil de recuperación. La recuperación de niveles normales sólo se logra al final del primer año en ambos grupos (Figura 19A).

Al igual que en el grupo global, los niveles séricos de IgG se normalizan en el primer postrasplante y los niveles de IgA no descienden por debajo de niveles normales, en ambos grupos. Los niveles de IgM sólo se normalizan de forma

estable después de los primeros 3 meses, en grupo de TCSP, mientras que es más lenta en el grupo TAMO, sin que las diferencias entre ambos grupos, sean significativas. Tampoco se observan diferencias en los niveles de C3, C4 y CH50 (Figuras 20A, 20B y 20C).

En conclusión, tanto en el grupo global como en el grupo de carcinoma de mama de alto riesgo, la recuperación inmune en la mayoría de los componentes estudiados, es más rápida tras TCSP que tras TAMO. Esta diferencia es estadísticamente significativa en los linfocitos totales y las subpoblaciones CD2+, CD3+, CD8+, CD8+CD57+, CD57+, CD3-CD16+CD56+, CD56+ y CD16+.

La diferencia más evidente en la recuperación inmune entre TAMO y TCSP, radica en la temprana y elevada recuperación de las poblaciones con fenotipo NK, que tiene lugar entre el día +14 hasta el +60 e incluso el +90. Este hecho hace establecer este periodo como el más adecuado para intervenciones terapéuticas de tipo inmune con IL-2, interferón o GM-CSF, de forma aislada o en combinación.

## **V.2. COMPARACION DE LA RECONSTITUCION INMUNE POSTRASPLANTE DE PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS, CON LA DE LAS PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE TUMORES SOLIDOS (CARCINOMA DE MAMA DE ALTO RIESGO DE RECAIDA).**

Los resultados respecto al segundo objetivo, es decir, determinar si existen diferencias en la reconstitución inmune en ambos grupos se resumen en las



Figuras 21 a 28. Como se puede observar, existe un gran paralelismo en la recuperación de todas las subpoblaciones estudiadas, sin diferencias apreciables entre ambos grupos de pacientes en la fase inicial (hasta el día +30). Sin embargo, a partir del control del día +60 tiende a producirse un patrón de recuperación diferente y superior en el grupo de neoplasias hematológicas, en los siguientes tipos de células: linfocitos totales ( $F= 3.09$ ,  $p= 0.013$ ), CD2+ ( $F= 2.80$ ,  $p= 0.022$ ), CD3+ ( $F= 2.95$ ,  $p= 0.017$ ), CD5+ ( $F= 2.53$ ,  $p= 0.013$ ), CD4+ ( $F= 2.49$ ,  $p= 0.037$ ) y CD8+ ( $F= 48.68$ ,  $p< 0.001$ ). A pesar de ello, existen escasas diferencias en las cifras absolutas de estas poblaciones.

A pesar de las diferencias en los puntos de estudio individuales en la recuperación de alguna de las poblaciones con fenotipo supresor/citotóxico, no existen diferencias significativas en el perfil completa de las curvas, entre ambos grupos. Las cifras absolutas alcanzadas por las poblaciones CD8+CD57+ y CD57+, más allá del día +60, son significativamente superiores en el grupo de pacientes con hemopatías malignas.

El test MANOVA no ha demostrado diferencias significativas en la recuperación de las poblaciones con fenotipo NK, linfocitos B, inmunoglobulinas y niveles de factores del complemento.

### **V.3. ESTUDIO DE POSIBLE INFLUENCIA DEL TIPO DE RECUPERACION INMUNE Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD NEOPLASICA TRAS TCGH.**

#### **V.3.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CARCINOMA DE MAMA DE ALTO**

---

**RIESGO (  $\geq 10$  GANGLIOS AFECTOS AL DIAGNÓSTICO,  $\geq 4$  GANGLIOS TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE Y CARCINOMA INFLAMATORIO), QUE HAN RECIBIDO MO O CGSP .**

Como un primer análisis de la posible influencia de un diferente patrón de recuperación inmune entre TAMO y TCSP, se ha analizado la SLE de ambos grupos.

En la Figura 29 se observan las curvas de SLE de ambos grupos, calculada por el método de Kaplan-Meier y la comparación de ambas por el test de log-rank. A pesar de que existe una tendencia a una mejor SLE en el grupo de TCSP respecto al de TAMO, tal como se observa en dicha figura no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.8$ ).

Es difícil extraer conclusiones de este resultado, ya que a pesar de ser 2 grupos muy homogéneos en cuanto a los factores pronósticos conocidos, es posible la influencia de otros factores no analizados, la inclusión de un número de pacientes limitado o disponer de un tiempo de seguimiento escaso, especialmente para el grupo de TCSP. Alternativamente, es posible que el diferente patrón de recuperación inmune en conjunto, tenga escaso impacto en el control de la enfermedad neoplásica. Con el fin de profundizar en la posible influencia de la recuperación inmune, se llevaron a cabo los siguientes análisis.

**V.3.2. ESTUDIO DE INFLUENCIA DE LA RECONSTITUCION INMUNE DE LAS POBLACIONES CELULARES CON FENOTIPO NK Y T SUPRESORA/CITOTOXICA, EN LA EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD NEOPLASICA.**

Con la intención de determinar la posible influencia del diferente patrón de recuperación inmune de TAMO y TCSP, se ha intentado determinar si el valor absoluto alcanzado por diversas poblaciones celulares con fenotipo generalmente asociado a actividad citotóxica NK y actividad citotóxica/supresora, tiene alguna influencia en la frecuencia de recaída.

El modelo estadístico de regresión múltiple de Cox, permite determinar si una o varias variables incluidas en el análisis, tiene relación independiente con el suceso en estudio, en este caso la recaída de la enfermedad (supervivencia libre de enfermedad). Dado que el modelo de Cox pretende determinar si es posible establecer una ecuación que relacione la variable independiente con la dependiente (en este caso el tiempo hasta la recaída de la enfermedad), utiliza variables cuantitativas, por lo que en un primer análisis se han utilizado este tipo de variable. Con el resultado obtenido, se puede establecer, con un determinado nivel de significación, la ecuación que relaciona las dos variables y predecir para un determinado nivel de variable independiente cuando ocurrirá el evento en estudio (recaída de enfermedad).

Sin embargo, el modelo de Cox no identifica grupos de pacientes con determinado nivel de valor de la variable independiente que se correlacione (en conjunto), con determinado comportamiento. Para este fin es preciso agrupar a los pacientes, es decir transformar las variables cuantitativas en cualitativas. Por tanto, para intentar determinar para que nivel de la variable el grupo de pacientes tiene un comportamiento diferente, se han recodificado en variables

categorías en base a diferentes niveles absolutos utilizando los establecidos por los percentiles (dada la distribución no normal de las variables de la muestra) 50 (mediana), 80 y 90, en el día +30 postrasplante, por ser éste el momento de máxima elevación de las poblaciones con fenotipo NK y ser máxima la diferencia entre los grupos de TAMO y TCSP. Las variables incluidas en el análisis han sido:

1. Poblaciones con fenotipo NK: CD3-CD16+CD56+, CD16+ total, CD16+CD2-, CD56+.
2. Poblaciones con fenotipo supresor/citotóxico: CD3+CD16+CD56+, CD8+CD57+, CD57+.
3. Población linfoide total: sin actividad exclusiva, como variable control.

Dado que el resultado del análisis uni o bivalente de estas poblaciones puede estar influido por otros factores pronósticos conocidos, tras un primer análisis univariante de cada una de ellas y, multivariante incluyendo todas las variables biológicas, se han incluido en el análisis multivariante los factores pronósticos clínicos conocidos en el carcinoma de mama.

En esta enfermedad se conocen diversas características del paciente y/o de la enfermedad que constituyen factores pronósticos de recaída de la enfermedad tras tratamiento quimioterápico convencional. Entre los principales factores pronósticos conocidos se encuentran los siguientes: número de ganglios axilares afectados al diagnóstico o tras quimioterapia neoadyuvante, receptores hormonales positivos, edad, situación hormonal de la paciente, grado histológico

y estadio clínico. No se ha confirmado que su valor pronóstico se mantenga tras quimioterapia intensiva y trasplante de célula germinal hematopoyética.

## ANÁLISIS UNIVARIANTE

El análisis univariante de la relación entre el nivel absoluto de las variables biológicas señaladas y la SLE, ha demostrado los siguientes resultados estadísticos:

### A. Poblaciones con fenotipo de célula NK:

#### 1. Población CD3-CD16+CD56+

##### 1.1. Valoración como variable cuantitativa:

No se observa correlación con la SLE ( $p = 0,72$ ).

| -----Variable no en la Ecuación----- |        |    |       |       |
|--------------------------------------|--------|----|-------|-------|
| Variable                             | Score  | df | Sig   | R     |
| CD3-CD16+CD56+                       | 0,1239 | 1  | ,7248 | ,0000 |

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación parcial.

df: grados de libertad

##### 1.2. Valoración como variable cualitativa:

##### 1.2.1. Pacientes con población CD3-CD16+CD56+ en el día +30, en

nivel superior o inferior al percentil 80 ( $\geq 457,8$  células  $\times 10^9/L$ ):

La comparación de la SLE en los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 80 en el día +30 postrasplante, muestra que no existe diferencia significativa ( $p= 0.34$ ), a pesar de

que parece existir una tendencia a una mayor SLE en el grupo de pacientes con percentil > 80.

*1.2.2. Pacientes con población CD3-CD16+CD56+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 90 ( $\geq 715,5$  células  $\times 10^9/L$ ):*

En la Figura 30, se observa la SLE en los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 90 en el día +30 postrasplante. Como puede observarse, la diferencia sigue siendo no significativa ( $p= 0,5$ ), a pesar de que se mantiene la tendencia a una mayor SLE en el grupo de pacientes con percentil > 90, ya observada en el grupo de percentil 80.

## **2. Población CD16+ total:**

### *2.1. Valoración como variable cuantitativa:*

No se observa correlación con la SLE ( $p = 0,73$ ).

| -----Variable en la ecuación----- |                     |        |        |    |       |       |         |
|-----------------------------------|---------------------|--------|--------|----|-------|-------|---------|
| Variable                          | B                   | S.E.   | Wald   | df | Sig   | R     | Exp (B) |
| CD16+                             | 5,326 <sup>-4</sup> | 0,0016 | 0,1126 | 1  | ,7372 | ,0000 | 1.0005  |

B: coeficiente de regresión.

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación parcial.

Exp (B):  $e^B$  = Odds ratio

df: grados de libertad

### *2.2. Valoración como variable cualitativa:*

*2.2.1. Pacientes con población CD16+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 80 ( $\geq 440,436$  células  $\times 10^9/L$ ):*

No existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $p= 0,5$ ), a pesar de que existe una tendencia a una mayor SLE en el grupo de pacientes con niveles  $\geq$  al percentil 80.

*2.2.2. Pacientes con población CD16+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 90 ( $\geq 572,09$  células  $\times 10^9/L$ ):*

En la Figura 31 se puede observar la SLE de los dos grupos de pacientes definidos por un nivel de población CD16+ en el día +30 superior o inferior al percentil 90. La diferencia entre ambos grupos sigue siendo no significativa ( $p= 0,9$ ), a pesar de mantenerse la tendencia a una mayor SLE en el grupo de pacientes con mayor percentil ya observado en el grupo anterior.

### **3. Población CD56+:**

#### *3.1. Valoración como variable cuantitativa:*

No se observa correlación con la SLE ( $p = 0,48$ ).

| -----Variable no en la Ecuación----- |        |    |       |       |
|--------------------------------------|--------|----|-------|-------|
| Variable                             | Score  | df | Sig   | R     |
| CD56+                                | 0,4947 | 1  | ,4818 | ,0000 |

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación.

df: grados de libertad

#### *3.2. Valoración como variable cualitativa:*

**3.2.1. Pacientes con población CD56+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 90 ( $\geq 654,352$  células  $\times 10^9/L$ )::**

En la Figura 32, se observa la SLE en los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 90 en el día +30 postrasplante. Como puede observarse, a pesar de que existe una tendencia a una mayor SLE en el grupo de pacientes con percentil  $> 90$ , la diferencia no es significativa ( $p=0,51$ ).

**B. Poblaciones con fenotipo de célula supresora/citotóxica:**

**1. Población CD3+CD16+CD56+:**

**1.1. Valoración como variable cuantitativa:**

Se observa una correlación entre el incremento de los niveles absolutos de esta población en el día +30 y una menor SLE, de forma significativa ( $p = 0,0012$ ). Exp (B)= 1,0154 ( 1,0060-1,0249, IC 95%).

| ----- Variable en la ecuación ----- |       |        |         |    |       |       |         |
|-------------------------------------|-------|--------|---------|----|-------|-------|---------|
| Variable                            | B     | S.E.   | Wald    | df | Sig   | R     | Exp (B) |
| CD3+CD16+CD56+                      | ,0153 | 0,0047 | 10,4231 | 1  | ,0012 | ,3456 | 1.0154  |

B: coeficiente de regresión.

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación.

Exp (B)=  $e^B$

df: grados de libertad

**1.2. Valoración como variable cualitativa:**



**1.2.1. Pacientes con población CD3+CD16+CD56+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 80 ( $\geq 76,23$  células  $\times 10^9/L$ ):**

En la Figura 33, se observa SLE en los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 80 en el día +30 postrasplante. Como indica el estadístico B ( $B = -0,68$ ), la tendencia es a una correlación negativa (menor SLE en el grupo de nivel de esta población superior al percentil 80), aunque no estadísticamente significativa ( $p = 0,061$ ).

**1.2.2. Pacientes con población CD3+CD16+CD56+ en el día +30, con nivel superior o inferior al percentil 90 ( $\geq 108,84$  células  $\times 10^9/L$ ):**

En la Figura 34 se observa SLE en los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 90 en el día +30 postrasplante. Como puede observarse, la correlación es negativa ( $B: -1,1821$ ), es decir, que un aumento en el nivel absoluto de esta población implica una menor SLE. La diferencia entre ambos grupos es significativa ( $p = 0,002$ ).

## **2. Población CD8+CD57+:**

### **2.1. Valoración como variable cuantitativa:**

Se observa una correlación entre el aumento de los niveles absolutos de esta población en el día +30 y una menor SLE, de forma estadísticamente significativa ( $p = 0,0012$ ).  $Exp(B) = 1,0022$  ( $1,0009-1,0036$ , IC 95%).

| Variable en la ecuación |       |        |         |    |       |       |         |
|-------------------------|-------|--------|---------|----|-------|-------|---------|
| Variable                | B     | S.E.   | Wald    | df | Sig   | R     | Exp (B) |
| CD8+CD57+               | ,0153 | 0,0047 | 10,4231 | 1  | ,0012 | ,3456 | 1.0154  |

B: coeficiente de regresión.

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación.

Exp (B)=  $e^B$

df: grados de libertad

## 2.2. Valoración como variable cualitativa:

2.2.1. *Pacientes con población CD8+CD57+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 90 ( $\geq 694,08$  células  $\times 10^9/L$ ):*

En la Figura 35 se observa la SLE en los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 90 en el día +30 postrasplante. Como indica el estadístico B (-1,3296), y se observa en la Figura 35, el grupo de pacientes con cifras absolutas de esta población en el día +30 postrasplante superiores al percentil 90, presentan una SLE significativamente menor que aquellos con niveles inferiores a este valor ( $p=0,0007$ ).

## 3. Población CD57+:

### 3.1. Valoración como variable cuantitativa:

Se observa una correlación entre el aumento de los niveles absolutos de esta población en el día +30 y una menor SLE, de forma significativa ( $p=0,0023$ ). Exp (B)= 1,0015 (1,0005-1,0024, IC 95%).

| ----- Variable en la ecuación ----- |       |                     |      |    |       |       |         |
|-------------------------------------|-------|---------------------|------|----|-------|-------|---------|
| Variable                            | B     | S.E.                | Wald | df | Sig   | R     | Exp (B) |
| CD57+                               | ,0015 | 04,867 <sup>a</sup> | 9,25 | 1  | ,0023 | ,3241 | 0,3241  |

B: coeficiente de regresión.

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación.

Exp (B)= e<sup>B</sup>

df: grados de libertad

### 3.2. Valoración como variable cualitativa:

3.2.1. *Pacientes con población CD57+ en el día +30, en nivel superior o inferior al percentil 90 ( $\geq 904,204$  células  $\times 10^9/L$ ):*

En la Figura 36 se observa la SLE de los 2 grupos de pacientes definidos por un valor de esta subpoblación superior o inferior al percentil 90 en el día +30 postrasplante. Como indica el estadístico B y se observa en la Figura 36, el grupo de pacientes con un nivel de células CD57+ superior al percentil 90 presenta una SLE inferior que el grupo con nivel inferior a este valor, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,0007$ ), de forma totalmente idéntica al comportamiento de CD8+CD57+, como más tarde se confirma en el estudio multivariante. Exp B: 0,2646; Intervalo confianza del 95%: 0,1228 a 0,5702).

**C. Población linfocitos total, en distintos percentiles:** No se observa correlación positiva o negativa entre la población linfocitos total, sea cual sea el nivel absoluto

de células considerado, con SLE ( $p= 0.28$ , para grupo de pacientes con nivel de linfocitos igual o superior al percentil 90, comparado con grupo con nivel inferior).

## ANALISIS MULTIVARIANTE

Tras obtener los resultados anteriores, se realizó estudio multivariante mediante el método de regresión múltiple de Cox, escalonado condicional (Forward Stepwise), introduciendo todas las variables previamente analizadas en el estudio univariante, en primer lugar como variables cuantitativas y posteriormente como categóricas en el percentil 90, obteniendo los siguientes resultados:

### 1. Valoración de variables cuantitativas:

Se detectó correlación inversa con SLE, exclusivamente con la variable población CD8+CD57+ ( $p= 0,0013$ ) con  $Exp (B)= 1,0022 (1,0009-1,0036, IC 95\%)$ .

| ----- Variable en la ecuación ----- |       |                     |       |    |       |       |         |
|-------------------------------------|-------|---------------------|-------|----|-------|-------|---------|
| Variable                            | B     | S.E.                | Wald  | df | Sig   | R     | Exp (B) |
| CD8+CD57+                           | ,0022 | 6,851 <sup>-4</sup> | 10,40 | 1  | ,0013 | ,3511 | 1,0022  |

B: coeficiente de regresión.

Sig: significación estadística.

R: coeficiente de correlación.

$Exp (B)= e^B$

df: grados de libertad.

2. Valoración de variables cualitativas en nivel igual o superior al percentil 90:

Se identifican tres variables con correlación inversa significativa con la supervivencia: CD8+CD57+ ( $p= 0,0025$ ), CD3+CD16+CD56+ ( $p= 0,0160$ ) y población CD57+ ( $p= 0,0025$ ). Se detecta además que la covariable población CD57+ depende linealmente de la covariable CD8+CD57+.

En último lugar, se realizó estudio multivariante, incluyendo en primer lugar, únicamente variables clínicas con significación pronóstica conocida en el carcinoma de mama tras tratamiento convencional que se detallan a continuación y los grupos en que se categorizaron:

- N° ganglios: 3 grupos: 10-14 ganglios axilares afectos; 15-19 ganglios ; >20 ganglios afectos. Con el fin de homogeneizar los grupos pronósticos se han excluido las pacientes con carcinoma de mama inflamatorio. Las pacientes con 4 a 6 ganglios positivos tras quimioterapia neoadyuvante se incluyeron en el grupo de 10-14 ganglios al diagnóstico, las de 7 y 8 ganglios positivos tras QT neoadyuvante en el grupo de 15-19 ganglios al diagnóstico y las de > 8 ganglios tras QT neoadyuvante en el de > 20 ganglios al diagnóstico.

- Edad: 5 grupos: < 20, 20-30, 30-40, 50-60, >60.

- Estado hormonal: 2 grupos: Premenopausia y postmenopausia.

- Grado histológico: 3 grupos: Grado 1, 2 y 3.

- Receptores de estrógeno: 2 grupos: Positivo y negativo.

- Receptores de progesterona: 2 grupos: Positivo y negativo.

- T patológico: 5 grupos: T1, T2, T3, T4.

El modelo de Cox (método Forward Stepwise), no identifica, en este grupo de pacientes, correlación entre ninguna de estas variables y la SLE.

A continuación, se incluyeron en el análisis multivariante todas las variables categorizadas (en el percentil 90) ya analizadas en el estudio univariante, más las variables clínicas anteriores:

De nuevo, las únicas variables con correlación (negativa) con la SLE son:

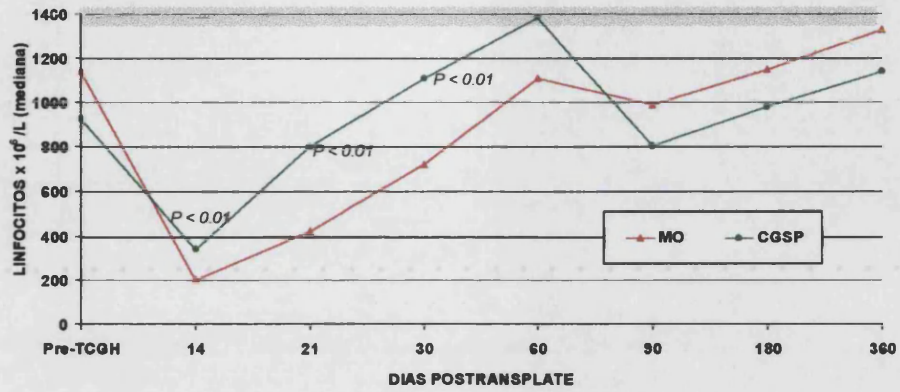
1. Población CD8+CD57+ con nivel  $\geq$  a percentil 90 en el día +30 ( $p=0,0012$ ).
2. Población CD3+CD16+CD56+ con nivel  $\geq$  a percentil 90 en el día +30 ( $p=0,048$ ).
3. Población CD57+ con nivel  $\geq$  a percentil 90 en el día +30 ( $p=0,007$ ).

En el presente estudio no se ha detectado correlación entre las variables clínicas con conocido peso pronóstico tras quimioterapia convencional.

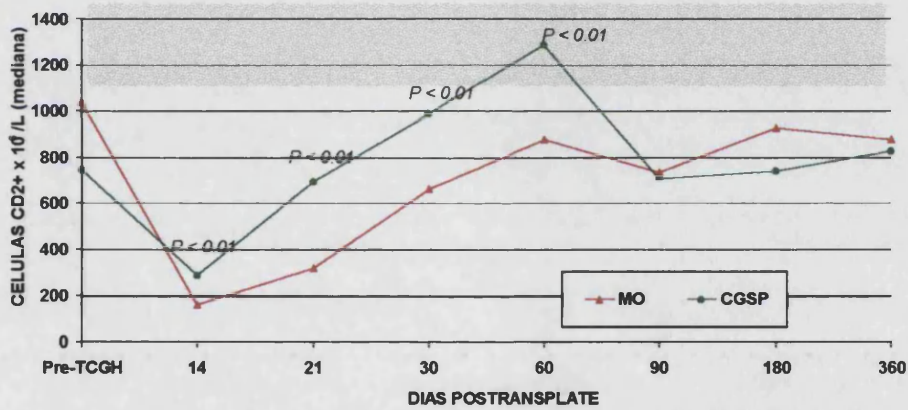
No existe relación significativa entre un mayor nivel de cifras absolutas de células con fenotipo NK y una mayor SLE, aunque parece existir una tendencia en este sentido. Existe relación estadísticamente significativa en el estudio uni y multivariante, entre un mayor nivel de cifras absolutas de células con fenotipo supresor/citotóxico en el día +30 postrasplante y una menor SLE.

