

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA**

ÁREA DE PEDIATRÍA

**RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA EN NIÑOS
RECEPTORES DE TRASPLANTES DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
MEDICINA POR
SELMA LESSA DE CASTRO**

DIRECTOR: Prof. Dra. TERESA ESPAÑOL BORÉN

TUTOR: Prof. Dr. ALFRED GALLART CATALÁ

BARCELONA, 2001

*A mis padres, Ilca y Custódio,
por su amor, cariño y
amistad incondicional.*

*La vida no es un pasillo recto y fácil
por el que viajamos libres y sin obstáculos,
en el que debemos hallar nuestro camino,
perdidos y confundidos, una y otra vez
atrapados en un callejón sin salida.*

*Pero, sí tenemos fe,
Dios siempre nos abrirá una puerta,
que aunque tal vez no sea
la que queríamos,
al final será
buena para nosotros.*

A. J. Cronin

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Jose Ortega Aramburu, Profesor Asociado de Pediatría y Jefe del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Materno Infantil Vall d'Hebron, por haberme acogido en el servicio y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo. Sin su apoyo científico y profesional, así como su estímulo constante no hubiera sido posible el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Teresa Español Borén, Profesora Asociada de Inmunología y Jefe de Sección de la Unidad de Inmunología del Hospital Vall d'Hebron, por su calidad humana, científica y profesional. Agradezco su confianza y atención que me ha dedicado, junto con su incondicional ayuda en todo momento, además de su estímulo a la investigación.

A la Dra. Teresa Olivé, médico adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Materno Infantil Vall d'Hebron, por su inestimable dedicación en la labor del control clínico y seguimiento de los pacientes y por su amistad.

Al Profesor Alfred Gallart Catalá, Catedrático de Pediatría del Hospital Materno Infantil Vall d'Hebron, por ser mi tutor, por el estímulo y confianza en mí depositados.

A Albert Navarro, Profesor de la Unidad de Bioestadística del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología Y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, por la ayuda en el análisis de los datos y por su interés.

A las Dras. Díaz de Heredia y Pilar Bastida, por su atención al inicio de mi instancia en el servicio y en todos los momentos.

A las enfermeras Antonia Franch, Belén, Carmen Maestre y Nuria, así como Amparo, por su gran ayuda y paciencia en la labor de las consultas externas.

A la secretaria Nieves Lorenz, por su ayuda en todos los momentos y por su amistad principalmente.

A Susana, Encarna y Elisa, por su inestimable ayuda en el aprendizaje de las técnicas de laboratorio.

A mi familia española, Otto, Paquita, Juanito, Sr. Rosendo y Sra. Margarita, por los grandes momentos vividos.

A mis amigos de todas las horas aquí en Barcelona y en Fortaleza, incluso las difíciles, en especial a Márcia, Fátima, Glaucia, Flavia, Ana Virginia, Margarita Ortega, César, Augusto, Jorge, Fernando, Ihvna, José, Victor, a la familia Meireles, a la familia Petrola Evangelista y a quien pueda haber olvidado.

A todos los que pertenecen al Hospital Infantil Albert Sabin y al HEMOCE, por su ayuda, compañerismo y gran apoyo en los buenos y malos momentos.

A Linda, mi gran amiga, hermana, gracias por su cariño, por existir y ser como es.

Al Padre Agustín, mi gran y especial amigo y mentor espiritual, por haberme abierto los sentidos y el corazón hacia DIOS.

A Juan Carlos, por su sonrisa y su poesía.

A Carmen Zárate por su amistad, su alegría y su ayuda, en el tramo final.

A toda mi familia, hermanos, sobrinos, cuñadas, tíos, por su cariño, por quererme.

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

- Alo-TPSP – Trasplante Alogénico de Células Progenitoras de Sangre Periférica
- Alo-TMO – Trasplante Alogénico de Médula Ósea
- Anti-HBs – Anticuerpo de Superficie de la Hepatitis B
- ARA C – Arabinósido de Citosina
- ASPAR – Asparaginasa
- ASTO – Antiestreptolisina O
- ATG – Globulina Antitimocítica (caballo o conejo)
- ATMO – Trasplante Autólogo de Médula Ósea
- ATPSP – Trasplante Autólogo de Sangre Periférica
- ATRA – Ácido Trans-Retinóico
- BRP – Buena Respuesta Parcial
- CD – Cluster de Diferenciación
- CFM – Ciclofosfamida
- CMV – Citomegalovirus
- Con A – Conavalina A
- CPH – Células Progenitoras Hematopoyéticas
- Cy A – Ciclosporina A
- DAE – Daunorrubicina, Arabinósido de Citosina y Etopósido
- DEI – Donante Emparentado Idéntico
- DENI – Donante Emparentado No Idéntico
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNE – Donante No Emparentado
- DNEI – Donante No Emparentado Idéntico
- DNENI – Donante No Emparentado No Idéntico
- DNR – Daunorrubicina
- EBMT – European Bone Marrow Transplantation
- EICH – Enfermedad Injerto Contra Huésped
- EICHa – Enfermedad Injerto Contra Huésped Aguda
- EICHc – Enfermedad Injerto Contra Huésped Crónica

- ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbente Assay
- EPO – Eritropoietina
- EVOH – Enfermedad Venoclusiva Hepática
- G-CSG – Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas
- GETH – Grupo Español de Trasplante Hemopoyético
- GGEV – Gammaglobulina Endovenosa
- GM-CSF – Factor Estimulador de Colonias Granulocítico-Macrofágico
- HIV – Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- HLA – Antígeno Leucocitario Humano
- HU – Hidroxiurea
- ICE – Ifosfamida, Carboplatina y Etopósido
- ICT – Irradiación Corporal Total
- Ig – Inmunoglobulina (s)
- IgA – Inmunoglobulina A
- IgG – Inmunoglobulina G
- IgM – Inmunoglobulina M
- IBMTR – International Registre of Bone Marrow Transplantation
- IDP – Inmunodeficiencias Primarias
- IDSC – Inmunodeficiencia Severa Combinada
- IL – Interleucina
- INT – Irradiación Nodal Total
- IU – Unidades Internacionales
- i.v. – intravenoso
- LAL – Leucemia Aguda Linfoblástica
- LAM – Leucemia Aguda Mieloblástica
- LANL – Leucemia Aguda No Linfoblástica
- LGL – Linfocitos Grandes Granulares
- LMC – Leucemia Mieloide Crónica
- md – mediana
- MHC – Complejo Principal de Histocompatibilidad
- MO – Médula Ósea
- MP – Mercaptopurina

- MTX – Metotrexate
- NK – Natural Killer
- OKT3 – Anticuerpo Monoclonal Anti-CD3
- PETHEMA – Programa para el Estudio y la Terapéutica de las Hemopatías Malignas – Asociación Española de Hematología y Hemoterapia
- PH – Progenitores Hematopoyéticos
- PHA – Fitohemaglutinina
- PPD – Purified Protein Derivative
- PRED – Prednisona
- PWM – Mitógeno de la Fitolaca
- QT – Quimioterapia
- RC1 – Primera Remisión Completa
- RC2 – Segunda Remisión Completa
- RP – Remisión Parcial
- RT – Radioterapia
- SC – stem cell (célula progenitora)
- SCU – Sangre de Cordón Umbilical
- SEOP – Sociedad Española de Oncología Pediátrica
- SFOP – Sociedad Francesa de Oncología Pediátrica
- SMD – Mielodisplasia
- SNC – Sistema Nervioso Central
- SP – Sangre Periférica
- TCR – Receptor de Células T
- TIT – Tratamiento Intratecal
- TMO – Trasplante de Médula Ósea
- TPH – Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas
- VCR – Vincristina
- VHB – Virus de la Hepatitis B
- VM 26 – Teniposido

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	2
1.2. Antecedentes Históricos	5
1.3. Tipos de Trasplante	8
1.4. Indicaciones Clínicas, Complicaciones y Finalidades de los Regímenes de Acondicionamientos en los TPH	10
1.5. Reconstitución Inmunológica post TPH	13
1.5.1. Linfocitos T CD4⁺	21
1.5.2. Linfocitos T CD8⁺	21
1.5.3. Células Natural Killer (NK)	22
1.5.4. Linfocitos B CD19⁺	23
1.5.5. Función Linfocitaria	24
1.6. Inmunización y Trasplante	27
1.6.1. Respuesta a la Vacunación y su Valoración	30
1.6.2. Inmunización en el Huésped Inmunocomprometido	31
1.6.2.1. Receptores de TPH Alogénico	33
1.6.2.2. Receptores de TPH Autólogo	34
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.1. MATERIAL	38
3.1.1. Pacientes Estudiados	38
3.1.2. Pacientes Evaluables	39
3.1.3. Grupos Diagnósticos	40
3.1.4. Protocolos Utilizados	40
3.1.5. Regímenes de Acondicionamientos en los TPH	46

3.1.6. Profilaxis en el TPH	47
3.1.6.1. Profilaxis de la EICH	47
3.1.6.2. Profilaxis Antiinfecciosa	48
3.1.6.3. Profilaxis de la Enfermedad Venoclusiva Hepática	48
3.1.6.4. Pautas de Vacunación	48
3.2. MÉTODOS	49
3.2.1. Valoración de la Reconstitución Inmunológica	49
3.2.1.1. Subpoblaciones Linfocitarias	49
3.2.1.2. Función Linfocitaria T	53
3.2.1.3. Función Linfocitaria B	54
a) Cifras de Inmunoglobulinas	54
b) Producción de Anticuerpos	54
b1) Post Vacunales (Vacuna de la Hepatitis B y del Tétanos)	54
b2) Naturales (ASTO – Antiestreptolisina O)	55
3.2.2. Estudio del Quimerismo	56
3.2.3. Análisis Estadístico	57
4. RESULTADOS	59
4.1. Curso Clínico de los Pacientes	60
4.2. Reconstitución Inmunológica en los diferentes tipos de Fuentes (MO, SP y SCU)	62
4.2.1. Linfocitos Totales y Subpoblaciones Linfocitarias	62
a) Linfocitos Totales	62
b) Linfocitos T CD3 ⁺	64
c) Linfocitos T CD4 ⁺	65
d) Linfocitos T CD8 ⁺	66
e) Relación CD4 ⁺ /CD8 ⁺	67
f) Linfocitos B CD19 ⁺	68

g) Células NK	70
4.2.2. Función Linfocitaria T	71
4.2.3. Función Linfocitaria B	73
a) Cifras de Inmunoglobulina G (IgG)	73
b) Cifras de Inmunoglobulina A (IgA)	75
c) Cifras de Inmunoglobulina M (IgM)	76
d) Producción de Anticuerpos Post Vacunales	77
d.1) Anti-Hepatitis B (Anti-HBs)	77
d.2) Anti-Tétanos	79
e) Producción de Anticuerpos Naturales (ASTO)	80
4.3. Reconstitución Inmunológica en relación a los diferentes Tipos	
de Trasplantes (Autólogo y Alogénico)	81
4.3.1. Linfocitos Totales y Subpoblaciones Linfocitarias	81
a) Linfocitos Totales	81
b) Linfocitos T CD3 ⁺	83
c) Linfocitos T CD4 ⁺	84
d) Linfocitos T CD8 ⁺	85
e) Relación CD4 ⁺ /CD8 ⁺	86
f) Linfocitos B CD19 ⁺	87
g) Células NK	88
4.3.2. Función Linfocitaria T	89
4.3.3. Función Linfocitaria B	91
a) Cifras de Inmunoglobulina G (IgG)	91
b) Cifras de Inmunoglobulina A (IgA)	93
c) Cifras de Inmunoglobulina M (IgM)	94
d) Producción de Anticuerpos Post Vacunales	95
d.1) Anti-Hepatitis B (Anti-HBs)	95
d.2) Anti-Tétanos	96
e) Producción de Anticuerpos Naturales (ASTO)	97

4.4. Reconstitución Inmunológica en los receptores de Trasplante Alogénico según el Diagnóstico (Enfermedades Neoplásicas y No Neoplásicas)	98
4.4.1. Linfocitos Totales y Subpoblaciones Linfocitarias:	98
a) Linfocitos Totales	98
b) Linfocitos T CD3⁺	99
c) Linfocitos T CD4⁺	100
d) Linfocitos T CD8⁺	101
e) Relación CD4⁺/CD8⁺	102
f) Linfocitos B CD19⁺	103
g) Células NK	104
4.4.2. Función Linfocitaria T	105
4.5. Reconstitución Inmunológica en relación a la EICH y el Tratamiento Inmunosupresor utilizado	107
4.6. Grado de Respuesta a las Vacunas (Tétanos y Hepatitis) respecto a los niveles de Inmunoglobulina G	110
4.6.1. Tétanos	110
4.6.2. Hepatitis	111
5. DISCUSIÓN	112
6. CONCLUSIONES	127
7. BIBLIOGRAFÍA	130

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

El trasplante de médula ósea (TMO) es una modalidad terapéutica muy eficaz en el tratamiento de un creciente número de enfermedades humanas de elevada mortalidad. En efecto, ahora es posible curar más de 60 diferentes enfermedades utilizando el TMO¹⁻⁵ y es el tratamiento de elección para muchas de las neoplasias onco-hematológicas y los trastornos no malignos como las hemopatías congénitas, aplasias medulares y las inmunodeficiencias primarias⁶⁻⁹.

El principio del TMO alogénico es el de sustituir una hematopoyesis enferma o con una función pobre o ausente, por una hematopoyesis normal obtenida a partir de un donante sano histocompatible^{10, 11}.

En el autotrasplante o trasplante autólogo, se obtienen las células del propio receptor en la fase de recuperación de la función medular post-quimioterapia, de la propia médula o de sangre periférica mediante la administración de los llamados factores de crecimiento hematopoyético. Esta modalidad de trasplante se puede utilizar en los casos de enfermos con tumores sólidos que no afectan la médula ósea o de leucemias en fase de remisión completa de la enfermedad^{12, 13}.

Los métodos y las técnicas utilizados en el TMO se han ido mejorando y, en la actualidad, el nombre TMO está siendo sustituido por el de **Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TPH)** ya que por una parte, lo que realmente se trasplanta son los elementos celulares responsables de la generación de un sistema hematopoyético nuevo y, por otro, actualmente dichas células se obtienen de tres fuentes: **la propia médula ósea, la sangre periférica y el cordón umbilical del recién nacido**^{1, 2}. La obtención de progenitores hematopoyéticos en otras fuentes diferentes a la médula ósea es un hecho reciente y actualmente son consideradas como alternativas totalmente viables y con resultados similares a la médula ósea^{11, 14-}

18.

Las células del sistema inmunitario tienen un origen común en una célula progenitora hematopoyética pluripotencial (*stem cell* - *SC*) localizada en la médula ósea y a partir de la cual la diferenciación da lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas¹⁹. Estas células hematopoyéticas primarias son la población de células más primitivas a partir de las cuales derivan todas las células sanguíneas circulantes. Se reconocen las *SC* por sus capacidades de auto-renovación y de diferenciación en diversas células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Éstas pierden la capacidad de auto-renovación y adquieren la de multiplicarse y diferenciarse, dando lugar a su vez a las células precursoras que tienen unas características específicas de cada línea celular^{20, 21} (Figura 1).

Por lo tanto, siempre que existan las condiciones adecuadas, a partir de un determinado número de *SC* y CPH puede alcanzarse una reconstitución inmunológica y hematológica completas.

Figura 1

1.2.ANTECEDENTES HISTORICOS

El primer trasplante de médula ósea humano documentado fue realizado por Osgood en 1939, cuando una mujer con aplasia medular tratada con transfusiones regulares, recibió la médula ósea de su hermano con idéntico grupo sanguíneo intravenosamente, pero no hubo éxito y la paciente murió cinco días después²².

Posteriormente, Jacobson y colaboradores demostraron que ratones irradiados letalmente podían recuperar la hematopoyesis normal por la protección del bazo^{23, 24}. En la segunda mitad de la década de los años cuarenta, se comprobó el efecto destructor de la irradiación sobre la médula ósea^{11, 25}. A principios de los años cincuenta, algunos experimentos de laboratorio como los de Lorenz, en 1951, demostraron que también la administración parenteral de médula ósea singénica, protegía a los ratones de una irradiación letal²⁶.

Aunque inicialmente el efecto protector de la médula ósea fue atribuido a un factor humoral, en 1956 se demostró, mediante diversos marcadores genéticos, que el efecto protector era debido a las células hematopoyéticas del donante^{23, 25, 26}.

Los primeros intentos modernos para el uso del TMO en el hombre clínicamente, fueron emprendidos por E. Donald Thomas (por lo cual le fue otorgado el premio Nobel) y colaboradores entre 1957 y 1959, con la realización de trasplantes singénicos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda en fases avanzadas de la enfermedad, utilizando como acondicionamiento la irradiación corporal total en seis pacientes; sin embargo, todos fallecieron posteriormente por recaída de la enfermedad²⁷.

Un accidente nuclear en Belgrado proporcionó a Mathé y colaboradores, en 1959, una oportunidad para intentar rescatar cinco pacientes víctimas del accidente, mediante la infusión de médula ósea de familiares y de voluntarios no emparentados, pero no hubo éxito²⁸. Otros 154 trasplantes se realizaron entre 1959 y 1962, pero con pobres resultados²⁹.

En los años posteriores, Van Bekkum y De Vries describieron en animales de experimentación la enfermedad injerto contra huésped (EICH) que producía la muerte de los pacientes¹¹.

La demostración de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y el desarrollo de sus métodos de tipaje en la década de los sesenta, llevó a una nueva fase en el TMO^{3, 11}. El primer injerto mantenido fue documentado en 1965, en un paciente con LLA (Leucemia Linfocítica Aguda) que recibió irradiación y quimioterapia seguido por la infusión intravenosa de médula ósea de seis distintos donantes relacionados, por lo que desarrolló la enfermedad injerto contra huésped y murió 20 meses después del trasplante³.

El primer trasplante con éxito, tuvo lugar en la Universidad de Minnesota, en noviembre de 1968, en un lactante afecto de una inmunodeficiencia severa combinada (IDSC), al que se infundió médula ósea de su hermana sana histocompatible³⁰. Casi simultáneamente, se trasplantó con éxito un niño con enfermedad de Wiskott-Aldrich³¹ y un segundo paciente con IDSC³². Estos tres niños actualmente son adultos y llevan una vida normal³³. Después, en marzo de 1969, el equipo de Seattle, realizó un trasplante de MO en un paciente afecto de leucemia utilizando previamente una dosis letal de irradiación corporal total (ICT)^{30, 34}.

Entre 1969 y 1980 el trasplante se fue consolidando como una opción terapéutica para pacientes con leucemia que no habían respondido a la quimioterapia convencional o para aquellas enfermedades no neoplásicas que precisaban múltiples transfusiones, como la anemia medular grave, así como para alguna enfermedad metabólica¹¹. Por la primera vez, un significativo porcentaje de pacientes presentó una supervivencia a largo plazo³.

Desde 1980 hasta nuestros días se han ido definiendo diferentes grupos de riesgo en cada patología, que han permitido un uso más racional del trasplante, alcanzando unos mejores resultados¹¹.

El número de centros de trasplante de MO ha seguido creciendo en todo el mundo y la creación de registros internacionales de donantes altruistas ha proporcionado una nueva perspectiva al trasplante medular, permitiendo así su utilización en pacientes que carecían de un donante familiar adecuado^{3, 11, 35, 36}. Inicialmente, los resultados no fueron totalmente satisfactorios^{37, 38}, pero posteriormente se han publicado diferentes estudios multicéntricos en los que los resultados son similares en el TMO con donante familiar y no familiar adecuado^{39,40}.

Hasta finales de 1999, figuran en el Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea (IBMTR) los datos completos de más de 60.000 pacientes que han recibido un trasplante de médula. Se estima que más de 10.000 pacientes viven actualmente sin la enfermedad que motivó el trasplante, después de transcurridos al menos cinco años post-TPH³³.

En España se realizaron en los últimos cinco años (del 96 al 2000) un promedio de 2200 trasplantes anuales, de los cuales cerca de 10% eran pacientes menores de 15 años. En la Unidad de Trasplante de Médula Ósea del Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona, entre enero de 1984 y diciembre de 2000 fueron realizados un total de 559 trasplantes, de los cuales 293 fueron alogénicos y 266 autólogos. El primer TPH de donante no emparentado (DNE) se realizó en 1991 y de sangre de cordón umbilical (SCU) en 1994. Se realizaron de 1984 a 1990 una media de 20 trasplantes anuales y de 1991 a 1999 una media de más de 40 trasplantes anuales, cifras estas que hasta hoy permanecen. Existen actualmente en España seis Unidades de Trasplantes exclusivamente pediátricas y otras tantas mixtas de adultos y niños².

Por lo tanto, el TPH es un procedimiento terapéutico en el que existe una notable experiencia que ha ido aumentando a lo largo de los años².

1.3. TIPOS DE TRASPLANTES

Según en **donante**, existen dos modalidades de TPH, los **Autólogos** y los **Alogénicos**.

Cuanto a la **identidad HLA**, los TPH pueden ser:

- (a) HLA genotípicamente idéntico (familiar)
- (b) HLA fenotípicamente idéntico (familiar o no familiar)
- (c) HLA no idéntico

En los **TPH Autólogos** el paciente actúa como su propio donante, o sea, sus propias CPH, después de ser extraídas, conservadas y tratadas (en enfermedades tumorales no invasivas de la médula ósea o en remisión completa de esta en caso de leucemias) en condiciones adecuadas, son reinfundidas como procedimiento de rescate permitiendo el empleo previo de tratamientos de quimio y radioterapia muy intensivos.

Los **TPH Alogénicos** son obtenidos de un donante que no es el propio paciente y con la mejor compatibilidad posible en el sistema HLA (antígenos leucocitarios humanos codificados por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad), sea un familiar o no. Al efecto citotóxico del tratamiento previo de quimioterapia o quimioradioterapia, se añade aquí un efecto inmunológico de injerto-contratumor.

En el **TPH singénico** el donante es un hermano gemelo univitelino y por tanto HLA idéntico.

En el TPH autólogo diversas técnicas pueden ser utilizadas para purificar las CPH de células neoplásicas residuales, como el sistema de “purgado” que es el tratamiento “ex vivo” del producto a ser infundido con agentes farmacológicos citotóxicos o mediante marcaje de las células blásticas con anticuerpos monoclonales y posterior lisis o separación. También se puede seleccionar del producto extraído sólo las CPH CD34⁺ que contiene las SC y las células progenitoras^{41,42}.

En el TPH alogénico, es fundamental la mayor identidad HLA posible. Como sólo el 20-30% de los pacientes tienen hermanos donantes totalmente compatibles, se está realizando un número creciente de trasplantes con donantes emparentados parcialmente compatibles o con donantes compatibles no emparentados. En éstos existe un mayor grado de alorreactividad que en los TPH de hermanos HLA-
idénticos debido a diferencias en los antígenos “menores” de histocompatibilidad⁴³.

44 .

1.4. INDICACIONES CLÍNICAS, COMPLICACIONES Y REGÍMENES DE ACONDICIONAMIENTOS EN LOS TPH

• **Indicaciones Clínicas del TPH**

Las principales indicaciones son las siguientes:

- Enfermedades Neoplásicas (hematológicas y tumores sólidos) que no sean curables por los agentes citotóxicos a dosis tolerables pero que puedan ser curadas con tratamientos mieloablativos (con alta toxicidad medular). Así, la infusión de CPH reconstruye el sistema hematopoyético, permitiendo la restauración de la actividad hematopoyética a nivel medular. En los TPH alogénicos y existe además un efecto inmunológico antitumoral, contribuyendo a la eliminación de la enfermedad residual mínima. Para estas indicaciones son utilizados tanto los TPH autólogos como los alogénicos, dependiendo de la enfermedad. El tratamiento previo consiste en quimioterapia con o sin radioterapia a dosis más mieloablativas que lo general^{45, 46, 47}.

- Enfermedades No Neoplásicas (aplasias medulares, hemopatías congénitas, inmunodeficiencias y otros errores congénitos) en las que o ya no existe una médula funcionante o esta médula no es capaz de producir ciertos elementos celulares sanguíneos en número y función adecuados por defectos genéticos varios. Para estas indicaciones sólo son utilizados los TPH alogénicos⁴⁸⁻⁵³.