**FIGURA 5**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**

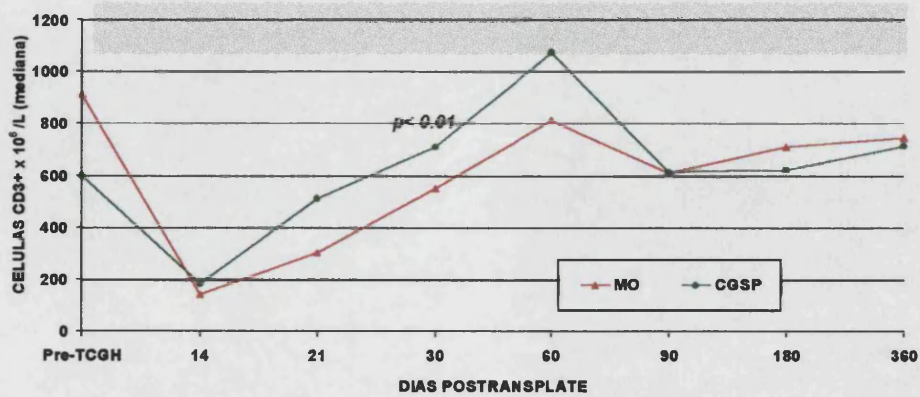
**A. EVOLUCION DE LINFOCITOS TOTALES**



**B. EVOLUCION DE CELULAS CD2+**

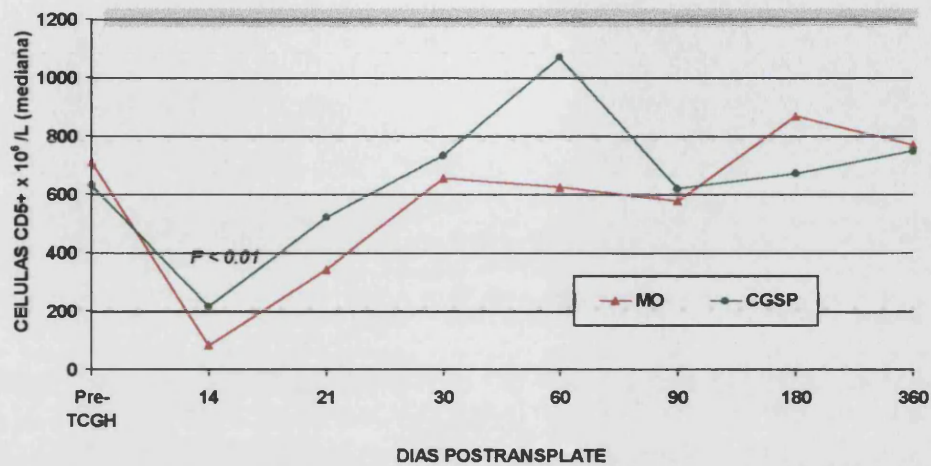


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3+**

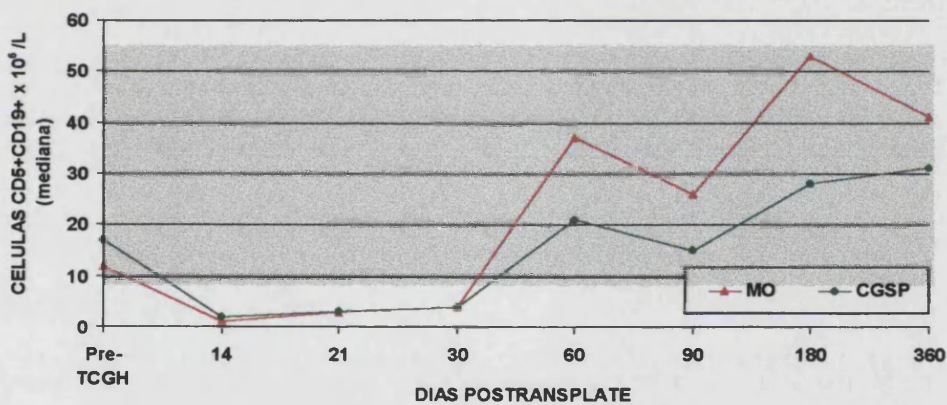


**FIGURA 6**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**

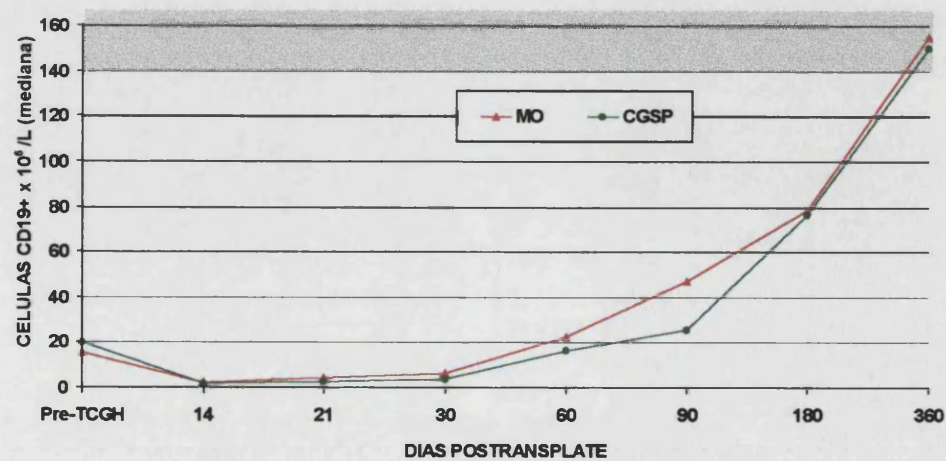
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD5+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD5+CD19+**

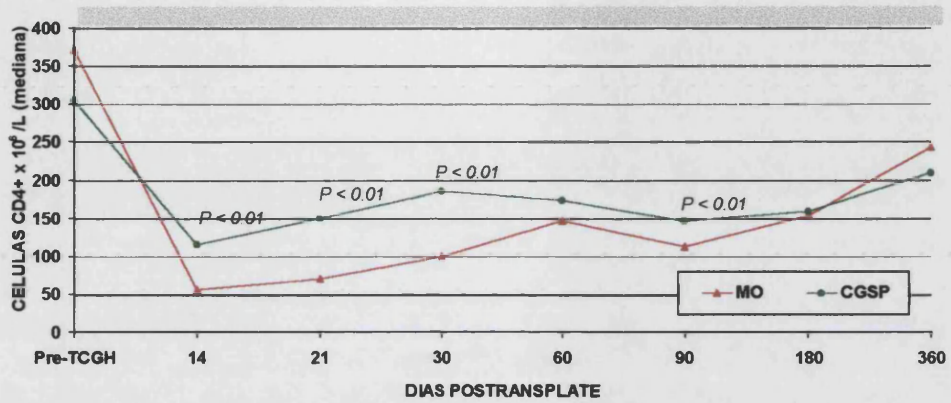


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD19+**

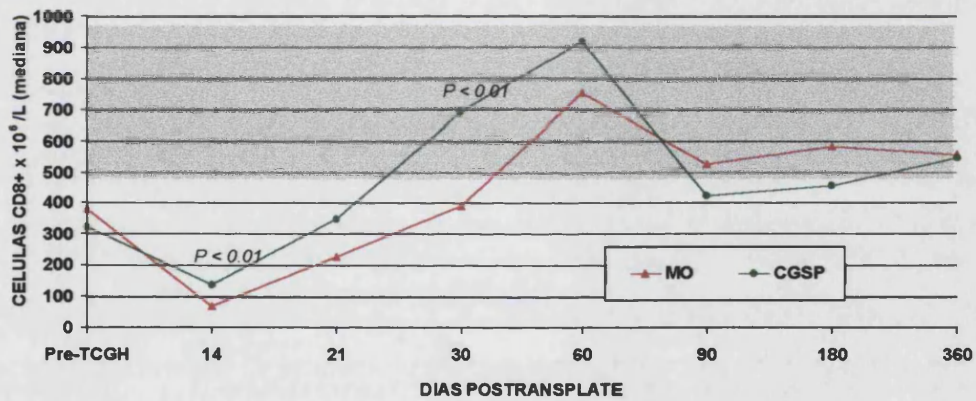




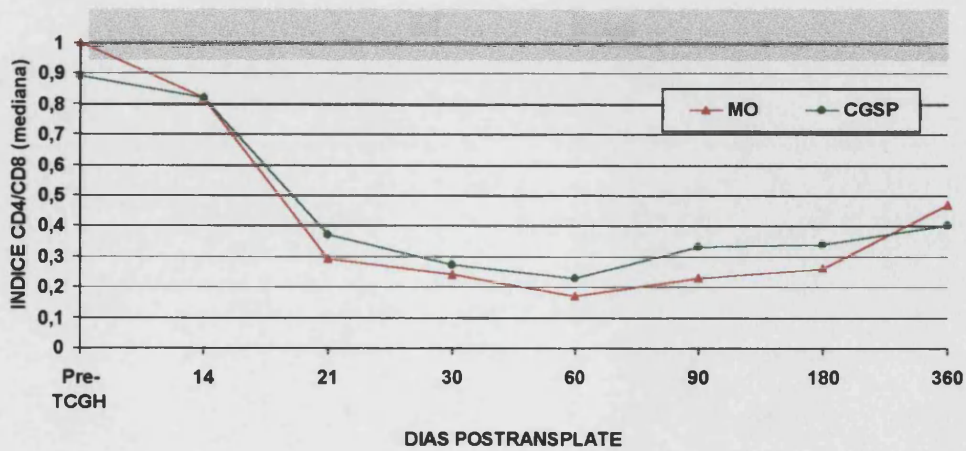
**FIGURA 7**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**  
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD4+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD8+**

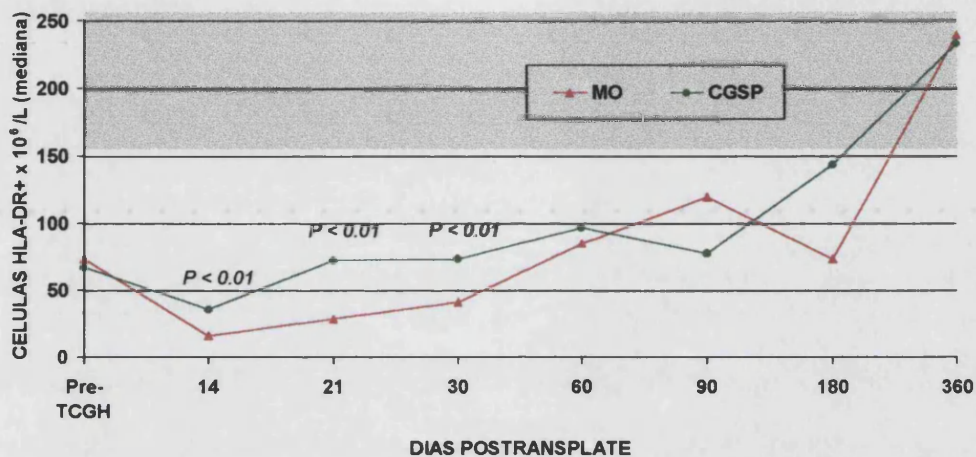


**C. EVOLUCION DEL INDICE CD4/CD8**

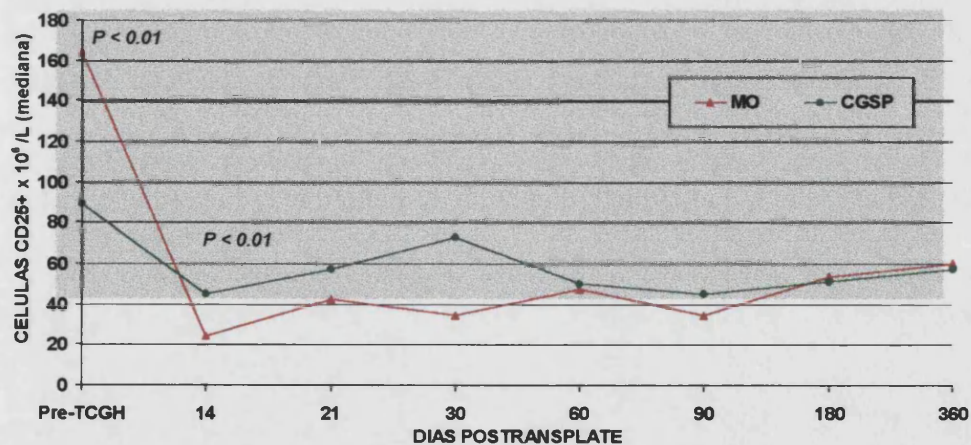


**FIGURA 8**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**

**A. EVOLUCION DE LA POBLACION HLA-DR+**

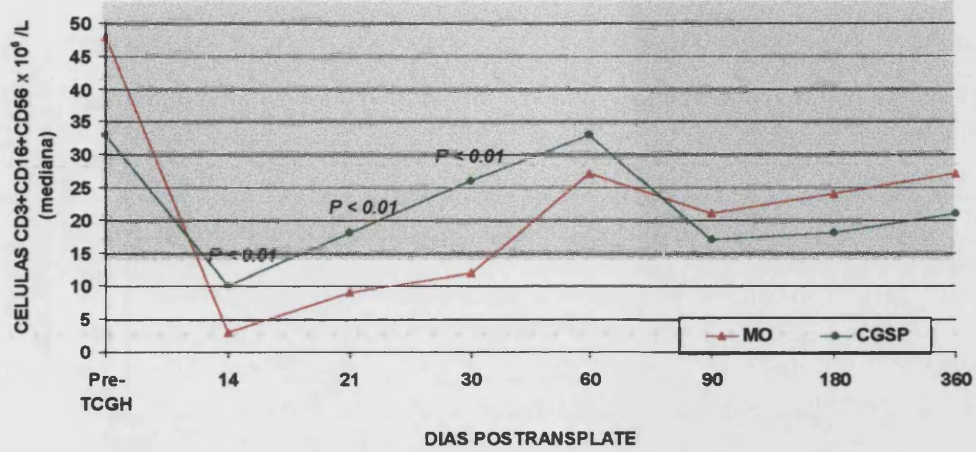


**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD25+**

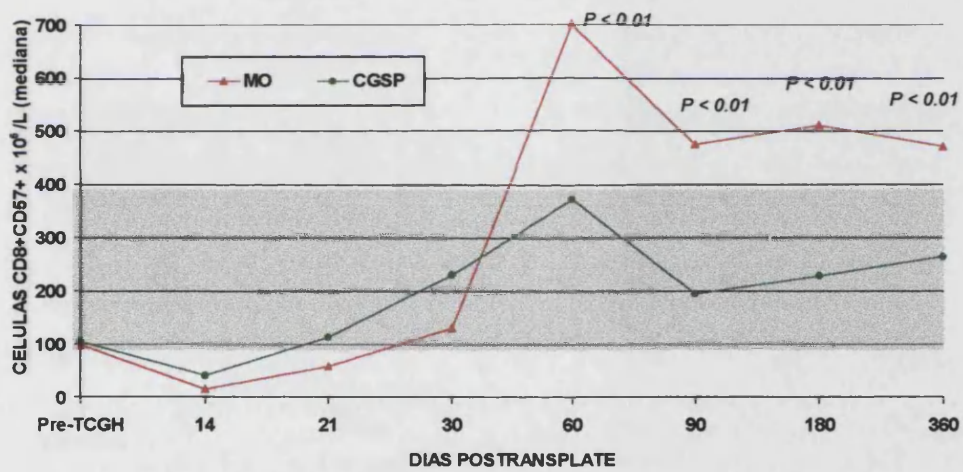


**FIGURA 9**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**

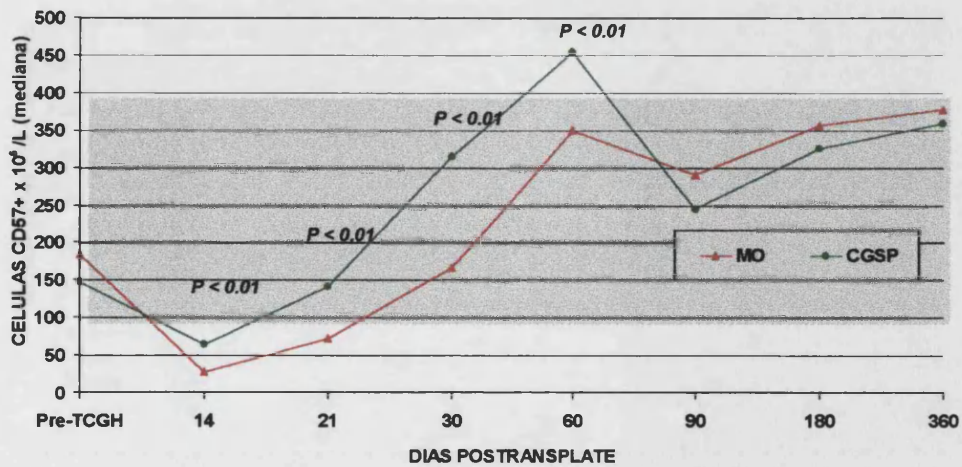
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3+CD16+CD56+**



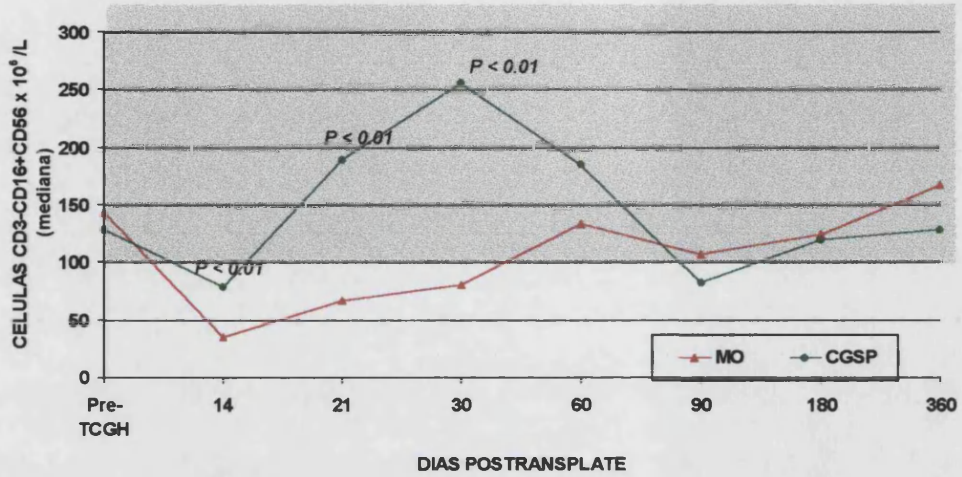
**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD8+CD57+**



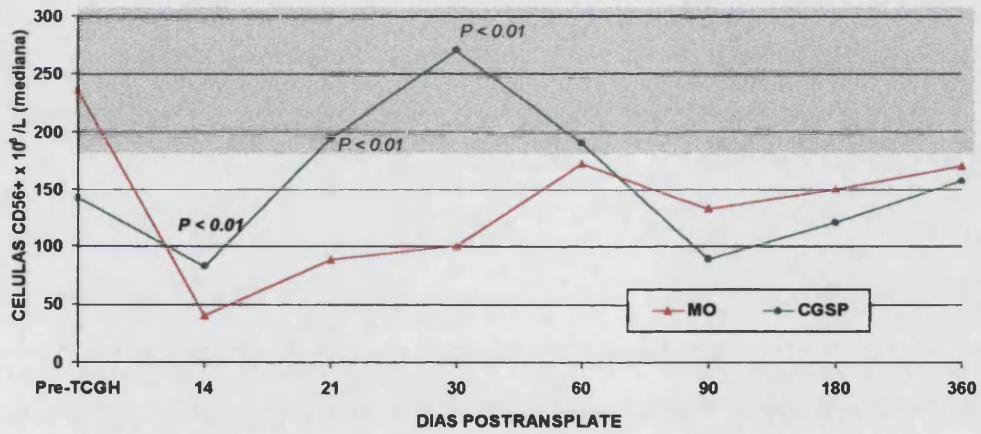
**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD57+**



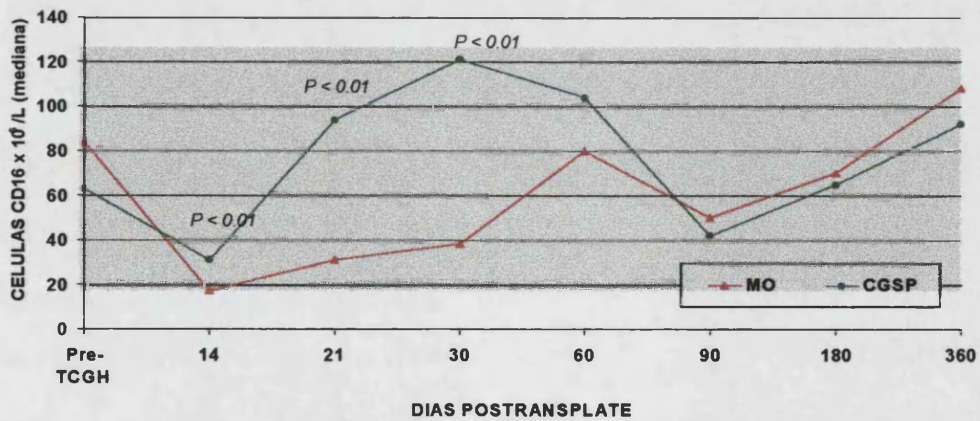
**FIGURA 10**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**  
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3-CD16+CD56+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD56+**

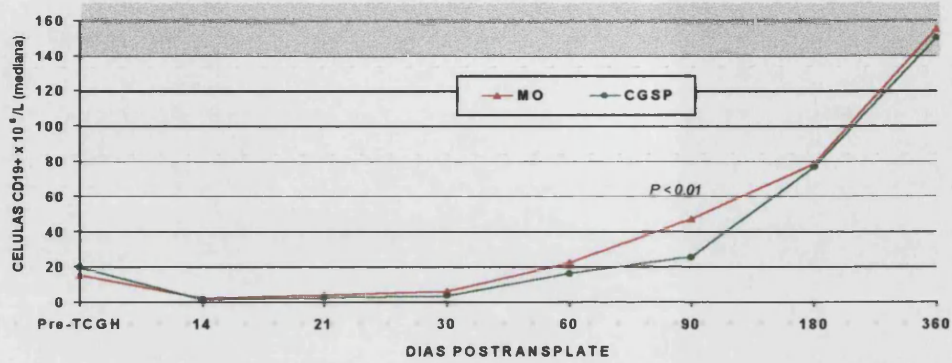


**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD16+**

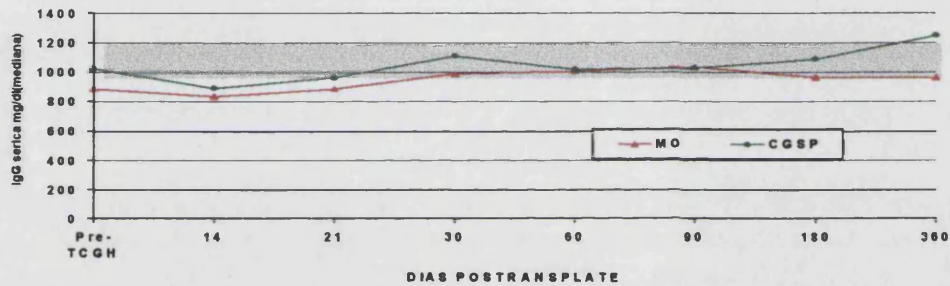


**FIGURA 11**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**

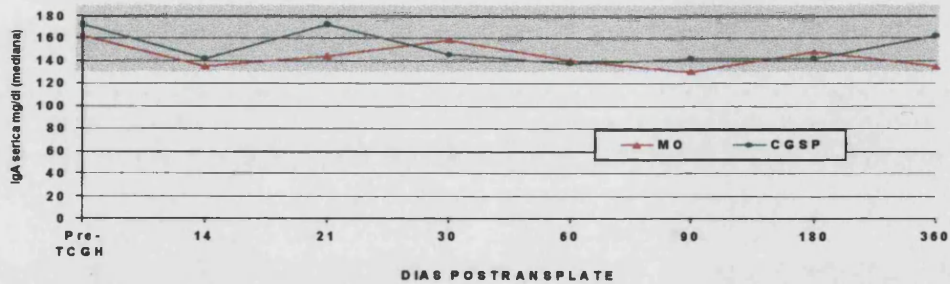
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD19+**



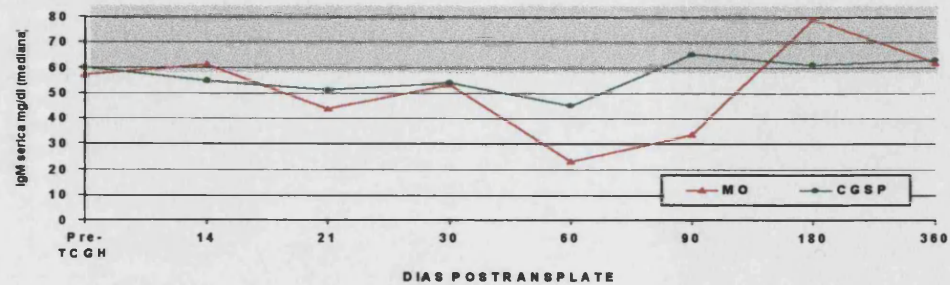
**B. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgG**