• **Complicaciones del TPH**

Son más frecuentes en pacientes que han recibido un intenso tratamiento previo o en aquellos en que el acondicionamiento es muy intensivo y después del TPH alogénico.

a) Las reacciones inmunológicas de rechazo y de EICH se hallan relacionadas con la disparidad genética entre donante y receptor, o sea, las diferencias antigénicas en el sistema HLA y otros sistemas menores. Son exclusivas del TPH alogénico.

El rechazo de la médula se produce cuando células inmunocompetentes residuales sobreviven al tratamiento de acondicionamiento y rechazan la médula del donante.

Se produce EICH cuando células T alorreactivas maduras del injerto reconocen aloantígenos del huésped. La EICH aguda (en los primeros 100 días tras el trasplante) y la EICH crónica (a partir del 4º mes después del trasplante) constituyen la mayor causa de morbilidad y mortalidad de los trasplantes alogénicos.

b) El riesgo de infección grave se debe a la fase de neutropenia intensa y de inmunodeficiencia inducidas por los regímenes de acondicionamiento. Es mayor en los pacientes inmunodeprimidos en relación con una EICH y su tratamiento. En el período postrasplante precoz, la granulocitopenia intensa aumenta el riesgo de infección por bacterias, hongos y virus. La depresión inmunológica es causa de infecciones oportunistas durante varios meses, especialmente en caso de trasplantes parcialmente incompatibles o de donantes no emparentados. Son particularmente graves las infecciones micóticas sistémicas y ciertas infecciones víricas como las producidas por citomegalovirus (CMV) y adenovirus, como las neumopatías intersticiales.

c) También son complicaciones graves las neumopatías intersticiales agudas de etiología tóxica, la enfermedad venooclusiva hepática (EVOH), la insuficiencia renal y otros efectos derivados de la toxicidad medicamentosa.

d) Otros tipos de complicaciones les constituye la posible recidiva de la enfermedad y la aparición de una neoplasia secundaria.

- **Régimen de Acondicionamiento Pre-TPH - Finalidades**

Es el tratamiento mediante quimioterapia y/o radioterapia que recibe el paciente en los días previos al trasplante.

En los trasplantes alogénicos, tiene la triple finalidad de:

- a) conseguir una inmunosupresión que garantice el prendimiento de los progenitores hematopoyéticos, ayudando así a superar las reacciones inmunológicas existentes, sean de rechazo o de enfermedad injerto contra huésped (EICH);

- b) eliminar las células tumorales residuales erradicando así la neoplasia subyacente y

- c) conseguir un espacio físico, eliminando la hemopoyesis del receptor para que se implanten los nuevos progenitores.

En los trasplantes autólogos se cumplen los dos últimos objetivos.

La mayor parte de los agentes quimioterápicos así como la irradiación corporal total (ICT) tienen un doble efecto inmunosupresor y citorreductor. Los regímenes de acondicionamiento se componen en general de dos o más quimioterápicos con adición o no de irradiación corporal total a dosis supraletales (los regímenes de acondicionamientos están descritos en el apartado material y métodos).

1.5. RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA POST-TPH

La reconstitución del sistema inmune es caracterizada por:

(1) la **transferencia** clínicamente significativa de una **respuesta inmune** derivada de la respuesta inmune y humoral del donante –

Después de la quimioterapia y radioterapia pré-trasplante, toda la hemopoyesis normal del receptor, la respuesta celular y la mayoría de la respuesta humoral son eliminadas.

La respuesta de los linfocitos T antígeno-específica es necesaria para el control clínico de infecciones por virus, protozoos y hongos y, a través del control de la producción de anticuerpos específicos por los linfocitos B, los linfocitos T son también necesarios para el control de infecciones bacterianas⁵⁴⁻⁵⁷.

Aunque la función de los linfocitos T antígeno-específica no haya sido detectada después de un trasplante alogénico de médula ósea (alo-TMO) con la detección de linfocitos T en sangre periférica, una transferencia temporaria de estos linfocitos ha sido detectada en los receptores de un trasplante alogénico de células progenitoras de sangre periférica movilizadas (alo-TPSP)⁵⁸. Se estima que la sangre periférica contiene de 1.0 a 1.5 logaritmos más de linfocitos T que la médula ósea. Así, el aumento en el número de linfocitos T transferidos en el momento del TPH puede proporcionar a corto plazo una inmunidad celular para estos receptores^{54, 59}.

La evaluación de las complicaciones infecciosas en los receptores de un alo-TPSP revela que la proporción de complicaciones es menor que las que se dan en los alo-TMO. O sea, que la transferencia de linfocitos T antígeno-específica derivada del donante transfiere beneficios clínicos al receptor. Sin embargo, la inmunidad a largo plazo todavía requiere la producción de nuevos linfocitos T antígeno-específicos^{54, 60}.

La falta de una respuesta linfocitaria T adecuada en un primer periodo es causada por la quimioterapia, y especialmente el metotrexate (MTX), ciclofosfamida (CFM), fludarabina, corticóides, ciclosporina (Cy) y la irradiación. Estos fármacos, usados como tratamiento previo de “acondicionamiento” y como profilaxis para la

EICH, pueden producir la destrucción selectiva de linfocitos T antígeno-específicos de memoria e inhibir su función. Estas células son las respondedoras ante la presencia de antígenos virales.

Así, la profilaxis de la EICH puede dar lugar a una destrucción activa de linfocitos T antígeno-específicos derivados del donante. Puesto que las CPH de sangre periférica contienen relativamente más linfocitos T antígeno-específicos que las CPH de médula ósea contaminadas con sangre periférica, algunos de estos linfocitos pueden persistir en los receptores de un alo-TPSP^{54, 60}.

La respuesta linfocitaria T clínicamente significativa derivada de las células del donante no se detecta en la primera fase después del TPH, sin embargo, la respuesta linfocitaria B, medida por la producción de anticuerpos derivada del donante, puede ser detectada de forma más precoz⁶¹. Varios estudios sobre la producción de anticuerpos han sido realizados para algunos antígenos (toxoides tetánico, toxoide diftérico, virus del polio, virus de la hepatitis) después del TPH. La respuesta máxima de anticuerpos es obtenida cuando ambos, donante y receptor, son previamente inmunizados⁶². Así, un incremento en la producción de anticuerpos se puede observar también si cualquiera de los dos, donante o receptor, han sido inmunizados antes del TPH.

Si los pacientes no son inmunizados, la producción de anticuerpos no está presente y, en muchos casos los niveles de anticuerpos clínicamente significativos no son detectados un año post-TPH^{54, 60}.

La transferencia temporal de la inmunoglobulina A (IgA) salivar derivada del donante fue descrita post-TPH⁶³. La evaluación de la transferencia de la inmunidad de los linfocitos B es confusa por el hecho de que los estudios para detectar la producción de anticuerpos post-TPH no han utilizado técnicas para diferenciar entre los anticuerpos producidos por los linfocitos B del donante o del receptor.

Por lo tanto, el aumento en la producción de anticuerpos post-TPH siguiente a la inmunización del donante y receptor puede ser debido a la transferencia de:

- (a) linfocitos B inmunes del donante;
- (b) células presentadoras de antígeno del donante antígeno-sensibilizadas o
- (c) linfocitos T inmunes del donante que cooperan con cualquiera de los linfocitos B antígeno-específicos del donante o del receptor⁵⁴.

La administración rutinaria de inmunoglobulina intravenosa en los receptores de TPH, enmascara la producción de anticuerpos por el receptor precozmente después del TPH⁶⁴. Los receptores de TPH son incapaces de producir anticuerpos normales para los antígenos capsulares polisacáridos de las bacterias respiratorias encapsuladas por un periodo prolongado post-TPH^{65, 66}. Cuando la terapia sustitutiva cesa, los pacientes pueden desarrollar infecciones piogénicas recurrentes si no reciben antibioticoterapia profiláctica. Defectos definibles en la producción de anticuerpos pueden ser detectados en todos los receptores de TPH⁶⁷.

(2) la recuperación de la **ontogenia linfoide normal** –

Las células hematopoyéticas pluripotenciales, destinadas a la diferenciación en linfocitos T, expresan el CD7 como primer antígeno de superficie característico⁶⁸. Posteriormente aparecen otros que participan de esta diferenciación. (CD3, CD4, CD8, etc.) en primer lugar como linfocitos doble positivos (CD4⁺CD8⁺) en el timo y posteriormente CD4⁺ (linfocitos T colaboradores) y CD8⁺ (linfocitos T citotóxicos) diferenciados, en la sangre periférica.

La maduración de las células pre B a B maduras en sangre periférica puede ser más lenta que la recuperación de las células T.

Esta diferenciación linfoide desde la *stem cell* al timo, está favorecida por la interleucina 7 (IL-7). Se demuestra que los pacientes con defectos en los receptores para la IL-7 o los experimentos con ratones que son incapaces de producir IL-7, presentan importantes disminuciones en los linfocitos T^{69, 70}.

Los linfocitos T presentes post-TPH pueden ser derivados o de los linfocitos T maduros de la médula infundida o de las CPH trasplantadas. La valoración más precisa de la ontogenia linfoide post-TPH puede ser observada en los receptores de TPH con células T deplecionadas, donde no existe contribución significativa de los linfocitos T maduros derivados del donante⁵⁴.

Los receptores de un TPH autólogo sin depleción de células T, alcanzan valores absolutos de linfocitos totales de 500/ μ L más rápidamente (15 días) que los receptores de TPH histocompatible sin tratamiento previo (27-30 días)⁷¹. La demora en la normalización del número absoluto de linfocitos totales en receptores de TPH alogénico es debida en parte a la administración rutinaria de MTX post-TPH como profilaxis contra la EICH aguda. Los receptores de TPH alogénico deplecionado de células T presentan en media una recuperación de los valores absolutos de linfocitos totales sobre el día 25, cuando comparados con el día 31 para los receptores de TPH histocompatible con células no tratadas, posiblemente debido a la ausencia del MTX post-TPH^{72, 73}.

La normalización del número absoluto de los linfocitos T CD3⁺ es retrasada de forma semejante al retraso en el número de linfocitos totales. Los receptores de TPH autólogo recuperan el número de linfocitos T CD3⁺ entre las 6 y 8 semanas post-TPH, mientras los receptores de TPH alogénico lo hacen cerca de 12 semanas post-TPH. La EICH aguda no tiene ningún efecto en esta recuperación^{54, 74}.

El porcentaje y número absoluto de linfocitos T CD8⁺ se normalizan de forma más rápida que la de los linfocitos T CD4⁺^{71, 72}. Los linfocitos T CD8⁺ alcanzan valores normales a los 4 meses post-TPH, mientras se detectan cifras bajas de linfocitos T CD4⁺ en los primeros 6 meses post-TPH. Esta rápida normalización de los linfocitos T CD8⁺ conjuntamente con los reducidos niveles de linfocitos T CD4⁺ resultan en una inversión del cociente CD4/CD8, lo cual no se normaliza hasta los 6 a 9 meses post-TPH^{54, 74}.

El número absoluto de nuevos linfocitos T CD4⁺ está inversamente correlacionado con la edad del receptor⁷⁵⁻⁷⁷. De este modo, los receptores adultos tienen una reducida capacidad para producir nuevos linfocitos T CD4⁺, secundariamente a una disminución en su función tímica.

Las células NK (citotóxicas naturales) reaparecen precozmente post-TPH y durante el primer mes representan la mayor población linfoide⁷⁸. La presencia de estas células en adición con los linfocitos T CD8⁺, contribuye para la inversión del cociente CD4/CD8.

El número de linfocitos B es determinado tanto por la presencia de inmunoglobulinas de superficie como por la expresión del anticuerpo monoclonal CD19 o CD20. Estos valores pueden alcanzar niveles normales de 1 a 2 meses post-TPH y no son afectados por la depleción de células T^{78, 79}. El análisis de los genes de cadenas pesadas presentes en los linfocitos B circulantes precozmente post-TPH demuestra que son similares a aquellos observados en los linfocitos B inmaduros, indicando que ocurre una maduración progresiva de los linfocitos B⁸⁰.

La IgA secretora está alterada en los 6 meses post-TPH⁸¹. Sin la reposición de inmunoglobulina intravenosa, los receptores tienen reducidos niveles de IgG, IgA y IgM durante los 6 primeros meses post-TPH⁷⁹. Los pacientes sin EICH crónica normalizan sus niveles de IgG entre los 8 y 9 meses, los de IgM entre los 9 y 12 meses y los de IgA entre los 2 a 3 años. Aquellos pacientes con EICH crónica pueden presentar niveles elevados de IgM y IgG ya desde los 6 a los 9 meses post-TPH⁷⁹.

La reconstitución de la función linfocitaria T post-TPH puede ser analizada en función de la respuesta a estímulos mitogénicos como la PHA y el anticuerpo monoclonal anti-CD3, o la estimulación antigénica específica (toxoides tetánicos, antígenos del virus de la hepatitis B, etc.). Los receptores de TPH sin depleción de células T presentan una disminuida proliferación a la estimulación con PHA o con el anticuerpo anti-CD3 en los 2 primeros meses post-TPH⁷². Entre los 4 y 6 meses, la respuesta proliferativa a la estimulación mitogénica se normaliza, sugiriendo que la

capacidad normal para producir la IL-2, hasta entonces no desarrollada, ya está presente⁵⁴.

La inmunización de los receptores de TPH durante los primeros 3 meses post-TPH con el toxoide tetánico o diftérico, no resulta en el desarrollo de una función linfocitaria T antígeno-específica cuando es valorada por la proliferación in vitro antígeno-inducida. Pero los pacientes sin EICH crónica que son inmunizados más de 100 días post-TPH, rutinariamente desarrollan una función linfocitaria T antígeno-específica. Sin embargo, la inmunización de pacientes con EICH crónica no resulta en una función linfocitaria T detectable en la mayoría de los pacientes. No está claro si la ausencia de una función linfocitaria T es debido a la inmunosupresión recibida por los pacientes con EICH crónica o a una falta de precursores de linfocitos T⁵⁴.

La reconstitución de la función linfocitaria B puede ser determinada después de una estimulación T-independiente, la cual no requiere linfocitos T antígeno-específicos, o después de una estimulación T-dependiente, la cual requiere linfocitos T inmunocompetentes. Esta capacidad funcional de los linfocitos B para responder a una estimulación específica se normaliza de forma precoz post-TPH⁵⁴.

La producción de anticuerpos específicos puede ser valorada en los receptores que son anticuerpos-positivos y recibieron un TPH de donantes anticuerpos-negativos y en los receptores que son anticuerpos-negativos y recibieron un TPH de donantes anticuerpos-positivos. Los receptores que presentan anticuerpos para el tétanos y la hepatitis antes del TPH poseen también anticuerpos detectables precozmente post-TPH, pero no existe una producción mantenida de estos anticuerpos hasta un año post-TPH⁶¹. De este modo, sin una estimulación antigénica, no ocurre una producción mantenida de anticuerpos post-TPH⁸². Cuando los pacientes anticuerpos-positivos son inmunizados inmediatamente (0-14 días) post-TPH, se observa una elevación transitoria en los títulos de anticuerpos⁶². Una inmunización más tardía en el periodo post-TPH no resulta en una producción específica de anticuerpos, a menos que se generen nuevos linfocitos T antígeno-específicos⁵⁴.

(3) los efectos de la **enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda y crónica** y sus terapias –

La EICH aguda siguiente a un TPH histocompatible, tiene escasos efectos sobre el tiempo de la reconstitución linfoide medida por el recuento absoluto de linfocitos totales o el número absoluto de linfocitos T CD3⁺. Una depresión transitoria del número absoluto de linfocitos T totales y de los linfocitos T CD3⁺ ocurre siguiente a la administración de una inmunosupresión anti-linfocito T, especialmente cuando se administra globulina antitimocítica (ATG) y anticuerpos monoclonales anti-linfocitos T. En ausencia de inmunosupresión específica, el tiempo de recuperación de linfocitos T y B no se afecta por la EICH aguda, sin embargo, las anomalías en la reconstitución inmunológica están más influenciadas por la EICH crónica⁵⁴.

Los pacientes con EICH crónica tienen una capacidad disminuida para desarrollar una respuesta de los linfocitos T antígeno-específica y para producir anticuerpos específicos, y tienen una incidencia aumentada de autoanticuerpos por disregulación inmunológica. La inmunización de estos pacientes con antígenos como del toxoide tetánico o diftérico, demuestra defectos sostenidos en la producción de anticuerpos, incluyendo disminuciones en la respuesta primaria (IgM) y secundaria (IgG) de anticuerpos^{79, 83}. Estos pacientes tienen una incidencia mayor de infecciones. La administración rutinaria de antibióticos profilácticos e inmunoglobulina intravenosa reduce las complicaciones infecciosas; sin embargo, persiste la incapacidad de los pacientes con EICH crónica para producir anticuerpos protectores frente a antígenos bacterianos polisacáridos.

Otros factores que pueden influenciar la reconstitución inmunológica incluyen la relación entre donante y receptor (familiar HLA-idéntico o no emparentado), el grado de identidad HLA, las infecciones previas al trasplante y la edad del receptor, entre otros.

El número absoluto de linfocitos T CD4⁺ predice la capacidad de receptores de TPH para responder a la inmunización⁷⁶. Así, los receptores que son incapaces

para producir nuevos linfocitos T CD4⁺ tienen dificultades para responder a nuevos estímulos antigénicos. Experimentos con ratones demuestran que la EICH aguda produce defectos en la función tímica, incluyendo una inhabilidad para producir nuevos linfocitos T⁸⁴. Estos defectos pueden ocurrir sobretodo en los receptores con edades más avanzadas que hayan recibido un TPH de donante no emparentado. Tales individuos tienen una limitada capacidad para producir nuevos linfocitos T CD4⁺ y, por lo tanto, dependen de la expansión clonal de los linfocitos T del donante para su inmunocompetencia. El espectro de antígenos lo cual tales linfocitos pueden responder puede ser limitado y puede explicar la aumentada incidencia de infecciones oportunistas encontradas en los receptores con edades más avanzadas de TPH no emparentados^{54, 60}.

La administración de ciclosporina (Cy) en la profilaxis de la EICH puede inhibir la diferenciación de los linfocitos doble-positivos en linfocitos T CD3⁺ diferenciados⁸⁵. Los efectos combinados de la alteración tímica y de la ciclosporina pueden resultar en defectos en ambas las selecciones tímicas, positivas y negativas. Cuando ocurren estos defectos en la selección positiva, puede resultar en una reducción en la frecuencia de linfocitos T maduros con especificidad para antígenos exógenos. Pero cuando ocurren en la selección negativa podría resultar en un aumento en la frecuencia de linfocitos T autoreactivos implicados en la patogénesis de la EICH crónica^{54, 60}.

El papel fundamental de la ciclosporina es la inhibición de la síntesis de IL-2, por tanto no hay activación de las células T citotóxicas CD8⁺, disminuyendo así la reacción inmunológica provocante del rechazo.

Por lo tanto, la reconstitución inmunológica es esencial en todos los casos y constituye la curación de la enfermedad de base en los pacientes afectos de inmunodeficiencias congénitas graves. En estos casos es esencial la reconstitución T y B, si bien en algunos pacientes las células B y la producción de anticuerpos no se recuperan y deben llevar tratamiento sustitutivo con gammaglobulina de forma permanente.

1.5.1. Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ o colaboradores representan una subpoblación de las células T y tienen como una de sus principales funciones la regulación de todas las respuestas inmunitarias frente a antígenos proteicos y ayudan en su calidad de células efectoras, en la eliminación de microorganismos intracelulares. Sus precursores provienen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo (el nombre de linfocitos “ T ” se refiere a que derivan del Timo). Las moléculas de superficie CD4 son glicoproteínas de cadena ligera de la superfamilia de las Ig. Se expresan en forma de un monómero en la superficie de células T periféricas y timocitos. En el hombre, también están presentes en monocitos y macrófagos, en menor cantidad. Son aproximadamente dos tercios (50-60%) de las células T circulantes en sangre y en mayor proporción en ganglios linfáticos y menor en bazo^{19, 86, 87}.

Estos linfocitos sólo reconocen antígenos a través del receptor de la célula T (TCR) y en combinación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II. En respuesta a la estimulación antigénica, las células T colaboradoras secretan diversas proteínas llamadas citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T así como de otras células, entre ellas las células B y los macrófagos. Las citocinas también atraen y activan a los leucocitos inflamatorios, incluyendo macrófagos y granulocitos, proporcionando importantes conexiones entre la inmunidad específica de las células T y los mecanismos efectoras de la inmunidad natural^{87, 88}.

1.5.2. Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos también representan una subpoblación de las células T, regulan las funciones de todas las respuestas inmunitarias frente a antígenos proteicos y ayudan en la eliminación de microorganismos intracelulares. Son células claves en el periodo inmediato post-TPH, participan en la lisis de células infectadas por virus y células tumorales. Su maduración y selección también se realiza en el timo. Las moléculas CD8 son glicoproteínas transmembrana y también

miembros de la superfamilia de las Ig. La mayoría de las moléculas CD8⁺ aparecen como heterodímeros, pero también pueden presentarse como homodímeros, pero se desconoce la importancia biológica de estas distintas formas. Están presentes en aproximadamente 20-25% en la sangre, 15-20% en los ganglios linfáticos y entre 10-15% en el bazo^{19, 86, 87}.

Constituyen un subgrupo de células T que reconocen antígenos a través del TCR y en el contexto de moléculas MHC de clase I, destruyendo las células que expresan antígenos peptídicos asociados a este tipo de complejo mayor de histocompatibilidad. Parecen ser células efectoras importantes en tres situaciones: (a) las infecciones intracelulares de células no fagocíticas o las infecciones que no son eliminadas por los fagocitos, como las infecciones virales o las debidas a bacterias como *Listeria monocytogenes*; (b) el rechazo agudo de alotrasplantes y (c) el rechazo de tumores. De hecho, la función fisiológica esencial de los linfocitos T citotóxicos es la vigilancia de las infecciones virales, asociada al reconocimiento y lisis directa de células extrañas del injerto en el rechazo celular agudo y a la inmunovigilancia y destrucción de las células que contienen genes mutados capaces de producir o asociarse a transformación maligna^{87, 88}.

1.5.3. Células NK (Natural Killer)

Las células NK o citotóxicas naturales representan una subpoblación de linfocitos que se encuentran cerca de 10% tanto en la sangre como en los tejidos linfoides, especialmente el bazo y raramente son encontradas en ganglios linfáticos. Tienen como marcador específico el CD16⁺CD56⁺. Estas moléculas también son miembros de la superfamilia de Ig. Derivan de la médula ósea pero también podrían derivar directamente de las células doble negativas, que sabemos son también CD16⁺, que se encuentran en el timo y que son precursoras de los linfocitos T. Son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos, razón por la cual son llamadas de linfocitos grandes granulares (LGL). Son capaces de destruir algunas células tumorales, sobre todo de origen hematopoyético, y células normales infectadas por virus, sin previa estimulación antigénica^{19, 60, 86, 87, 89}.

Cuando consideramos el fenotipo de superficie y el linaje, las células NK no son células T ni B pues no poseen los marcadores ni de linfocitos T (CD3) ni de linfocitos B (CD19). Su proceso de maduración se efectúa fuera del timo y en órganos linfoides periféricos, desconociéndose los procesos requeridos para que esta diferenciación se produzca y el órgano donde se desarrolla. Esto explica que no se alteren sustancialmente los niveles de células NK en animales atímicos y en los casos de IDSC observados tanto en animales como en el hombre. El mecanismo de lisis de las células NK es idéntico al de los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos). La gran diferencia que existe entre ambas células es el mecanismo de reconocimiento del antígeno en la superficie celular, que no es restringido por las moléculas de clase I o II del MHC^{19, 86-88}.

No se comprende perfectamente la función de las células NK en la inmunidad normal. Se piensa que sirven para lisar células infectadas por virus antes de que los linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos puedan diferenciarse a partir de pre-linfocitos T citotóxicos, es decir, durante los primeros días de la infección viral. Puesto que las células NK pueden lisar ciertas células tumorales, se ha propuesto también que estas células sirvan para destruir clones malignos *in vivo*. Sin embargo, los infiltrados inflamatorios asociados al tumor no expresan típicamente niveles significativos de células NK. La única situación en la que predominan grandes cantidades de células NK en las lesiones es la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en los receptores de TPH. Estas células infiltran epitelios como la piel y se puede hallar junto a células epiteliales necróticas, lo que es el sello distintivo de una EICH^{87, 88, 90}.

1.5.4. Linfocitos B CD19⁺

Los linfocitos B CD19⁺ representan la mayoría de las células B. La molécula CD19 aparece ya en diversos estadios de la diferenciación de células B. Son las únicas células capaces de producir anticuerpos, participando así de la inmunidad humoral. Son así llamados porque se observó en las aves que maduraban en un órgano denominado bolsa de fabricio. En los mamíferos, no hay equivalente

anatómico de la bolsa, y las primeras fases de maduración de la célula B tienen lugar en la médula ósea. Así, el término linfocito “ B ” se refiere al derivado de la médula ósea (Bone marrow en inglés). Son encontrados de 10-15% en la sangre, de 20-25% en los ganglios linfáticos y de 40-45% en el bazo. Los receptores para los antígenos en los linfocitos B son moléculas de inmunoglobulina unidas a la membrana. La interacción de los antígenos con estos receptores de membrana inicia la secuencia de activación de la célula B, que termina en el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos específicos por el antígeno desencadenante^{19, 86-88}.

La función fisiológica de los anticuerpos es neutralizar y eliminar al antígeno que ha inducido su formación. La eliminación de diferentes antígenos o microorganismos requiere varios mecanismos efectoras que dependen de distintas clases de anticuerpos. El sistema inmunitario humoral posee la capacidad para responder a distintos tipos de antígenos produciendo diferentes clases de anticuerpos. Por ejemplo, la respuesta de anticuerpos frente a bacterias con cápsulas de polisacáridos es principalmente de inmunoglobulina M, que activa el sistema del complemento dando lugar a la opsonización y fagocitosis de las bacterias y la respuesta a muchos virus es mediante anticuerpos IgG de alta afinidad que bloquean la entrada del virus en las células del huésped y también favorecen la fagocitosis por macrófagos^{86, 88}.

Las respuestas inmunitarias humorales se inician en los órganos linfoides periféricos, como el bazo en el caso de antígenos vehiculizados por la sangre, los ganglios linfáticos de drenaje cuando los antígenos penetran a través de la piel o de los epitelios mucosos, y los tejidos linfoides de las mucosas para algunos antígenos inhalados e ingeridos⁸⁸.

1.5.5. Función Linfocitaria

La activación o estimulación de los linfocitos “in vitro” nos permite valorar lo que regularmente ocurre cuando el antígeno reacciona con linfocitos específicamente sensibilizados en el huésped. La activación linfocitaria mide la capacidad funcional

de los linfocitos T o B para proliferar después de la provocación antigénica y es, por lo tanto, una prueba más fiable de inmunocompetencia que la sola cuenta de los tipos de linfocitos. Es comúnmente empleada para evaluar la inmunidad celular en los enfermos con inmunodeficiencias, enfermedades infecciosas o enfermedades neoplásicas^{86, 88}.

Numerosas sustancias han sido empleadas en la evaluación de la función de los linfocitos, que pueden ser estimulados por mitógenos y por antígenos. En contraste con los estudios efectuados en ratones, no hay evidencia incontrovertible de que los linfocitos T o B sean activados selectivamente por mitógenos inespecíficos. Los mitógenos inespecíficos más conocidos que activan los linfocitos humanos son la fitohemaglutinina (PHA), para las células T; la concavalina A (Con A), también para las células T pero un subconjunto diferente de la PHA; la globulina antitímocítica (ATG), específica para células T; el anticuerpo monoclonal anti-CD3, específico para células T CD3⁺; la proteína A de la pared celular del *Staphylococcus aureus* (SpA, SAC), con especificidad relativa para células B independiente de células T; el mitógeno de la fitolaca (PWM), que estimula principalmente las células B, dependientes de células T y la estreptolisina S (ELS), sin una especificidad comprobada, pero probablemente para células T^{86, 88}.

Mientras que los mitógenos estimulan un gran número de linfocitos, los antígenos estimulan menos células ya que han de estar específicamente sensibilizadas al antígeno en cuestión. En la mayoría de los casos, sólo las células T responden a los antígenos en esta prueba. Así, en contraste con la activación de los linfocitos inducida por mitógenos, la estimulación por antígenos da por resultado menor síntesis de DNA total. Una amplia gama de antígenos ha sido empleada en la activación de los linfocitos para evaluar in vitro la inmunidad celular humana. Entre ellos, podemos citar el PPD (purified protein derivative), el antígeno de la Candida, la estreptocinasa-estreptodornasa, la coccidioidina, el toxoide antitetánico, el virus de la viruela y el herpesvirus simple, siempre en individuos previamente expuestos a ellos y a los antígenos de histocompatibilidad (por cultivo mixto de linfocitos)^{86, 88}.

Además, el estudio de la función de los linfocitos B in vivo puede ser realizado a través del análisis de los niveles de inmunoglobulinas, por la producción de anticuerpos post vacunación y/o por la medida de producción de anticuerpos naturales. En este último, la principal forma de medir esta producción es por la determinación de los títulos de antiestreptolisina O (ASTO), que hace la valoración de la respuesta inmunitaria post-TPH de los niños después de una exposición al antígeno estreptocócico. Se ha identificado más de 20 antígenos extracelulares liberados por estreptococos hemolíticos del grupo A creciendo en tejidos humanos y la estreptolisina O está entre aquellos de mayor importancia. Por este motivo, la determinación de los anticuerpos contra la estreptolisina O (ASTO) es útil tanto para el serodiagnóstico de la enfermedad por estreptococos del grupo A como para evaluar la respuesta inmunitaria del paciente post-TPH^{86, 88, 91}.

1.6. INMUNIZACIÓN Y TRASPLANTE

El hecho de que exista la necesidad de vacunar correctamente a los niños sometidos a TPH tiene una doble razón: la necesidad de que toda persona tenga unos niveles de anticuerpos correctos durante toda su vida y, por otra parte, corregir las deficiencias específicas que surgen como consecuencia del propio trasplante^{92, 93}.

Actualmente es cada vez mayor el número de pacientes que reciben un TPH, así como cada vez se consigue una supervivencia más larga en estos pacientes. Esto justifica la gran importancia de las medidas enfocadas a mejorar su calidad de vida a medio y largo plazo. También desde el punto de vista de la salud pública, es importante que no exista un número creciente de individuos vulnerables a agentes capaces de producir infecciones graves. Por lo tanto, la inmunización post-TPH no debe ser considerada apenas como una medida para prevenir infecciones graves aunque infrecuentes (tétanos, difteria, poliomielitis, etc.), sino que en un futuro no lejano puede convertirse en una importante arma para disminuir la morbimortalidad relacionada con el TPH^{54, 92, 94, 95}.

Uno de los aspectos prácticos más importantes del TPH son aquellas medidas tomadas para prevenir y tratar las complicaciones infecciosas, y con un programa de inmunización adecuado se puede disminuir estas complicaciones⁹⁶.

La inmunización con antígenos proteicos en el período post-trasplante inmediato puede dar lugar a un efímero aumento en los títulos de anticuerpos. Una producción de anticuerpos mantenida después de la inmunización con estos antígenos ocurrirá solamente cuando se recupere la inmunocompetencia de los linfocitos T y B. La presencia de la función linfocitaria T antígeno-específica en pacientes sin EICH crónica ocurre de 3 a 6 meses post-TPH. Los pacientes que son reinmunizados con toxoide tetánico y diftérico durante este periodo, rutinariamente desarrollan una proliferación linfocitaria T y una producción in vivo de anticuerpos específicos^{54, 97}.

La inmunización con vacunas de polisacáridos puros, o sea, no conjugados, durante el mismo periodo, raramente resulta en la producción de anticuerpos a niveles protectores. En el TPH las respuestas a antígenos independientes de células T son pobres, hecho que se evidencia por los malos resultados obtenidos con las vacunas de polisacáridos puros, como la del neumococo. Ya la inmunización con vacunas de polisacáridos conjugados podrá resultar en la producción de niveles protectores de anticuerpos, una vez desarrollada una adecuada función linfocitaria T. Al convertir un antígeno independiente del timo en dependiente, la respuesta vacunal puede mejorar espectacularmente; éste fue el caso para la vacuna de *H. influenzae* tipo b. Con la vacuna polisacárida no se consiguen respuestas satisfactorias; sin embargo, al unir covalentemente el polisacárido con una proteína transportadora, formando así una vacuna conjugada, se consigue convertir al antígeno en dependiente del timo, obteniéndose de esta forma buenas respuestas incluso en los pacientes sometidos a un TPH^{96, 98}.

Los pacientes con EICH crónica raramente desarrollan una inmunidad linfocitaria T o B a niveles protectores uniforme después de repetidas inmunizaciones. La administración rutinaria de inmunoglobulina intravenosa a los pacientes con EICH crónica evita la necesidad de estos pacientes en recibir inmunización de rutina con antígenos proteicos o polisacáridos⁵⁴.

Debido a un posible defecto en la producción de anticuerpos para las vacunas contra virus, las vacunas de virus vivos son consideradas contraindicadas en todos los pacientes con inmunidad celular alterada, por el riesgo de que se produzca una infección sistémica grave e incluso mortal^{54, 99}. Así, el TPH es una contraindicación para la administración de la vacuna de la poliomielitis de virus vivos, siendo preferible el uso de la vacuna con virus inactivados. Debido a los riesgos asociados con la administración de vacunas con virus vivos atenuados, la inmunización con las vacunas del sarampión, la rubéola, la parotiditis y la varicela sólo deben ser administradas a pacientes sin EICH crónica después de transcurridos de 1 a 2 años del TPH¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. Salvo estas vacunas, y en las circunstancias especiales, como sea una

exigencia social del ambiente, no se debe administrar ninguna otra vacuna de virus vivos en estos casos.

Los pacientes con EICH crónica que están recibiendo Ig intravenosa no presentan riesgo de infección porque tienen una protección pasiva de anticuerpos. Por cierto que una inmunización con vacunas de virus vivos en la presencia de terapia sustitutiva con Ig intravenosa es ineficaz⁵⁴. La eficacia de la inmunización puede ser confirmada por la medida de los niveles específicos de anticuerpos.

Por lo tanto, tras el TPH, la inmunidad celular y la humoral se reconstituyen mucho más lentamente que la hemopoyesis, sobretodo en los pacientes con EICH, por lo que la respuesta inmune frente a las vacunas puede estar comprometida. Así, cuanto más tarde se vacune mejor respuesta se puede obtener¹⁰⁶. Esta es la razón por la que se indica vacunar los niños a partir del año post-TPH en infecciones que no suponen un riesgo inmediato para el paciente (como son tétanos, difteria y poliomielitis).

Existen varias razones para que se considere la práctica de la inmunización postrasplante como una rutina en el tratamiento de los pacientes receptores de un TPH, pero destacan dos:

- (a) la gran mayoría de pacientes presentan en el postrasplante una mala respuesta inmune frente a diversas infecciones prevenibles mediante vacunación, sea por pérdida de la inmunidad tras el TPH, sea por partir de una mala situación inmune pré-trasplante. Por otra parte, en el TPH existe un mayor riesgo de determinadas infecciones (*Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae* y VHB) susceptibles de prevención por vacunación, y
- (b) la existencia de vacunas eficaces y seguras para la mayoría de estas infecciones^{92, 94, 96, 107-111}.

Los Comités de Complicaciones Infecciosas en los varios grupos de estudios de los TPH en todo el mundo se han ocupado de este problema^{112, 113}.

Las recomendaciones para la inmunización post-TPH propuestas por el EBMT (European Bone Marrow Transplantation) y la pauta utilizada por el Grupo Español de Trasplante Hemopoyético (GETH) y en nuestro estudio están descritas en el apartado de material y métodos.

1.6.1. Respuesta a la Vacunación y su Valoración

Los principios generales para una vacunación segura y efectiva potenciando así el gran desarrollo de las vacunas en los primeros años del siglo XX, siguieron dos vías: la primera fue la búsqueda de organismos atenuados con patogenicidad reducida que estimularan la inmunidad protectora, y la segunda fue el desarrollo de vacunas basadas en organismos muertos y componentes de organismos purificados con posterioridad que fuesen tan efectivos como los organismos completos vivos. Cualquier vacuna viva puede causar en individuos inmunosuprimidos, como los receptores de TPH, una infección sistémica letal¹¹⁴.

Existen unos requisitos específicos para que la vacunación tenga éxito, que varían según sea la naturaleza del organismo que infecta. Para los organismos extracelulares, los anticuerpos proporcionan el mecanismo adaptativo más importante de defensa, mientras que para el control de organismos intracelulares, como el virus de la poliomielitis, también es esencial una respuesta efectiva de linfocitos T CD8. Por lo tanto, en los niños post-TPH, la efectividad de las vacunas solo es alcanzada cuando ya existe una efectiva reconstitución de los linfocitos T y B^{114, 115}.

La respuesta a la vacunación, conjuntamente con la evaluación de la respuesta de los anticuerpos a los antígenos los cuales la población es comúnmente expuesta, son los métodos para valorar la inmunidad mediada por anticuerpos (inmunidad humoral).

Los tests más frecuentemente utilizados son:

- (a) la medida de la producción de anticuerpos naturales, como el estudio de las isohemaglutininas, heteroaglutininas y heterolisinas (por ejemplo, contra eritrocitos de carnero o conejo), la producción de antiestreptolisina y anticuerpos bactericidas contra la *Escherichia coli*;
- (b) la medida de la respuesta a la vacunación, donde pueden ser utilizados antígenos proteicos o polisacáridos, siendo este último particularmente importante en pacientes con infecciones pulmonares¹¹⁶.

Las vacunas son empleadas en las dosis recomendadas y, después de un periodo mínimo de un mes después de la última dosis, los niveles de anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación son determinados. Se puede determinar los niveles de anticuerpos producidos por la vacuna del tétanos, difteria, hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, poliomielitis, etc.

1.6.2. Inmunización en el Huésped Inmunocomprometido

En las últimas tres décadas, el número de pacientes inmunocomprometidos aumentó rápidamente. Los pacientes pueden ser inmunocomprometidos por la inmunosupresión utilizada después de un trasplante de órganos sólidos, por una terapia intensiva para enfermedades neoplásicas o no neoplásicas, que incluyen protocolos quimioterápicos intensivos para tratamientos y/o acondicionamientos y trasplantes autólogos y alogénicos de progenitores hematopoyéticos, y por infecciones como por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), CMV, etc.¹¹⁷⁻¹²¹.

En los pacientes trasplantados, el mayor riesgo para desarrollar infecciones usualmente ocurre después del TPH, pero pueden permanecer inmunodeprimidos debido a la EICH o a la terapia inmunosupresiva utilizada para prevenir la EICH, durante largos periodos post-TPH.

La inmunización de los pacientes inmunodeprimidos es muy importante debido a la necesidad de protegerlos contra infecciones graves, pues dentro de las complicaciones del TPH, las infecciones son una causa importante de mortalidad, facilitada por la inmunodepresión y las extremas neutropenias que padecen estos enfermos, y de ahí el interés de las medidas profilácticas antiinfecciosas, entre las que se incluyen las vacunas. Además, desde el punto de vista de salud pública es también importante debido a la necesidad para prevenir y no aumentar el número de individuos que son vulnerables a agentes infecciosos nocivos, como el virus de la poliomielitis^{94, 117, 122-125}.

Estos pacientes son subsidiarios de recibir las mismas vacunas que los niños con una inmunidad normal y incluso otras, que en estos niños inmunodeprimidos, por su tendencia a sufrir infecciones sistémicas, resultan de mayor utilidad que en los niños normales. Debemos tener en cuenta el momento adecuado de la vacunación en estos pacientes. Hay que considerar que el riesgo de infección y el tipo de microorganismos causal van asociados al tiempo transcurrido desde el trasplante⁹⁴.

En los 3 meses posteriores al trasplante el parámetro determinante es la neutropenia extrema, siendo en este periodo de tiempo cuando hay una mayor incidencia de infecciones bacterianas graves y por hongos. El *H. influenzae* tipo b es la principal causa de neumonía en este periodo. Los pacientes con déficit de IgG2 tienen una respuesta disminuida frente a las vacunas Hib conjugadas y al toxoide tetánico⁹⁴. Desde entonces adquieren mayor importancia las infecciones virales (citomegalovirus, varicela-zoster, Epstein-Barr) y las parasitarias (*Pneumocystis carinii*, toxoplasmosis) debido a la persistencia del déficit funcional de los linfocitos T^{126, 127}. Después de los 6 meses del TPH, entre las bacterias encapsuladas el neumococo es la principal causa de infección^{92, 94, 96}.

1.6.2.1. Receptores de TPH Alogénico

En los receptores de TPH alogénico, existen cuatro componentes que se combinan para producir el estado de inmunodeficiencia en el paciente: (1) la actividad inmunosupresiva de la enfermedad de base y su tratamiento, (2) las altas dosis de quimioterapia y radioterapia utilizadas para erradicar el sistema inmune del receptor, (3) la reactividad inmunológica entre los PH del donante y el receptor y (4) la terapia inmunosupresiva utilizada post-TPH¹¹⁷.

En los pacientes con inmunodeficiencias primarias (IDP) no se realiza habitualmente el tratamiento descrito en (2) ya que el paciente no tiene, por su enfermedad de base (1), capacidad de respuesta inmunológica propia.

En el TPH alogénico, el sistema inmune del receptor es reemplazado por el sistema inmune del donante. La transferencia de inmunidad puede tener una duración limitada y en este tiempo un elevado número de pacientes se vuelve susceptibles al tétanos¹²⁸, poliomielitis^{100, 101} y sarampión¹²⁹, por ejemplo. El estado inmune del donante es importante para una transferencia de inmunidad a corto plazo y puede ser mejorado por la inmunización del donante antes del TPH^{130, 131}.

El periodo post-TPH, por el riesgo de contraer infecciones en las distintas fases ya mencionadas, presenta unas combinaciones de riesgos y beneficios para la inmunización. El riesgo para desarrollar infecciones esta extremadamente influenciado por la presencia de la EICH. Las infecciones también pueden ser frecuentes en una fase más tardía post-TPH. Sin embargo, una protección adicional a largo plazo contra otras infecciones como tétanos, difteria, poliomielitis y sarampión debe ser considerada. Varios estudios demuestran la pérdida de inmunidad para tétanos, virus del polio y difteria en los seguimientos post-TPH^{100, 101, 129, 132, 133}.

Las recomendaciones para la vacunación de los niños post-TPH alogénico del EBMT y del GETH están descritas en el apartado material y métodos.

1.6.2.2. Receptores de TPH Autólogo

En los receptores de TPH autólogo, los factores que contribuyen para producir el estado de inmunodeficiencia del paciente son dos: (1) la inmunosupresión debido a la enfermedad de base y su tratamiento y (2) las altas dosis de quimioterapia y radioterapia utilizadas para erradicar el sistema inmune del receptor¹¹⁷.

En los receptores del TPH autólogo, evidentemente no existe una disparidad inmunológica entre donante y receptor. En la mayoría de los pacientes, la recuperación inmune es más rápida que en los TPH alogénicos, sobretodo cuando se utiliza como fuente de PH la SP o la SCU. Estos pacientes usualmente no son propensos para desarrollar las infecciones severas que son evitables por inmunización durante el periodo post-TPH. No obstante, algunos estudios demuestran que los receptores del TPH autólogo pierden la inmunidad protectora para el tétanos, el virus de la poliomielitis y el sarampión a largo plazo en el seguimiento postrasplante^{101, 134, 135}. No hay estudios publicados sobre la pérdida de inmunidad a largo plazo en los receptores de TPH autólogo de sangre periférica, pero es probable que el riesgo de perder la inmunidad sea equivalente entre la MO y la SP¹¹⁷.

Las recomendaciones para la vacunación de los niños post-TPH autólogo del EBMT y del GETH están descritas en el apartado material y métodos.

2. OBJETIVOS

El **objetivo** de esta Tesis ha sido evaluar la reconstitución inmunológica en las distintas modalidades de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (TPH) en niños. Para ello se estudió la reconstitución de las distintas subpoblaciones linfocitarias T, B y NK así como la recuperación de la función T y la respuesta humoral a través de la producción de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), de la producción de anticuerpos naturales (antiestreptolisina O) y de la respuesta a los antígenos vacunales de la hepatitis B (anti-HBs) y del tétanos (anti-toxoide tetanico) en una serie de niños trasplantados.

Hipótesis de Trabajo:

Estudiar si la reconstitución inmunológica post TPH depende en parte de la enfermedad de base, del tipo de trasplante realizado, de la fuente de los PH y del grado de la Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH).

Para ello se analizaron las diferencias en la reconstitución inmunológica:

- a) entre los tres tipos de fuentes: médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y sangre de cordón umbilical (SCU).
- b) entre los dos tipos de trasplantes (autólogo y alogénico).
- c) entre receptores de TPH alogénicos (de médula ósea o sangre de cordón) en enfermedades neoplásicas y no neoplásicas.
- d) según la severidad de la enfermedad injerto contra huésped aguda y crónica y del tratamiento inmunosupresor utilizado.
- e) y el grado de respuesta a las vacunas (tétanos y hepatitis) en relación a los niveles de inmunoglobulinas G y la presencia de anticuerpos naturales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL:

3.1.1. Pacientes Estudiados –

Estudiamos la reconstitución inmunológica a los 1, 3, 6, 12, 18 y 24 meses post trasplante, en ciento cuatro niños receptores de Trasplantes de Progenitores Hematopoyéticos (TPH) Autólogo o Alogénico, en cualquiera de sus modalidades en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea del Hospital Universitario Materno Infantil Vall d'Hebron de Barcelona (UAB – Universidad Autónoma de Barcelona).

Las edades de los pacientes estuvieron comprendidas entre 4,2 meses y 17,1 años. El estudio fue realizado durante 33 meses, en el periodo de Enero del 1996 a Septiembre del 1998 y el seguimiento mínimo ha sido de 24 meses (el estudio fue cerrado en el mes Septiembre del año 2000).

Todos los datos de los niños trasplantados fueron recogidos en hojas protocolizadas (Anexo 1).

Se realizaron en total 106 TPH, pues dos de los niños recibieron dos trasplantes en años distintos y los progenitores hematopoyéticos se obtuvieron de una de las tres fuentes habituales de obtención, sea médula ósea (MO), sangre periférica (SP) o sangre del cordón umbilical (SCU).

En la experiencia de la Unidad de Trasplante de Médula Ósea del Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona, entre Enero de 1984 y Diciembre de 1999 se realizaron un total de 514 trasplantes, de los cuales 261 fueron alogénicos y 253 autólogos. El primer TPH de donante no emparentado (DNE) se realizó en 1991 y, de sangre de cordón umbilical (SCU) en 1994.

En el primer año del estudio (enero/1996 al diciembre/1996), de un total de 33 pacientes trasplantados, hubo 7 éxitos y 6 recidivas. Fueron evaluables, 24 niños, de los cuales 11 recibieron TPH Autólogo y 13 TPH Alogénico.

En el segundo año (enero/1997 al diciembre/1997), de los 40 niños trasplantados, 15 no fueron evaluados por éxitus, recidiva o pérdida de seguimiento (un paciente se trasladó al país de origen), posibilitando el análisis de 25 niños, de los que 14 recibieron TPH Autólogo y 11 TPH Alogénico.

En el tercer y último año de recogida de nuevos casos (enero/1998 al septiembre/1998), de los 33 niños trasplantados, fue posible el análisis de 23 niños, de los cuales 10 recibieron TPH Autólogo y 13 TPH Alogénico.

3.1.2. Pacientes Evaluables –

Del total de 72 niños elegibles, se pudo realizar una evolución completa de la Reconstitución Inmunológica en 61. Hubimos de excluir 4 pacientes que tuvieron una supervivencia inferior a los seis meses y otros 7 en los que no fue posible tener al menos hasta tres estudios de la reconstitución inmunológica.