**C. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgA**

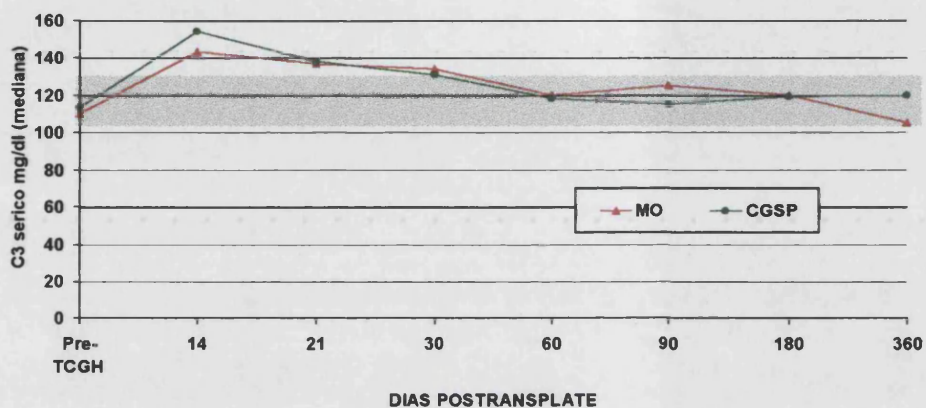


**D. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgM**

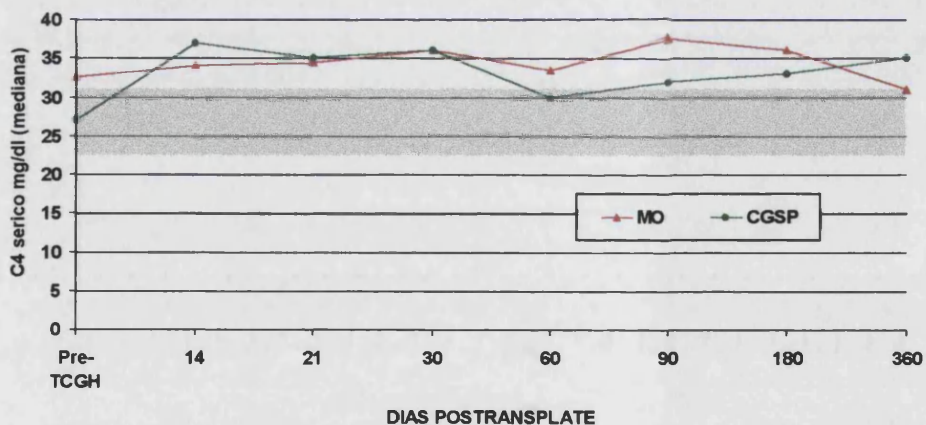


**FIGURA 12**  
**GRUPO GLOBAL DE PACIENTES. TAMO vs TCSP**

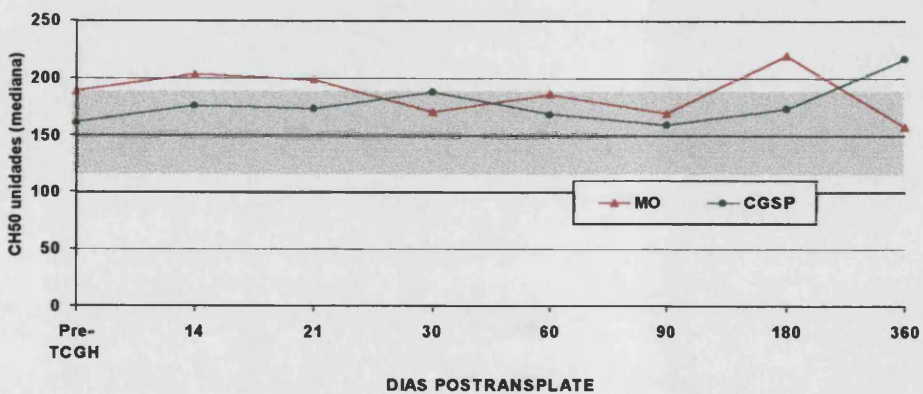
**A. EVOLUCION DE LOS NIVELES SERICOS DE C3**



**B. EVOLUCION DE LOS NIVELES SERICOS DE C4**

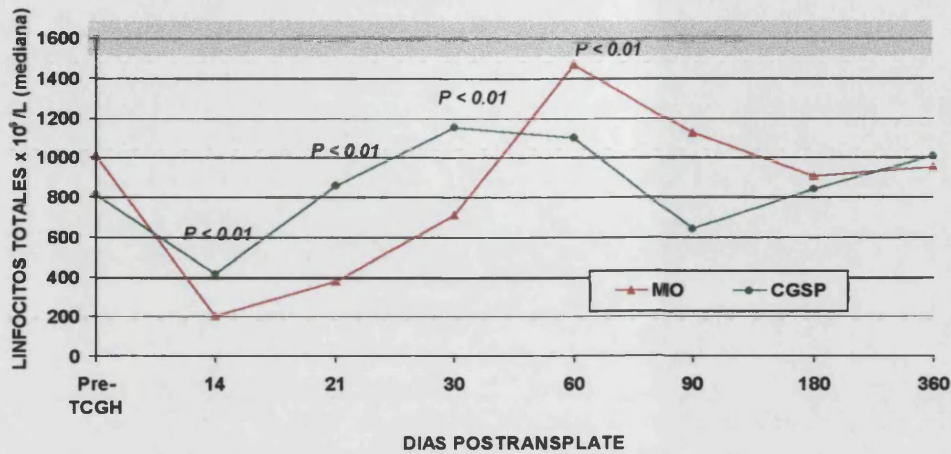


**C. EVOLUCION DE CH50**

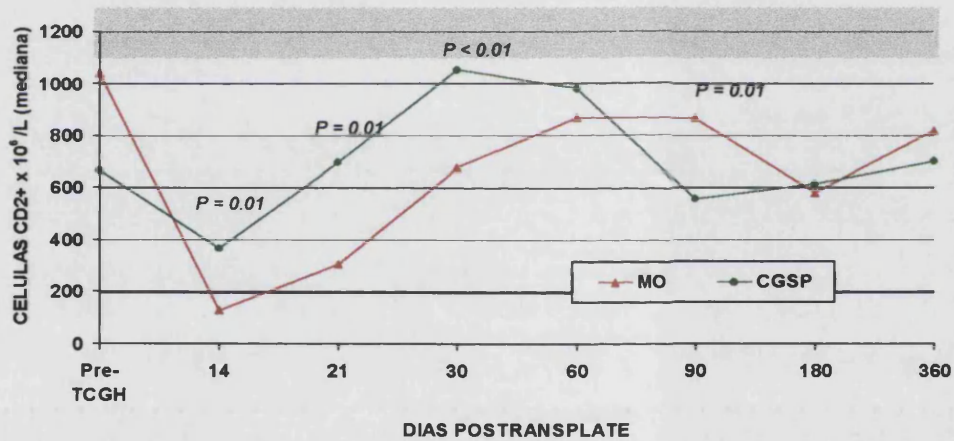


**FIGURA 13**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP**

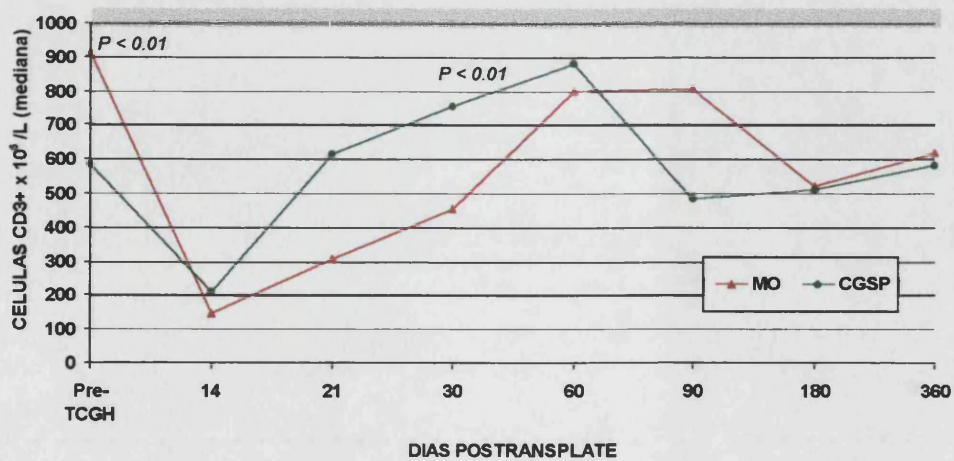
**A. EVOLUCION DE LINFOCITOS TOTALES**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD2+**

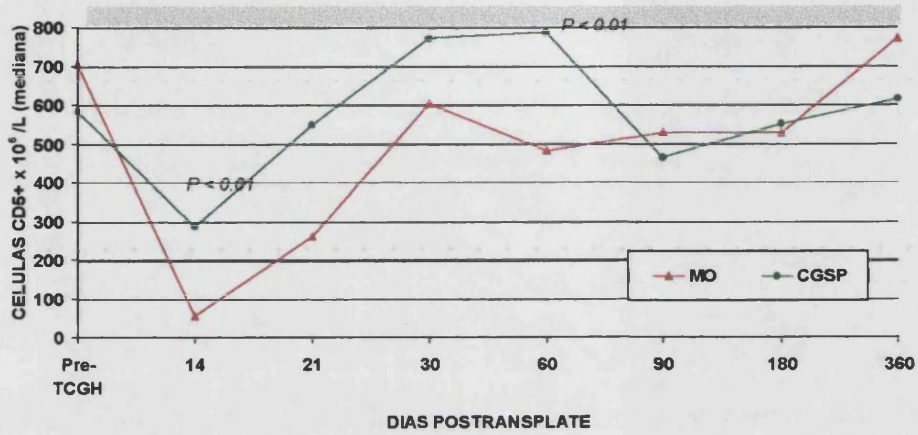


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3+**

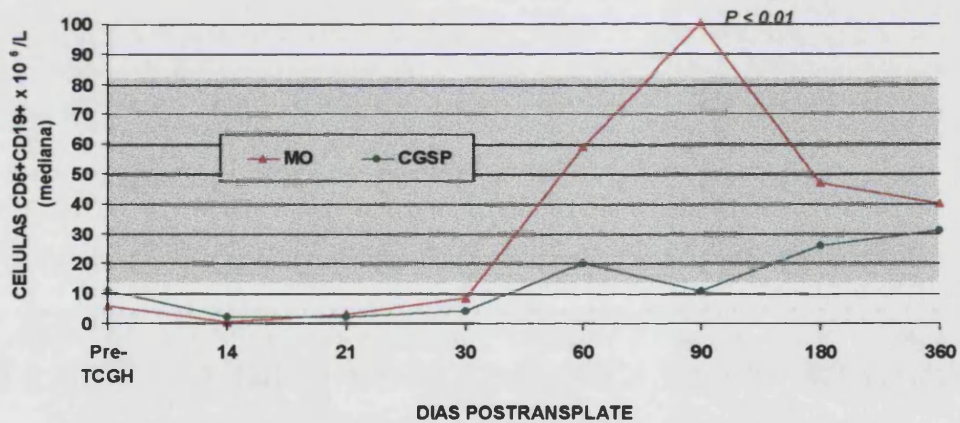


**FIGURA 14**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP.**

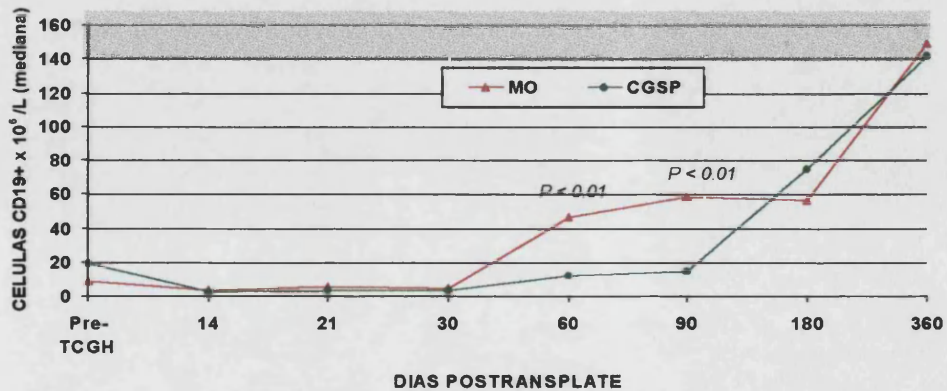
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD5+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD5+CD19+**

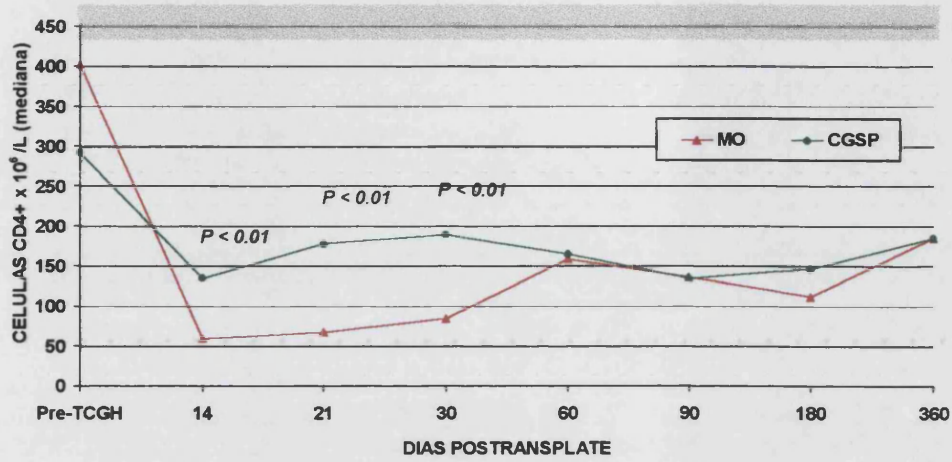


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD19+**

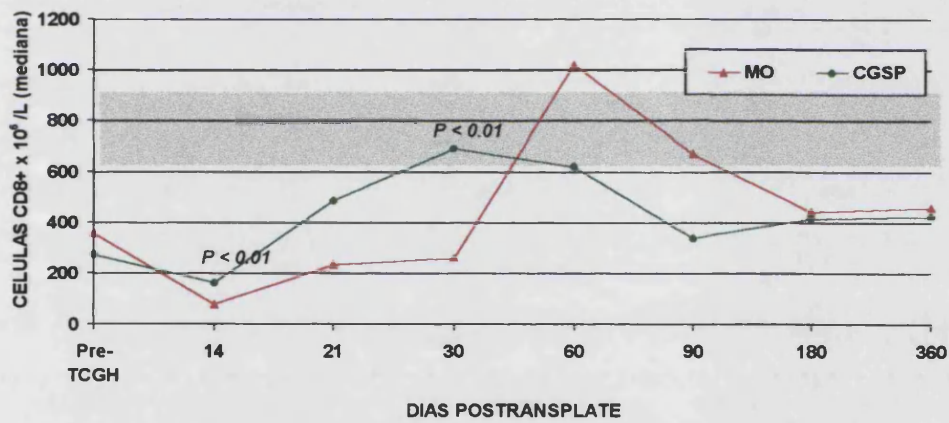




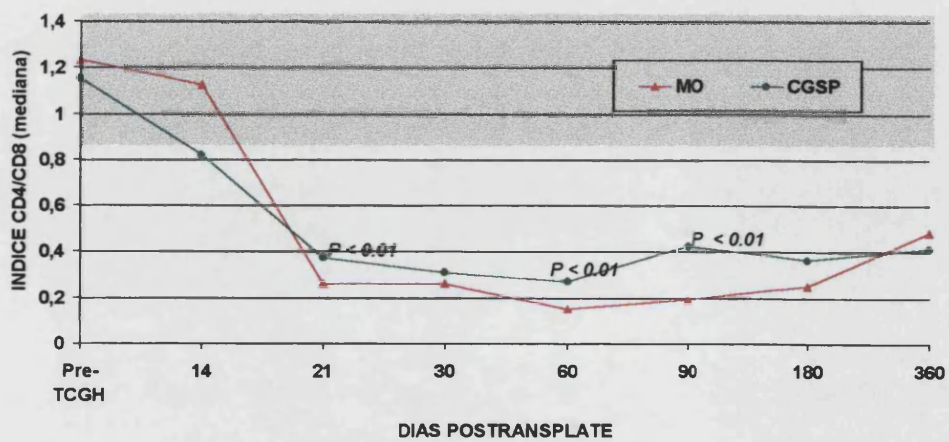
**FIGURA 15**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP.**  
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD4+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD8+**

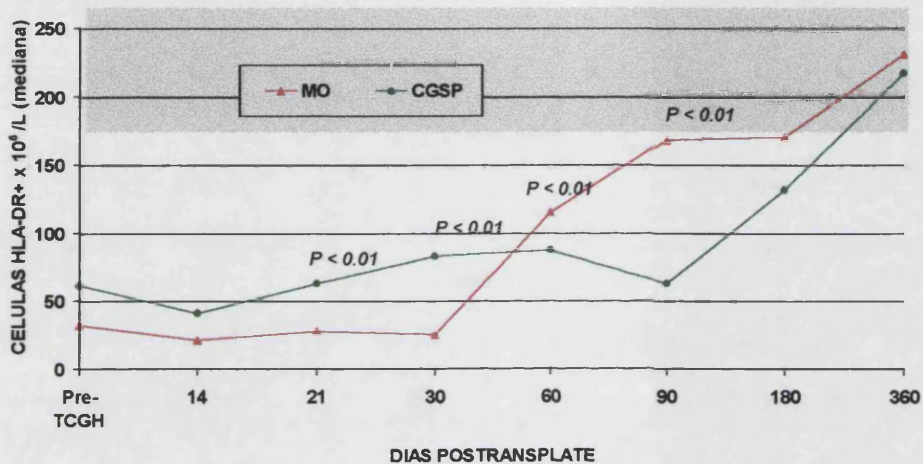


**C. EVOLUCION DEL INDICE CD4/CD8**

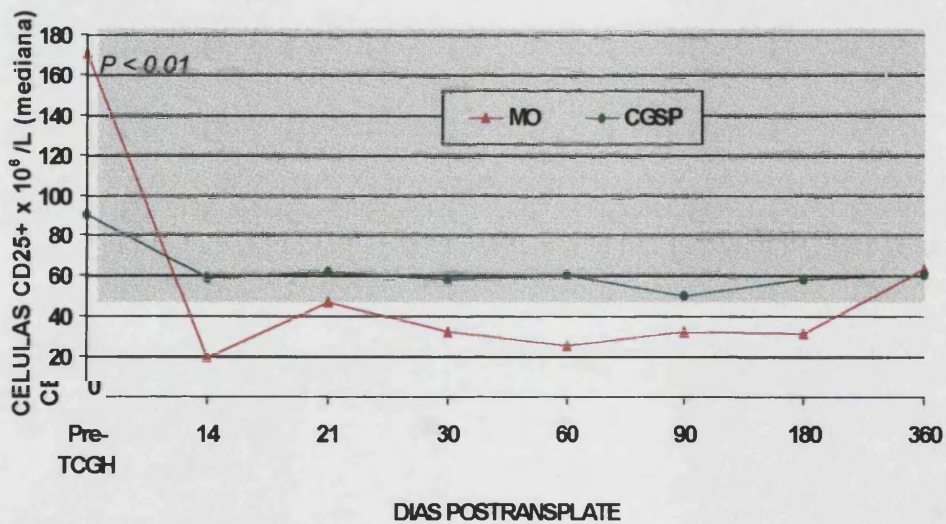


**FIGURA 16**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP.**

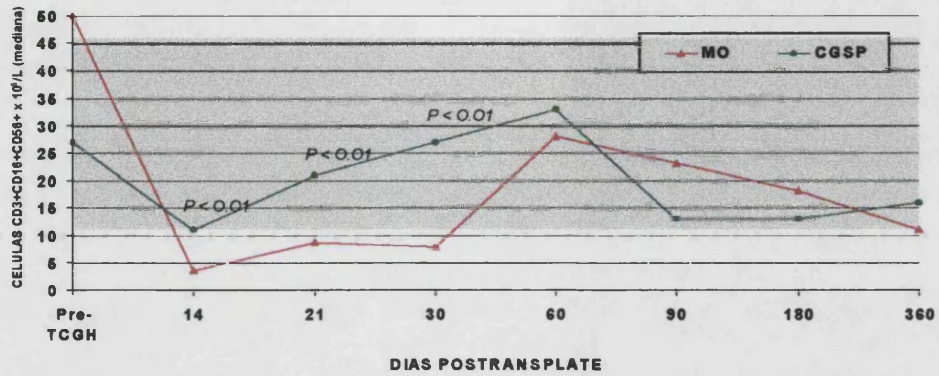
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION HLA-DR+**



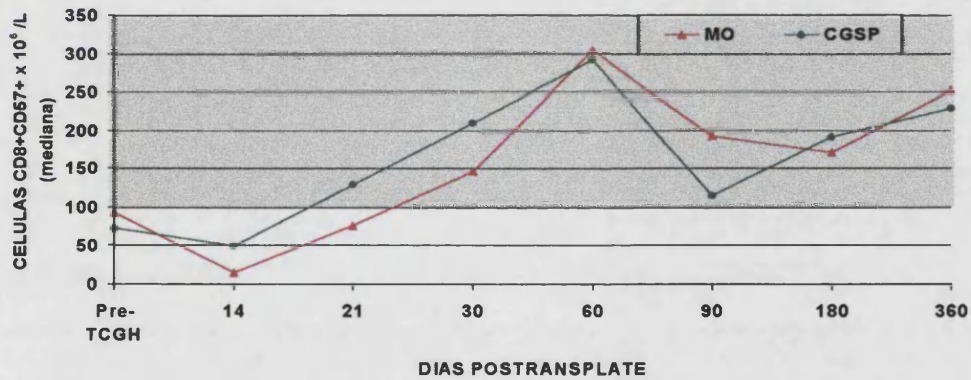
**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD25+**



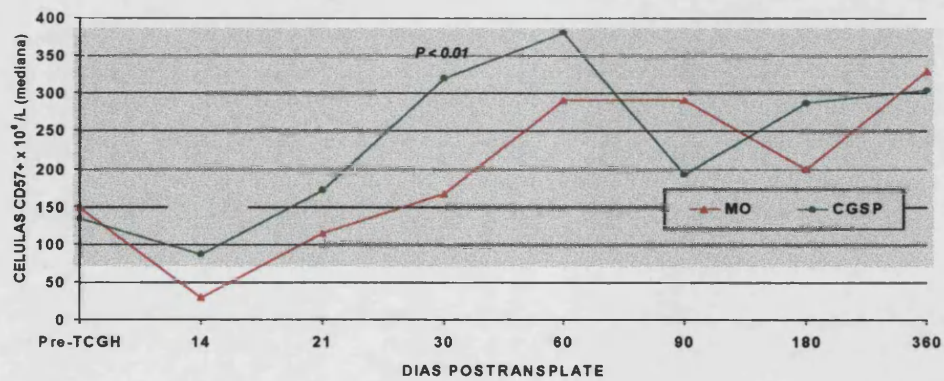
**FIGURA 17**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP**  
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3+CD16+CD56+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD8+CD57+**

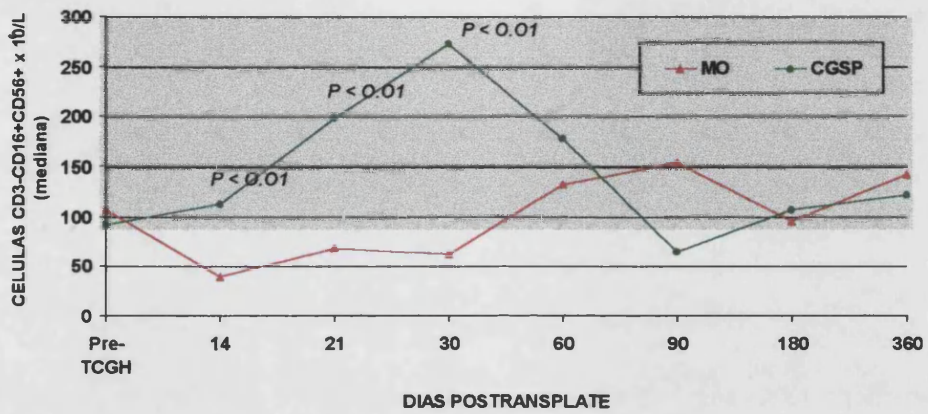


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD57+**

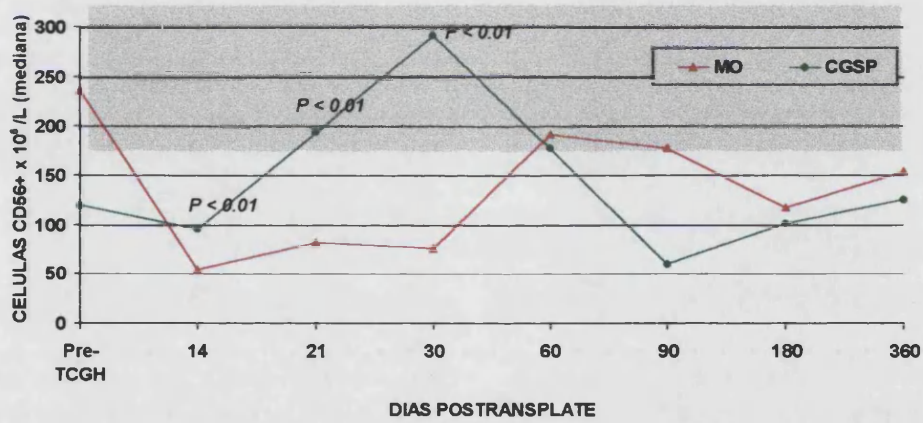


**FIGURA 18**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP**

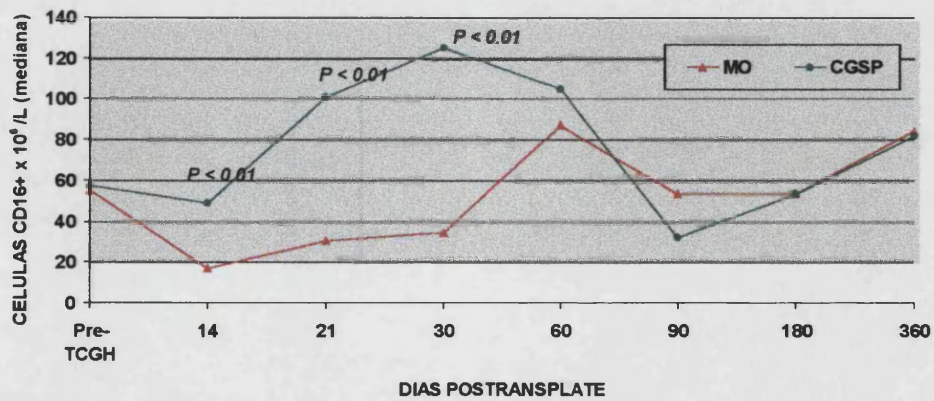
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3-CD16+CD56+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD56+**

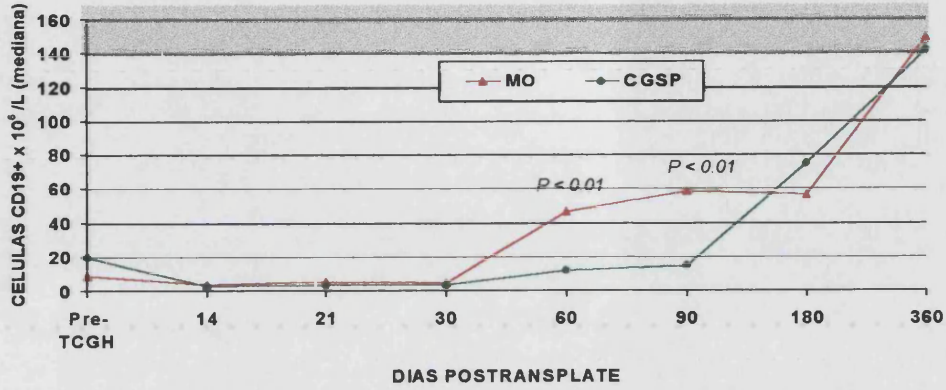


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD16+**

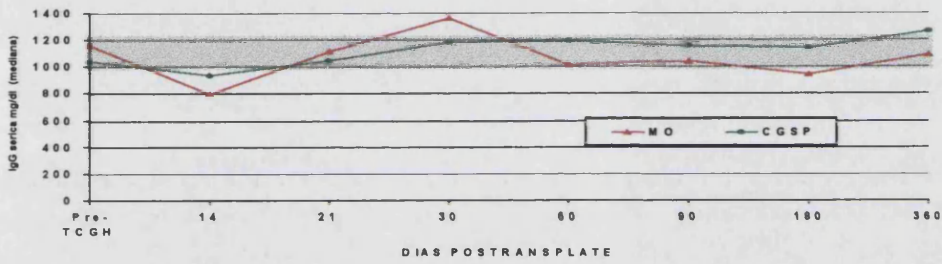


**FIGURA 19**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP**

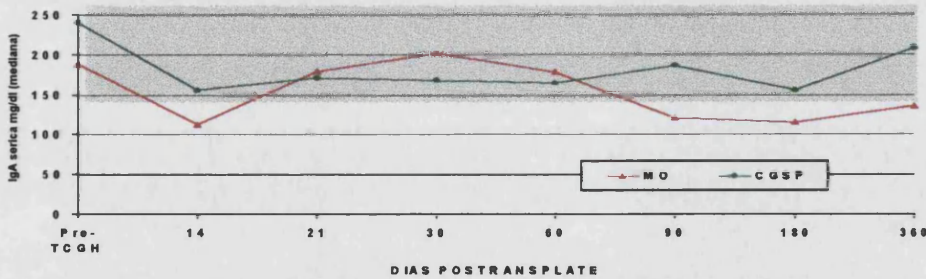
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD19+**



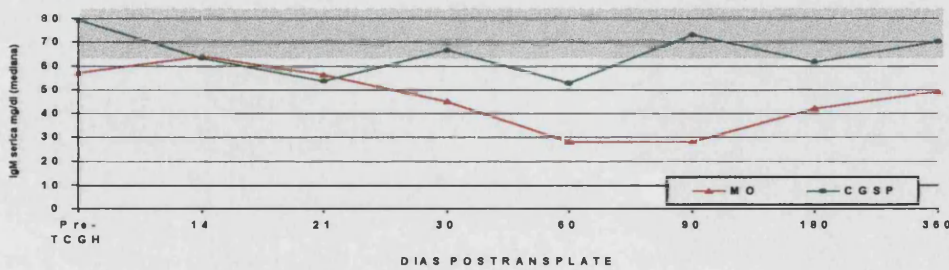
**B. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgG**



**C. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgA**

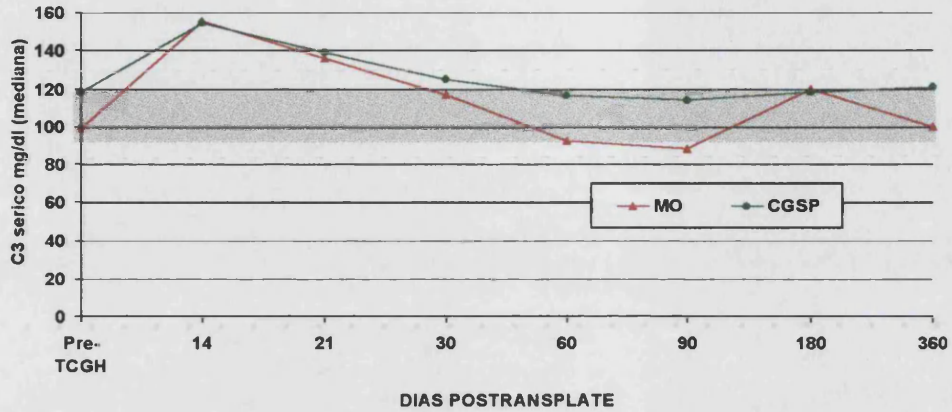


**D. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgM**

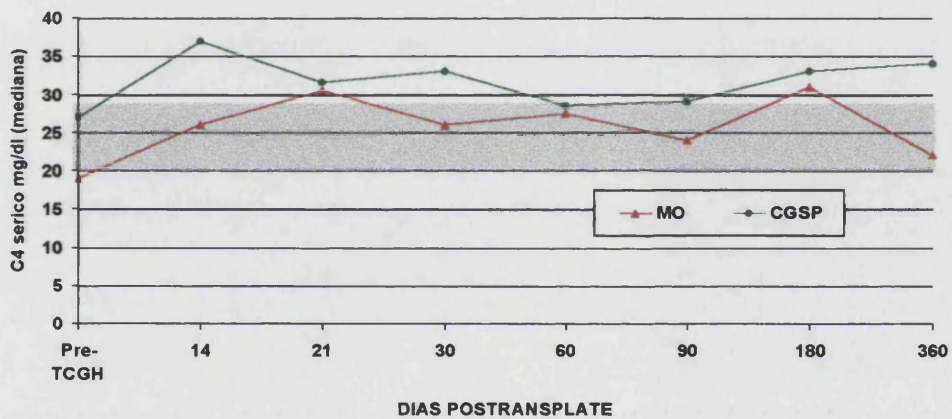


**FIGURA 20**  
**CA MAMA ALTO RIESGO. TAMO vs TCSP**

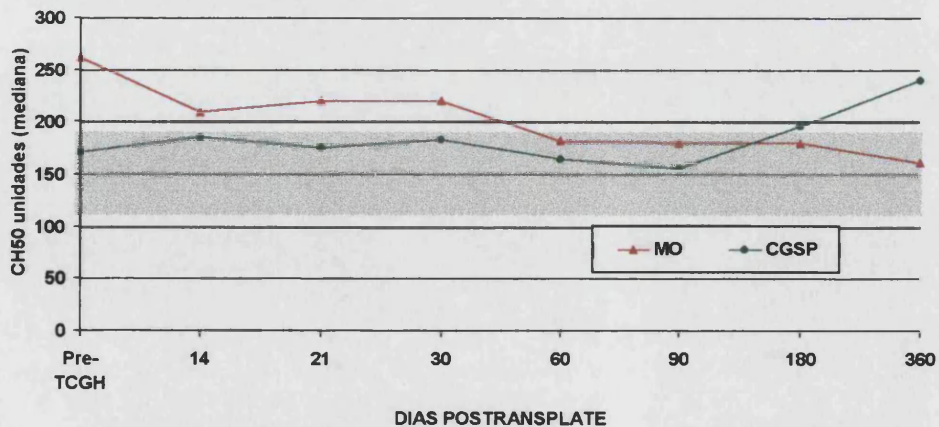
**A. EVOLUCION DE LOS NIVELES SERICOS DE C3**



**B. EVOLUCION DE LOS NIVELES SERICOS DE C4**

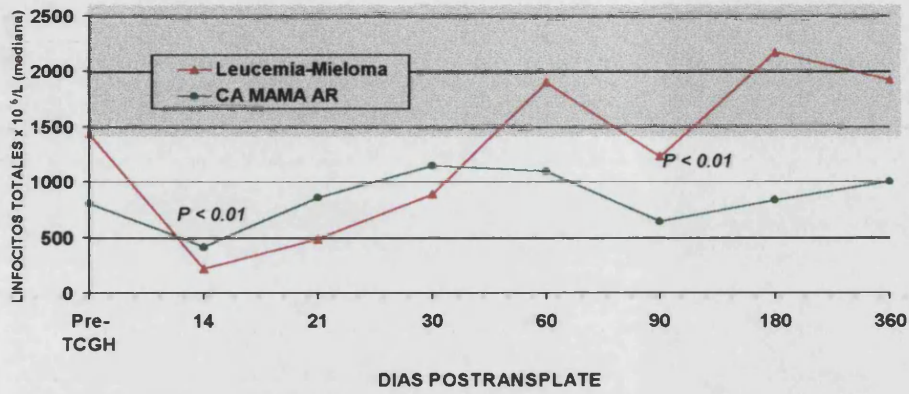


**C. EVOLUCION DE CH50**

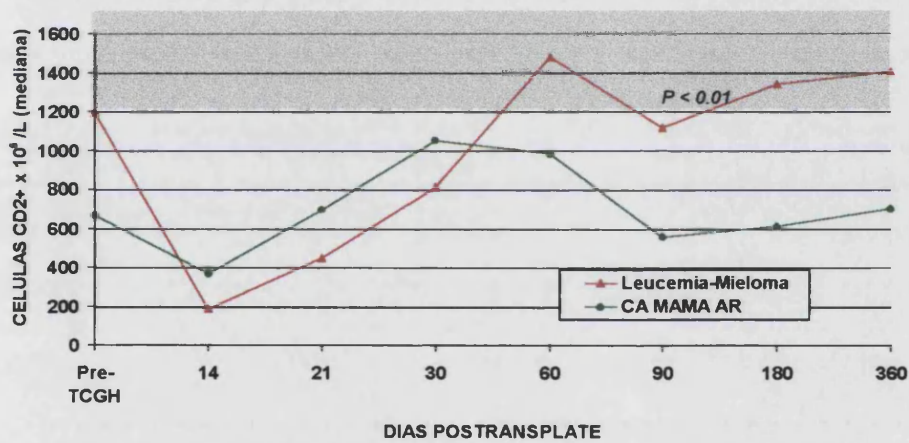


**FIGURA 21**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

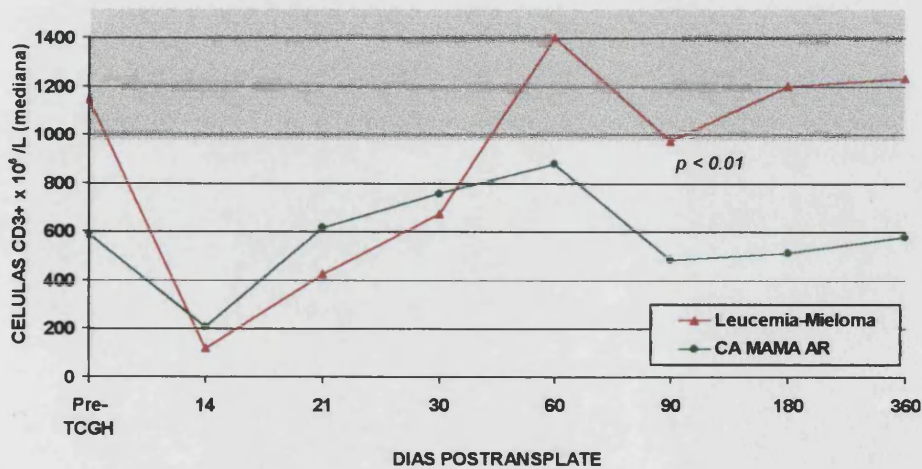
**A. EVOLUCION DE LINFOCITOS TOTALES**



**B. EVOLUCION DE CELULAS CD2+**

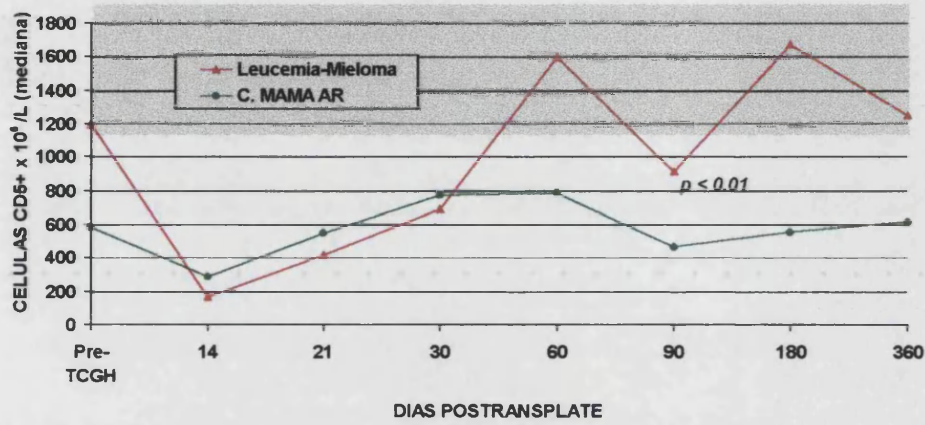


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3+**

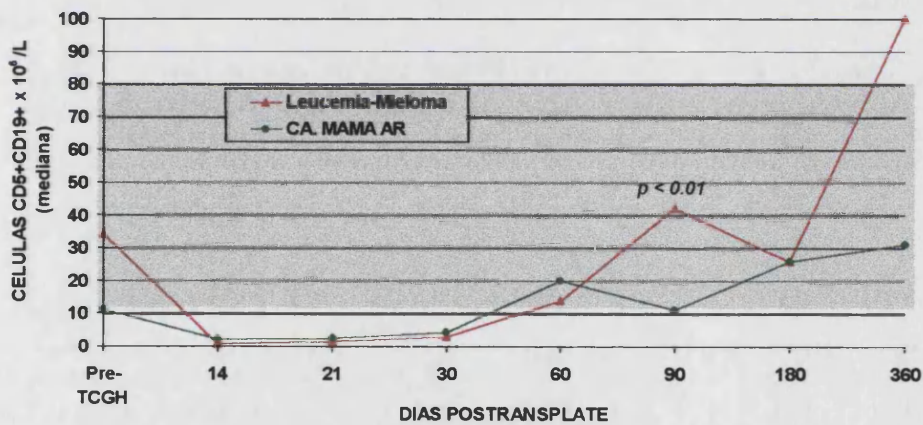


**FIGURA 22**  
**RECUPERACION IMMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

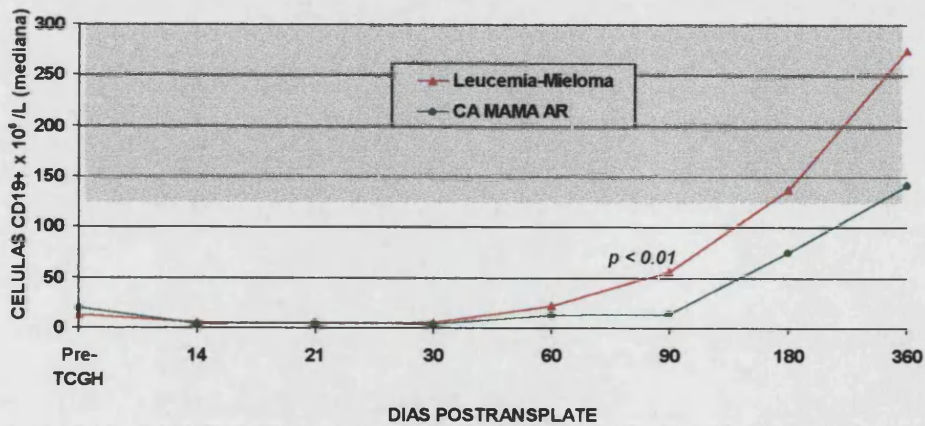
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD5+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD5+CD19+**



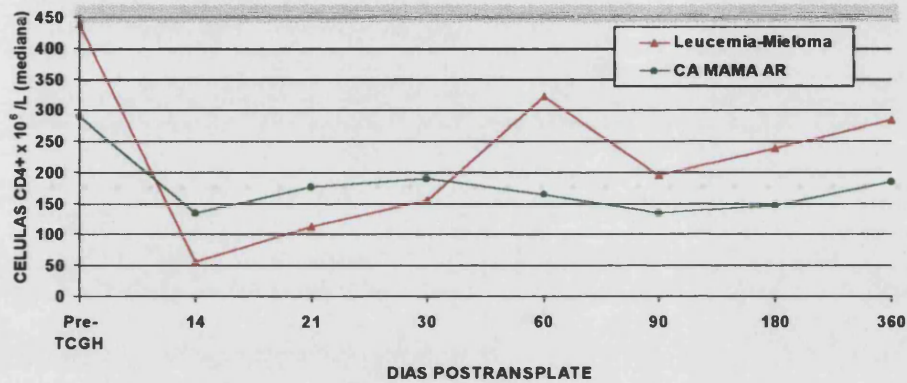
**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD19+**



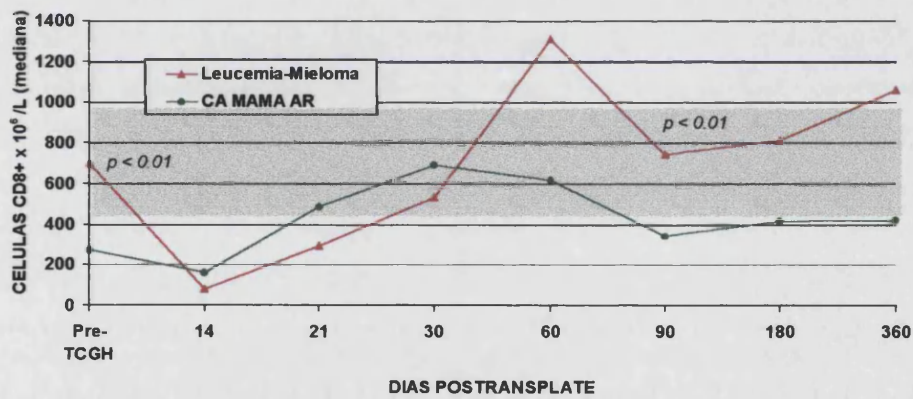


**FIGURA 23**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

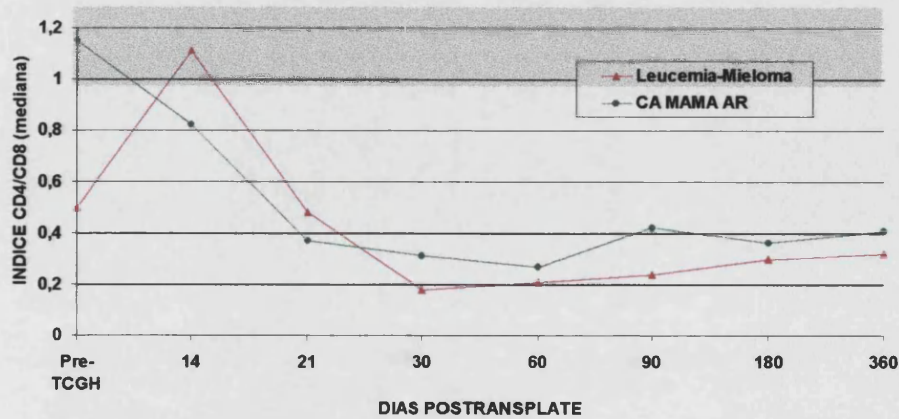
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD4+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD8+**

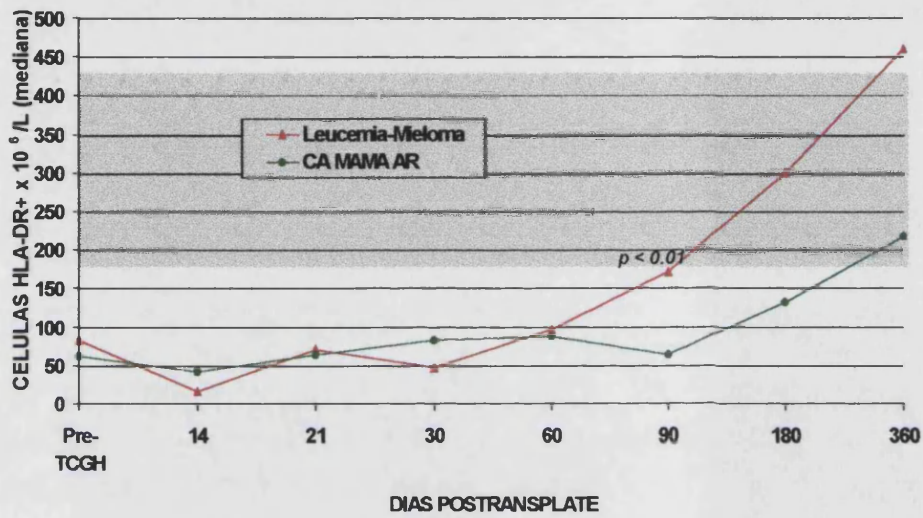


**C. EVOLUCION DEL INDICE CD4/CD8**

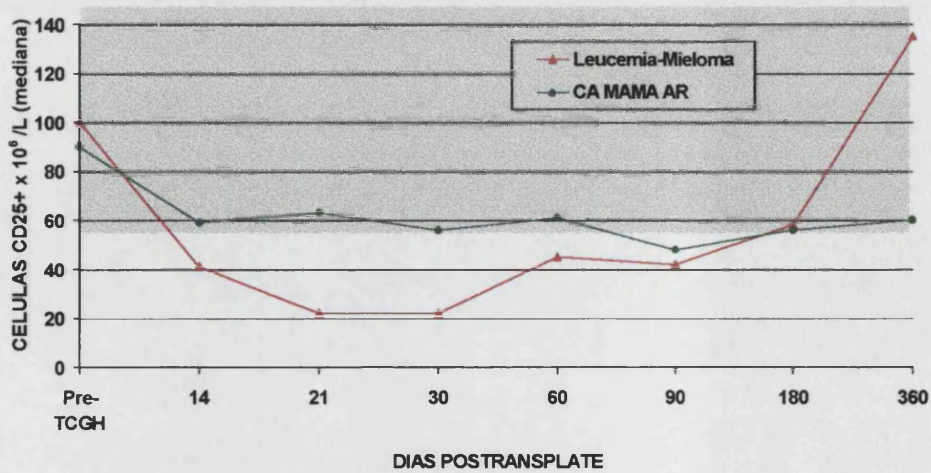


**FIGURA 24**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

**A. EVOLUCION DE LA POBLACION HLA-DR+**

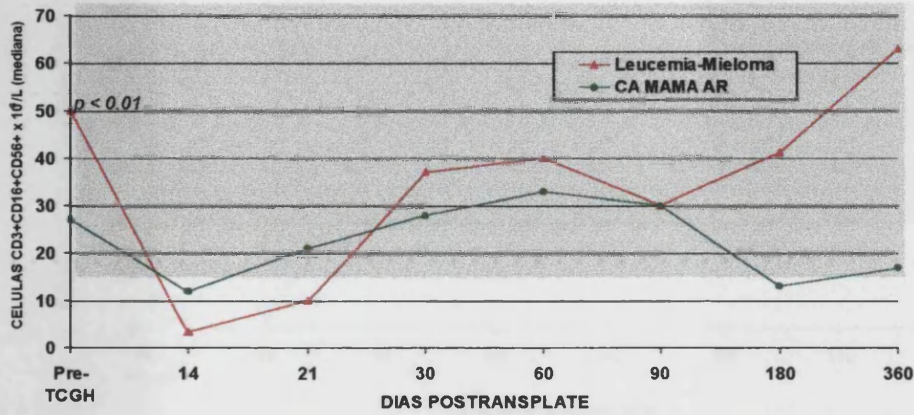


**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD25+**

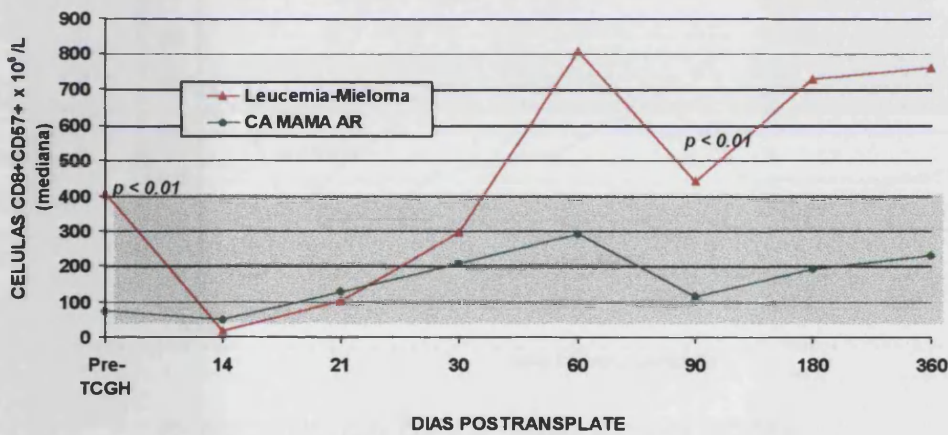


**FIGURA 25**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

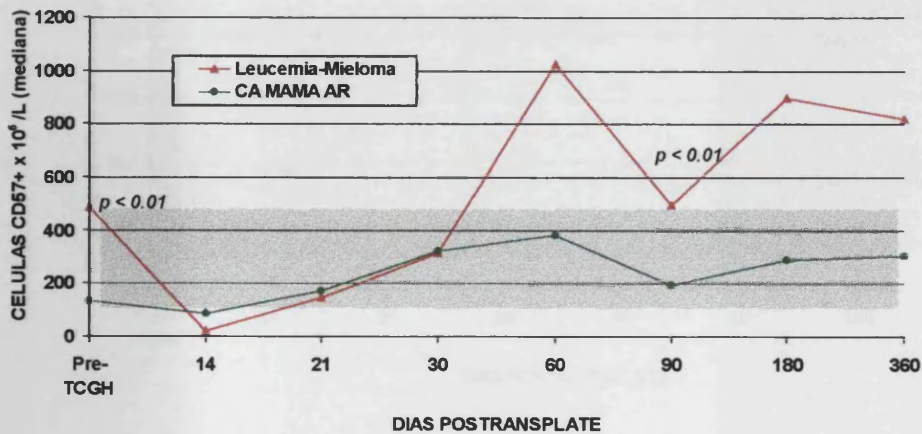
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3+CD16+CD56+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD8+CD57+**