Las modalidades de TPH las agrupamos en dos grupos:

- Grupo 1: Trasplantes Autólogos de Sangre Periférica (ATPSP) y de Médula Ósea (ATMO) con y sin tratamiento in vitro (n = 28);
- Grupo 2, Trasplantes Alogénicos de Sangre Periférica, de Médula Ósea o de Sangre de Cordón Umbilical, HLA idénticos o no idénticos de Donantes Emparentados (TMO-DEI y TMO-DENI) y HLA idénticos o no idénticos de Donantes no Emparentados (TMO-DNEI y TMO-DNENI) (n = 33).

En los TPH Autólogos, las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) fueron obtenidas por leucaféresis de la sangre periférica previa movilización con el factor de crecimiento hematopoyético (G-CSF) o por extracción de la propia médula ósea.

En los TPH Alogénicos, las CPH procedieron de donantes familiares (idénticos o no idénticos), en 21 casos o donantes no familiares (idénticos o no idénticos) en 12 casos y entre estos, 5 pacientes recibieron CPH procedentes de sangre de cordón umbilical y 7 de médula ósea.

3.1.3. Grupos Diagnósticos –

Los Grupos Diagnósticos incluyeron:

- Grupo 1: compuesto por las Enfermedades Neoplásicas de Riesgo Intermedio: leucemia aguda linfoblástica (LAL) y leucemia aguda no linfoblástica (LANL) en 1ª o 2ª Remisión Completa (RC1 o RC2), leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica, mielodisplasia (SMD), linfomas en RC1 o RC2 y los tumores sólidos (sarcomas de Ewing, neuroblastomas y meduloblastomas) en Remisión Completa (RC1 o RC2) o Buena Respuesta Parcial (BRP) (n = 45).

- Grupo 2: formado por las Enfermedades Neoplásicas de Riesgo Alto: LAL y LANL > RC2 o Remisión Parcial (RP), LMC en fase blástica y los tumores sólidos en Remisión Parcial (RP) o después de la recidiva (n = 3);

- Grupo 3: constituido por las Enfermedades No Neoplásicas: hemopatías congénitas (osteopetrosis, anemia de Fanconi, enfermedades metabólicas), aplasias medulares e inmunodeficiencias primarias (inmunodeficiencia severa combinada, síndrome de Wiskott-Aldrich, disgenesia reticular) (n = 13).

3.1.4. Protocolos Utilizados –

Se utilizaron protocolos establecidos y/o individualizados para el tratamiento de cada una de las enfermedades. Las pautas han sido consensuadas por grupos de trabajo nacionales e internacionales.

3.1.4.1. Protocolos de quimioterapia en leucemias agudas, linfomas y tumores sólidos:

a) Leucemias Agudas Linfoblásticas: Protocolos PETHEMA (84, 89, 93, 96); SHOP-LAL / 94, SEOP-89 y/o LMB-89 (SFOP).

En el Protocolo PHETEMA 84, tanto para pacientes de Alto Riesgo (índice de riesgo = 3), como para pacientes de Medio y Bajo Riesgo (índice de riesgo < 3), los fármacos administrados en la fase de Inducción de la Remisión A₁, fueron Prednisolona (PRED), Vincristina (VCR), Daunorrubicina (DNR) y Asparaginasa (ASPAR) por vía sistémica y Methotrexato (MTX) y Arabinósido de Citosina (ARA C) en la punción lumbar.

En la fase A₂, para los pacientes de Alto Riesgo, se administró radioterapia holocraneal, con dosis de acuerdo con la edad del niño, MTX y ARA-C intratecal coincidiendo con el inicio de la administración de infusiones intravenosas de los mismos fármacos y Tioguanina oral diariamente. Aún en esta fase se hizo una Reinducción precoz en el que la DNR y la ASPAR fueron sustituidas por Ciclofosfamida (CFM) y Teniposido (VM-26). Para los pacientes de Riesgo Medio o Bajo se administró MTX y ARA-C intratecal coincidiendo con el inicio de la administración de MTX en infusión intravenosa así como la Mercaptopurina (MP) oral.

En la Fase de Mantenimiento, Fase B, se utilizó la MP oral y el MTX, en un periodo de dos años para los dos grupos de pacientes.

En el Protocolo PETHEMA 89, la Fase de Inducción (-1) incluyó cinco fármacos por vía sistémica (PRED, VCR, DNR, ASPAR, CFM) y tres por vía intratecal – TIT (MTX, ARA-C, Hidrocortisona).

En la Fase -2, se administró simultáneamente tratamiento intratecal (TIT) y MTX en infusión intravenosa a altas dosis acompañada de la administración de Mercaptopurina oral.

La Fase de Consolidación (C-1) consistió en la administración de siete fármacos (Dexametasona (DXM), VCR, DNR, ASPAR, CFM, ARA-C, VM-26) y una dosis de TIT.

La Fase de Mantenimiento fue la clásica asociación de Mercaptopurina en dosis oral diaria y MTX en dosis semanales.

El Protocolo PETHEMA 93 fue utilizado en los niños con LAL de Muy Alto Riesgo y las drogas administradas en la Fase de Inducción fueron: PRED, VCR, DNR, ASPAR, CFM y TIT.

La Fase de Consolidación consistió de tres bloques. En el Bloque 1, fueron administrados los siguientes fármacos: DXM, VCR, AD-MTX (altas dosis de MTX), AD-ARA-C, AD-ASPAR, MP y TIT. En el Bloque 2, se administró DXM, VCR, AD-MTX, Mitoxantrona (MITOX), CFM, ASPAR y TIT. En el Bloque 3 se administró DXM, AD-ARA-C, AD-ASPAR, VM-26 y TIT.

El Mantenimiento es el mismo descrito arriba.

El Protocolo PETHEMA 96 fue utilizado en los niños con LAL de Riesgo Intermedio o Alto. Las drogas utilizadas en la Inducción fueron: VCR, DNR, PRED, ASPAR, CFM y TIT.

El tratamiento de Consolidación-1 consistió de MP, MTX, VM-26, ARA-C y TIT y la Consolidación-2/Reinducción consistió de DXM, VCR, DNR, CFM, ASPAR y TIT.

El tratamiento de Mantenimiento-1 constó de MP y MTX continuo y reinducciones con VCR, PRED, ASPAR y TIT. El Mantenimiento-2 consistió de MP y MTX.

El Protocolo terapéutico SHOP – 94 (Sociedades de Hematología y Oncología Pediátricas de la Asociación Española de Pediatría), fue utilizado en los niños (<16 años), excluyéndose las Leucemias de estirpe B y los pacientes de Muy Alto Riesgo.

En el tratamiento de Inducción se administró los fármacos PRED, VCR, DNR y ASPAR en las formas de Bajo Riesgo y los mismos fármacos añadiéndose CFM en las formas de Alto Riesgo, así como la TIT.

El tratamiento de Consolidación comprendió la administración de altas dosis de MTX, ARA-C (CSF-G tras el ARA-C), MP y TIT.

La profilaxis y tratamiento de la afectación del SNC incluyó dos regímenes, uno con radioterapia craneal (enfermos considerados de Muy Alto Riesgo de afectación de SNC) y otro sin la radioterapia.

El tratamiento de Mantenimiento consistió en la administración de MP oral en dosis única diaria y MTX semanal i.m. Durante el primer año después del diagnóstico, a todos los pacientes se les administró reinducciones cada 4 semanas con VCR y PRED.

Los Protocolos citados tuvieron una duración de 24 meses.

En las Leucemias de células B fue también utilizado el mismo protocolo empleado para los Linfomas B, el LMB-89. La inducción consistió de la administración del COP (CFM, VCR, PRED, MTX + HC-hidrocortisona, ARA-C) hasta el día 7, luego más dos ciclos del COPADM 1 (VCR, MTX HD (altas dosis) + Ácido Fólico, MTX + HC, ARA-C, CFM, ADRIA, PRED y COPADM2 (= COPADM1, pero con dosis de CFM en doble + 2 administraciones de VCR). En el tratamiento de Consolidación se administró dos ciclos de CYVE - Cytarabina (ARA-C), ARA-C HD y VP-16.

El tratamiento de Mantenimiento incluyó, uno ciclo con los mismos fármacos del COPADM a dosis menos intensas y con irradiación craneal; el segundo con ARA-C + VP-16; el tercer igual al primero pero sin MTX HD y irradiación craneal y el cuarto ciclo idéntico al segundo.

b) Leucemias Agudas No Linfoblásticas: Protocolo LAM – 88 y APL-93.

En el protocolo LAM – 88 se utilizó en la inducción el esquema DAE: DNR, ARA-C y Etopósido (VP-16), un o dos ciclos hasta la remisión. La intensificación consistió de 2 ciclos: el primero con Mitoxantrona y ARA-C + TIT (terapia intratecal) y el segundo con M-ANSA, ARA-C y TIT.

En las recaídas se podía utilizar el esquema DAE modificado, cambiando la Daunorrubicina por la Idarrubicina, o el EMA (Etopósido, Mitoxantrona, ARA-C).

En el protocolo APL-93, para LAM subtipo M3, se utilizó el ácido trans-retinóico (ATRA) asociado a DNR y ARA-C o al esquema DAE.

c) Linfomas No Hodgkin T y B: LMT-89 y LMB-89 (ya descrito).

En el protocolo LMT-89, de la Sociedad Francesa de Oncología Pediátrica (SFOP), se utilizó en la Inducción una tanda de los esquemas COP, COPADM1 y COPADM2. El periodo de Consolidación consistió de 5 tandas con las combinaciones de los siguientes fármacos: MTX, ARA-C, 6-Tioguanina (6-TG), VP-16 y ASPAR. En el Mantenimiento se utilizó la 6-TG, MTX, CFM, DNR, Hidroxiurea (HU) y VCR. El periodo de Reinducción consistió de 2 ciclos del esquema VANDA (DEXA, ARA-C, Mitoxantrone, VP-16, ASPAR y TIT con MTX, ARA-C y Hidrocortisona).

d) Tumores Sólidos (Sarcoma de Ewing, Neuroblastoma, Meduloblastoma): SEOP, dCECAT, UKCCSG/SIOP PNET III.

En los Sarcomas de Ewing se utilizó el protocolo de la SEOP que incluyó 7 ciclos con los fármacos Etopósido, VCR y Ifosfamida (alternando con Actinomicina). Cuando no se obtuvo respuesta completa se administró intensificación y se procedió a rescate con trasplante autólogo.

En las recidivas se utilizó después de la exéresis quirúrgica ciclos con CFM, Carboplatina y VM-26 asociado a radioterapia en el tumor.

En los Neuroblastomas se utilizó el protocolo dCECAT en dosis mensuales, que incluyó desferral, CFM, Etopósido, Carboplatina y Tiotepa, 4 tandas previas a la exéresis quirúrgica.

Después de la exéresis se administraron tandas de quimioterapia utilizando combinaciones de los siguientes fármacos: CFM, ADRIA, VCR, Cisplatina, Ifosfamida y Etopósido.

En las recidivas se utilizó el esquema ICE (Ifosfamida, Carboplatina y Etopósido).

Los Meduloblastomas utilizaron el protocolo UKCCSG/SIOP PNET III, donde se utilizó los quimioterápicos VCR, Carboplatino, Etopósido y CFM en 8 tandas + radioterapia craneoespinal, holocraneal y en fosa posterior.

En las recaídas se utilizó, además de quimioterapia intratecal + rescate con autotrasplante, combinaciones de los fármacos Ifosfamida y Carboplatino seguido de VP-16 oral.

3.1.4.2. Tratamiento de la Aplasia Adquirida Severa: AMA-97 (Sociedad Española de Hematología Pediátrica – Asociación Española de Pediatría)

El tratamiento de elección es el TPH siempre que exista un donante familiar HLA- compatible. Uno de los criterios de inclusión en el protocolo de tratamiento inmunosupresor es no disponer de donante HLA-compatible, no mostrar características de aplasia constitucional, tener edad inferior a 18 años y no presentar síndrome mielodisplásico.

El tratamiento inmunosupresor no se debe empezar hasta dos o tres semanas después del diagnóstico, para valorar posible evolución espontánea a la normalidad, forma de presentación de leucemia aguda de inicio aplásico y para dar tiempo a tener todos los resultados de las pruebas solicitadas. Se utiliza Ciclosporina A (Cy A), Gammaglobulina Antitimocito de Caballo (ATG), Metilprednisolona y G-CSF.

Después de una valoración en el día +50 de tratamiento, si hay una respuesta completa, se sigue con Cy A y nueva valoración en día +90. En caso de remisión parcial ó ausencia de remisión, se añade Eritropoietina (EPO) u Oxitosona y se inicia búsqueda de donante no emparentado.

Una nueva valoración en el día +91 de tratamiento, si se comprueba una remisión completa, se retira paulatinamente la Cy A. En los casos de remisión parcial, se disminuye la dosis de Cy A para mantener niveles terapéuticos hasta el día 119. En el caso de ausencia de remisión, se mantiene las mismas dosis de Cy A, se añade Gammaglobulina Antitimocito de Conejo del +91 al +95, Metilprednisolona a altas dosis a lo largo de 12 a 13 días hasta la supresión, GM-CSF desde el día +99 hasta conseguir cifras de granulocitos igual a $1.500/\text{mm}^3$.

En el día +120 de tratamiento, después de una nueva valoración, si se comprueba una remisión completa, se procede a controles clínicos analíticos y supresión progresiva de la Cy A en 15 días. En los casos de remisión parcial, se disminuye la Cy A para mantener niveles terapéuticos y se añade la Oxitosona.

En los casos de ausencia de remisión a los 6 meses, se procede a trasplante de médula ósea a partir de donante no emparentado, cuya búsqueda se inició a los 3 meses.

3.1.5. Regímenes de Acondicionamientos en los TPH –

Los pacientes fueron acondicionados, según pautas individualizadas, dependiendo de su enfermedad de base y del tipo de donante.

En las Leucemias Agudas Linfoblásticas (LAL) se utilizó en los niños > 3 años, Etopósido (VP-16), CFM e Irradiación Corporal Total (ICT) + RT craneoespinal si recaída en el SNC. En los niños < 3 años, se sustituyó la ICT por el Busulfán.

En las Leucemias Agudas Mieloblásticas (LAM o LANL) se administró CFM e ICT en los niños > 3 años. En los niños < 3 años se sustituyó la ICT por Etopósido (VP-16) y Busulfán.

En los Linfomas No Hodgkin se utilizó ARA-C, Melfalan e ICT ó VP-16, CFM e ICT + irradiación craneoespinal o poliquimioterapia sin Irradiación Corporal Total tipo BEAM.

En las Anemias de Fanconi con donante familiar idéntico se utilizó la CFM a dosis total de 20mg/Kg y la Irradiación Nodal Total (INT) a dosis de 5Gy, y en aquellas con donante no familiar se incluyó además de la CFM e ICT, ATG de caballo o conejo.

En las Anemias Aplásticas Severas con donante familiar idéntico, el acondicionamiento consistió en CFM (en dosis total de 200mg/Kg) y la ATG. En los trasplantes con donante no familiar se utilizó CFM, ATG e ICT o INT.

En las IDSC (Inmunodeficiencias Severas Combinadas) en los niños con donantes hermanos HLA-idénticos no se hizo ningún acondicionamiento y con donantes no emparentados HLA-idénticos y familiares no idénticos (haploidénticos) se utilizó Busulfán, CFM ± ATG.

En el Síndrome de Wiskott-Aldrich, mucopolisacaridosis, deficiencias enzimáticas, osteopetrosis, talasemia mayor y otras hemopatías congénitas el régimen de acondicionamiento, en los niños con donantes hermanos HLA-idénticos consistió de Busulfán y CFM. En los niños con donantes no emparentados HLA-idénticos, familiares fenotípicamente idénticos o con 1 diferencia antigénica o donantes familiares no idénticos se utilizó los mismos fármacos y ATG. En la osteopetrosis se incluyó Tiotepa.

En el Síndrome Mielodisplásico se utilizó Busulfán, CFM y Melfalan.

En los Tumores Sólidos se utilizó el Melfalan, Carboplatino y VP-16 para los Sarcomas de Ewing; Busulfán, CFM, Melfalan y ICT en los Neuroblastomas y CFM y Melfalan en los Meduloblastomas.

3.1.6. Profilaxis en el TPH –

3.1.6.1. Profilaxis de la Enfermedad Injerto Contra Huésped:

La profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) incluyó regímenes individualizados, según el tipo de enfermedad.

En todas las enfermedades, malignas y no malignas, con donante familiar idéntico o no emparentado, se utilizó la Ciclosporina A con adición o no de MTX en

pauta corta seguido de Ácido Folínico. En donantes no idénticos se añadió Metilprednisolona o ATG o depleción T.

3.1.6.2. Profilaxis Antiinfecciosa:

La profilaxis antiinfecciosa se realizó mediante aislamiento en cámara de flujo laminar de aire filtrado para impedir contaminación con bacterias y hongos. Además se administró una dieta pobre en gérmenes, junto a antibacterianos no absorbibles (cotrimoxazol) y antifúngicos orales no absorbibles (anfotericina B ó nistatina) o absorbibles (fluconazol o itraconazol) para la descontaminación intestinal y antivirales (aciclovir). Se infundió gammaglobulina i.v. semanal durante 3 meses en los TPH alogénicos. Los hemoderivados (concentrados de hematíes y de plaquetas) administrados fueron previamente filtrados e irradiados. Se utilizaron en algunos casos factores estimuladores del crecimiento de colonias (G-CSF) para acelerar la recuperación de las cifras de neutrófilos. Ante la sospecha de infección se inició precozmente antibioticoterapia empírica endovenosa (cefipime + vancomicina o teicoplanina), después de ordenar cultivos de bacterias y hongos. Se investigó semanalmente la presencia de infección por citomegalovirus (CMV) mediante antigenemia.

3.1.6.3. Profilaxis de la Enfermedad Venoclusiva Hepática (EVOH):

La profilaxis de la enfermedad venoclusiva hepática se realizó mediante la utilización de heparina sódica a bajas dosis en bomba de infusión continua por un periodo en torno de los treinta días o heparina de bajo peso molecular.

3.1.6.4. Pautas de Vacunación –

- a) Pauta del EBMT (Grupo Europeo de Trasplante de Médula Ósea).
(Anexo 2).
- b) Pauta adaptada del servicio y aplicada en todos los tipos de trasplante.
(Anexo 3).

3.2. MÉTODOS:

3.2.1. Valoración de la Reconstitución Inmunológica –

Fue estudiada a través de los siguientes parámetros:

3.2.1.1. Subpoblaciones Linfocitarias:

El estudio de las subpoblaciones linfocitarias T (Total, Colaboradoras y Citotóxicas) y B y Natural Killer (NK) se realizó mediante Citometría de Flujo, en citómetro FACSCAN B-D[®], con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos específicos para cada subpoblación¹³⁶:

- Subpoblación de Linfocitos T Total – CD3⁺;
- Subpoblación de Células T Colaboradoras – CD3⁺ CD4⁺;
- Subpoblación de Células T Citotóxicas – CD3⁺ CD8⁺;
- Subpoblación de Células B – CD19⁺;
- Células NK – CD3⁻CD16⁺/CD56⁺.

Las muestras fueron obtenidas de sangre venosa periférica (3ml, con anticoagulante) conjuntamente con otros estudios de la rutina normal de seguimiento.

En la técnica de Inmunofenotipaje de las Subpoblaciones Linfocitarias, a un volumen de 200 µl de sangre total se añadió 5 µl del respectivo anticuerpo monoclonal marcado con un fluorocromo. En un primer tubo se colocó anti-CD3^{FITC}, anti-CD4^{PE} y anti-CD45^{PerCP}. Un segundo tubo con anti-CD3^{FITC}, anti-CD8^{PerCP} y anti-CD45^{PerCP}. El tercer tubo conteniendo anti-CD3^{FITC} y anti-CD19. Un cuarto tubo con anti-CD3^{FITC} y anti-CD16-CD56. En un quinto tubo se colocó control de isotipo. Se mezclaron uniformemente y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 minutos. Al finalizar esta se añadió 2 ml de solución lisante (FACS[™], Becton & Dickinson, USA) a cada uno y se volvieron a incubar por 5 minutos adicionales en las mismas condiciones anteriores. Los tubos fueron posteriormente centrifugados a 1.200 rpm durante 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Se recuperaron los botones celulares en 0,3 ml de solución tamponada (PBS) para su posterior análisis

en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur con dos láser (Becton & Dickinson, USA). Imágenes de controles normales en la figura 2.

Los valores normales considerados para las variables estudiadas fueron obtenidos de las tablas de referencia del estudio de 375 muestras de sangre de niños saludables en el estudio de Comans-Bitter et al¹³⁷. Sigue la tabla simplificada de estos valores.

Subpoblaciones Linfocitarias *	GRUPOS DE EDAD			
	9 - 15 meses	15 - 24 meses	2 - 5 años	5 - 10 años
Linfocitos Totales	5.5 (2.6 - 10.4)	5.6 (2.7 - 11.9)	3.3 (1.7 - 6.9)	2.8 (1.1 - 5.9)
Linfocitos B CD19 ⁺	1.4 (0.6 - 2.7)	1.3 (0.6 - 3.1)	0.8 (0.2 - 2.1)	0.5 (0.2 - 1.6)
Linfocitos T CD3 ⁺	3.4 (1.6 - 6.7)	3.5 (1.4 - 8.0)	2.3 (0.9 - 4.5)	1.9 (0.7 - 4.2)
Linfocitos T CD4 ⁺	2.3 (1.0 - 4.6)	2.2 (0.9 - 5.5)	1.3 (0.5 - 2.4)	1.0 (0.3 - 2.0)
Linfocitos T CD8 ⁺	1.1 (0.4 - 2.1)	1.2 (0.4 - 2.3)	0.8 (0.3 - 1.6)	0.8 (0.3 - 1.8)
Relación CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2.4 (1.3 - 3.9)	1.9 (0.9 - 3.7)	1.6 (0.9 - 2.9)	1.2 (0.9 - 2.6)
Células NK CD3 ⁻ /CD16 ⁺ 56 ⁺	0.4 (0.2 - 1.2)	0.4 (0.1 - 1.4)	0.4 (0.1 - 1.0)	0.3 (0.09 - 0.9)

Tabla I - Número Absoluto de las Subpoblaciones Linfocitarias en Sangre Periférica. Adaptado de Comans-Bitter et al.

* $\times 10^9/L$ (mediana y percentiles 5 a 95)

Figura 2.

Figura 3.

3.2.1.2. Función Linfocitaria T:

La función linfocitaria T fue estudiada a través de la capacidad de transformación linfoblástica tras estimulación por mitógenos (PHA [fitohemaglutinina] y el anticuerpo monoclonal anti-CD3 [OKT3]).

En la técnica de cultivo de linfocitos para estimulación con mitógenos^{138, 139}, los linfocitos son purificados a partir de sangre periférica heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Los cultivos son hechos en placas de 96 pocillos a una concentración celular de aproximadamente 1×10^6 linfocitos / 2ml (200 μ l / pocillo). Enseguida, se añaden los mitógenos en diversas concentraciones sobre los pocillos de la placa por duplicado, en general se utiliza seis pocillos (negativo y 2 concentraciones diferentes) para la respuesta a OKT3 y diez (negativo y 4 diluciones diferentes) para la respuesta a PHA, para cada paciente. Los cultivos son incubados en estufa con CO₂ a 5%, a 37° C, durante 72 horas, tiempo en el cual la mayor parte de los mitógenos producen su máximo efecto sobre la síntesis del DNA. Se añade timidina tritiada [³H-Tdr] (25 μ l / pocillo), durante las últimas cuatro horas del cultivo, pues una medición más precisa de la síntesis del DNA es lograda marcando los cultivos con este precursor de los nucleósidos que se incorpora al DNA recién sintetizado. Este es recogido y fijado en soporte de papel de filtro (en semiautomático Cell Harvest – Skatron) y junto con el líquido de centelleo es leído en Contador (Tri-Carb 1500).

El *índice de estimulación* es el resultado que se obtiene dividiendo las cpm (cuentas por minuto) en la fracción estimulada por las cpm en la fracción control o no estimulada.

Como regla este índice es considerado como valor normal si es > 20 para la PHA y > 10 para el OKT3.

- Dificultades y/o limitaciones observadas en el estudio de las subpoblaciones linfocitarias:

En algunos niños, sobretodo en los TPH alogénicos, nos encontramos en ocasiones con material insuficiente o incluso con problemas como la dificultad técnica en las punciones venosas de los pacientes con EICH crónica extensa de piel. Estas dificultades, principalmente en el periodo inmediato post-TPH, con la existencia de pocas células, dificultaron o incluso imposibilitaron el estudio funcional linfocitario.

3.2.1.3. Función Linfocitaria B:

a) Cifras de Inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM):

Las cifras de Inmunoglobulinas fueron obtenidas por el método de la Nefelometría¹⁴⁰.

Los valores considerados normales fueron obtenidos de las Tablas de Normalidad de la Asociación Americana de Bioquímica Clínica y controles propios del laboratorio¹⁴¹.

b) Producción de Anticuerpos:

b.1) Post Vacunales (vacuna de la Hepatitis B [Anti-HBs] y del Tétanos [Anti - Toxoide Tetánico]).

La medida de la producción de anticuerpos post vacuna de la Hepatitis B (Anti-HBs) y post vacuna del Tétanos (Anti-Toxoide Tetánico – IgG) se realizó por la técnica cuantitativa de Enzimoimmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbente Assay)^{142, 143}.

Los niveles de anticuerpos considerados como protectores en nuestro estudio fueron categorizados entre los siguientes intervalos, según datos del laboratorio que realiza los anticuerpos:

- para el anticuerpo Anti-Toxoide Tetánico:
 - < 0.01 IU / ml = ausencia de respuesta;
 - 0.01 – 0.1 IU / ml = respuesta parcial;
 - >0.1 IU / ml = buena respuesta.

- para el anticuerpo Anti-HBs:
 - <10 mIU / ml = ausencia de respuesta;
 - 10 – 100 mIU / ml = respuesta parcial;
 - > 100 mIU / ml = buena respuesta.

La pauta de vacunación o revacunación fue empezada después de valorar la presencia de anticuerpos previos.

Los anticuerpos post-vacuna fueron medidos después de las tres dosis de la vacuna y como mínimo un mes después de la última dosis.

Siguiendo la categorización de la respuesta establecida, cuando los niños no presentaban respuesta, eran administradas las tres dosis de la vacuna; cuando presentaban una respuesta parcial, era administrado una dosis de recuerdo y en caso de presentaren una buena respuesta, se seguían los niveles de anticuerpos para detectar si se producía una negativización de la respuesta.

b.2) Ac Naturales (ASTO – Antiestreptolisina O).

La producción de anticuerpos naturales se midió por la determinación de los títulos de *antiestreptolisina O* (ASTO) mediante la técnica clásica de la inhibición de la hemólisis¹⁴⁴.

Los valores de referencia varían con la edad; se consideran como valores normales 100UI / ml de antiestreptolisina-O en niños en edad preescolar y de 166 a 250 UI / ml en niños en edad escolar o adultos jóvenes. Es poco valorable en niños de corta edad (< 2 años).

En nuestro estudio consideramos los siguientes intervalos:

- 20 UI / ml = ausencia de respuesta;
- 20 – 100 UI / ml = respuesta parcial;
- 40 UI / ml (para niños < 2 años) y
- >100 UI / ml para el resto de los niños = buena respuesta.

- Dificultades y/o limitaciones observadas en el estudio de la función linfocitaria:

La valoración de la IgG en los primeros 3 meses post-TPH alogénico no pudo ser considerada debido al hecho de que en ese periodo, los niños reciben inmunoglobulina exógena como medida de profilaxis de las infecciones y por tanto las cifras no fueron valorables.

Algunos niños tuvieron que ser excluidos del estudio por no disponer de estudios de anticuerpos previos a la vacunación y/o por no tenerse certeza de la efectivación de la vacunación con fechas aproximadas.

Debido a la gran diversidad en las regiones de origen de los niños y para no causar una posible interrupción en la vacunación, cada uno fue vacunado en su centro de referencia bajo nuestra coordinación y de su pediatra de cabecera.

Todos los niños recibieron la pauta vacunal adaptada del servicio juntamente con una orientación a su pediatra.

3.2.2. Estudio del Quimerismo –

Es fundamental para comprobar el prendimiento de los PH trasplantados en los TPH alogénicos.

En los 33 niños que realizaron TPH Alogénico, observamos que 27 niños tuvieron quimerismo completo, 3 niños tuvieron quimerismo mixto, y 3 no presentaban quimerismo y sí reconstitución autóloga.

De los tres que presentaron quimerismo mixto, en dos hubo una pérdida progresiva del implante con posterior rechazo y el otro presentó un quimerismo mixto estable, con buena evolución clínica actual.

Fue considerado como punto de corte para la valoración de un quimerismo mixto el valor de 1% (sí >1% de células del receptor = quimerismo mixto).

Fueron utilizados diferentes métodos para el estudio del quimerismo. En los casos de TPH en que donante y receptor eran de distintos sexos, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* (FISH), en colaboración entre los Departamentos de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Unidad de Antropología; Departamento de Fisiología Animal y Biología Celular, Unidad de Biología Celular y Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Unidad de Trasplante de Médula Ósea, Universidad Autónoma de Barcelona. Los restantes casos se estudiaron mediante análisis de microsatélites de DNA y los otros métodos como estudios de citogenética, de los antígenos eritrocitarios (grupo sanguíneo y factor Rh), y por el estudio de histocompatibilidad (en los casos de diferencia antigénica HLA entre donante y receptor).

3.2.3. Análisis Estadístico –

El análisis estadístico se realizó en la Unidad de Bioestadística del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello se emplearon los programas SPSS 8.0, SAS 6.12 y Stat-Xact.

Inicialmente se efectuó un análisis descriptivo univariado de cada variable en cada uno de los períodos de observación. Las variables categóricas se describieron mediante su distribución de frecuencias, mientras que en las variables cuantitativas se presentaron la mediana y los cuartiles. La utilización de la mediana como medida de la tendencia central de la distribución se justifica por su propiedad de no ser

sensible a los valores extremos¹⁴⁵⁻¹⁴⁷, lo cual es deseable en el estudio de distribuciones asimétricas. Cabe indicar, que otras medidas como la media no poseen esta característica, lo cual puede provocar un sesgo importante en los resultados obtenidos. Este problema, además, puede aumentar considerablemente en estudios, como es el caso, con un bajo número de individuos analizados.

En una segunda fase se realizó el análisis bivariado entre los parámetros de reconstitución inmunológica y las variables que podían tener algún efecto sobre los mismos. Dichos análisis se efectuaron mediante pruebas no paramétricas: la U de Mann-Whitney cuando los factores tenían dos categorías y el test de Kruskal-Wallis cuando las categorías del factor eran superiores a dos. En este último caso, en todas aquellas asociaciones que mostraron significación estadística se procedió a realizar test de comparaciones múltiples *post-hoc* para determinar entre cuales de las categorías se observaban las diferencias¹⁴⁷.

Por otra parte, para estudiar la asociación entre dos variables categóricas (sea el caso del grado de respuesta a las vacunas respecto a las fuentes de PH utilizadas, etc.) se utilizó el test de independencia de la χ^2 de Pearson. En caso de incumplirse las condiciones de aplicabilidad de éste, fue necesario el uso del test exacto de Fisher.

La siguiente fase lógica de análisis hubiera sido la fase multivariante. Ésta fue imposible de realizar debido al pequeño tamaño de la muestra analizada. Debido a este mismo problema, se debe alertar sobre la posible poca consistencia de algunos resultados como por ejemplo aquellos que involucran la fuente sangre de cordón umbilical (SCU), cuya frecuencia en la muestra analizada fue muy baja. Finalmente, dado que la significación estadística mediante la obtención del p-valor depende del tamaño muestral (es decir, según el p-valor, una misma diferencia será más significativa cuanto mayor sea el tamaño muestral) se decidió utilizar como criterio $p < 0,1$, relajando moderadamente, así, la exigencia en la significación de las asociaciones^{148, 149}.

4. RESULTADOS

4.1. CURSO CLÍNICO DE LOS PACIENTES:

En el total de 61 niños evaluables se realizaron los estudios indicados en los tiempos determinados: 1, 3, 6, 12, 18 y 24 meses post TPH.

La mediana (md) de la edad de los pacientes fue de 73,3 meses (6,11 años), con una mínima de 4,2 meses y una máxima de 204,8 meses (17,1 años). De los cuales, 38 (62,3%) eran niños y 23 (37,7%) eran niñas.

De los tipos de trasplantes realizados, 28 fueron trasplantes autólogos (45,9%) y 33 fueron alogénicos (54,1%).

Respecto a los tipos de fuentes utilizadas, 36 trasplantes (59%) fueron de médula ósea (MO), 6 trasplantes (9,8%) de sangre de cordón umbilical (SCU) y 19 trasplantes (31,1%) de sangre periférica (SP).

En cuanto al diagnóstico, padecían enfermedades neoplásicas de riesgo intermedio 45 pacientes (73,8%), enfermedades neoplásicas de riesgo alto, 3 (4,9%) y enfermedades no neoplásicas, 13 (21,3%).

En relación a la aparición de complicaciones como la enfermedad injerto contra huésped aguda (EICHa) y crónica (EICHc) en los trasplantes alogénicos (n=33), se observó que 5 niños no desarrollaron EICHa, 13 niños la desarrollaron en grado I (46,4%), 10 pacientes en grado II (35,7%) y 5 en grado III (17,9%). Respecto a la enfermedad injerto contra huésped crónica (EICHc), 18 pacientes no la desarrollaron, 6 niños la desarrollaron en forma localizada (40%) y 9 pacientes la padecieron en forma extensa (60%). Trece niños desarrollaron los dos tipos de EICH (Aguda y Crónica).

La radioterapia en el acondicionamiento previo al TPH se realizó en 42 niños (68,9%). Entre los niños que hicieron radioterapia, 22 (52,4%) recibieron un TPH autólogo y 20 (47,6%) recibieron un TPH alogénico.

Diecisiete (60,7%) de los 28 niños que desarrollaron EICHa habían recibido radioterapia en el acondicionamiento. Entre ellos, 8 (47,1%) tenían EICHa grado I, 7 (41,2%) tenían el grado II y 2 (11,8%) tenían el grado III. De los 15 niños que desarrollaron la EICHc, 10 (66,7%) habían recibido radioterapia en el acondicionamiento, entre ellos, 3 (30%) tenían EICHc localizada y 7 (70%) tenían EICHc extensa.

Entre otras complicaciones observadas, destacan las infecciones por citomegalovirus (CMV) en 5 niños (50%) y enfermedad venooclusiva hepática, neumonía intersticial, hepatitis C, hipertiroidismo y miocardiopatía tóxica manifestadas todas ellas en uno solo niño respectivamente (10%).

Como toxicidades precoces más frecuentes se observó vómitos, mucositis, elevación de la tensión arterial, diarrea, conjuntivitis e insuficiencia renal leve, las cuales se resolvieron en el periodo post-TPH.

Las recidivas del proceso tumoral se presentaron en 9 (14,7%) de los 61 niños, 6 (9,8%) con diagnóstico de leucemia y 3 (4,9%) con tumor sólido. De las 9 recidivas, 5 están vivos (8,2%) y 4 fallecieron (6,5%). De los vivos, 3 habían recibido un TPH autólogo (4,9%) y 2 TPH alogénico (3,3%). De los éxitos, 3 recibieron TPH autólogo (4,9%) y uno un TPH alogénico (1,6%).

En los estudios del quimerismo en los trasplantes alogénicos, 90% de los niños tuvieron quimerismo completo y 10% tuvieron quimerismo mixto.

Entre los niños estudiados, no hubo ningún fallo inicial del implante, pero dos niños perdieron el implante de forma progresiva meses después del trasplante.

En la fecha que se cerró el estudio, 55 niños seguían vivos (90,2%) y 6 habían fallecido (9,8%).

4.2. RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA EN LOS DIFERENTES TIPOS DE FUENTES (MO, SP Y SCU)

4.2.1. Linfocitos Totales y Subpoblaciones Linfocitarias –

a) Linfocitos Totales:

En la tabla 1 se presentan los valores de los linfocitos totales para cada fuente utilizada en los tiempos determinados. Se observa un importante aumento de estos linfocitos a partir del mes del TPH, alcanzando valores respecto a las tablas normales para la edad, por encima de los 1100 linfocitos/ μ l, a los 3 meses en todas las fuentes.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en los meses 1, 6 y 24. En el primer mes post-TPH hubo una regeneración más rápida de linfocitos en los pacientes que recibieron células progenitoras de SP y de SCU respecto a los que recibieron células progenitoras de la MO. Se observó una evolución similar en los tres tipos de fuentes, con una mayor tendencia al aumento del número de linfocitos totales a lo largo del primer año en los niños que recibieron TPH de SCU (Gráfico 1).

Tabla 1. Linfocitos Totales × Fuentes

Linfocitos Totales	1 mes*		3 meses		6 meses*		12 meses		18 meses		24 meses*	
P	p < 0,06				p < 0,03						p < 0,07	
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	610	30	1303	34	1468	34	2701	32	3015	33	3276
SCU	4	1210	5	1617	6	3896	6	4960	6	4924	5	3884
SP	8	1279	14	1356	17	1736	15	2932	12	3224	12	2179

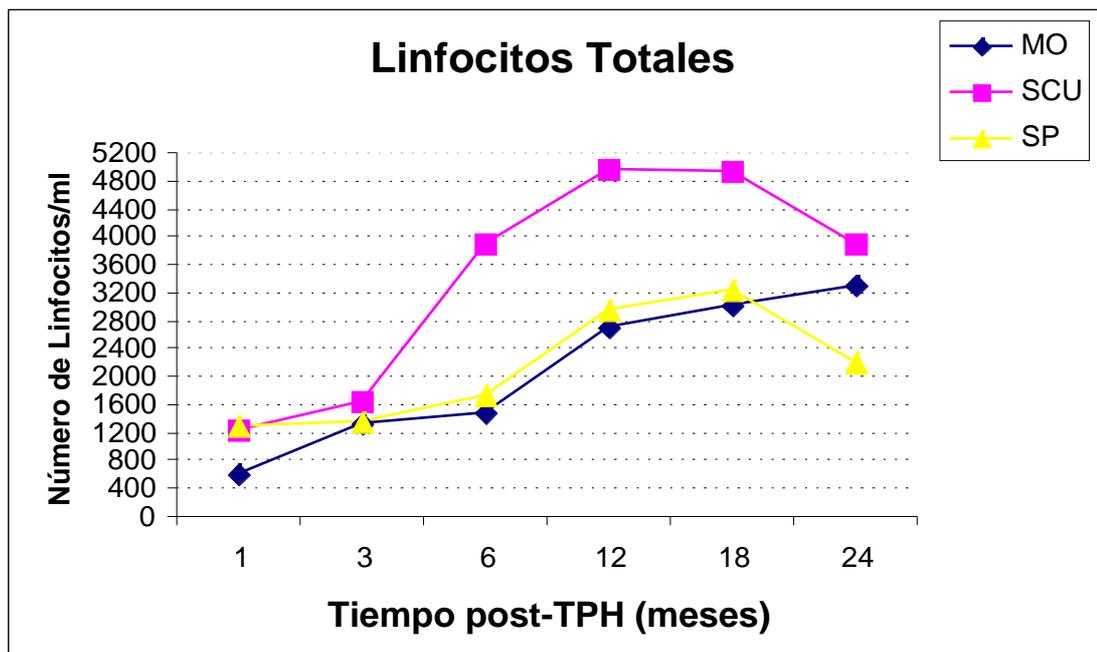


Gráfico 1. Valores de Linfocitos Totales en relación a la fuente de PH y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

b) Linfocitos T CD3⁺:

En la tabla 2 se presentan los valores de los linfocitos T CD3⁺ para cada fuente utilizada. Se puede observar un aumento por encima de los 500 linfocitos/ μ l a partir de los 3 meses post TPH. Solo se observaron diferencias estadísticamente significativas a 1 mes del TPH entre el número menor de linfocitos T CD3⁺ de los receptores de CPH de médula ósea y las otras dos fuentes, normalizándose los valores, con niveles mayores que 700/ μ l, a los 6 meses.

Tabla 2. Linfocitos T CD3⁺ \times Fuentes.

Linfocitos T CD3 ⁺	1 mes*		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
P	p < 0,04											
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	337	30	502	34	783	34	1617	32	1742	33	2163
SCU	4	723	5	1078	6	1399	6	2192	6	2709	5	2569
SP	8	720	14	929	17	932	15	1773	12	1747	12	1488

El gráfico 2 ilustra los valores de linfocitos T CD3⁺, mostrando una regeneración más rápida cuando se utilizaron el SCU y la SP. Esta diferencia permanece evidente hasta los 6 meses, cuando a partir del cual este aumento se estabiliza.

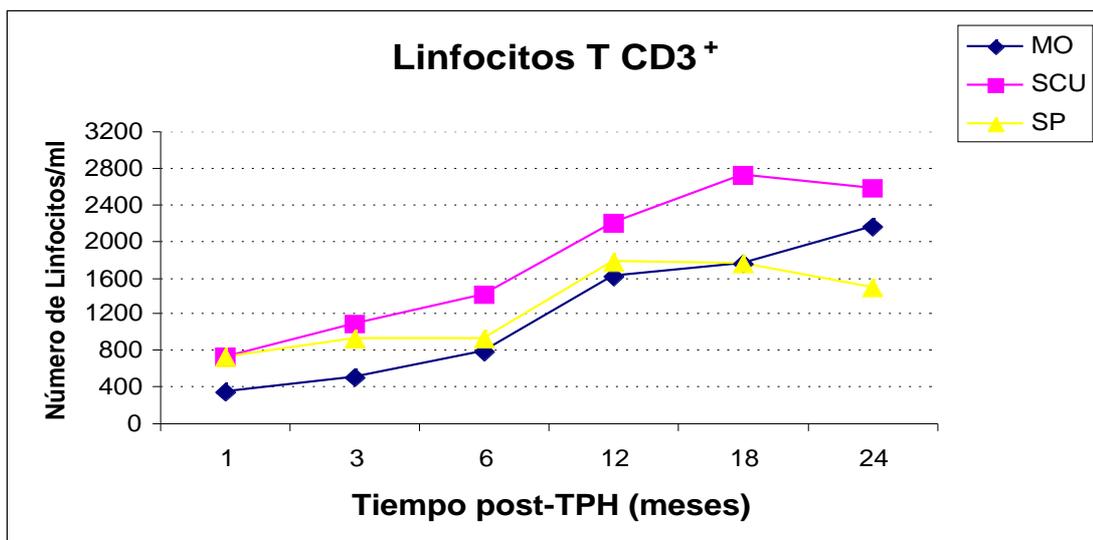


Gráfico 2. Valores de Linfocitos T CD3⁺ en relación a la fuente de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

c) Linfocitos T CD4⁺:

En la tabla 3 se presentan los valores de los linfocitos T CD4⁺ para cada fuente utilizada. Se observa un avance en la recuperación del número de linfocitos T CD4⁺ en los receptores de SCU respecto a las otras dos fuentes, que persiste hasta los 18 meses. Se alcanzaron cifras por encima de 200 células/ μ l en todas las fuentes a partir de los 3 meses y normalización de los valores a los 6 meses, con niveles mayores que 300 células/ μ l. Se observó significación estadística (Tabla 3).

Tabla 3. Linfocitos T CD4⁺ \times Fuentes

Linfocitos T CD4 ⁺	1 mes*		3 meses		6 meses*		12 meses*		18 meses*		24 meses*	
P	p < 0,07				p < 0,02		p < 0,06		p < 0,03		p < 0,04	
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	138	30	204	34	324	34	739	32	965	33	1114
SCU	4	269	5	323	6	820	6	1388	6	1871	5	1318
SP	8	246	14	205	17	319	15	898	12	962	12	689

Cuando se hizo el test de las comparaciones múltiples entre cada tipo de fuente entre sí, se observó significación estadística a los tres y doce meses entre MO-SCU ($p < 0,05$), a los seis y dieciocho meses entre MO-SCU y SP-SCU ($p < 0,005$ y $0,008$) y a los veinticuatro meses entre MO-SP y SP-SCU ($p < 0,05$). En el gráfico 3 se puede comprobar la tendencia de los valores de linfocitos T CD4⁺.

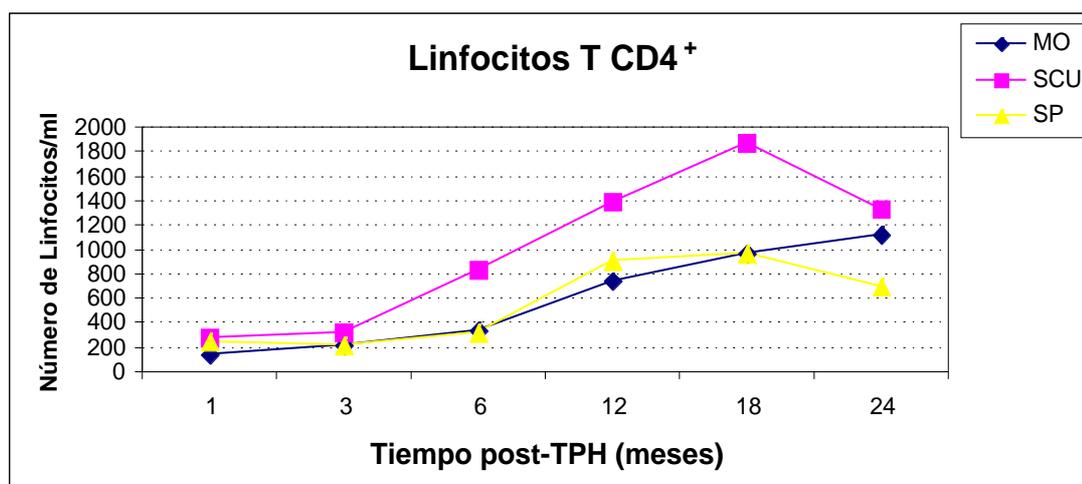


Gráfico 3. Valores de los Linfocitos T CD4⁺ en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

d) Linfocitos T CD8⁺:

En la tabla 4 están representados los valores de los linfocitos T CD8⁺ para cada fuente. Observamos niveles considerados normales, por encima de los 300 linfocitos/ μ l, ya a partir del primer mes post TPH, permaneciendo con estos valores durante todo el seguimiento. Solo hubo diferencias estadísticamente significativas al mes post-TPH siendo inferiores las cifras en los receptores de MO.

Tabla 4. Linfocitos T CD8⁺ × Fuentes

Linfocitos T CD8 ⁺	1 mes*		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
P	p < 0,07											
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	352	30	511	34	516	34	802	32	868	33	942
SCU	4	553	5	952	6	1064	6	1255	6	1045	5	1109
SP	8	654	14	828	17	609	15	1106	12	938	12	706

Cuando se hizo el test de las comparaciones múltiples entre cada tipo de fuente entre sí, solo se observó significación estadística al mes post-TPH entre MO-SP (p<0,05). El gráfico 4 ilustra el número aumentado de linfocitos T CD8⁺ en los niños que recibieron células progenitoras de SCU y SP respecto a los que recibieron MO hasta los 12 meses post-TPH. En los meses siguientes los valores tendieron a igualarse.

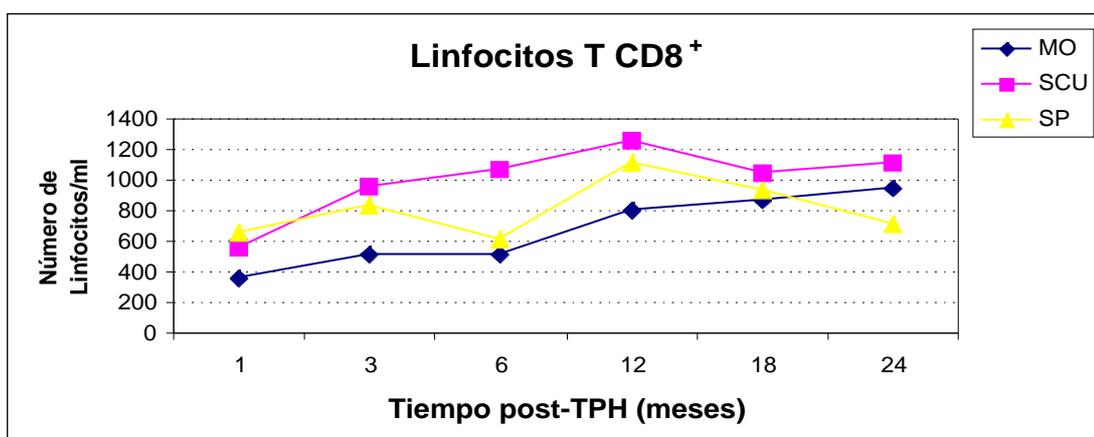


Gráfico 4. Valores de los Linfocitos CD8⁺ en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

e) Relación CD4⁺/CD8⁺:

En la tabla 5 se presentan las relaciones entre los linfocitos CD4⁺/CD8⁺ para cada fuente. El cociente es inferior al de las tablas normales para la edad y solo empieza a normalizarse, con valores superiores a 1, a partir de los 12 meses. Se observan diferencias estadísticamente significativas a los meses 12 y 18 post-TPH en el sentido de superioridad del cociente en los receptores de SCU respecto a las otras dos fuentes (Gráfico 5).