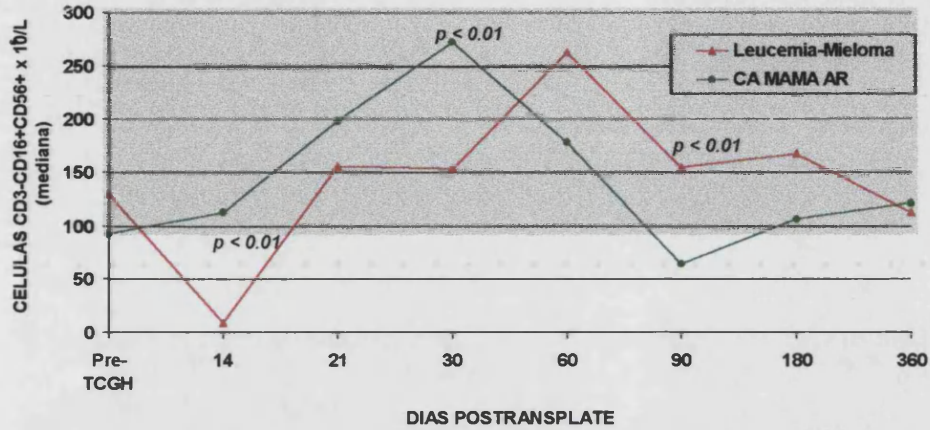


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD57+**

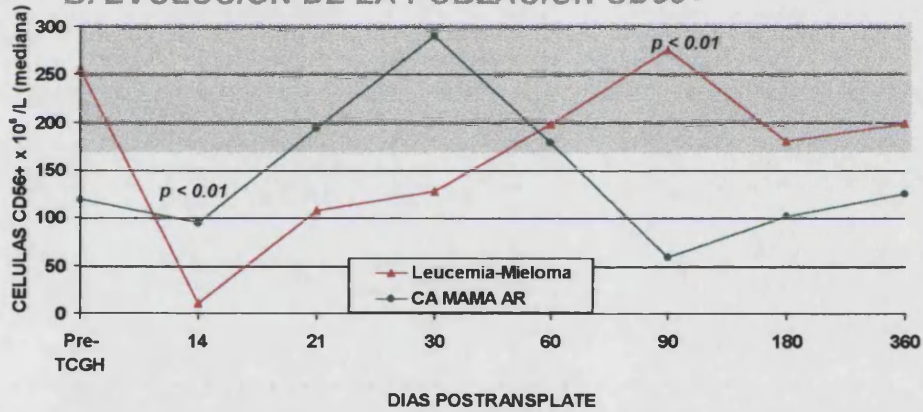


**FIGURA 26**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

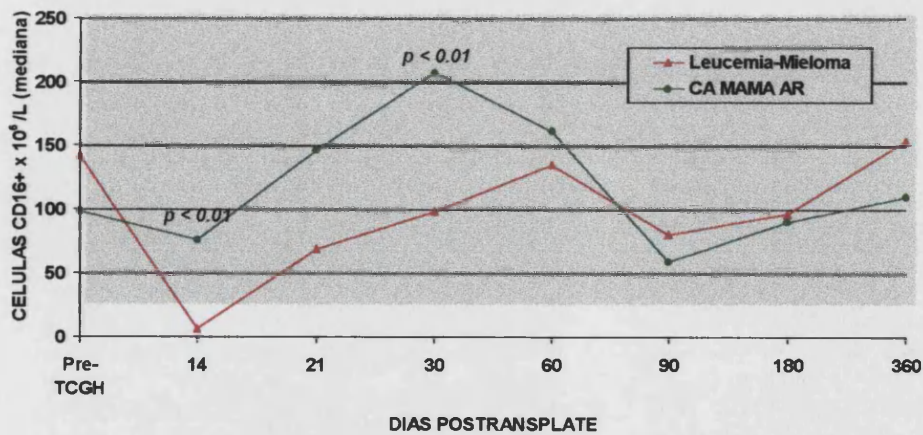
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD3-CD16+CD56+**



**B. EVOLUCION DE LA POBLACION CD56+**

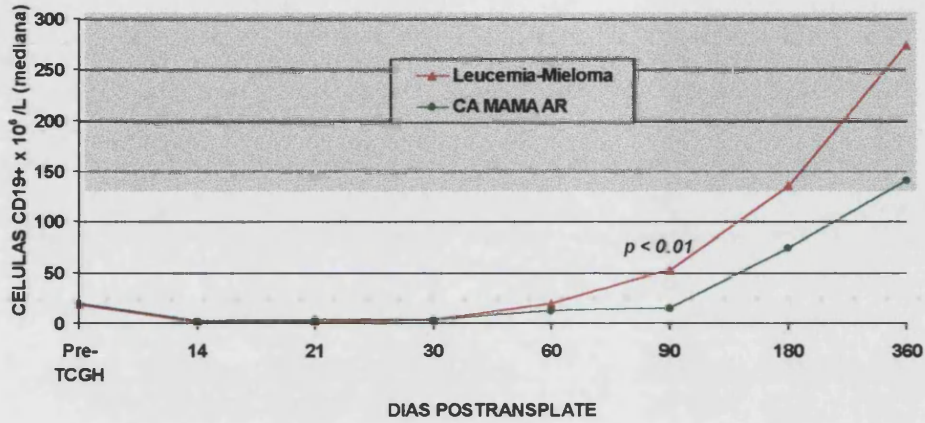


**C. EVOLUCION DE LA POBLACION CD16+**

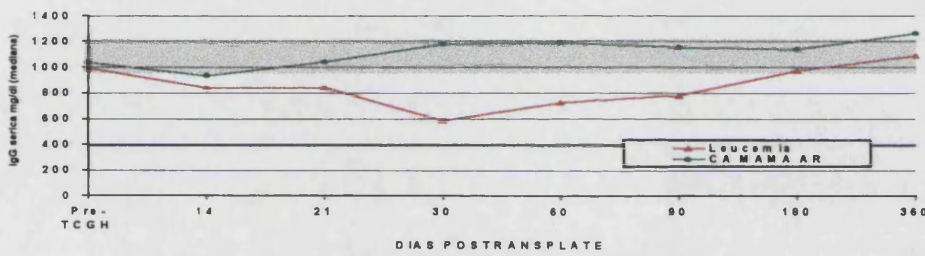


**FIGURA 27**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR.**

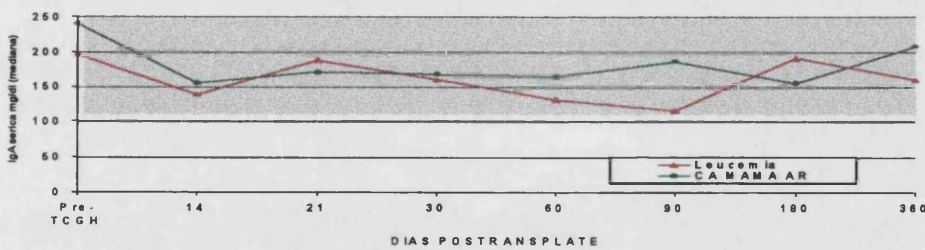
**A. EVOLUCION DE LA POBLACION CD19+**



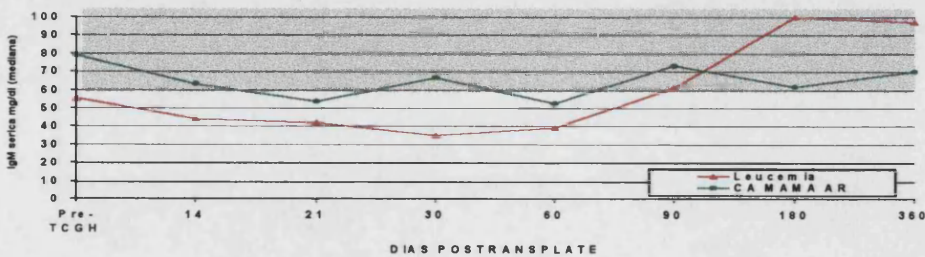
**B. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgG**



**C. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgA**

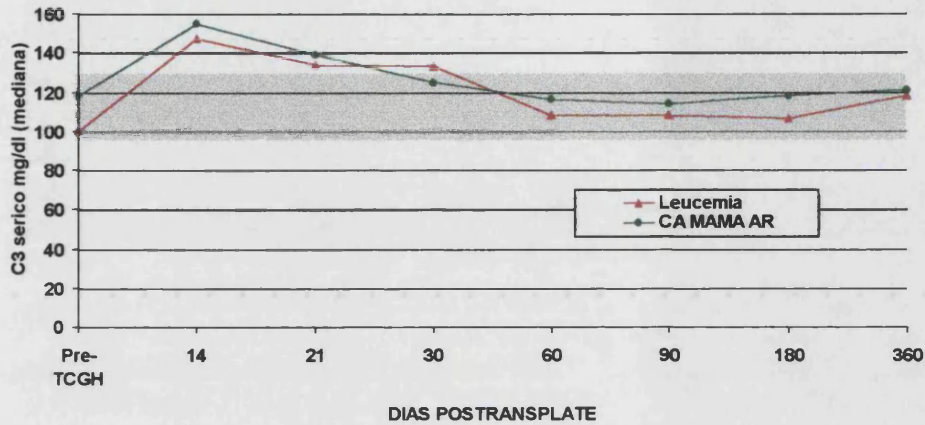


**D. EVOLUCION DE NIVELES SERICOS DE IgM**

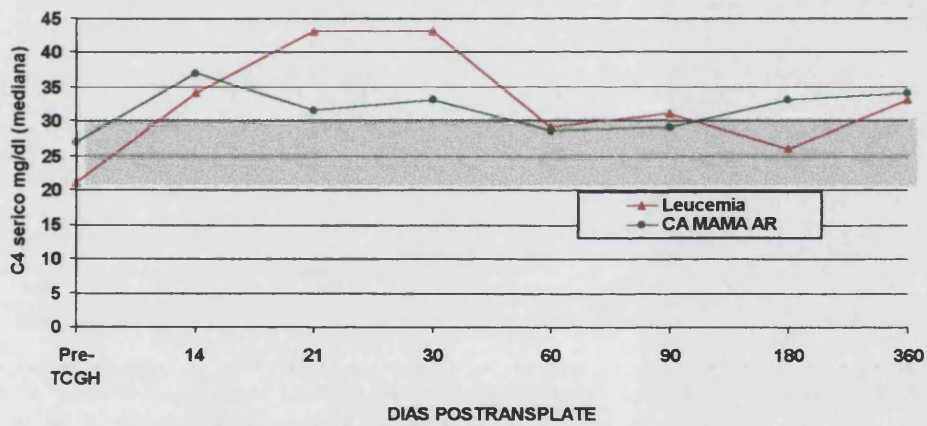


**FIGURA 28**  
**RECUPERACION INMUNE TRAS TCSP EN NEOPLASIAS**  
**HEMATOLOGICAS COMPARADO CON CA MAMA AR**

**A. EVOLUCION DE LOS NIVELES SERICOS DE C3**



**B. EVOLUCION DE LOS NIVELES SERICOS DE C4**



**C. EVOLUCION DE CH50**

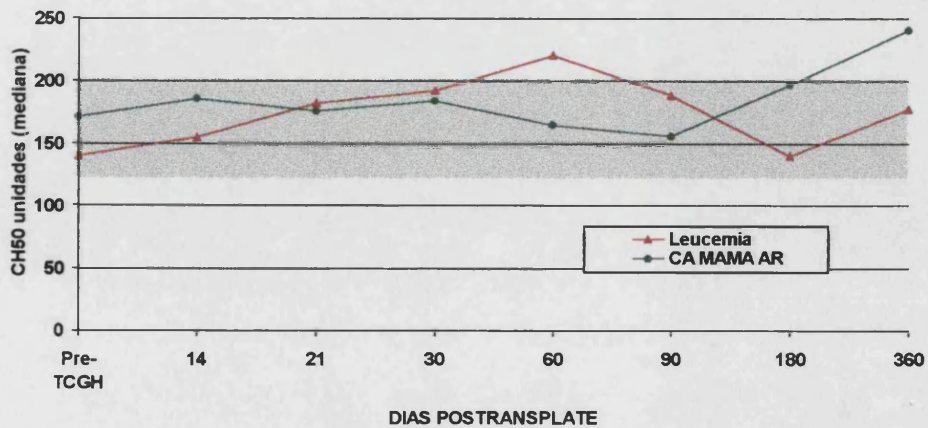
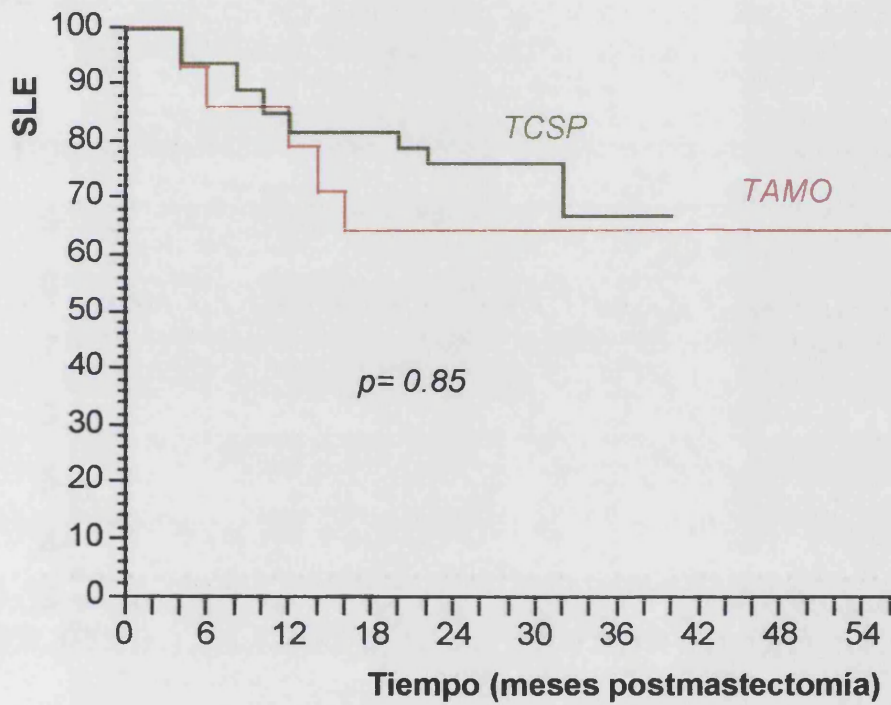


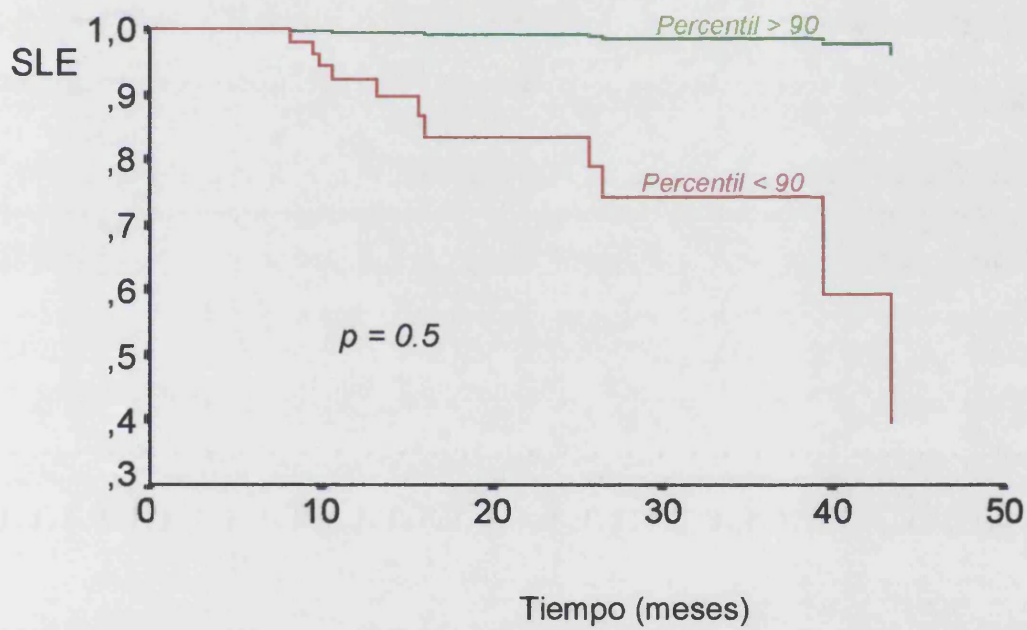
Figura 29

**Carcinoma de mama de alto riesgo de recaída**  
**Supervivencia libre de enfermedad desde mastectomía**  
**TAMO vs TCSP**  
**Método Kaplan-Meier**



**Figura 30**

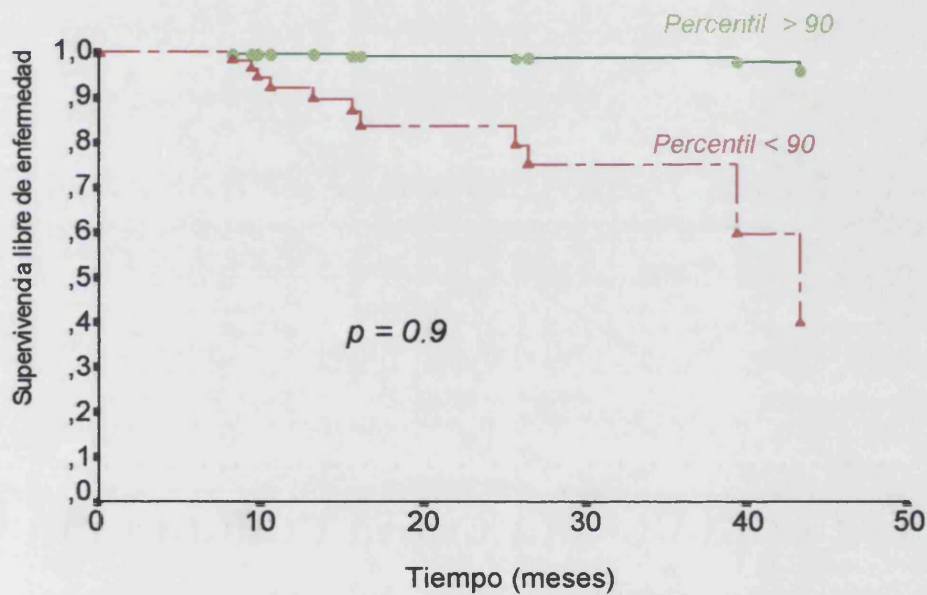
**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD3-CD16+CD56+ en el día +30 postrasplante**





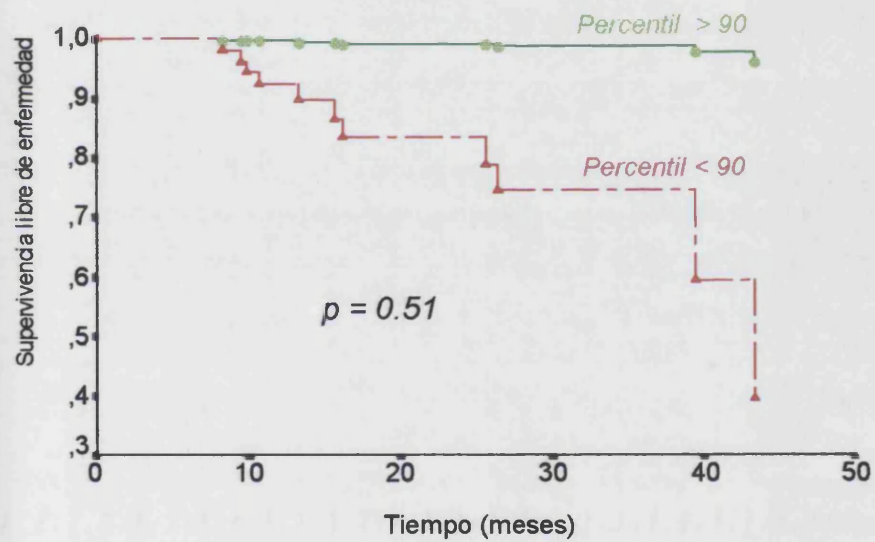
**Figura 31**

**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD16+ en el día +30 postrasplante**



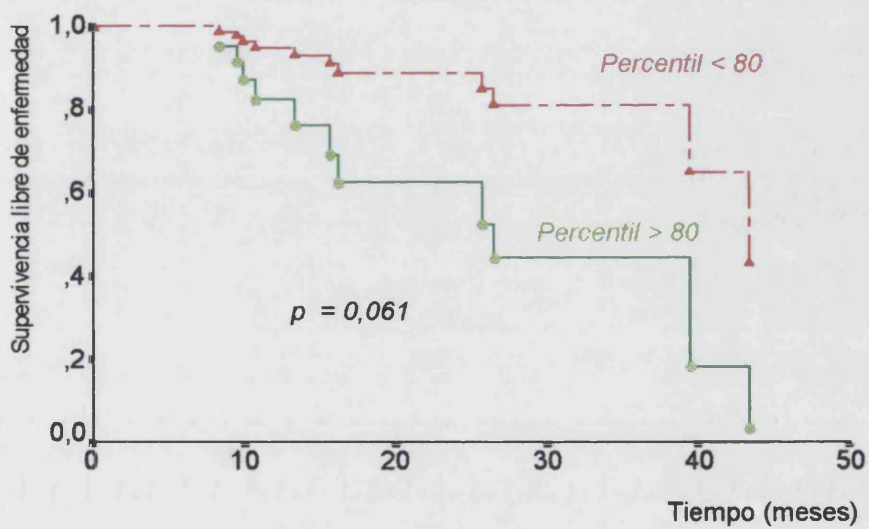
**Figura 32**

**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD56+ en el día +30 postrasplante**



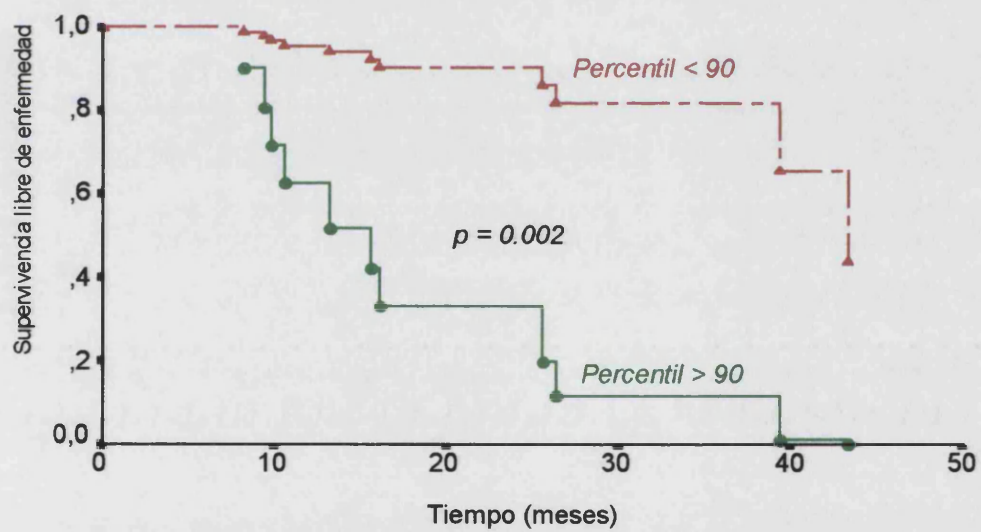
**Figura 33**

**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD3+CD16+CD56+ en el día +30 postrasplante**



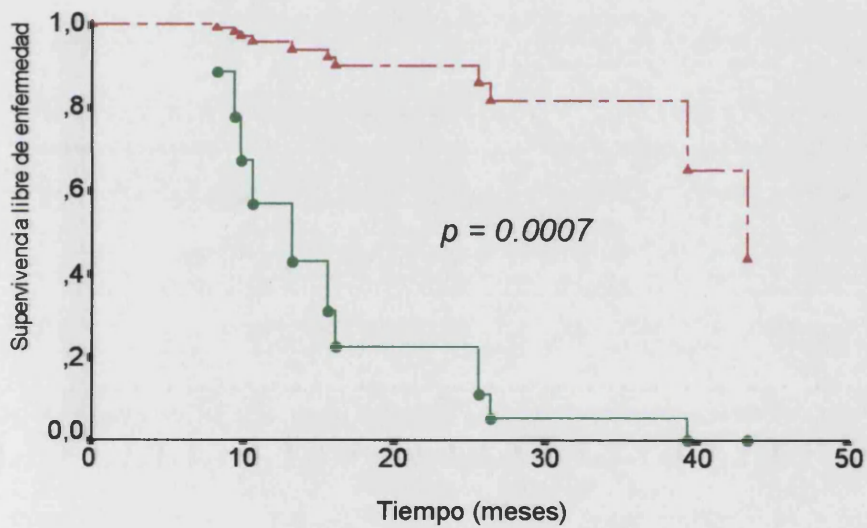
**Figura 34**

**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD3+CD16+CD56+ en el día +30 postrasplante**



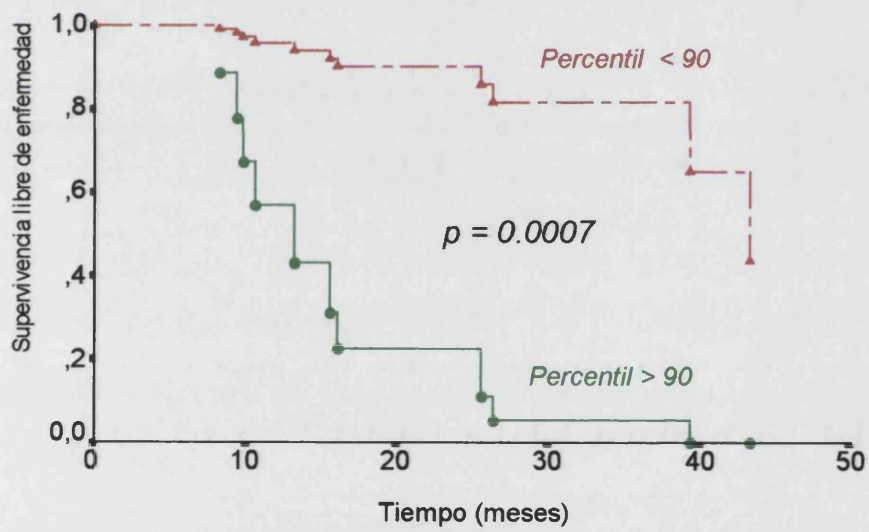
**Figura 35**

**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD8+CD57+ en el día +30 postrasplante.**



**Figura 36**

**Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída tratadas con TCSP, en función del nivel de la población CD57+ en el día +30 postrasplante.**



## VI. DISCUSION

## VI. DISCUSION

La reconstitución del sistema inmunitario postrasplante de células germinales hematopoyéticas es imprescindible para alcanzar una supervivencia prolongada. El periodo de riesgo durante el cual el paciente sometido a TCGH está expuesto a sufrir infecciones que comprometen la vida es prolongado, debido a la lenta recuperación de las cifras absolutas y del funcionalismo linfocitario. La recuperación completa puede tardar varios años. Incluso en pacientes que no llegan a padecer infecciones, pueden detectarse de forma prolongada anomalías en la actividad funcional "in vitro" de los linfocitos.