Tabla 5. Relación CD4⁺/CD8⁺ × Fuentes

Relación CD4/CD8	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses*		18 meses*		24 meses	
P							p < 0,07		p < 0,02			
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	0,40	30	0,37	34	0,55	34	0,87	32	1,07	33	1,22
SCU	4	0,63	5	0,30	6	0,76	6	1,19	6	1,50	5	1,21
SP	8	0,39	14	0,40	17	0,59	15	0,80	12	0,93	12	0,94

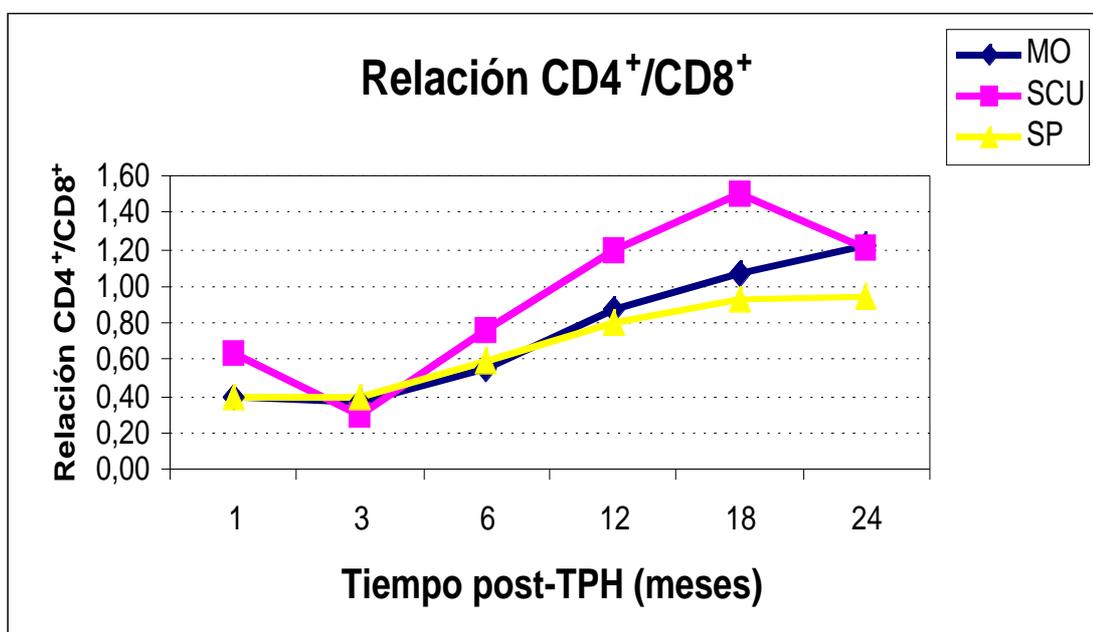


Gráfico 5. Cociente CD4⁺/CD8⁺ en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

f) Linfocitos B CD19⁺:

En la tabla 6 se presentan los valores de los linfocitos B CD19⁺ para cada fuente utilizada. Se observa un aumento de estos linfocitos a partir de los 3 meses, alcanzándose unos niveles normales a partir de los 6 meses, por encima de los 200linfocitos/ μ l, y permaneciendo con estos niveles hasta los 24 meses post TPH. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas a los meses 3, 6, 12, 18 y 24. Destacan los valores superiores de linfocitos B CD19⁺ en los receptores de SCU entre los 6 y los 18 meses.

Al realizarse el test de comparaciones múltiples entre cada tipo de fuente entre sí, se observó significación estadística a los tres meses entre MO-SP ($p=0,000$) y entre SCU-SP ($p<0,065$), a los seis meses entre todas las fuentes entre sí ($p<0,06$), a los 12 meses entre MO-SP ($p<0,041$) y MO-SCU ($p<0,05$), a los dieciocho meses entre MO-SCU ($p<0,025$) y a los veinticuatro meses entre MO-SP ($p<0,084$) y SP-SCU ($p<0,034$).

El gráfico 6 ilustra los valores de los linfocitos B CD19⁺. Se observa que durante el primer mes la proliferación linfocitaria fue muy baja, llegando a ser indetectable en algunos niños. Entre el tercer y sexto mes estos valores tendieron a recuperarse manteniéndose altos desde el sexto mes hasta los 24 meses postrasplante.

Tabla 6. Linfocitos B CD19⁺ × Fuentes

Linfocitos B CD19 ⁺	1 mes		3 meses*		6 meses*		12 meses*		18 meses*		24 meses*	
P			p < 0,002		p < 0,003		p < 0,009		p < 0,07		p < 0,07	
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	5	30	17	34	209	34	524	32	611	33	729
SCU	4	0	5	16	6	1256	6	1501	6	1107	5	972
SP	8	38	14	293	17	529	15	832	12	948	12	408

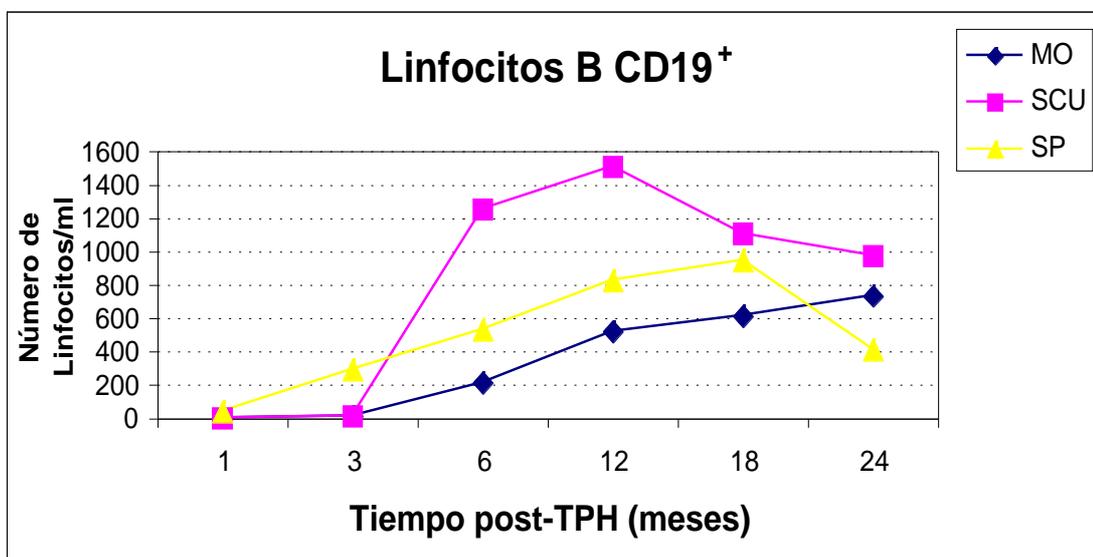


Gráfico 6. Valores de los Linfocitos B CD19⁺ en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

g) Células NK:

En la tabla 7 se presentan los valores de las células NK para cada fuente. El número de estas células se mostró dentro de la normalidad, mayor que 90 células/ μ l, ya durante el primer mes post TPH y siguió con niveles en torno de las 300 células hasta los 24 meses. Solo se observó diferencias estadísticamente significativas a los 6 meses con un mayor número en los receptores de SCU.

Tabla 7. Células NK \times Fuentes

Células NK	1 mes		3 meses		6 meses*		12 meses		18 meses		24 meses	
P					p < 0,01							
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	179	29	348	34	247	34	248	32	304	33	267
SCU	4	256	5	315	6	580	6	306	6	384	5	313
SP	8	317	14	280	17	266	15	279	12	326	12	319

El gráfico 7 demuestra los niveles de células NK hasta los 24 meses postrasplante.

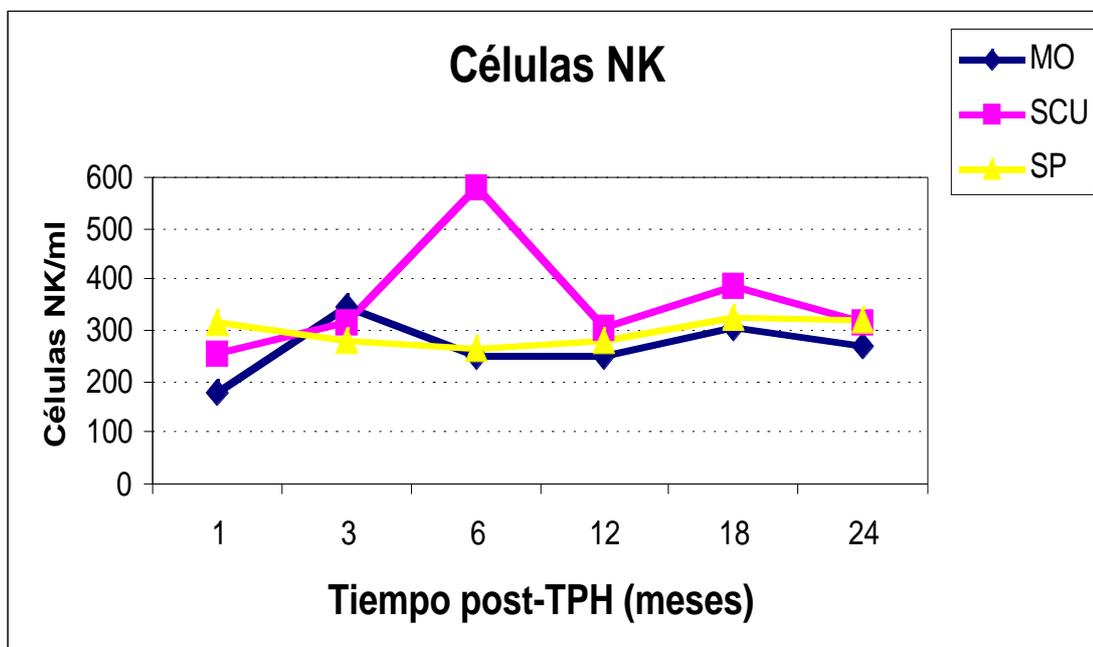


Gráfico 7. Valores de las Células NK en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

4.2.2. Función Linfocitaria T –

La función linfocitaria T, estudiada a través de la estimulación por el mitógeno PHA (fitohemaglutinina) y por el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) está representada en las tablas 8 - y 8 - para cada fuente utilizada. Se observa que la respuesta tras estimulación fue en su mayoría normal (N) a partir del primer mes post-TPH, cuando se utilizó la MO y el SP como fuentes. Cuando se utilizó el SCU, esta respuesta fue ausente (A) en _ de los niños y estuvo entre normal y parcial (P) en _ del primer al tercer mes; a partir de entonces se observó un predominio de la respuesta normal para las tres fuentes (Gráfico 8). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas a los 3 ($p<0,05$) y 12 meses ($p<0,09$) post-TPH siendo notorio el retraso en la recuperación de la función en los linfocitos de los pacientes receptores de trasplante de SCU durante los primeros meses.

Tabla 8 - I. Función Linfocitaria (respuesta a PHA y OKT3) × Fuentes

Función Linfocitaria	1 mes			3 meses *			6 meses		
	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal
MO n	2	2	14	1	2	26		3	27
%	11,1	11,1	77,8	3,4	6,9	89,7		10,0	90,0
SCU n	1	2	1		3	2		1	5
%	25,0	50,0	25,0		60,0	40,0		16,7	83,3
SP n		2	6		1	13	1		16
%		25%	75%		7,1	92,9	5,9		94,1

Tabla 8 - II. Función Linfocitaria (respuesta a PHA y OKT3) × Fuentes

Función Linfocitaria	12 meses *			18 meses			24 meses		
	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal
MO n		8	24	1	5	23		6	24
%		25,0	75,0	3,4	17,2	79,3		20,0	80,0
SCU n			6			4			5
%			100,0			100,0			100,0
SP n			14	1	2	8		2	10
%			100,0	9,1	18,2	72,7		16,7	83,3

Gráfico 8. Estudio de la Función Linfocitaria tras estimulación con PHA y OKT3 en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta (A, P, N) en cada una de las fuentes.

Gráfico 8

4.2.3 Función Linfocitaria B –

Fue estudiada mediante el análisis de las cifras de inmunoglobulina G, A, M, la producción de anticuerpos post-vacunales (vacuna de la hepatitis B y del tétanos) y la producción de anticuerpos naturales (ASTO).

a) Cifras de Inmunoglobulina G (IgG):

En la tabla 9 se presentan los valores de la inmunoglobulina G (IgG) para cada fuente utilizada. Los niveles encontrados a los meses 1 y 3 post-TPH no son evaluables, debido al hecho de que en los trasplantes alogénicos en ese periodo reciben inmunoglobulina exógena como medida de profilaxis de las infecciones y por tanto las cifras no son valorables. Pero a partir de los 6 meses ya se tiene valores superiores a 400mg/dL, observándose así una respuesta parcial, llegándose a valores por encima de 600mg/dL a los 12 meses excepto en los receptores de SCU. A los 24 meses los valores son normales en los receptores de PH de las tres fuentes, con cierto retraso en los receptores de SCU. (Gráfico 9).

Se observó diferencias estadísticamente significativas en los meses 1, 3 y 18 aunque no son valorables las cifras de los dos primeros valores por la administración de IgG i.v. en los receptores de trasplantes alogénicos, que mayoritariamente recibieron como fuentes MO y SCU. A los 18 y 24 meses los receptores de trasplantes de SCU presentaban valores inferiores a los receptores de CPH de las otras dos fuentes.

Tabla 9. Inmunoglobulina G × Fuentes

Inmunoglobulina G	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses*		24 meses	
P	p < 0,01											
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	1060	30	841	33	657	31	789	31	934	31	941
SCU	4	1155	5	984	6	602	6	470	6	529	5	609
SP	7	765	13	634	11	520	13	773	11	824	12	897

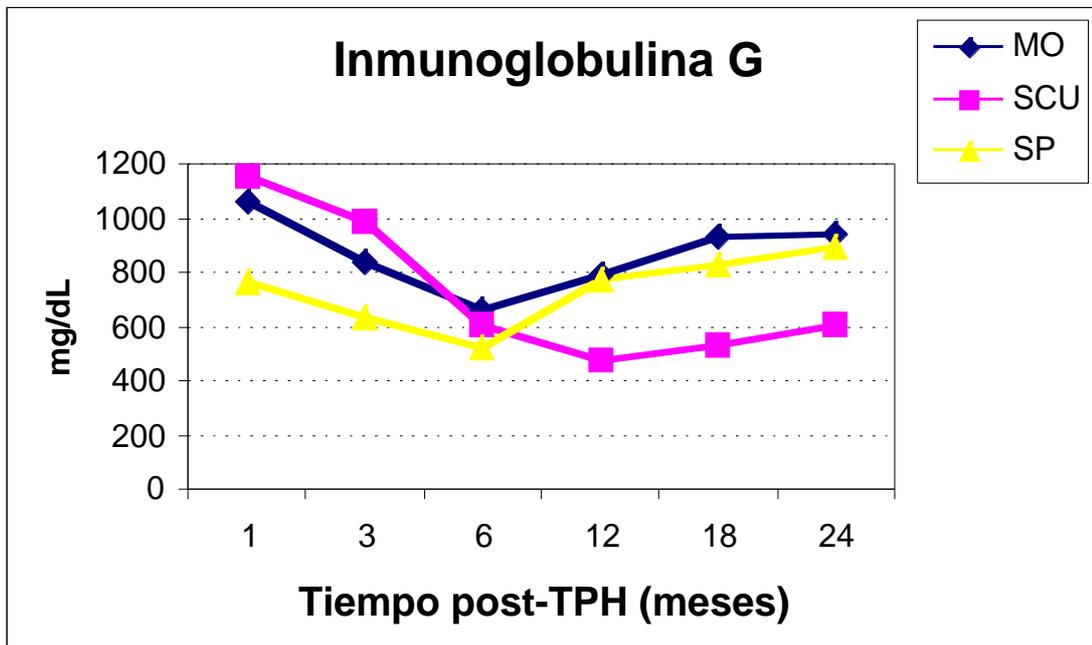


Gráfico 9. Cifras de Inmunoglobulina G en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

b) Cifras de Inmunoglobulina A (IgA):

En la tabla 10 se presentan los valores de la IgA para cada fuente utilizada. Se observa niveles considerados normales, por encima de los 40 mg/dL, en el primer mes en las tres fuentes por persistencia de las inmunoglobulinas producidas por las células B antes del trasplante. Después de un descenso, a partir del tercer mes hay un aumento progresivo de estos niveles en los receptores de CPH de MO y SP. En los pacientes receptores de SCU se observa valores inferiores con un retardo en la recuperación a lo largo de los 24 meses (Gráfico 10). Existen diferencias estadísticamente significativas a los meses 3, 6, 12, 18 y 24 en el sentido de superioridad de las cifras de IgA en los receptores de CPH de MO y SP respecto a los receptores de CPH de SCU.

Tabla 10. Inmunoglobulina A × Fuentes

Inmunoglobulina A	1 mes		3 meses*		6 meses*		12 meses*		18 meses*		24 meses*	
	P											
Fuente	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
	MO	21	49	30	31	33	39	31	52	31	75	31
SCU	4	44	5	13	6	23	6	13	6	41	5	35
SP	7	49	13	59	11	57	13	90	11	129	12	162

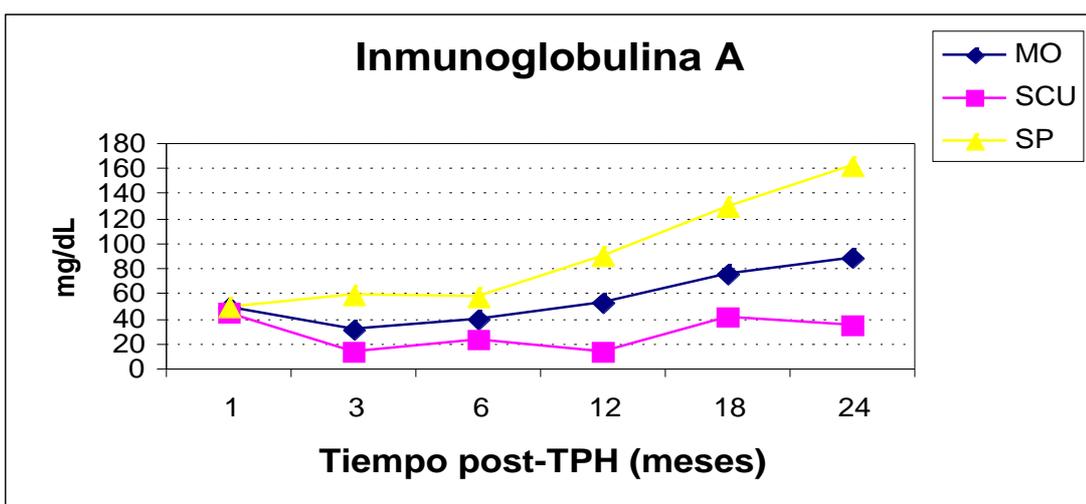


Gráfico 10. Cifras de Inmunoglobulina A en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

c) Cifras de Inmunoglobulina M (IgM):

En la tabla 11 se presentan los valores de la IgM para cada fuente utilizada. Se observa niveles por encima de los 30 mg/dL en el primer mes en las tres fuentes por la razón antes explicada. A partir del tercer mes hay un aumento progresivo de estos niveles en los receptores de CPH de MO y SCU sin que existan diferencias estadísticamente significativas (Gráfico 11).

Tabla 11. Inmunoglobulina M × Fuentes

Inmunoglobulina M	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses*		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
MO	21	45	30	47	33	49	31	75	31	90	31	100
SCU	4	63	5	45	6	54	6	67	6	80	5	138
SP	7	33	13	65	11	62	13	99	11	127	12	110

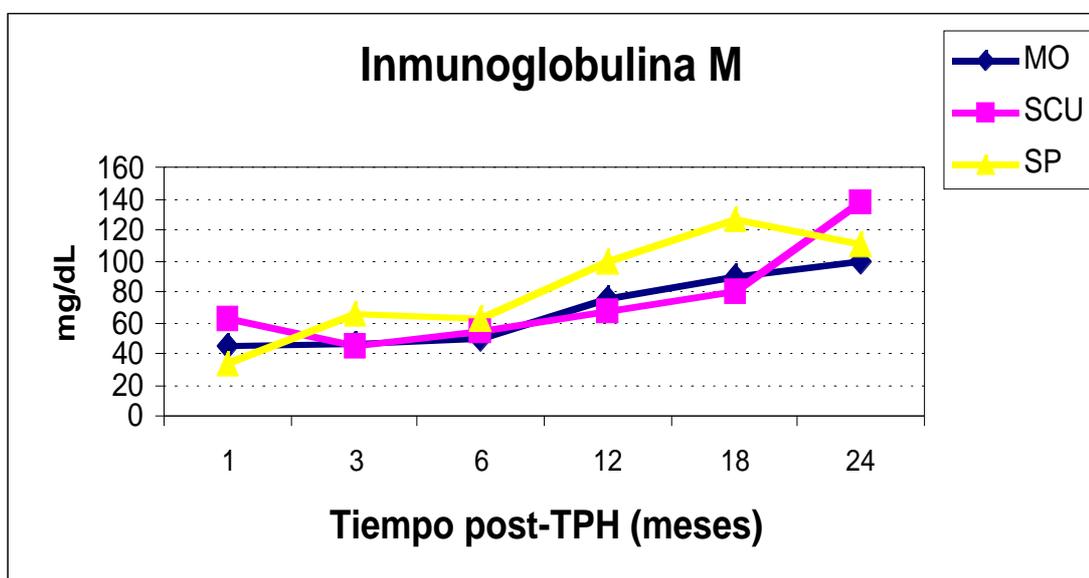


Gráfico 11. Cifras de Inmunoglobulina M en relación a las fuentes de PH y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

d) Producción de Anticuerpos Post Vacunales:

d.1) Anti-Hepatitis B (Anti-HBs):

La respuesta a los antígenos vacunales de la hepatitis B fue buena en 16 niños (42,1%), parcial en 7 (18,4%) y no hubo respuesta en 15 (39,5%). Fueron excluidos doce niños por no haber sido posible la medida de los anticuerpos post-vacuna y por no tenerse certeza sobre la vacunación. En once niños no fue medida la producción de estos anticuerpos pre y post vacuna.

En la tabla 12 se presentan los valores en porcentajes de la respuesta a los antígenos vacunales de la hepatitis B para cada fuente utilizada. Se observa que la proporción entre respuesta (parcial o total) y no-respuesta a la vacuna de la hepatitis B fue similar, donde la mitad de los pacientes tuvieron respuesta y la otra mitad no. Cuando se utilizó como fuente la MO no hubo diferencias significativas entre las respuestas, cuando se utilizó el SCU todos los pacientes obtuvieron una buena respuesta y cuando se utilizó la SP no se observó respuesta en 75% de los pacientes (Gráfico 12). Se observa diferencias estadísticamente significativas ($p=0,028$).

Tabla 12. Anticuerpo Anti-Hepatitis B × Fuentes.

			Fuente			Total
			MO	SCU	SP	
Anticuerpo Anti-Hepatitis B	No Respuesta	n	9		6	15
		%	36,0		75,0	39,5
	Respuesta	n	16	5	2	23
		%	64,0	100,0	25,0	60,5
	Total	n	25	5	8	38
		%	100,0	100,0	100,0	100,0

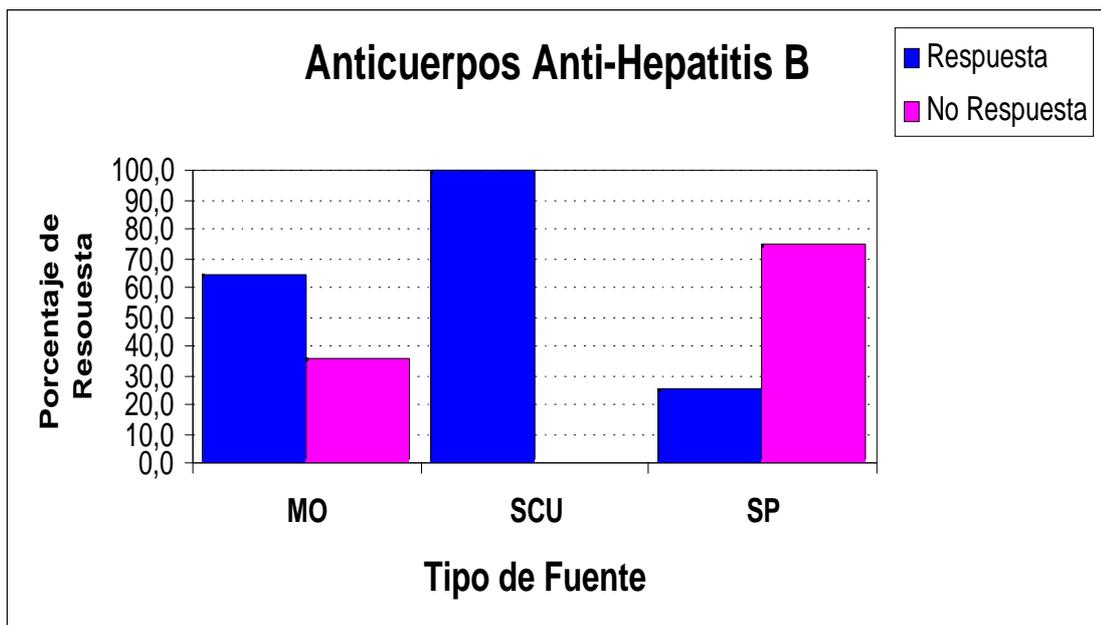


Gráfico 12. Anticuerpos Anti-Hepatitis B en relación al tipo de respuesta a la vacuna y a la fuente de PH utilizada. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta para cada una de las fuentes.

d.2) Anti-Tétanos:

La respuesta a los antígenos vacunales del tétanos fue buena en 36 niños (92,3%) y parcial en 3 niños (7,7%). Once niños fueron excluidos por no haber sido posible la medida de los anticuerpos post-vacuna y por haber fallos en la vacunación. En once niños no fue medida la producción de estos anticuerpos pre y post vacuna.

En la tabla 13 se presentan los valores de los porcentajes de la respuesta a los antígenos vacunales del tétanos para cada fuente utilizada. Se observa que todos los niños vacunados tuvieron respuesta, independiente del tipo de fuente utilizada (Gráfico 13). No fueron observadas diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 13. Anticuerpos Anti-Toxoide Tetánico × Fuentes.

		Fuente				
			MO	SCU	SP	Total
Anticuerpo Anti-Tétanos	Respuesta Parcial	n	3			3
		%	11,5			7,7
	Buena Respuesta	n	23	5	8	36
		%	88,5	100,0	100,0	92,3
Total		n	26	5	8	39
		%	100,0	100,0	100,0	100,0

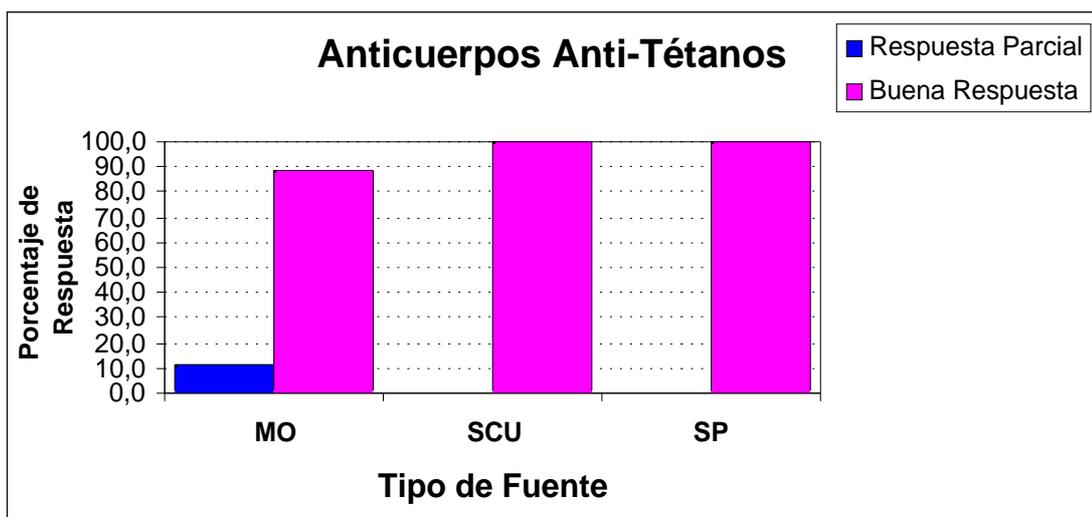


Gráfico 13. Anticuerpos Anti-Tétanos en relación al tipo de respuesta a la vacuna y a la fuente de PH utilizada. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta para cada una de las fuentes.

e) Producción de Anticuerpos Naturales (ASTO):

La producción de anticuerpos naturales medida por la determinación de los títulos de antiestreptolisina O (ASTO) fue considerada buena en 10 niños (24,4%), parcial en 15 niños (36,6%) y no hubo respuesta en 16 niños (39%). Los niños menores que 2 años no fueron valorados debido a la baja respuesta en esta edad. En doce niños no fue medida esta producción de anticuerpos.

En la tabla 14 se presentan los valores de los títulos de ASTO para cada fuente utilizada. Se observa que los niños que recibieron trasplante de PH de MO y de SP presentaron una mejor producción respecto a los que recibieron SCU, no siendo estos datos estadísticamente significativos (Gráfico 14).

Tabla 14. Títulos de ASTO × Fuentes.

		Fuente				
			MO	SCU	SP	Total
Antiestreptolisina O (ASTO)	No Respuesta	n	10	2	4	16
		%	38,5	100,0	30,8	39,0
	Respuesta	n	16		9	25
		%	61,5		69,2	61,0
Total		n	26	2	13	41
		%	100,0	100,0	100,0	100,0

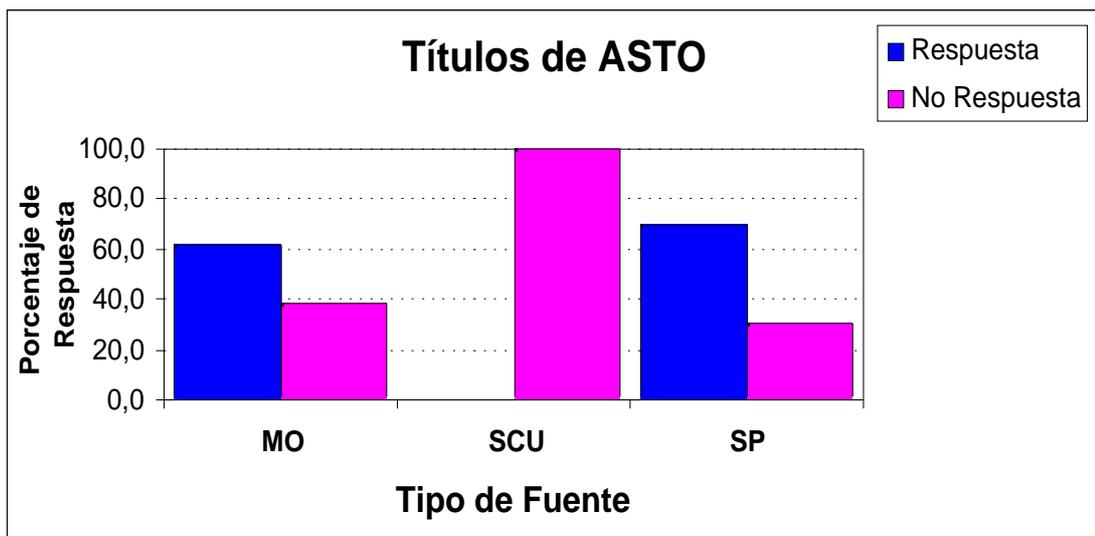


Gráfico 14. Títulos de Antiestreptolisina O (ASTO) en relación a la fuente de PH utilizada. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta para cada una de las fuentes.

4.3. RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA EN RELACIÓN A LOS DIFERENTES TIPOS DE TRASPLANTES (AUTÓLOGO Y ALOGÉNICO)

De los 61 trasplantes estudiados, 28 fueron trasplantes autólogos (45,9%) y 33 fueron alogénicos (54,1%).

4.3.1. Linfocitos Totales y Subpoblaciones Linfocitarias –

a) Linfocitos Totales:

En la tabla 15 se presentan los valores de los linfocitos totales respecto a los tipos de TPH realizado. El número de linfocitos totales fue ligeramente más elevado en los niños que recibieron un TPH autólogo que en los que recibieron un TPH alogénico en el primer mes, pero estas diferencias no llegaron a ser significativas. Esta evolución permanece similar en los dos grupos, observándose un aumento progresivo hasta los 18 meses post-TPH, a partir del cual ocurre una estabilización (Gráfico 15). Los niveles normales se alcanzaron en los dos tipos de trasplante a partir del tercer mes post-TPH, con linfocitos por encima de 1100// μ l. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 15. Linfocitos Totales × TPH

Linfocitos Totales	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
Tipos TPH	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	1012	20	1393	25	1792	23	2932	19	3456	21	3168
ALOGÉNICO	23	740	29	1254	32	1556	32	2788	31	3096	29	3080

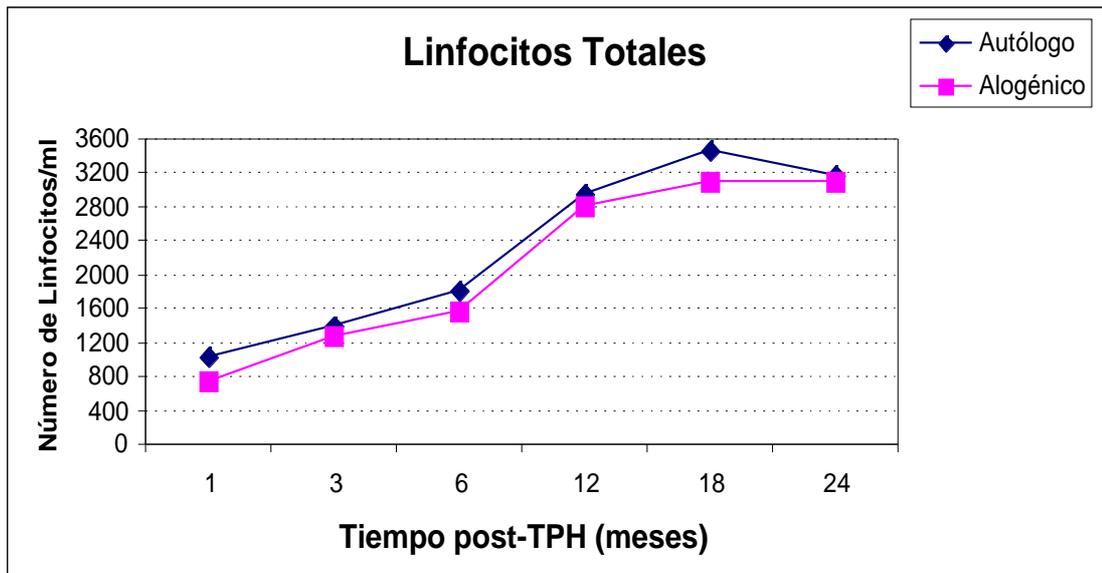


Gráfico 15. Valores de Linfocitos Totales en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

b) Linfocitos T CD3⁺:

En la tabla 16 se presentan los valores de los linfocitos T CD3⁺ para cada tipo de TPH realizado. A partir del sexto mes post-TPH se alcanzó niveles normales de linfocitos T CD3⁺, por encima de los 700 linfocitos/ μ l. Se observa un ligero aumento en el número de estos linfocitos en los niños que recibieron un TPH autólogo a lo largo de los meses, hasta el mes 18 post-TPH (Gráfico 16). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes.

Tabla 16. Linfocitos T CD3⁺ \times TPH

Linfocitos T CD3 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	546	20	700	25	868	23	1724	19	1875	21	2009
ALOGÉNICO	23	470	29	541	32	781	32	1666	31	1857	29	2247

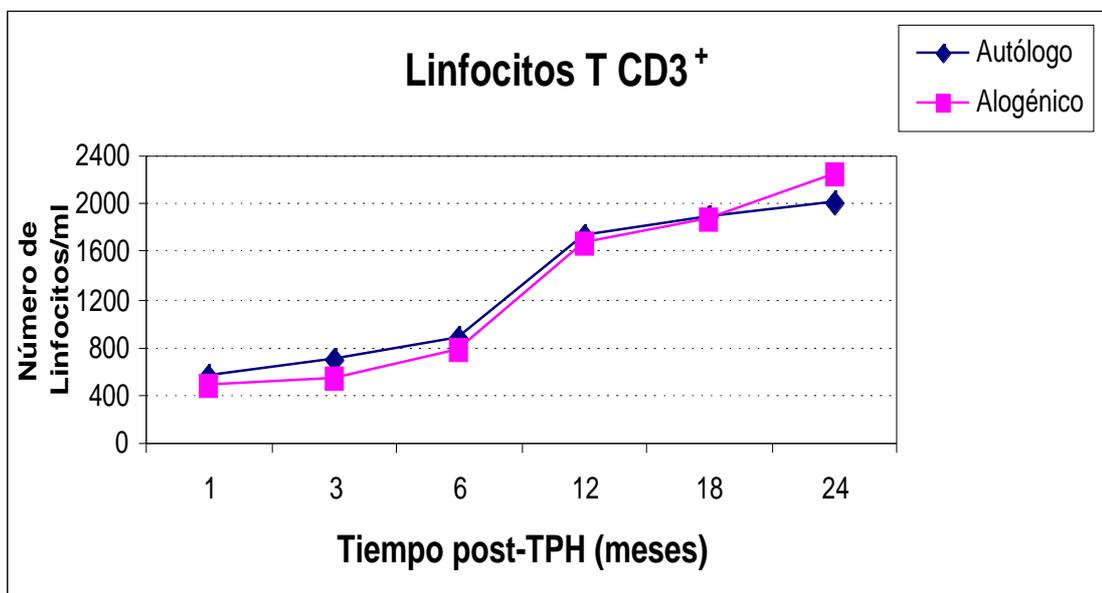


Gráfico 16. Valores de Linfocitos T CD3⁺ en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

c) Linfocitos T CD4⁺:

En la tabla 17 se muestran los valores de los linfocitos CD4⁺ para los tipos de TPH realizado. El número de estos linfocitos fue inicialmente bajo, alcanzando un nivel por encima de las 200 células/ μ l a partir de los 3 meses post-TPH en los dos tipos de trasplante, con una tendencia a la normalización a partir de los 6 meses, con niveles mayores que las 300 células/ μ l. La evolución fue muy similar entre ambos grupos de pacientes (Gráfico 17).

No se observó diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados entre los dos grupos de niños.

Tabla 17. Linfocitos T CD4⁺ × TPH

Linfocitos T CD4 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	160	20	205	25	358	23	898	19	1077	21	855
ALOGÉNICO	23	154	29	231	32	336	32	759	31	977	29	1093

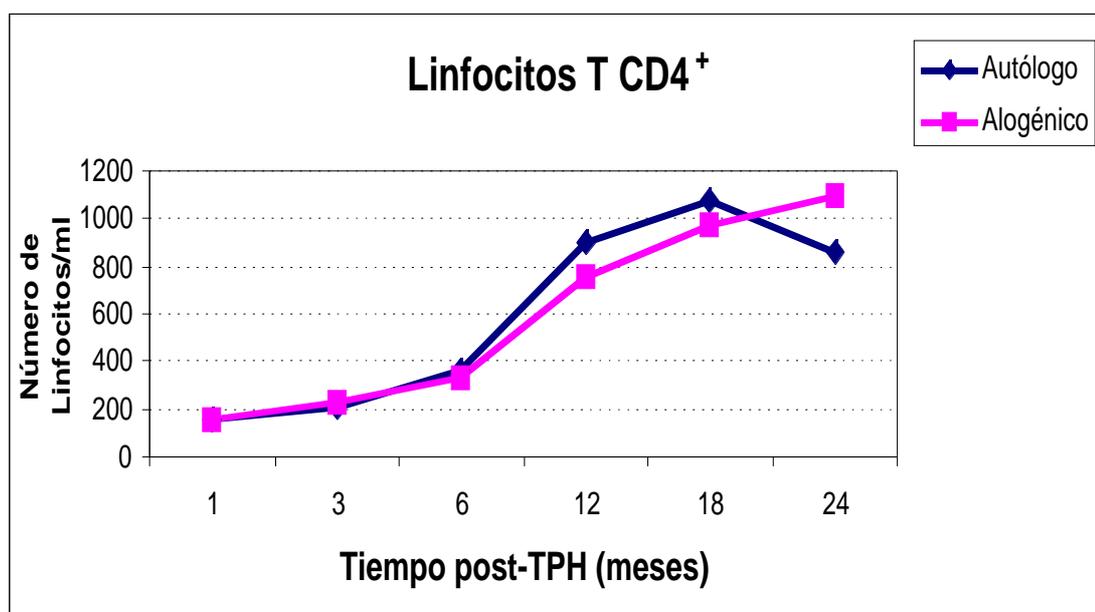


Gráfico 17. Valores de Linfocitos T CD4⁺ en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

d) Linfocitos T CD8⁺:

En la tabla 18 se presentan los valores de los linfocitos CD8⁺ para los dos tipos de TPH. Se observa valores normales, por encima de los 300 linfocitos/ μ l ya en el primer mes post-TPH y estos valores permanecieron elevados durante todo el estudio (Gráfico 18). No se observó diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados en los pacientes tratados con un trasplante autólogo o un trasplante alogénico.

Tabla 18. Linfocitos T CD8⁺ \times TPH

Linfocitos T CD8 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	474	20	624	25	548	23	997	19	930	21	835
ALOGÉNICO	23	368	29	532	32	577	32	832	31	881	29	1026

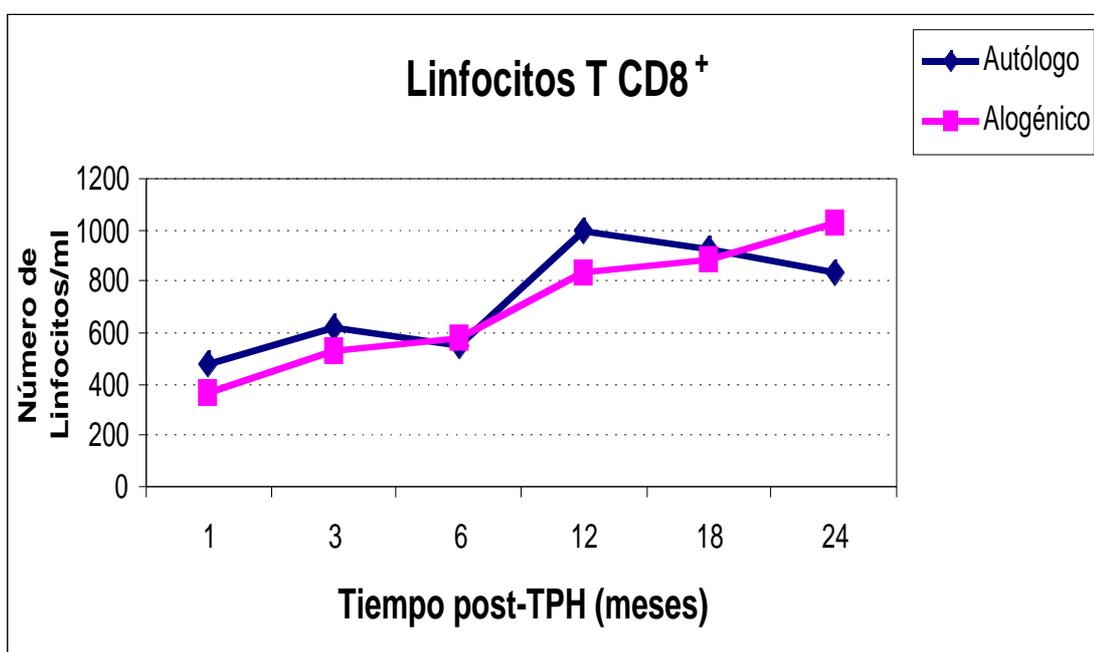


Gráfico 18. Valores de Linfocitos T CD8⁺ en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

e) Relación CD4⁺/CD8⁺:

En la tabla 19 se presentan las relaciones entre los linfocitos CD4⁺/CD8⁺ para cada tipo de TPH. Se observa un cociente inferior a la unidad hasta los 12 meses post-TPH, que solo empieza a normalizarse a partir de los 18 meses. Entre los 12 y 24 meses se observa un aumento en este cociente en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico (Gráfico 19). No se observan diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de pacientes.

Tabla 19. Relación CD4⁺/CD8⁺ × TPH

Relación CD4/CD8	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	0,39	20	0,40	25	0,62	23	0,88	19	0,96	21	0,97
ALOGÉNICO	23	0,46	29	0,36	32	0,54	32	0,90	31	1,16	29	1,22

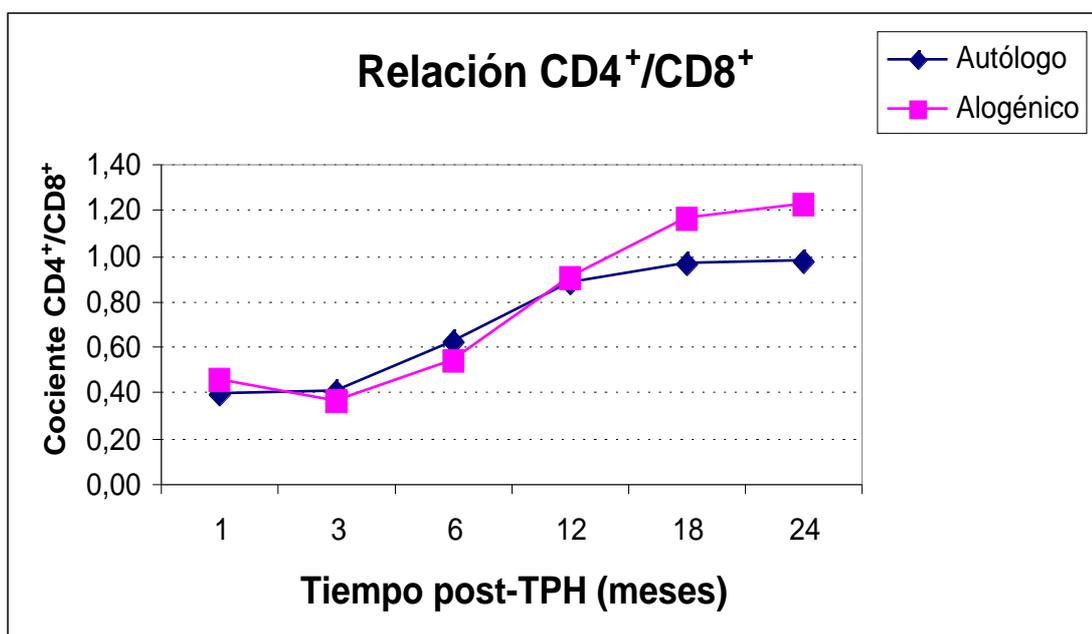


Gráfico 19. Cociente CD4⁺/CD8⁺ en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

f) Linfocitos B CD19⁺:

En la tabla 20 se presentan los valores de los linfocitos B CD19⁺ en los tipos de TPH. Se observa un bajo número en el primer mes, pero a partir del tercer mes hay un incremento en este valor, alcanzando niveles normales, por encima de los 200linfocitos/ μ l, a partir del sexto mes post-TPH, que siguen alto hasta los 24 meses post-TPH. Entre los meses 1 y 18 los linfocitos B CD19⁺ de pacientes tratados con trasplante autólogo se mantuvieron elevados en relación con aquellos pacientes tratados con trasplante alogénico (Gráfico 20). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los meses 3 y 6, siendo bastante superior el número de linfocitos CD19⁺ en los niños que recibieron un TPH autólogo.