El conocimiento limitado de los mecanismos de diferenciación linfoide así como el carácter multifactorial de la patogenia de la inmunodeficiencia secundaria al TCGH, han dificultado el análisis de las bases celulares y moleculares de la misma, determinando que a pesar de los estudios realizados persistan importantes incógnitas.

La mayor parte de los estudios de recuperación inmune postrasplante se han realizado en trasplante alogénico, situación en donde la presencia de diversos factores, puede dificultar la interpretación de los resultados.

Entre otras implicaciones, el conocimiento detallado del patrón de recuperación inmune postrasplante de células germinales de médula ósea o de sangre periférica, puede permitir una actuación más selectiva y eficaz con la intención acelerar esta recuperación con algún método de inmunoterapia adoptiva.



La destrucción de la mayor parte de las células que componen el sistema inmune por la quimio-radioterapia obliga a que este sistema se recupere fundamentalmente a partir de las células infundidas. La lenta reconstitución inmune resulta de la propia complejidad de la ontogenia linfoide, así como de la posible interferencia en dicho proceso de otros factores. La inmunodeficiencia está determinada primariamente por la quimio-radioterapia empleadas para el acondicionamiento del paciente, que destruye el sistema inmune. Es improbable que la recapitulación del proceso de diferenciación del sistema inmune después del TCGH sea comparable a la ontogenia fisiológica por varias razones, entre las que se incluyen las siguientes:

1. El timo, órgano en el que tiene lugar la mayor parte de los procesos de diferenciación y maduración de las células T, puede encontrarse según la edad del paciente en estado de involución avanzado, siendo además lesionado por el propio tratamiento de acondicionamiento o por la presencia de enfermedad injerto contra huésped en el caso del trasplante alogénico. La diferenciación linfoide T debe llevarse a cabo en localización extratímica, tal como ocurre en una pequeña proporción de forma fisiológica.
2. La utilización de fármacos inmunosupresores, especialmente la administración de ciclosporina A, es el método más utilizado para la prevención de la EICH aguda. Junto al propio efecto inmunosupresor de la ciclosporina, ésta podría afectar a las etapas tempranas de la diferenciación de las células T, como apoyan estudios de experimentación en modelos animales.

3. Se ha demostrado que la enfermedad injerto contra huésped crónica es un proceso que se asocia con una prolongación de la inmunodeficiencia, aunque se desconoce la patogenia que relaciona ambos fenómenos.

4. Se ha descrito que la presencia de infección por citomegalovirus con o sin expresión clínica, contribuye a prolongar la inmunodeficiencia.

En el presente estudio sobre una población adulta, no se ha intentado determinar el papel del timo en la recuperación inmune. Sin embargo, la ausencia de otros factores asociados al TCGH alogénico, permite relacionar de forma más exacta, el patrón de recuperación, con el tipo de CGH reinfundido.

A pesar de que en el presente estudio no se han realizado estudios funcionales, y ciertamente existe un periodo de retraso entre la recuperación cuantitativa de las subpoblaciones linfocitarias y su actividad funcional, existen numerosos estudios que permiten admitir este paralelismo y su utilización como método de aumentar el conocimiento en este área.

Hasta la actualidad, se ha utilizado el TCSP casi exclusivamente por su más rápida capacidad de recuperación hematológica mieloide. Sin embargo, un estudio retrospectivo en pacientes con linfoma no Hodgkin de grado intermedio, ha sugerido que el TCSP se puede asociar a una supervivencia libre de enfermedad más prolongada que tras TAMO<sup>156</sup>. Se encuentran en marcha un estudio multicéntrico prospectivo en Estados Unidos, con el fin de determinar si se confirma el anterior resultado. En el caso de confirmarse, la reducción de la recaída tras TCSP podría ser debida a una reconstitución inmune más efectiva o a la infusión de un menor número de células tumorales ocultas.

En el presente estudio se ha analizado comparativamente el ritmo y patrón de recuperación tras TCSP y TAMO con el fin de determinar si existen estas diferencias y estudiar la posible influencia en la recaída de la enfermedad.

### ***VI.1. Estudio comparativo de la recuperación inmune tras TAMO y TCSP:***

La célula germinal de sangre periférica está reemplazando progresivamente a la médula ósea para el rescate hematológico tras dosis altas de quimio-radioterapia en el tratamiento de neoplasias sólidas y hematológicas. Esta sustitución se ha producido al demostrarse una recuperación hematológica de las tres series mieloides más rápida y una estabilidad del injerto hemopoyético a largo plazo similar al obtenido con la médula ósea.

El procedimiento de movilización y recolección de las CGSP, motiva un aumento del número de células linfoides en el injerto y un cambio del estado funcional de algunas subpoblaciones <sup>167</sup>. La CGH de sangre periférica obtenidas para trasplante, contiene como media aproximadamente 10 veces más linfocitos que la recolección habitual de médula ósea <sup>168</sup>. De hecho, los protocolos de aféresis utilizados para la recolección de CGH de sangre periférica son prácticamente idénticos a los utilizados para la recolección de linfocitos. Este hecho hizo prever una recuperación inmune diferente en el TCSP<sup>169</sup>. Posteriormente, diversos estudios han analizado la recuperación inmune tras TCSP autólogo <sup>46,47,170,171</sup>, detectando una rápida recuperación. Sin embargo,

sólo algunos han comparado ambos tipos de trasplante mediante estudios de fenotipo inmune <sup>172,173</sup> y/o estudios funcionales <sup>174,175</sup>. Estos estudios parecen confirmar una más rápida recuperación inmune tras TCSP.

Scheid y colaboradores <sup>170</sup>, estudiaron la recuperación inmune tras TCSP en 5 pacientes con diagnóstico de LNH de alto grado de malignidad (2 linfoma linfoblástico y 3 LNH-B de alto grado sin detallar histología) con criterios de alto riesgo en base al Índice Pronóstico Internacional. El tratamiento incluyó una inducción con VAPEC-B, tres ciclos de consolidación con ifosfamida en dosis altas y Ara-C, seguido de tratamiento intensivo con esquema BUCY en 1ª RC. Todos los pacientes presentaron una rápida recuperación de las cifras de linfocitos ( $1 \times 10^9/l$  en 10-13 días), inversión del índice CD4/CD8 de forma prolongada (durante más de 6 meses), e incremento transitorio de células CD56+ y CD16+ entre los días 14 al 70 postrasplante, con una rápida recuperación de la actividad NK y actividad LAK inducible que coincide en el tiempo con mayores cifras absolutas de CD56 y CD16. No se detectaron modificaciones en el nivel de células CD25.

El estudio de Henon y colaboradores <sup>172</sup>, analiza de forma retrospectiva, la recuperación inmune hematológica e inmune en 40 pacientes (20 pacientes por grupo) mediante un estudio fenotípico limitado (marcaje con CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20). La recuperación de la cifra de linfocitos totales fue significativamente más rápida en el grupo de TCSP. Sin embargo, no se

detectaron diferencias en el patrón de recuperación de las poblaciones estudiadas.

El estudio de Roberts y colaboradores<sup>173</sup>, con un análisis de poblaciones más amplio, muestra una diferencia estadísticamente significativa en la rapidez de recuperación de los linfocitos y todas las subpoblaciones estudiadas ( CD3+, CD4+, CD8, células B y NK). El patrón de más rápida recuperación de la población CD8+ respecto a CD4+, es similar en ambos grupos. A pesar de que el número de pacientes en alguno de los grupos es escaso (7 pacientes en el grupo de TAMO, 49 en el de TCSP y 11 en el de TMO alogénico), el estudio multivariado mostró que los factores que influenciaron la recuperación inmune fueron el tipo de trasplante, el número de células mononucleares trasplantadas y el tipo de tratamiento de acondicionamiento.

En el estudio de Fegan y colaboradores<sup>175</sup>, se estudió de forma prospectiva la actividad LAK en 45 pacientes con neoplasias hematológicas, tras TAMO (N=10), TCSP (N=25) y TMO alogénico (N=10),. Se observó que esta actividad es significativamente más alta tras TCSP que tras TAMO o TMO alogénico, en todos los puntos estudiados hasta las 8 semanas postrasplante (2, 4, 6 y 8 semanas). Esta actividad se relacionó fundamentalmente con la población CD3-CD56+.

Diversos estudios han intentado analizar la causa de la rápida recuperación en sangre periférica postrasplante de las cifras absolutas y la actividad NK. En primer lugar un estudio de la actividad NK en sangre periférica de forma basal en individuos sanos, demostró que es normal mientras que en médula

ósea es baja<sup>176</sup>. Adicionalmente, se ha analizado el fenotipo y actividad citotóxica del producto de las aféresis para TCSP. Los resultados obtenidos en diversos estudios han sido contrapuestos. En el estudio de Verbik y colaboradores<sup>177</sup>, el nivel de citotoxicidad de la población mononuclear movilizada con GM-CSF y medida con ensayo de liberación de cromo, fue de bajo nivel. La incubación de estas células con citoquinas, aumenta la citotoxicidad<sup>178</sup>.

En un estudio más reciente<sup>167</sup>, en el que se analiza el producto obtenido tras movilización con ciclofosfamida y G-CSF y recolección con leucaféresis de gran volumen, se observó que contiene un gran número de células con fenotipo NK (CD3-CD56+) ( $42.1-212 \times 10^6/\text{Kg}$  peso), funcionalmente activas. El porcentaje de estas células y su actividad aumentaron durante la recolección en la mayoría de los casos. El pico de células CD3-CD56+ y el de células CD34+ coincidieron en el tiempo. La incubación del producto de las aféresis con interleukina-2 (10-1000 U/ml) durante 6-8 días, produjo una expansión de la población citotóxica de 3-5.4 veces, siendo la concentración de 100 U IL-2/ml la más adecuada para generar un gran número de células NK, sin afectar a las células CD34+.

Los niveles de actividad citotóxica detectados en el producto de las aféresis son mayores que los detectados en una recolección de MO en situación basal<sup>179</sup>, y podrían tener teóricamente actividad frente a las células tumorales presentes en el producto obtenido o una vez infundidas en el paciente.

En el presente estudio, se ha analizado de forma prospectiva la evolución de las cifras absolutas de un amplio número de marcadores linfocitarios: linfocitos

totales, células T (CD2+, CD3+) y subpoblaciones (CD4+, CD8+, CD3+CD16+CD56+, CD8+CD57+), células HLA-DR+, CD25+, células NK (CD3-CD16+CD56+, CD16+, CD56+), linfocitos B (CD19+), así como niveles de inmunoglobulinas y complemento séricos y tests cutáneos de inmunidad celular.

Se ha estudiado un grupo amplio de pacientes, con diferente diagnóstico y tratamiento de acondicionamiento (N= 232) que puede permitir observar una tendencia general, y un subgrupo de pacientes homogéneo en términos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de intensificación (N= 82) para intentar establecer si la recuperación de ciertas poblaciones tiene impacto en la frecuencia de recaída de la enfermedad. Esta homogeneidad intenta excluir que las diferencias en las recuperaciones se deban a otros factores como pueden ser los tratamientos de inducción, acondicionamiento o postrasplante.

Se ha escogido el grupo de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída por ser éste el más numeroso y homogéneo en cuanto al tratamiento recibido. Este grupo tiene adicionalmente el interés de que al ser una neoplasia extrahematológica, no existe una inmunodepresión previa inducida por la propia enfermedad, aunque sí la debida al tratamiento quimioterápico previo.

Los resultados de la comparación de la recuperación inmune tras TAMO o TCSP, indican que existen diferencias de tipo cuantitativo y cualitativo, tanto en el grupo global de pacientes como en el de carcinoma de mama de alto riesgo de recaída.

En el TCSP se recuperan de forma significativamente mas rápida los linfocitos totales, los linfocitos T y las subpoblaciones CD8+, CD8+CD57+, CD57+

y poblaciones con fenotipo NK. Estas últimas alcanzan niveles normales en el día 14-21 postrasplante y, en gran número de pacientes, mantiene niveles superiores a la media normal, durante 2-3 meses. En las poblaciones linfocitarias señaladas, el grupo de MO presenta un patrón de recuperación similar aunque con niveles absolutos inferiores y de forma retrasada. Este paralelismo no se observa en las poblaciones con fenotipo NK. En el TCSP, se produce una recuperación superior al nivel pretrasplante e incluso, en una parte de los casos, superior a los controles normales. Tras TAMO, el nivel no supera en ningún momento el valor pretrasplante y no alcanza niveles normales al finalizar el periodo de estudio.

La cifra absoluta y proporcional de células CD2+ tiende a la normalización ( $> 1 \times 10^9/l$ ) entre el primer y segundo mes en el TCSP, mientras que el grupo de TAMO no alcanza esta cifra durante el año de seguimiento.

Los linfocitos T tienen en su gran mayoría maduración funcional expresado por la presencia de CD3+. La presencia en superficie de este complejo molecular indica que las células expresan ya el receptor para antígeno (TCR) y son por tanto de fenotipo maduro. Otros estudios, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen un determinante formado por las cadenas alfa y beta del TCR, han permitido demostrar que la mayoría de las células T presentan este tipo de receptor y no a la subpoblación que expresa el dímero gamma-delta.

En cuanto a las subpoblaciones CD4+ y CD8+, se ha observado que ambas tienen un ritmo de incremento mayor en el grupo TCSP. Sin embargo, en el caso de las CD4+ esta diferencia no es significativa. El incremento es escaso y



alcanza en un nivel que representa el 50% de los niveles pretrasplante que ya son infranormales. Por el contrario, se produce un incremento rápido de las células CD8+. El retraso de la recuperación de la cifra de linfocitos CD4+ respecto a los linfocitos CD8+, tiene como resultado un cociente CD4/CD8 invertido de forma prolongada en ambos grupos, que se mantiene al finalizar el primer año.

Aunque la reconstitución inmune postrasplante tiene algunas características del desarrollo linfoide normal, en la recuperación T no parece seguir un patrón similar, especialmente en lo que se refiere a la subpoblación CD4+. La producción de este tipo de linfocitos, independientemente del origen de la CGH, está reducida en el periodo postrasplante de forma contraria a lo que ocurre en el recién nacido<sup>180</sup>. Asimismo, se han descrito diferencias en el fenotipo de estas células CD4+ que aparecen postrasplante, respecto a los que aparecen durante la ontogenia linfoide normal. En el recién nacido, se observa una mayor proporción de células que expresan CD45RA, L-selectin, CD29<sup>débil/-</sup>, CD11<sup>débil/-</sup> y CD28+.

La edad del paciente es de importancia por su relación con la involución del timo que se produce en la adolescencia. Existe una relación inversa entre la edad del paciente y el recuento de linfocitos T CD4+ a los 6 meses postrasplante.<sup>93</sup> La recuperación inicial tras la administración de quimioterapia mieloablativa se produce a expensas de la linfocitos CD4+CD45RO+ (forma isómera de bajo peso molecular de CD45R). En pacientes que mantienen funcional el timo, esta población es sustituida por la isoforma CD45RA+. Por el contrario, las células T

CD4+ producidas a nivel extratímico expresan casi exclusivamente la isoforma CD45RO+.

En el estudio presente la edad no es la causa del diferente ritmo de recuperación de las cifras de linfocitos entre el grupo de TAMO y TCSP, ya que no existen diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, no se ha estudiado el patrón de la isoforma de CD45 (RA o RO).

Por otra parte, tanto en el grupo de TAMO como en el de TCSP, la mayor parte (más de un 80%) de los linfocitos CD8+ coexpresan CD57+ (HNK1+). Mediante la técnica de doble marcaje utilizadas en este estudio, se ha podido establecer que, en esta situación la expresión de CD57 no indica la presencia de células NK sino se trata de linfocitos T maduros.

La subpoblación CD8+CD57+, se detecta en pequeñas proporciones (menos de un 10%) en sujetos normales. La expansión de esta población de linfocitos se ha comunicado en el periodo postrasplante alogénico y/o asociado a infecciones persistentes o recurrentes por citomegalovirus o por VIH <sup>155,156,157,158,181,182,183,184</sup>. Algunos estudios han relacionado esta anomalía fenotípica postrasplante con la mayor edad de los pacientes. Por otra parte, no se ha demostrado correlación entre el incremento de estas células y la incidencia de EICH, lo que concuerda con la observación en el estudio actual de su elevación en pacientes en trasplante autólogo.

Estudios *in vitro*, han demostrado que estas células ejercen una actividad supresora de la proliferación B y T inducida por mitógenos <sup>144</sup>, lo que sugiere su papel de regulación de la reactividad linfoide frente a antígenos virales o de un

estado de tolerancia inmune en pacientes trasplantados. No se conoce con claridad su mecanismo de acción y su posible efecto inhibitor de otras funciones inmunes.

En un estudio reciente, se ha comunicado el papel de esta subpoblación de linfocitos de sangre periférica en la inhibición de la actividad citolítica mediada por células, no restringida por la presencia de moléculas del CMH, y mediado por la liberación de un factor soluble con un coeficiente de sedimentación inferior a 1S, que inhibe la unión de concanavalina A <sup>148</sup>. El 95% al 100% de esta población expresa los antígenos pan-T, CD2+, CD5+, CD7+ y el complejo CD3-TCR $\alpha\beta$ . En contraste, la gran mayoría de estas células (92%-93%), no expresan el marcador de células NK, CD56, lo cual concuerda con el hecho de que estas células no exhiben actividad NK espontánea.

En contraste con los estudios anteriores, aunque no mutuamente excluyente, otro estudio in vitro demostró que células CD8+CD57+, pueden actuar como precursores de células LAK en estudios de estimulación con IL-2 <sup>159</sup>. Asimismo, se ha comunicado la expansión de esta población tras TMO alogénico, mostrando una relación con una baja incidencia de recaída e infección por citomegalovirus <sup>185</sup>. Sin embargo, en este estudio, la asociación de esta población con la presencia de infección por CM, y la ausencia de estudios funcionales, no permite asignar a esta población una actividad citotóxica.

En conjunto, en relación los linfocitos CD8+CD57+ detectados en SP, en el periodo postrasplante alogénico, existen grandes dudas acerca de su posible

actividad citolítica espontánea. Por contra, parecen inhibir la actividad citolítica celular HLA-específica y antígeno inespecífica, la síntesis *in vitro* de inmunoglobulinas. Posiblemente interaccionan con las células efectoras en un paso común del proceso citolítico, independiente del reconocimiento del antígeno.

En cuanto al significado de una reducción de la SLE en relación con la elevación de la población CD8+CD57+, dado que este estudio era exploratorio y no pretendía contestar esta pregunta, no es posible determinar si esta elevación facilita la recaída al inhibir la actividad citotóxica antitumoral, o bien, es un efecto, es decir, que identifica a una subpoblación de pacientes con enfermedad quimioresistente. Es necesario, un estudio prospectivo, para validar esta correlación e intentar determinar su intervención en la patogenia de la recaída.

Se ha sugerido que las células T maduras infundidas con el inoculo, contribuyen a dicha elevación ya que ésta no ocurre en los receptores de médula ósea con deplección T<sup>186</sup>.

En ambos grupos, y sin una diferencia significativa, se ha detectado a partir del 3º mes, un incremento de células T que expresan HLA-DR, que sólo alcanza niveles normales al final del 1º año de seguimiento. Este marcador se expresa generalmente, en células T maduras tras la estimulación antigénica o mitogénica. En el periodo postrasplante sin embargo, el incremento de esta población no se asocia a un incremento de otro marcador de activación linfocitaria como es el receptor de la interleukina-2 (CD25), que se mantiene durante todo el periodo de estudio en los límites inferiores de la normalidad. Esta disociación, ya

descrita y confirmada en este estudio, sugiere que la presencia de HLA-DR es en realidad un marcador de inmadurez celular T y justifican las alteraciones funcionales detectadas *in vitro* con respuesta proliferativa T deprimida frente a estímulos mitogénicos, tales como lectinas o el anticuerpo monoclonal anti-CD3. Esta hiporrespuesta se mantiene cuando las células son estimuladas a través de la molécula CD2, la cual representa una vía alternativa de transducción de señales activadoras, con una importancia fisiológica en etapas tempranas de la ontogenia linfoide.

La alteración de la respuesta proliferativa a los distintos estímulos mitogénicos no se normaliza completamente en presencia de interleukina-2 exógena, lo que indica que además de reducción de la síntesis de IL-2 detectada en estos pacientes, existen otros factores que contribuyen a la patogenia de la inmunodeficiencia. Entre estos factores se incluye la ausencia de expresión receptores para IL-2 (CD25) tras la estimulación mitogénica *in vitro*. Esto sugiere que una parte de las células circulantes fenotípicamente maduras presenta una alteración en la respuesta que afecta algún paso metabólico previo a la expresión de CD25.

Posiblemente el aspecto diferencial más evidente entre la recuperación post-TAMO y post-TCSP, reside en la recuperación de las subpoblaciones con fenotipo NK. Esta rapidez de recuperación puede ser el resultado de una diferente biología de las células obtenidas tras movilización que hace que proliferen más rápido una vez infundidas, o bien, que sea debido a la infusión del elevado número de células NK presentes en el producto que se infunde<sup>167</sup>. No se

conoce bien cuál es el mecanismo por el que la movilización induce este aumento de células con fenotipo y actividad NK.

Reittie y colaboradores<sup>187</sup>, estudiaron 43 pacientes con neoplasias hematológicas, tratados con trasplante de médula ósea alogénico con deplección T, TAMO no depleccionado o quimioterapia convencional, con la intención de investigar los mecanismos de generación de células NK activadas, en qué situaciones aparecen y que fenotipo expresan. Observaron que aparecen tras TMO-alogénico con deplección T y tras TAMO, y no tras quimioterapia. Por tanto, su producción no parece tener relación con el proceso de deplección T, ni parece causado por la estimulación por aloantígenos administrados con el soporte hematológico ya que no existían diferencias en el número de unidades de sangre o plaquetas administrado. Tampoco se detectaron diferencias en la reactivación o infección viral. La actividad killer está mediada fundamentalmente por células CD3-CD16+, aunque también existe actividad killer ejercida por células CD3+CD16-.

El fenómeno de activación de la actividad killer postrasplante parece representar una disfunción inmune tras la repoblación del sistema inmune con subpoblaciones linfoides derivadas exclusivamente de sangre o de médula ósea.

A pesar de que este fenómeno se produce también tras TAMO, los resultados del estudio actual indican que es mucho más evidente tras TCSP, posiblemente porque la movilización y recolección mediante leucaféresis, inician un mecanismo de producción y activación celular.

A partir de los resultados de este estudio y los estudios funcionales publicados por diversos grupos se han propuesto al menos 2 interpretaciones en cuanto al mecanismo que determina el bloqueo metabólico de las células T. Una posibilidad es que las células que no expresan IL-2R tras la estimulación, estén sometidas a la inmunorregulación mediada por células T supresoras o monocitos. En cuanto a estas células T se ha descrito su actividad en algunos casos postrasplante, aunque no existen datos sobre su mecanismo de acción molecular. Por lo que se refiere a la supresión por células del sistema mononuclear fagocítico, se ha propuesto recientemente que pueden inhibir la respuesta mitogénica de las células T en algunos casos de trasplante a través de un incremento de la síntesis de prostaglandinas y en concreto de la PGE2.

Otra explicación alternativa es la posibilidad de que proporciones variables de células T circulantes CD3+ no hayan alcanzado, sin embargo, una maduración funcional completa, como consecuencia de la ontogenia anómala del sistema inmune. Esta hipótesis se apoya indirectamente en algunos estudios que demuestran una disminución de la capacidad proliferativa de las células T de pacientes trasplantados, empleando condiciones experimentales en las que es improbable la interacción *in vitro* con células supresoras. Igualmente se ha sugerido que la expresión de CD3 en la superficie de timocitos humanos normales puede no estar asociada a una maduración funcional completa.

La disfunción de las células T se manifiesta *in vivo* por una respuesta deprimida a las pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada frente a distintos

antígenos. La hipersensibilidad retardada refleja la inmunidad frente a virus, hongos y ciertas infecciones <sup>188</sup>. El mecanismo celular implicado en las reacciones de hipersensibilidad esta mediado las citoquinas liberadas por linfocitos T CD4+ al ser estimulados por el antígeno. El antígeno a nivel del tejido local, es procesado por procesado por células presentadoras de antígeno y presentado junto con moléculas de clase II del CMH, a células CD4+ inflamatorias (TH1), que liberan a nivel local diversas citoquinas que atraen y estimulan a macrófagos. Entre estas citoquinas se incluyen los siguientes:

1. Interquinas: Factor inhibidor de emigración (MIF) y el factor quimiotáctico de macrófagos (MCF).

2. Citoquinas: Interferón- $\gamma$ , que activa a macrófagos, liberan a su vez diversos mediadores; IL-3/GM-CSF, que aumenta la producción medular de macrófagos.

3. Citotoxinas: TNF- $\beta$ , que produce destrucción tisular local y aumenta la expresión de moléculas de adhesión a nivel endotelial local.

La induración es el resultado del acumulo de las células inflamatorias y exudación de fluidos en el sitio de la inyección.

El único estudio de recuperación de la inmunidad celular *in vivo* realizado en pacientes tratados con TCGH es el de Witherspoon y colaboradores <sup>189</sup>. En este amplio estudio se estudiaron 332 pacientes con diagnóstico de leucemia o anemia aplásica, tratados con TMO alogénico (N=308) o singénico (N=24) y 241 donantes sanos de médula ósea. El seguimiento postrasplante fue de 5 años y se observó que la recuperación a neoantígenos (DNCB) no se produjo hasta los 2



años y la antígenos de recuerdo fue infranormal hasta los 4 años. Entre los siguientes factores: diagnóstico, presencia o no de EICH aguda, EICH crónica, tratamiento de acondicionamiento y tratamiento con ATG, únicamente la presencia de EICH aguda mostró una relación significativa con la persistencia de anergia.

Es difícil la comparación entre los resultados del estudio anterior y el estudio actual por tratarse de trasplante autólogo y un menor periodo de seguimiento. Sin embargo, el nivel de respuesta a neoantígenos y antígenos de memoria referido al año en el estudio referido es del 50% de los pacientes, algo superior al detectado en este estudio. Por tanto, los resultados de nuestro estudio sugieren que la recuperación de la inmunidad celular *in vivo* postrasplante autólogo (TAMO o TCSP) es similar a la de el TMO alogénico.

Probablemente la disfunción de las células T también contribuya, junto a las alteraciones de las células B, a la disminución de la síntesis de inmunoglobulinas específicas tras la inmunización primaria.

Estudios previos que identificaban las células B mediante la detección de Ig de superficie, indicaban que las proporciones de linfocitos B, tendían a normalizarse a partir de los 3-6 meses postrasplante. Sin embargo, la detección de antígenos de diferenciación (CD19 en el presente estudio), ha permitido reconocer que la recuperación de niveles normales de células B no se produce hasta el primer año. Se ha demostrado que una proporción anormalmente

elevada de linfocitos B en el período inicial postrasplante son CD5+. Este marcador se expresa dentro de la estirpe B en una pequeña proporción de linfocitos normales, así como en las células de la leucemia linfática crónica B. Se desconoce si las células B CD5+ representan un estadio transicional en la diferenciación normal de la estirpe, que precede a la adquisición de la maduración funcional de los linfocitos B, o bien se trata de una subpoblación minoritaria ya diferenciada.

Numerosos investigadores han tratado de determinar que fase de la función B (activación, proliferación, producción de Igs) es deficiente. Los estudios realizados sobre la función de las células B *in vivo* son más complejos de interpretar, ya que la respuesta fisiológica de estas células está regulada por los linfocitos T y, por lo tanto, las alteraciones detectadas pueden reflejar conjuntamente la disfunción de las células B y de las células T.

Los estudios funcionales *in vitro* demuestran que, tras la estimulación *in vitro* con agentes mitógenos, los linfocitos B postrasplante no responden normalmente proliferando y sintetizando inmunoglobulinas. La hiporrespuesta se mantiene incluso en presencia de células T cooperadoras normales o de interleukina-2. Estos datos parecen indicar una incompleta maduración funcional de los linfocitos B.

La linfopenia B mantenida demostrada en este estudio y los estudios funcionales referidos contrastan con el mantenimiento de los niveles séricos de Igs. En efecto, a pesar de que durante 1-2 meses postrasplante, las células B desaparecen casi totalmente, los niveles de inmunoglobulinas séricas no bajan de

forma significativa. Este hecho no se puede explicar simplemente por la vida media de las inmunoglobulinas (4-6 días para IgA e IgM, 21 días para IgG), sino que es probable la persistencia de células plásticas resistentes a la quimio-radioterapia en dosis altas, que desaparecen lentamente y son sustituidas por nuevas células B que inician la producción de inmunoglobulinas.

Por otra parte, la falta de correlación entre las cifras absolutas de linfocitos y los niveles de Igs, se puede explicar porque la linfopoyesis B postrasplante suele ser inicialmente oligo/monoclonal, lo que también explica la disociación entre los niveles de Igs y de anticuerpos específicos. Se ha observado una reducción de la síntesis de inmunoglobulinas específicas en respuesta a la inmunización primaria con diferentes antígenos. Este hecho contrasta, en el caso del trasplante alogénico, con la detección de inmunoglobulinas circulantes específicas para antígenos frente a los que había sido inmunizado el donante. La interpretación es que se trata de inmunoglobulinas producidas por linfocitos B ya diferenciados que acompañan al injerto. Ello también explica que la concentración sérica de IgG e IgM se normalice rápidamente y sólo persista de forma prolongada un déficit de IgA.

En contra de lo referido en otros estudios, en el presente estudio, se ha observado una reducción más evidente y prolongada de la cifras de IgM séricas, que en los otros 2 isotipos estudiados. Estos niveles tienden a normalizarse al finalizar el periodo del estudio. Únicamente el grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo tratada con TAMO muestra una ligera reducción en los niveles de IgA a partir de los 3 meses de trasplante, con

tendencia a la normalización al finalizar el 1º año postrasplante. Esto último contrasta con el hecho de que este grupo de pacientes presenta un ritmo de recuperación de la población CD19 ligeramente más rápido que el grupo de TCSP, aunque no significativo.

Por tanto y como conclusión de los resultados de recuperación inmune y dado que la diferencia más evidente en la recuperación inmune entre TAMO y TCSP, radica en la temprana y elevada recuperación de las poblaciones con fenotipo NK, con niveles normales o elevados entre el día +14 hasta el +60 (o +90), sugiere que este periodo es el más adecuado para intervenciones terapéuticas de tipo inmune con IL-2, interferón o GM-CSF, de forma aislada o en combinación.

Por otra parte, si se pretende una inmunomodulación *ex vivo* (inducción de células LAK) con el fin de inducir un efecto injerto contra tumor y reducir la recaída postrasplante, la utilización de CGSP también puede ser un mejor producto.

#### ***VI.2. Estudio comparativo de la recuperación inmune tras TCSP en pacientes con tumores sólidos y neoplasias hematológicas:***

Los resultados expuestos señalan que a pesar de la similitud de la recuperación inmune precoz (hasta día +30), existen diferencias en el perfil de la recuperación posterior de los linfocitos totales y células CD2+, CD3+, CD5+, CD4+ y CD8+. En todos los casos, esta diferencia indica una mayor recuperación

de las cifras absolutas en pacientes con neoplasias hematológicas. Este resultado es diferente a lo esperado en base a la supuesta mayor alteración del sistema inmune asociado a enfermedades hematológicas. Las pacientes con carcinoma de mama, han recibido en el periodo postrasplante radioterapia loco-regional complementaria sobre lecho mamario y axila homolateral en dosis total de 40 Gy a lo largo de 5 semanas, que se inicia entre el día +60 y el +90. Este tratamiento puede reducir la cifra de linfocitos, ligeramente y de forma transitoria, durante uno o dos meses. Sin embargo, este tratamiento no justifica el diferente perfil de recuperación tardía. Por otra parte, las escasas diferencias en la comparación de los niveles absolutos se comienzan a observar antes del inicio de la radioterapia.

No existen estudios previos en nuestro conocimiento, dirigidos a estudiar este aspecto. En el presente estudio se concluye que no existen diferencias en el perfil de recuperación de la mayor parte de poblaciones linfoides o existe una recuperación más rápida en neoplasias hematológicas que en tumores sólidos.

Estos resultados parecen indicar que la recuperación del sistema inmune debe efectuarse fundamentalmente a partir de las células infundidas, que precisan sufrir un proceso de proliferación y diferenciación diferente en varios aspectos a la ontogenia linfoide normal.

***VI.3. Estudio de la influencia de la diferente reconstitución inmune en el control de la enfermedad neoplásica.***

La radio-quimioterapia en dosis altas con soporte de CGH mediante TAMO o TCSP, ha demostrado en diversos ensayos, que puede inducir SLE prolongada en pacientes con diversas neoplasias resistentes al tratamiento convencional. Sin embargo, es evidente que a pesar de una mayor actividad antineoplásica, con gran frecuencia no elimina totalmente la población tumoral.

Existe evidencia de la contribución de que la reacción inmune asociada al TCGH alogénico tiene acción citotóxica frente a células tumorales, y es la razón fundamental de la mayor tasa de recaída en el trasplante autólogo o singénico frente al alogénico. La reacción injerto contra tumor (ICT) como tal no existe en el trasplante autólogo, sin embargo, en las fases precoces de la recuperación inmune del TCGH autólogo, se produce una elevación transitoria de células con fenotipo y actividad citotóxica de amplio espectro, fundamentalmente de tipo NK y LAK espontánea. Algunos estudios han relacionado un mayor nivel de actividad citotóxica postrasplante con una menor frecuencia de recaída<sup>155,156,157</sup>.

Estudios previos y el actual, han demostrado que existen diferencias en la recuperación inmune tras TAMO y TCSP. En el TCSP se produce una recuperación acelerada de las cifras absolutas de todas las poblaciones celulares, respecto al TAMO, que es especialmente marcada en la recuperación de las cifras absolutas y actividad NK y LAK.

Ciertos estudios han descrito una menor frecuencia de recaída de la enfermedad en el TCSP que tras TAMO<sup>190</sup>. En el estudio de Vose y colaboradores<sup>156</sup>, se analiza de forma retrospectiva la evolución de 158 pacientes con diagnóstico de LNH de grado intermedio de malignidad o inmunoblástico, tratados con TAMO

(N= 105) o TCSP (N= 53). Mediante un análisis multivariado, desarrollan un modelo pronóstico con un grupo de pacientes aquellos sin masa tumoral  $\geq 10$  cm en el momento de trasplante, y no más de uno de las siguientes características: 3 o más líneas de quimioterapia previa, LDH elevada, quimiorresistencia. El grupo de mal pronóstico es aquel de pacientes con masa  $\geq 10$  cm y dos o más de las características señaladas. El grupo de mal pronóstico tiene una SLE a 3 años del 10%, comparado con un 45% del grupo de buen pronóstico ( $p < 0.001$ ). Dentro del grupo de mal pronóstico, no se observó diferencia en la SLE a los 3 años entre el grupo de TAMO y TCSP. Sin embargo, en el grupo de buen pronóstico, los pacientes que recibieron TAMO tuvieron una SLE a 3 años del 32%, comparado con el 70% en los que recibieron TCSP ( $p < 0.008$ ). El hecho de que esta diferencia se observe exclusivamente en el grupo de buen pronóstico puede indicar que el efecto inmunoterápico es más eficaz cuando existe una enfermedad residual inferior.

Esta diferencia, en caso de confirmarse en estudios prospectivos, es de gran importancia. La causa de esta diferencia no está aclarada, puede estar en relación con una menor contaminación de la sangre periférica respecto a la médula ósea<sup>191,192,193</sup>, o bien puede tener relación con la presencia de mayor actividad citotóxica en la sangre periférica, con un efecto antitumoral incrementado.

En el presente estudio, para intentar establecer si la recuperación de ciertas poblaciones linfocitarias postrasplante tiene impacto en la frecuencia de recaída de la enfermedad, se ha escogido el grupo de pacientes con carcinoma de mama

de alto riesgo por ser éste un subgrupo de pacientes numeroso (N= 82) y homogéneo en términos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

El análisis uni o multivariante de la influencia de los factores pronósticos clínicos con conocido peso pronóstico tras quimioterapia convencional (número de ganglios axilares afectos, receptores hormonales, estado hormonal, edad, grado histológico y tamaño tumoral), no ha mostrado impacto en la SLE postrasplante. Este tipo de análisis no ha sido comunicado hasta ahora por ningún grupo de estudio, sin embargo, este resultado parece indicar que la influencia de estos factores pronósticos se pierde al seleccionar un grupo de pacientes con mal pronóstico y que, por otra parte, el tratamiento intensivo y trasplante, puede modificar la biología de la enfermedad.

En nuestro estudio, al intentar correlacionar distintos niveles de poblaciones con fenotipo NK y la SLE en pacientes con carcinoma de mama, no se ha observado relación significativa. La ausencia de esta correlación puede indicar que no existe realmente o que existe otros factores no conocidos que interaccionan.

Dada la regulación multifactorial inmune, es obvio que en la recuperación postrasplante, el estudio de la presencia de actividad inhibidora es de al menos igual importancia que el estudio de actividad citotóxica. Sin embargo, este aspecto ha sido menos evaluado hasta ahora. El análisis multivariante realizado en este estudio, incluyendo las variables biológicas y clínicas ya señaladas, demuestra una influencia inversa estadísticamente significativa, exclusivamente entre los niveles elevados de la población CD8+CD57+ y la SLE. El significado clínico de la elevación de esta subpoblación no se conoce bien. El estudio de Autran y



colaboradores en 25 pacientes con hemopatía aguda tratados con trasplante de médula ósea alogénico, demuestra que estas células son linfocitos maduros que expresan CD2, complejo CD3-TCR $\alpha\beta$ , CD5, CD7, sin marcadores NK y no ejercen, de forma basal, actividad citotóxica NK ni LAK<sup>148</sup>. Esta actividad inhibitoria parece ser mediada por un factor soluble no antígeno específico, glicosilado y de bajo peso molecular y coeficiente de sedimentación. Esta misma población, que de forma basal parece tener, en el periodo postrasplante, actividad inhibidora, es, sin embargo, capaz de ser activada *in vitro* con IL-2<sup>147</sup>.

En el presente estudio no se ha realizado seguimiento microbiológico de la infección por CMV, sin embargo, se sabe que la tasa de infección asintomática es similar al TMO alogénico y, por tanto, no se puede excluir que la expansión de esta población, tenga relación con dicha infección.

La coincidencia en el tiempo de la expansión de las poblaciones con fenotipo supresor/citotóxico (con una correlación negativa con la SLE) y de la población NK (sin relación significativa, aunque con tendencia a una relación positiva), hace que la interpretación pueda ser que la actividad supresora es dominante y que sólo cuando esta actividad es baja puede ejercerse actividad citotóxica NK.

Esta hipótesis probablemente sólo se podría confirmar o descartar mediante un estudio prospectivo que analice la actividad funcional en un número de pacientes suficiente, que permita determinar el balance final de la presencia simultánea de población con fenotipo NK y supresor/citotóxico en el periodo precoz de la recuperación inmune postrasplante.

## VII. CONCLUSIONES

## VII. CONCLUSIONES

1. La reconstitución inmune de la mayor parte de las poblaciones linfocitarias es diferente y generalmente más rápida con trasplante autólogo de células germinales de sangre periférica que con trasplante autólogo de médula ósea.

2. El momento de máximo nivel de recuperación de población citotóxica T dependiente y NK dependiente se encuentra entre el día +21 y el +90. Por tanto, éste periodo, es el más adecuado para una actuación terapéutica de base inmune.

3. No existen diferencias significativas en el perfil de recuperación inmune de las poblaciones linfocitarias en el grupo de pacientes con diagnóstico de hemopatía maligna respecto al grupo de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo.

4. En el subgrupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama de alto riesgo no existen diferencias en la supervivencia libre de enfermedad cuando el soporte hemopoyético se realiza con trasplante autólogo de médula ósea o con células germinales de sangre periférica.

5. El incremento de las cifras absolutas de la población con fenotipo supresor/citotóxico CD8+CD57+ en el día +30 postrasplante, implica una menor supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída.

6. No existe relación entre el incremento de las cifras absolutas de las poblaciones con fenotipo NK en el día +30, y la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo de recaída.

**VIII. BIBLIOGRAFIA.-**

---

**IX. BIBLIOGRAFIA.-**

- <sup>1</sup> Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Hematopoietic precursor cell transplant in Europe: Activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1996;17:137-148.
- <sup>2</sup> Santos GW. History of bone marrow transplantation. *Clinics Hematol* 1983; 12: 611-639.
- <sup>3</sup> Fabricious-Moeller J. Experimental studies of the hemorrhagic diathesis from X-ray sickness. Levin & Munksgaard, Copenhagen, 1922.
- <sup>4</sup> Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, et al. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949;34:1538-1542.
- <sup>5</sup> Lorenz E, Uphoff DE, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12:197-203.
- <sup>6</sup> Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-497.
- <sup>7</sup> Mathé G, Bernard J. Essais de traitement de la leucemie greffée 1210 par l'irradiation X suivie de transfusion de cellules hématopoïétiques normales (isologues ou homologues, myeloïdes ou lymphoïdes, adultes ou embryonnaires). *Rev Fr Etudes Clin Biol* 1959;4:442-448.

- <sup>8</sup> Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: Experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25:1525-1532.
- <sup>9</sup> van Bekkum DW, Vos O, Weyzen WWH. Homo et hétérogrefe tissues hématopoïétiques chez la souris. *Ref Hematol.* 1956;2:477-502.
- <sup>10</sup> de Vries MJ, Vos O. Treatment of mouse lymphosarcoma by total-body X-irradiation and by injection of bone marrow and lymph node cells. *J Nat Cancer Inst.* 1958;21:1117-1124.
- <sup>11</sup> Thomas ED, Storb R, Clift RA. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975; 292: 832-843.
- <sup>12</sup> Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Cytomegalovirus infection and specific cell-mediated immunity after marrow transplant. *J Infect Dis* 1980;142:816-824.
- <sup>13</sup> Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus after allogeneic marrow transplant. *J Infect Dis* 1980;141:479-487.
- <sup>14</sup> Quinnan GV, Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients. *N Eng J Med* 1982;307:7-13.
- <sup>15</sup> Appelbaum FR. Marrow transplantation for hematologic malignancies: A brief review of current status and future prospects. *Sem Hematol* 1988;25:16-22.

- <sup>16</sup> Spitzer G, Zander A, Tannir N. Autologous bone marrow transplantation in human solid tumors. *Recent Advances in Bone Marrow Transplantation* Ed RP Gale. Alan R. Liss 1983;615-42.
- <sup>17</sup> Gale RP, Champlin RE. How does bone marrow transplantation cure leukemia ?. *Lancet* 1984 ii:28.
- <sup>18</sup> Fefer A, Sullivan KM, Weiden P, et al. Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic transplantation. *Prog Clin Biol Res* 1987;244:401-408.
- <sup>19</sup> Jones RJ, Ambinder RF, Piantodosi S, et al. Evidence of a graft versus-lymphoma effect associated with allogenic bone marrow transplantation. *Blood* 1991;78:3103-3106.
- <sup>20</sup> Bernard D, Maurizis JC, Ruse F, et al. Presence of HLA-D/DR antigens on the membrane of breast tumor cells. *Clin Exp Immunol* 1984;56:215-221.
- <sup>21</sup> Natali PG, Giacomini P, Bigotti A, et al. Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1983;43:660-668.
- <sup>22</sup> Greiner JW, Hand PH, Noguchi P, et al. Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte alpha-interferon treatment. *Blood* 1994; 84 (suppl 1):84a:366.
- <sup>23</sup> Glazier AD, Tutscha PJ, Farmer ER, et al. Graft-versus-host disease in cyclosporine A treated rats following syngeneic and autologous bone marrow reconstitution. *J Exp Med* 1983; 158:1-8.



- <sup>24</sup> Geller RB, Esa AH, Beschoner WE, et al. Successful in vitro graft-versus-host effect against Ia-bearing tumor using cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease in the rat. *Blood* 1989; 74:1165-1171.
- <sup>25</sup> Jenkins MK, Schwartz RH, Pardoll DM. Effects of cyclosporin on T cell development and clonal deletion. *Science* 1988;241:1655-1658.
- <sup>26</sup> Jones RJ, Vogelsang GB, Hess AD, et al. Induction of graft-versus-host disease after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1989;1:754-757.
- <sup>27</sup> Talbot DC, Powles RL, Sloane JP, et al. Cyclosporine-induced graft-versus-host disease following autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1990;6:17-20.
- <sup>28</sup> Carella AM, Gaozza E, Raffo MR, et al. Therapy of acute phase chronic myelogenous leukemia with intensive chemotherapy, blood cell autotransplant and cyclosporine A. *Leukemia* 1991;5:517-521.
- <sup>29</sup> Yeager AM, Vogelsang GB, Jones RJ, et al. Induction of cutaneous GVHD by administration of cyclosporin to patients undergoing autologous bone marrow transplant for acute myeloid leukemia. *Blood* 1992;79:3031-3035.
- <sup>30</sup> Kennedy MJ, Vogelsang GB, Beveridge RA, et al. Phase I trial of intravenous cyclosporine to induce of graft-versus-host disease after autologous bone marrow transplantation for breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:478-484.

- <sup>31</sup> Schwartz R, Momburg F, Moldenhauer G, et al. Induction of HLA class-II antigen expression on human carcinoma cell lines by IFN-gamma. *Int J Cancer* 1985; 35:245-250.
- <sup>32</sup> Noga SJ, Horwitz L, Kim H, et al. Interferon-gamma potentiates the antitumor effect of cyclosporine-induced autoimmunity. *J Hematotherapy* 1992; 1:75-84.
- <sup>33</sup> Kennedy MJ, Vogelsang GB, Jones RJ, et al. Phase I trial of interferon gamma to potentiate cyclosporine-induced graft-versus-host disease in women undergoing autologous bone marrow transplantation for breast cancer. *J Clin Oncol* 1994 12:249-257.
- <sup>34</sup> Ciccone E, Pende D, Viale O, et al. Specific recognition of human CD3-CD16+ natural killer cells requires the expression of an autosomic recessive gene on target cells. *J Exp Med* 1990;172:47-52.
- <sup>35</sup> Ciccone E, Colonna M, Viale O, et al. Susceptibility or resistance to lysis by alloreactive natural killer cells is governed by a gene in the human major histocompatibility complex between BF and HLA-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9794-9797.
- <sup>36</sup> Ciccone E, Pende D, Viale O, et al. Evidence of a killer (NK) cell repertoire for (Allo) antigen recognition: Definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J Exp Med* 1992;175:709-718.
- <sup>38</sup> Moretta A, Tambussi G, Bottino C, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990;172:695-714.

- <sup>38</sup> Aramburu J, Balboa MA, Ramirez A, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor  $\gamma\delta^+$  T lymphocytes. I: Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 1990;144:3238-3247.
- <sup>39</sup> Moretta A, Vitale M, Sivori S, et al. Human NK cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med* 1994;180:545-555.
- <sup>40</sup> Moretta A, Vitale M, Bottino C, et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993;178:597-604.
- <sup>41</sup> Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987;69:369-80.
- <sup>42</sup> Keever CA, Welte K, Small T, et al. Interleukin 2-activated killer cells in patients following transplants of soybean lectin-separated and E rosette-depleted bone marrow. *Blood* 1987;70:1893-903.
- <sup>43</sup> Reittie JE, Leger O, Gottlieb D, et al. Analysis of endogenously generated activated killer cells after autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 1987;XIX: 2648-50.
- <sup>44</sup> Tratkiewicz JA, Szer J. Prediction of leukemia relapse soon after bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 1987;XIX: 2648-50.

- 
- <sup>45</sup> Rook AH, Frederick WRJ, Burns WH, et al. Natural killer cell activity and interferon release predict survival from viral infection in bone marrow transplant recipients. *Transplant Proc* 1983;15:1773-1776.
- <sup>46</sup> Ashihara E, Shimazaki N, Yamagata T, et al. Reconstitution of lymphocyte subsets after peripheral blood stem cell transplantation: two-color flow cytometric analysis. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:377-381.
- <sup>47</sup> Craig JIO, Turner ML, Parker AC. Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Reviews*, 1.992; 6: 59-67.
- <sup>48</sup> Hooper WG, Barth RF, Niranjana ST. Lack of natural cell activity in hairy cell leukemia patients and partial restoration with interleukin-2. *Cancer* 1986;5:988-993.
- <sup>49</sup> Kay BE, Zarling J. Restoration of impaired natural killer cell activity of B-chronic lymphocytic leukemia patients by recombinant interleukin-2. *Am J Hematol* 1987;24:161-167.
- <sup>50</sup> Wanebo HJ, Pace R, Hargett S, Katz D, Sando J. Production of and response to interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Cancer* 1986;3:656-662.
- <sup>51</sup> Herberman RB. Natural killer cells and their possible relevance to transplantation biology. *Transplantation* 1982;34:1-7.
- <sup>52</sup> Wunder E, Sovalat H, Fritsch G, Silvestri F, Henon P, Serke S. Report on the European workshop on peripheral blood stem cell determination and standardisation. *J Hematotherapy* 1992;1:131-142

- 
- <sup>53</sup> Sutherland DR, Stewart AK, Keating A. CD34+ antigen: Molecular features and potential clinical applications. *Stem Cells* 1993;11(Suppl3):50-57
- <sup>54</sup> Siena S, Bregni M, Brando B et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991;77:400-409
- <sup>55</sup> Bender JG, Williams SF, Myers S et al. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:281-285
- <sup>56</sup> Siena S, Bregni M, Gianni AM. Estimation of peripheral blood CD34+ cells for autologous transplantation in cancer patients. *Exp Hematol* 1993;21:203-205
- <sup>57</sup> Fritsch G, Buchinger P, Printz D. Use of flow cytometric CD34+ analysis to quantify hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymph* 1993;10:443-451
- <sup>58</sup> Dreger P, Marquardt P, Haferlach T et al. Effective mobilisation of peripheral blood progenitor cells with Dexamethasone-BEAM and G-CSF: Timing of harvesting and composition of the leukapheresis product. *Br J Cancer* 1993;68:950-957
- <sup>59</sup> van der Wall E, Richel DJ, Holtkamp MJ et al. Bone marrow reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: Effect of graft size. *Ann Oncol* 1994;5:795-802
- <sup>60</sup> Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haematopoietic stem cells. *ClinicsHaematol* 1986; 15: 19-48.

- 
- <sup>61</sup> Santos GW, Colvin OM. Pharmacological purging of bone marrow with reference to autografting. *Clinics in Haematol.* 1986; 15: 67-83.
- <sup>62</sup> Thilaganathan B, Nicolaides K, Morgan G. Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *Br J Haematol* 1994;87:634-636.
- <sup>63</sup> Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, et al. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 1991;77:2591-2596.
- <sup>64</sup> Haas R, Ho AD, Bredthauer U, et al. Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1990;18:94-98.
- <sup>65</sup> Demuyneck H, Pettengell R, de Campos E, Dexter TM, Testa NG. The capacity of peripheral blood stem cells mobilized with chemotherapy plus G-CSF to repopulate irradiated marrow stroma in vitro is similar to that of bone marrow. *Eur J Cancer* 1992;28:381-386.
- <sup>66</sup> Dührsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988;72:2074-2081.
- <sup>67</sup> Simmons PJ, Zannettino A, Gronthons S, Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymph* 1994;12:353-363.

- 
- <sup>68</sup> Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. Expression of the YB5.B8 (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 1991;78:30-37.
- <sup>69</sup> Thompson J, Brodsky I, Yunnis J. Molecular quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation. *Blood* 1992;79:1629-1635.
- <sup>70</sup> Gribben JG, Saporito L, Barber M, et al. Bone marrows of non-Hodgkin's lymphoma patients with a bcl-2 traslocation can be purged of polymerase chain reaction-detectable lymphoma cells using monoclonal antibodies and immunomagnetic bead depletion. *Blood* 1992;80:1083-1089.
- <sup>71</sup> Shpall EJ, Jones RB. Release of tumor cells from bone marrow. *Blood* 1994;83:623-625.
- <sup>72</sup> Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into pheripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994;83:636-640.
- <sup>73</sup> Rill DR, Santana V, Roberts M, et al. Direct demoststration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994;84:380-383.
- <sup>74</sup> Brenner M, Rill D, Moen NC, et al. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1993;341:85-86.

- <sup>75</sup> Makino S, Harada M, Akashi K et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 °C without rate-controlled freezing. *Blood* 1987;70:974-978.
- <sup>76</sup> García-Conde J, Solano C. Trasplante autólogo de médula ósea en tumores sólidos. Bases biológicas y resultados terapéuticos. En: E. Díaz Rubio ed. *Controversias en Oncología*; Barcelona, Doyma 1.991; 19-48.
- <sup>77</sup> Hagenbeek A, Martens AC. Minimal residual disease in acute leukemia: preclinical studies in a relevant rat model (BNML). *Bailliere's Clin Haematol* 1991; 4: 609-635.
- <sup>78</sup> Reed EC, Bowden RA, Dandliker PS, et al. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. *Ann Intern Med* 1988;109:783-788.
- <sup>79</sup> Haynes BF, Denning SM, Singer KH, Kurtzberg J. Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of human T-cell development. *Immunol Today* 1989;10: 87-91.
- <sup>80</sup> Ferrick Da, Ohashi PS, Wallace V, Schilham M, Mak TW. Thymic ontogeny and selection of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells. *Immunol Today* 1989; 10: 403-407.
- <sup>81</sup> Toribio ML, Alonso JM, Barcena A, et al. Human T-cell precursors: involvement of the IL-2 pathway in the generation of mature T cells. *Immunol Rev* 1988; 104: 55-79.
- <sup>82</sup> Haynes BF, Martin ME, Kay HH, Kurtzberg J. Early events in human T cell ontogeny. *J Exp Med* 1988; 168: 1061-1080.



- 
- <sup>83</sup> Campana D, Janossy G, Coustan-Smith E, et al. The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man. *J Immunol* 1989; 142: 57-66.
- <sup>84</sup> Haynes BF, Singer KH, Dennings SM, Martin ME. Analysis of expression of CD2, CD3 and T cell antigen receptor molecules during early human fetal thymic development. *J Immunol* 1988; 141: 3776-3784.
- <sup>85</sup> Lobach DF, Haynes BE. Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J Clin Immunol* 1987; 7: 81-97.
- <sup>86</sup> Marrack P, Lo D, Brinster R, et al. The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* 1988; 53: 627-634.
- <sup>87</sup> Russell, Lo DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988; 336: 73-76.
- <sup>88</sup> Zuniga-Pflucker JC, Longo DL, Kruisbeek AM. Positive selection of CD4-8+ T cells in the thymus of normal mice. *Nature* 1989;338-376.
- <sup>89</sup> Parkman R. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. En: *Bone Marrow Transplantation*. Ed. ED Thomas. Blackwell Scientific Publications. Boston 1994. Pgs: 504-512.
- <sup>90</sup> Verma UN, Mazumder A. Immune reconstitution following bone marrow transplantation. *Cancer Immunol Immunother* 1993;37:351-360.

- <sup>91</sup> Franceschini F, Gale RP. En: UCLA Symposia on Molecular and cellular biology: Progress in Bone Marrow Transplantation, eds Gale RP and Champlin RE. Allan R. Liss, New York, 1987. Pgs 607-622.
- <sup>92</sup> Saxon A. En: UCLA Symposia on Molecular and cellular biology: Progress in Bone Marrow Transplantation, eds Gale RP and Champlin RE. Allan R. Liss, New York, 1987. Pgs 623-633.
- <sup>93</sup> Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Age thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. N Engl J Med 1995;332:143-149.
- <sup>94</sup> Gale RP, Sparkes RS, Golde DW. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in human. Science 1978;201:937-940.
- <sup>95</sup> Thomas DE, Ramberg RE, Sale GE, Sparkes RS, Golde DW. Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophages in man. Science 1976;192:1016 -1021.
- <sup>96</sup> Brkic S, Tsoi MS, Mori T, et. Cellular interaction in marrow grafted patients. III. Normal interleukin 1 and defective interleukin 2 production in short term and in those with graft-versus-host disease. Transplantation 1985;39:30-35.
- <sup>97</sup> Pechumer H, Leinisch E, Bender-Gotze C, Ziegler-Heitbrock HW. Recovery of monocytes after bone marrow transplantation-rapid reappearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production. Transplantation 1991;52:698-704.

- <sup>98</sup> Zander AR, Reuben JM, Johnston D, et. Immune recovery following allogeneic bone marrow transplantaion. *Transplantation* 1985;40:177-183.
- <sup>99</sup> Ault KA, Antin JH, Ginsberg D, et al. Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med* 1985;161:1483-1502.
- <sup>100</sup> Niederwieser D, Gastl G, Rumpold H, Marth C, Kraft D, Huber C. Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). *Br J Haematol* 1987;65:301-305.
- <sup>101</sup> Jacobs R, Stoll M, Stratman G, Leo R, Link H, Schmidt RE. CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 1992;79:3239-3244.
- <sup>102</sup> Bowden RA, Day LM, Amos DE, Meyers JD. Natural cytotoxic activity against cytomegalovirus-infected target cells following marrow transplantation. *Transplantation* 1987;44:504-508.
- <sup>103</sup> Hercend T, Takvorian T, Nowill A, et al. Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1986;67:722-728.
- <sup>104</sup> Livnat S, Seigneuret M, Strob R, Prentice R. Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after bone marrow transplantation. *J Immunol* 1980;124:481-487.
- <sup>105</sup> Blaise D, Olive D, Stoppa AM, et al. Hematologic and immunological effects of the systemic administration of recombinant interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1990;76:1092-1097.

- <sup>106</sup> Hamon MD, Prentice HG, Gottlieb DJ, et al. Immunotherapy with interleukin 2 after ABMT in AML. *Bone Marrow Transplant* 1993;11:399-401.
- <sup>107</sup> Lum LG, Seigneuret MC, Storb R. The transfer of antigen-specific humoral immunity from marrow donors to marrow recipients. *J Clin Immunol* 1986; 6:389-396.
- <sup>108</sup> Shiobara S, Lum LG, Witherspoon RP, Storb R. Antigen-specific antibody responses of lymphocytes to tetanus toxoid after human marrow transplantation. *Transplantation* 1995; 41:587-592.
- <sup>109</sup> Lum LG, Munn NA, Schanfield MS, Storb R. The detection of specific antibody formation to recall antigens after human bone marrow transplantation. *Blood* 1986;67:582-587.
- <sup>110</sup> Wimperis JZ, Brenner MK, Prentice HG, et al. Transfer of functioning humoral immune system in transplantation of T-lymphocyte-depleted bone marrow. *Lancet* 1986; 339-343.
- <sup>111</sup> Wahren B, Gahrton G, Linde A, et al. Transfer and persistence of viral antibody-producing cells in bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1984; 150:358-365.
- <sup>112</sup> Witherspoon RP, Schanfield MS, Storb R, Thomas ED, Giblett ER. Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation* 1978; 26: 407-408.

- <sup>113</sup> Holland HK, Wingard JR, Beschoner WE, Saral R, Santos J. Bronchiolitis obliterans in bone marrow transplantation and its relationship to chronic graft-vs-host disease and low serum IgG. *Blood* 1988;72:621-627.
- <sup>114</sup> Sheridan JF, Tutschka PJ, Sedmack DD, Copelan EA. Immunoglobulin G subclass deficiency and pneumococcal infection after allogeneic BMT. *Blood* 1990;75:1583-1586.
- <sup>115</sup> Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Rilly RJ, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990;76:1647-1656.
- <sup>116</sup> Antin JH, Ault KA, Rapoport JM, Smith BR. B lymphocyte reconstitution after human marrow transplantation after human marrow transplantation. Leu-1 antigen defines a distinct population of B lymphocytes. *J Clin Invest* 1987;80:325-332.
- <sup>117</sup> Bengtsson M, Smedmyr B, Festin R, Oberg S, Simonson B, Totterman TA. B-lymphocyte regeneration in marrow and blood after autologous BMT: increased numbers of B-cells carrying activation and progression markers. *Leuk Res* 1989;13:791-797.
- <sup>118</sup> Mitus AJ, Stein R, Rapoport JM, et al. Monoclonal oligoclonal gammopathy after bone marrow transplantation. *Blood* 1989;74:2764-2768.
- <sup>119</sup> Storek J, Saxon A. Reconstitution of B cell immunity following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;9:395-408.

- <sup>120</sup> B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny?. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:387-398.
- <sup>121</sup> Velardi A, Speranza C, Terenzi A, et al. Acquisition of Ig isotype diversity after marrow transplantation in adults. A recapitulation of normal B-cell ontogeny. *J Immunol* 1988;141:815-820.
- <sup>122</sup> Ljungman P, Fridell E, Lonnqvist B, et al. Efficacy and safety of vaccination on marrow transplant recipients with live attenuated measles, mumps and rubella vaccine. *J Infect Dis* 1989;159:610-615.
- <sup>123</sup> Ljungman P, Wiklund-Hammarstein M, Duraj V, et al. Response to tetanus toxoid immunization after allogeneic bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1990;162:496-500.
- <sup>124</sup> Saxon A, Mitsuyasu R, Stevens R, Champlin R, Kimata H, Gale RP. Designed transfer of specific immune responses with bone marrow transplantation *J Clin Invest* 1986;78:959-967.
- <sup>125</sup> Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Infection with herpes simplex virus and cell-mediated immunity after marrow transplantation. *J Infect Dis* 1980; 142:338-346.
- <sup>126</sup> Wade JC, Day LM, Crowley JJ, Meyers JD. Recurrent infection with herpes simplex virus after marrow transplantation: role of the specific immune response and acyclovir treatment. *J Infect Dis* 1980; 149:750-756.

- <sup>127</sup> Ljungman P, Wilczek H, Gahrton G, et al. Long-term acyclovir prophylaxis in bone marrow transplant recipients and lymphocyte proliferation responses to herpes virus antigens in vitro, *Bone Marrow Transplant* 1986;1:185-192.
- <sup>128</sup> Gratama JW, Verdonck LF, Van Der Linden JA, et al. Cellular immunity to vaccinations and herpes-virus infections after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1986; 41: 719-724.
- <sup>129</sup> Effenbein GI, Adams JS, Bellis MM, Santos GW, Smith KA. Role of interleukin-2 in depressed T-cell mitogenesis after allogeneic marrow transplantation. *Leuk Res* 1984;8:417-423.
- <sup>130</sup> Welte K, Keever CA, Levick J, et al. Interleukin-2 production and response to interleukin-2 by peripheral blood mononuclear cells from patients after bone marrow transplantation. II. Patients receiving soybean lectin-separated and T-cell-depleted bone marrow. *Blood* 1987;70:1595-1603.
- <sup>131</sup> Cayeux S, Meuer S, Pezzutto A, et al. T-cell ontogeny after bone marrow transplantation: failure to synthesize interleukin-2 (IL-2) and lack of CD2- and CD3-mediated proliferation by both CD4+ and CD8+ cells even in the presence of exogenous IL-2. *Blood* 1989;74:2270-2277.
- <sup>132</sup> Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:622-632.
- <sup>133</sup> Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res* 1978;27:305-317.

- 
- <sup>134</sup> Timonen T, Reynolds CW, Ortaldo JR, Herberman RB. Isolation of human and rat natural killer cells. *J Immunol. Methods.* 1982;51: 269-276.
- <sup>135</sup> Ortaldo JR, Herberman RB. Heterogeneity of natural killer cells. *Ann Rev Immunol* 1984;2: 359-369.
- <sup>136</sup> Lanier LL, Phillips TH. Ontogeny of natural killer cells. *Nature* 1986;319:269-270.
- <sup>137</sup> Herberman RB, Reynolds CW, Ortaldo JR. Mechanism of cytotoxicity by Natural Killer (NK) cells. *Ann Rev Immunol* 1986;4:651-680.
- <sup>138</sup> Herberman RB, Ed. NK cells and other natural effector cells. New York. Academic Press. 1982.
- <sup>139</sup> Ortaldo JR, Longo DL. Human natural lymphocyte effector cells: Definition, analysis of activity, and clinical effectiveness. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:999-1010.
- <sup>140</sup> Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007-1012.
- <sup>141</sup> Yron I, Wood TA, Spiess PJ, Rosenberg SA. In vitro growth of murine T cells.V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. *J Immunol* 1980;125:238-245.



- <sup>142</sup> Kim S, Haas GP, Hillman GG. Development of immunotherapy for the treatment of malignancies refractory to conventional therapies. *Cytokines Molecular Therapy* 1996;2:1-11.
- <sup>143</sup> Wurch AM, Gratama JW, Middeldorp JM, et al. The effect of cytomegalovirus infection on T lymphocytes after bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 278-287.
- <sup>144</sup> Leroy E, Calvo CF, Divine M, et al. Persistence of T8/HNK1+ suppressor lymphocytes in the blood of long term surviving patients after allogeneic bone-marrow transplantation. *J Immunol* 1986;137:2180-2189.
- <sup>145</sup> Yabe H, Yabe M, Katoato S, Kimura M, Iwaki K. Increased numbers of CD8+CD11+, CD8+CD11-, and CD8+Leu7+ cells in patients with chronic graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1990;5:295-300.
- <sup>146</sup> Gupta S. Abnormality of Leu2+7+ cells in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), AIDS related complex and asymptomatic homosexuals. *J Clin Immunol* 1986;6:502-509.
- <sup>147</sup> Ruthlein J, James SP, Strober W. Role of CD2 in activation and cytotoxic function of CD8/LEU7 positive cells. *J Immunol* 1988;141: 3791-3797.
- <sup>148</sup> Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, et al. A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 1991;77:2237-2241.

- <sup>149</sup> Schabel F, Griswold D, Thomas H, et al. Increasing the therapeutic response rate to anticancer drugs by applying the basic principles of pharmacology. *Cancer* 1984;54:1160-1167.
- <sup>150</sup> Goldie JH, Coldman AJ. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treat Rep* 1983;67:923-931.
- <sup>151</sup> Appelbaum FR. Marrow transplantation for hematologic malignancies: A brief review of current status and future prospects. *Sem Hematol* 1988;25:16-22.
- <sup>152</sup> Spitzer G, Zander A, Tannir N. Autologous bone marrow transplantation in human solid tumors. *Recent Advances in Bone Marrow Transplantation* Ed RP Gale. Alan R. Liss 1983;615-42.
- <sup>153</sup> Ashihara E, Shimazaki N, Yamagata T, et al. Reconstitution of lymphocyte subsets after peripheral blood stem cell transplantation: two-color flow cytometric analysis. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:377-381.
- <sup>154</sup> Craig JIO, Turner ML, Parker AC. Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Reviews*, 1.992; 6: 59-67.
- <sup>155</sup> Tratkiewicz JA, Szer J. Prediction of leukemia relapse soon after bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 1987;XIX: 2648-50.
- <sup>156</sup> Vose JM, Anderson JR, Kessinger A, et al. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 1993;11:1846-1851.

- 
- <sup>157</sup> Richard C, Baro J, Bello-Fernandez C, et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating bone marrow transplantation for acute myeloblastic leukemia enhances activated killer cell function and may diminish relapse. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:721-726.
- <sup>158</sup> Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and descriptions of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982;49:2112-2135.
- <sup>159</sup> Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1972;31:1860-1861.
- <sup>160</sup> Sokal JE, Aungst CW. Cellular immune responses and prognosis in the malignant lymphomas. *Natl Cancer Inst Monogr* 1971;34:109-112.
- <sup>161</sup> Kumar P, Thompson JJ, Frey DJ, et al. *Clin Exp Allergy* 1996;26:104-107.
- <sup>162</sup> Witherspoon RP, Matthews D, Storb R, et al. Recovery of in vivo cellular immunity after human marrow grafting. Influence of time postgrafting and acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1984;37:145-150.
- <sup>163</sup> Sokal JE. Measurement of delayed skin-test responses. *N Engl J Med* 1975;292:501-502.
- <sup>164</sup> Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.

- 
- <sup>165</sup> Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II: Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.
- <sup>166</sup> Cox DR. Regression models and life-tables (with discussion). *J R Stat Soc* 1972;34:187-220.
- <sup>167</sup> Silva MR, Parreira A, Ascensao JL. Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: conditions for in vitro expansion. *Exp Hematol* 1995;23:1676-1681.
- <sup>168</sup> Weaver CH, Longin K, Buckner CD et al. Lymphocyte content in peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:411-415.
- <sup>169</sup> Zander AR, Cockerill KJ. Autologous transplantation with circulating hematopoietic stem cells. *J Clin Apheresis* 1987;3:191-201.
- <sup>170</sup> Scheid C, Pettengell R, Ghielmini M, et al. Time course of the recovery of cellular immune function after high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell transplantation for high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:901-906.
- <sup>171</sup> Scambia G, Panici PB, Pierelli L, et al. Immunological reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation for advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1993;29A:1518-1522.

- <sup>172</sup> Henon PhR, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann JC, Lepers M, Wunder E, Kandel G. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 1993;9:285-291.
- <sup>173</sup> Roberts MM, To LB, Gillis D, et al. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:469-475.
- <sup>174</sup> Gordy C, Perry G, Thomas M, et al. Immune function and phenotype of peripheral blood and bone marrow stem cell products and peripheral blood reconstitution. *J Cell Biochem* 1994;18B:100 (Abstract).
- <sup>175</sup> Fegan C, Thomas H, Bailey-Wood R, et al. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:277-281.
- <sup>176</sup> Talpaz M, Spitzer G. Low natural killer cell activity in the bone marrow of healthy donors with normal natural killer cell activity in the peripheral blood. *Exp Hematol* 1984;12:629-632.
- <sup>177</sup> Verbik DJ, Jackson JD, Pirruccello SJ, et al. Characteristics of GM-CSF mobilized human peripheral stem cell harvests obtained from consecutive collections. *Blood* 1993;82:654a (Abstract).
- <sup>178</sup> Verbik DJ, Jackson JD, Pirruccello SJ, et al. Augmentation of cytotoxicity of peripheral blood stem cells after in vitro activation with cytokines. *Blood* 1992;80:433a (Abstract).

- 179 Kessinger A. Do autologous peripheral blood cell transplantation provide more than hematopoietic recovery ?. *Stem Cells* 1995;13:351-354.
- 180 Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:413-425.
- 181 Schroff RW, Gale RP, Fahey JL. Regeneration of T cell subpopulations after bone marrow transplantation: cytomegalovirus infection and lymphoid subset imbalance. *J Immunol* 1982;129:1926-1930.
- 182 Verdonck LF, De Gast GC. Is cytomegalovirus infection a major cause of T cell alterations after (autologous) bone marrow transplantation ? *Lancet* 1984, i::932-934.
- 183 Farrell C, Atkinson K, Chapman G, Penny R, Biggs J. Subsets of T lymphocyte subpopulations after human marrow transplantation defined by monoclonal antibodies and two colour fluorescence. *Transplant Proc* 1985;17:1704-1706.
- 184 Gratama JW, Fibbe WE, Naipal AM, et al. Cytomegalovirus immunity and T lymphocytes in bone marrow donors and acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1986;2:141-146.
- 185 Dolstra H, Preijers F, Van de Wiel-van Kemenade E, Schattenberg A, Galam J, De Witte T. Expansion of CD8+CD57+ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. *Br J Haematol* 1995;90:300-307.

- <sup>186</sup> Janossy G, Prentice HG, Grob JP et al. T lymphocyte regeneration after transplantation of the T cell depleted allogeneic bone marrow. *Clin Exp Immunol* 1986;63:577-586.
- <sup>187</sup> Reittie JE, Gottlieb D, Heslop He, et al. Endogenously generated activated killer cells circulate after autologous and allogeneic marrow transplantation but not after chemotherapy. *Blood* 1989;73:1351-1358.
- <sup>188</sup> Turk JL. Delayed hypersensitivity. 3rd de. Research Monographs in Immunology series. vol 1. Amsterdam. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980.
- <sup>189</sup> Witherspoon RP, Matthews D, Storb R, et al. Recovery of in vivo cellular immunity after human marrow grafting. Influence of time postgrafting and acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1984;37:145-150.
- <sup>190</sup> Vose JM, Anderson JR, Kessinger A, et al. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 1993;11: 1846-1851.
- <sup>191</sup> Sharp JG, Crouse DA. Marrow contamination. Detection and significance. En: Armitage JO, Antman KH (eds). *High-dose cancer therapy: Pharmacology, hematopoietins, stem cells*. Baltimore. Williams & Wilkins, 1995. Pgs 259-288.
- <sup>192</sup> Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cells collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1993;82: 2605-2610.

- <sup>193</sup> Craig JIO, Langlands K, Parker AC, Anthony RS. Molecular detection of tumor contamination in peripheral blood stem cell harvests. *Exp Hematol* 1994;22:898-902.