Tabla 20. Linfocitos B CD19⁺ \times TPH

Linfocitos B CD19 ⁺	1 mes		3 meses*		6 meses*		12 meses		18 meses		24 meses	
P			p < 0,00		p < 0,04							
Tipos TPH	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	12	20	372	25	529	23	774	19	968	21	462
ALOGÉNICO	23	5	29	14	32	188	32	524	31	648	29	701

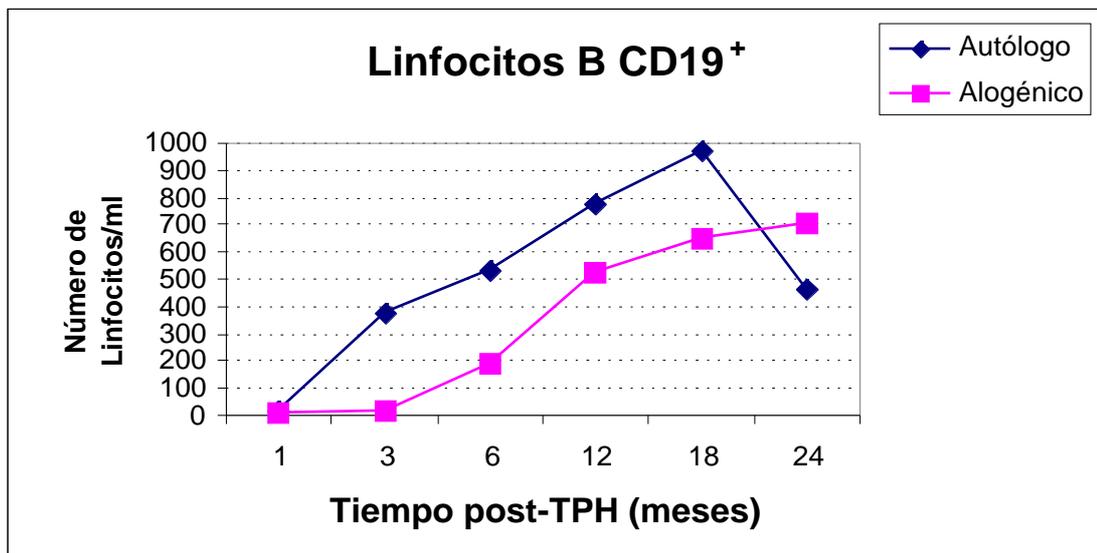


Gráfico 20. Valores de Linfocitos B CD19⁺ en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

g) Células NK:

En la tabla 21 se presentan los valores de las células NK para cada tipo de TPH. Desde el primer mes post-TPH el número de estas células fue normal, por encima de las 90 células/ μ l en ambos grupos de pacientes. A partir del tercer mes hasta un año este aumento fue mayor en los niños tratados con trasplante alogénico. A partir de entonces prevaleció un patrón similar en esta elevación (Gráfico 21). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes.

Tabla 21. Células NK \times TPH

Células NK	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	10	210	20	297	25	266	23	275	19	329	21	286
ALOGÉNICO	23	210	28	346	32	321	32	298	31	311	29	273

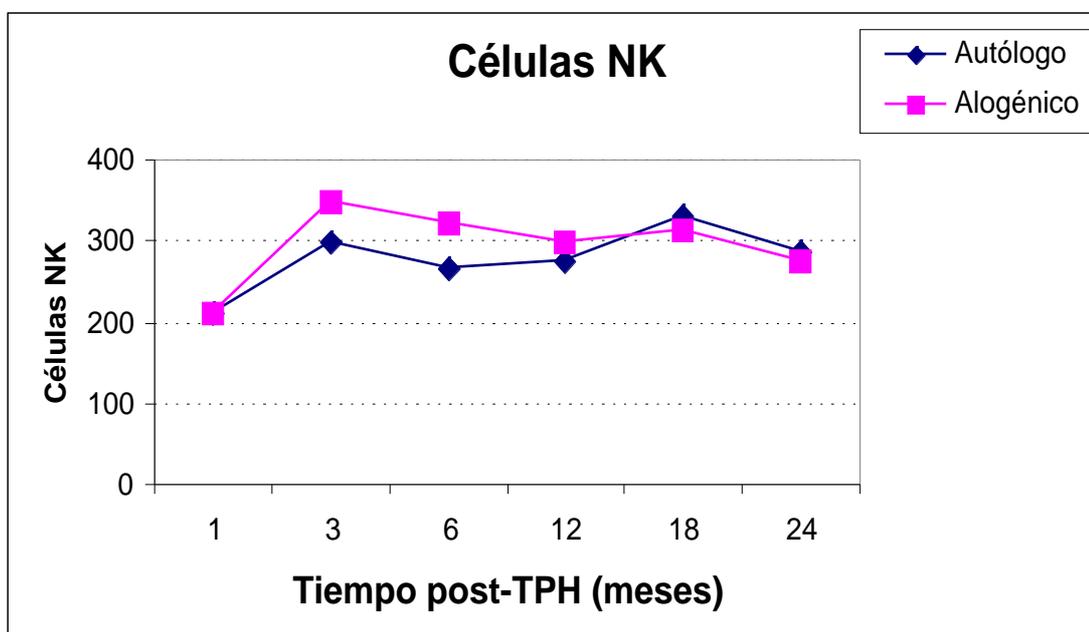


Gráfico 21. Valores de las Células NK en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

4.3.2. Función Linfocitaria T –

La función linfocitaria T está representada en las tablas 22 - y 22 - para cada tipo de trasplante. Se observa que la respuesta tras estimulación fue en su mayoría de parcial (P) a normal (N) a partir del primer mes post-TPH en los dos grupos de pacientes. Hubo un predominio de la respuesta normal, con una mejor recuperación funcional en los pacientes que recibieron un trasplante autólogo (Gráfico 22). No fueron observadas diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 22 - I. Función Linfocitaria T (respuesta a PHA y OKT3) × TPH

Función Linfocitaria	1 mes			3 meses			6 meses		
	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal
Autólogo n		2	8		2	18	1	1	21
%		20,0	80,0		10,0	90,0	4,3	4,3	91,3
Alogénico n	3	4	13	1	4	23		3	27
%	15,0	20,0	65,0	3,6	14,3	82,1		10,0	90,0

Tabla 22 - II. Función Linfocitaria T (respuesta a PHA y OKT3) × TPH

Función Linfocitaria	12 meses			18 meses			24 meses		
	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal	Ausente	Parcial	Normal
Autólogo n		2	20	1	2	13		3	18
%		9,1	90,9	6,3	12,5	81,3		14,3	85,7
Alogénico n		6	24	1	5	22		5	21
%		20,0	80,0	3,6	17,9	78,6		19,2	80,8

Gráfico 22. Estudio de la Función Linfocitaria T tras estimulación con PHA y OKT3 en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta (A, P, N) para cada uno de los tipos de trasplante.

Gráfico 22

4.3.3. Función Linfocitaria B –

Fue estudiada mediante el análisis de las cifras de inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina M (IgM), la producción de anticuerpos post vacunales (vacuna de la Hepatitis B y del Tétanos) y la producción de anticuerpos naturales (ASTO).

a) Cifras de Inmunoglobulina G:

En la tabla 23 se presentan los valores de la IgG para cada tipo de trasplante. Se observa niveles elevados en los meses 1 y 3 post-TPH con diferencias estadísticamente significativas, pero no valorables por el hecho de que fue administrado IgG i.v. en ese periodo en los receptores de trasplantes alogénicos como profilaxis contra las infecciones[#]. A partir de los 6 meses se observa una respuesta parcial, con valores superiores a 500mg/dL y a los 12 meses ya se tiene valores normales, con cifras superiores a 600mg/dL en los dos tipos de trasplantes. Estos valores tienden a permanecer estables hasta el final del estudio (Gráfico 23). Se observó diferencias estadísticamente significativas en los meses 1 y 3, pero estas no son valorables por la administración de IgG i.v. en los receptores de trasplantes alogénicos.

Tabla 23. Inmunoglobulina G × TPH

Inmunoglobulina G	1 mes#		3 meses#		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	9	776	19	636	18	493	20	660	17	824	19	907
ALOGÉNICO	23	1140	29	936	32	660	30	781	31	797	29	920

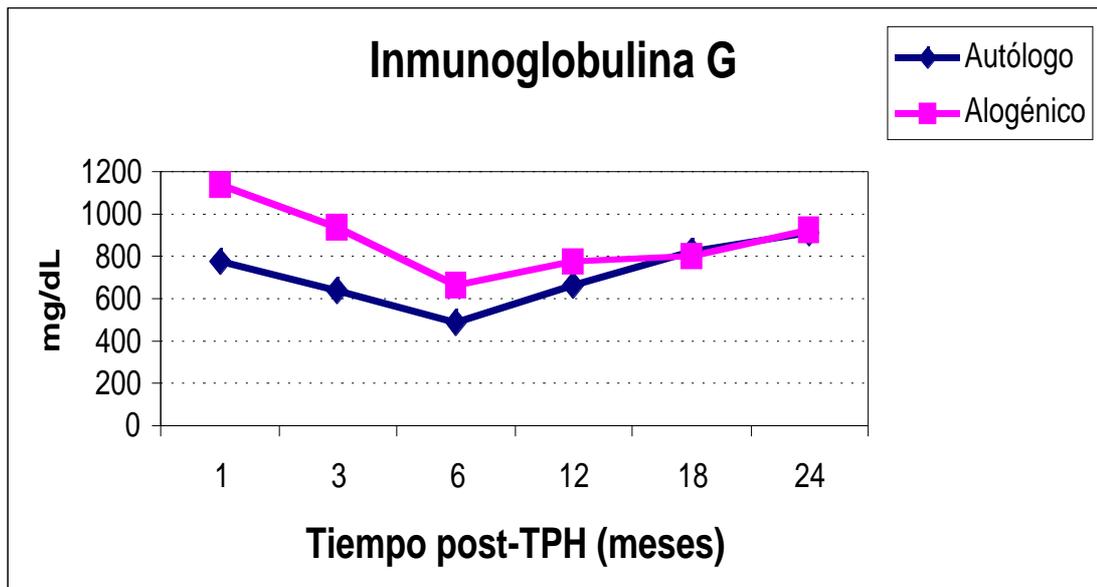


Gráfico 23. Cifras de Inmunoglobulina G en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio. # tratamiento con GGev en TPH alogénicos.

b) Cifras de Inmunoglobulina A (IgA):

En la tabla 24 se presentan los valores de la IgA para cada tipo de trasplante realizado. Se observa niveles considerados normales, por encima de los 40 mg/dL ya en el primer mes en los dos grupos de pacientes, con un aumento progresivo de estos niveles en los pacientes que recibieron trasplante autólogo. En los pacientes receptores de trasplante alogénico, a partir del tercer mes se observa valores inferiores, con una evolución más lenta, pero también con un aumento progresivo, a lo largo de los 24 meses (Gráfico 24). Se observa diferencias estadísticamente significativas a los meses 3, 6, 12, 18 y 24 siendo las cifras de IgA en los receptores de TPH autólogo superiores a las cifras de los receptores de TPH alogénico.

Tabla 24. Inmunoglobulina A × TPH

Inmunoglobulina A	1 mes		3 meses*		6 meses*		12 meses*		18 meses*		24 meses*	
P			p < 0,01		p < 0,02		p < 0,02		p < 0,04		p < 0,004	
Tipos TPH	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	9	49	19	56	18	59	20	85	17	86	19	134
ALOGÉNICO	23	49	29	22	32	33	30	45	31	66	29	76

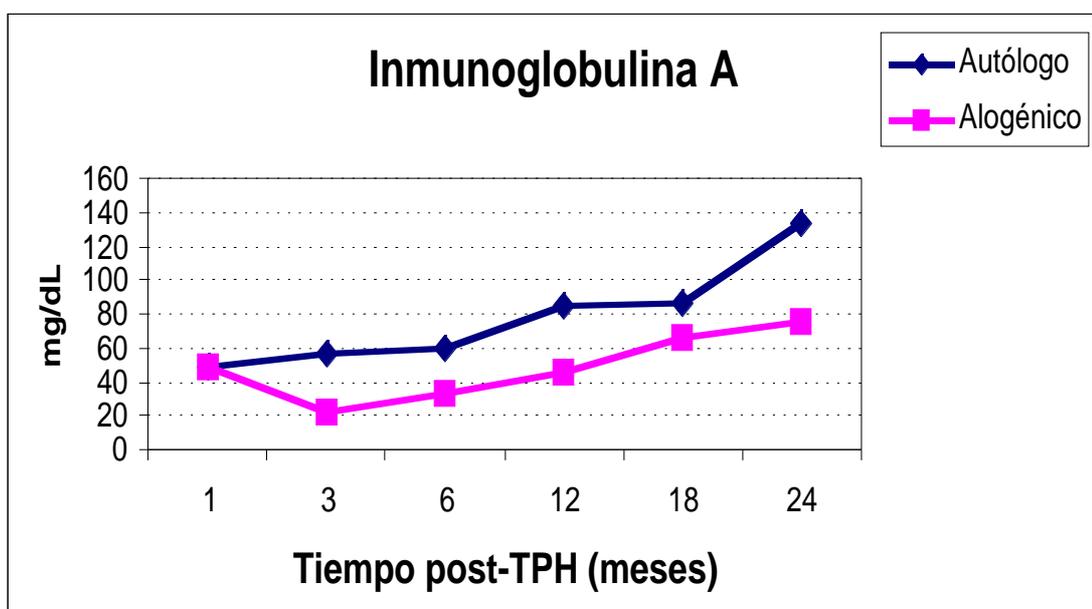


Gráfico 24. Cifras de Inmunoglobulina A en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

c) Cifras de Inmunoglobulina M (IgM):

En la tabla 25 se presentan los valores de la IgM para cada tipo de trasplante realizado. Se observa cifras de IgM por encima de los 30 mg/dL en el primer mes post-TPH en los dos grupos de pacientes, con un aumento progresivo de estos niveles en los pacientes que recibieron trasplante autólogo a partir de los 3 meses. En los pacientes receptores de trasplante alogénico, a partir del tercer mes se observa valores inferiores y una recuperación más lenta, pero también con un aumento progresivo a lo largo de los 24 meses (Gráfico 25). Se observa diferencias estadísticamente significativas a los meses 1 y 3, siendo las cifras de IgM en los receptores de TPH autólogo superiores a las cifras de los receptores de TPH alogénico.

Tabla 25. Inmunoglobulina M × TPH

Inmunoglobulina M	1 mes*		3 meses*		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
P	p < 0,02		p < 0,03									
Tipos TPH	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
AUTÓLOGO	9	33	19	65	18	59	20	97	17	101	19	110
ALOGÉNICO	23	49	29	42	32	50	30	75	31	90	29	92

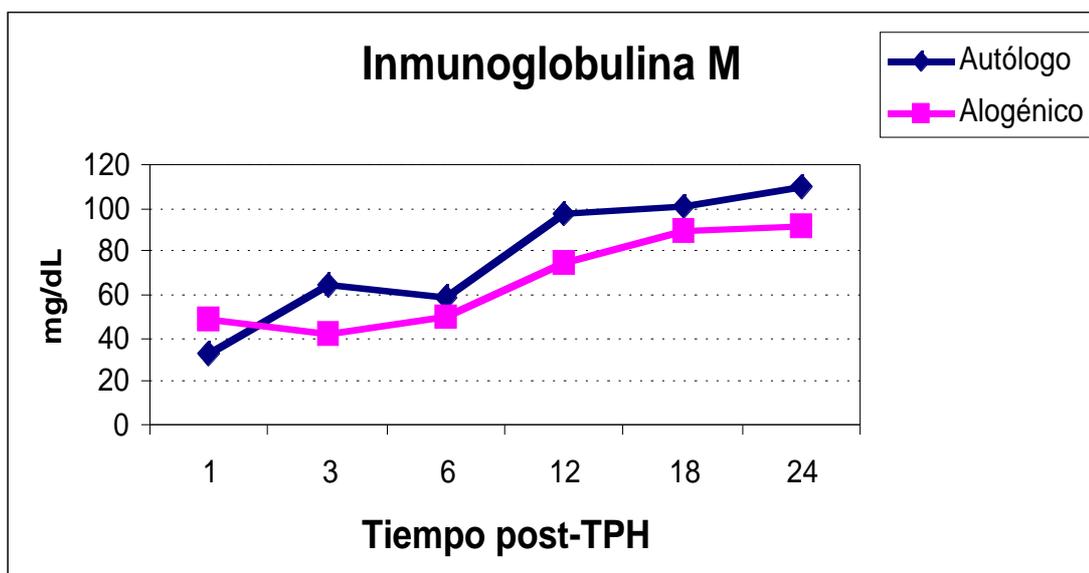


Gráfico 25. Cifras de Inmunoglobulina M en relación al tipo de trasplante y al tiempo transcurrido desde el trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

d) Producción de Anticuerpos Post Vacunales:

d.1) Anti-Hepatitis B (Anti-HBs):

En la tabla 26 se presentan los valores de los porcentajes de la respuesta a los antígenos vacunales de la hepatitis B para cada tipo de trasplante utilizado. Se observa que la proporción entre respuesta (parcial o total) y no-respuesta a la vacuna de la hepatitis B fue similar. Hubo una mejor respuesta en los pacientes que recibieron trasplante alogénico respecto a los que recibieron trasplante autólogo (Gráfico 26) aunque dado el escaso número de pacientes analizados no se pueda extraer conclusiones.

Tabla 26. Anticuerpos Anti-Hepatitis B × TPH.

			Tipo de Trasplante		Total
			Autólogo	Alogénico	
Anticuerpos Anti-Hepatitis B	No Respuesta	n	10	5	15
		%	71,4	20,8	39,5
	Respuesta	n	4	19	23
		%	28,6	79,2	60,5
	Total	n	14	24	38
		%	100,0	100,0	100,0

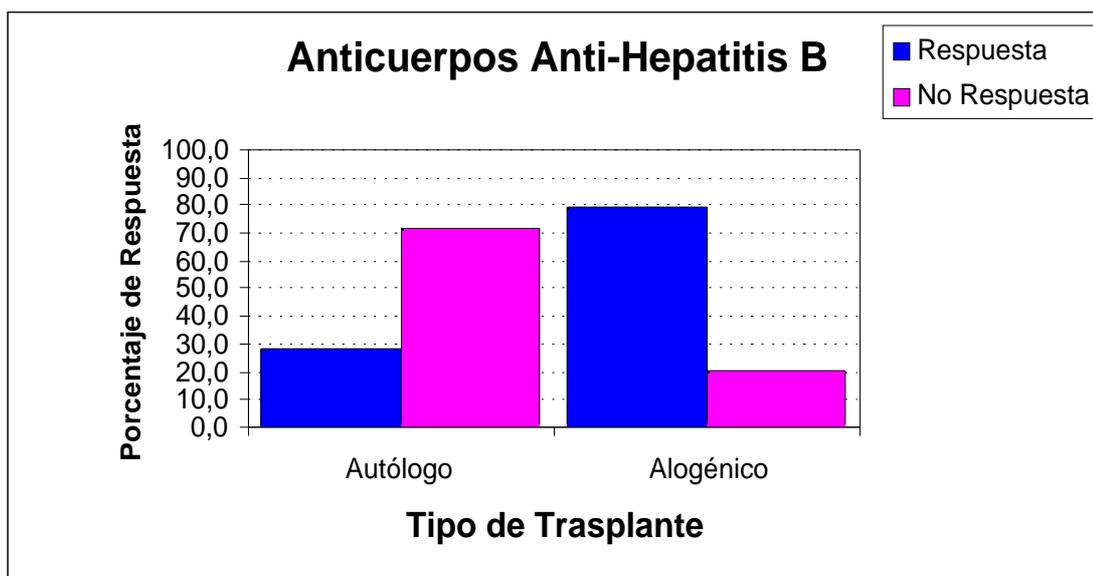


Gráfico 26. Respuesta a la vacuna de la Hepatitis B en relación al tipo de trasplante. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta para cada uno de los tipos de trasplantes.

d.2) Anti-Tétanos:

En la tabla 27 se presentan los valores de los porcentajes de la respuesta a los antígenos vacunales del tétanos para cada tipo de trasplante realizado. Se observa que todos los niños vacunados tuvieron respuesta, en su mayoría buena, no siendo esta influenciada por el tipo de trasplante (Gráfico 27). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 27. Anticuerpos Anti-Toxoide Tetánico × TPH.

			Tipos de Trasplante		
			Autólogo	Alogénico	Total
Anticuerpo Anti-Tétanos	Respuesta Parcial	n	1	2	3
		%	6,7	8,3	7,7
	Buena Respuesta	n	14	22	36
		%	93,3	91,7	92,3
	Total	n	15	24	39
		%	100,0	100,0	100,0

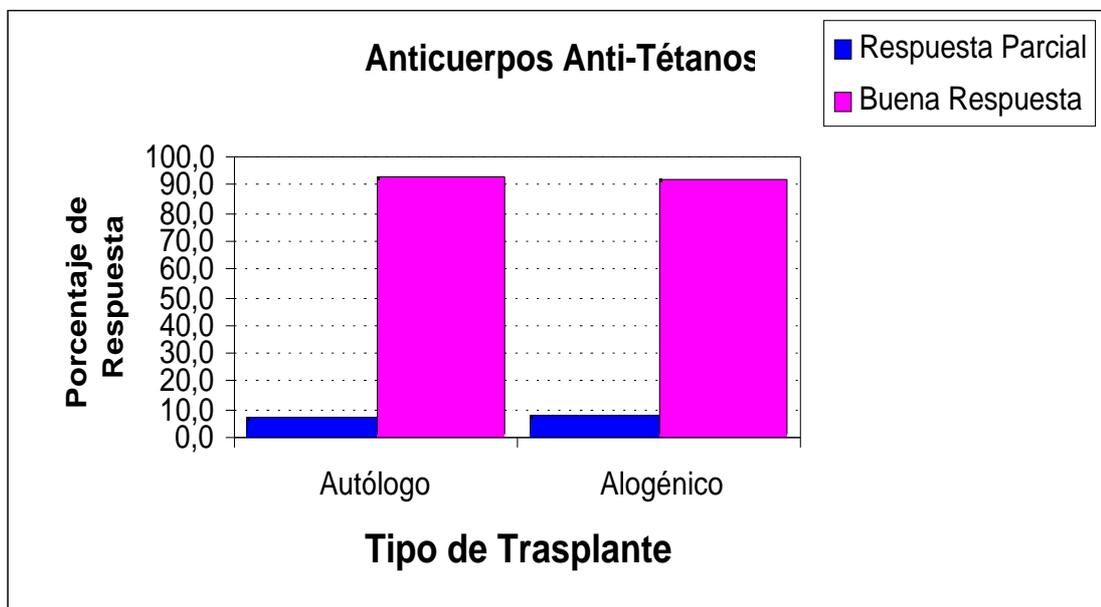


Gráfico 27. Respuesta a la vacuna del Tétanos en relación al tipo de trasplante. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta para cada uno de los tipos de trasplantes.

e) Producción de Anticuerpos Naturales (ASTO):

En la tabla 28 se presentan los valores de los títulos de ASTO para cada tipo de trasplante utilizado. Se observa que los niños que recibieron trasplante autólogo presentaron una mejor respuesta que aquellos que recibieron un trasplante alogénico (Gráfico 28), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 28. Títulos de ASTO × TPH.

			Tipo de Trasplante		
			Autólogo	Alogénico	Total
Antiestreptolisina O (ASTO)	No Respuesta	n	7	9	16
		%	36,8	40,9	39,0
	Respuesta	n	12	13	25
		%	63,2	59,1	61,0
	Total	n	19	22	41
		%	100,0	100,0	100,0

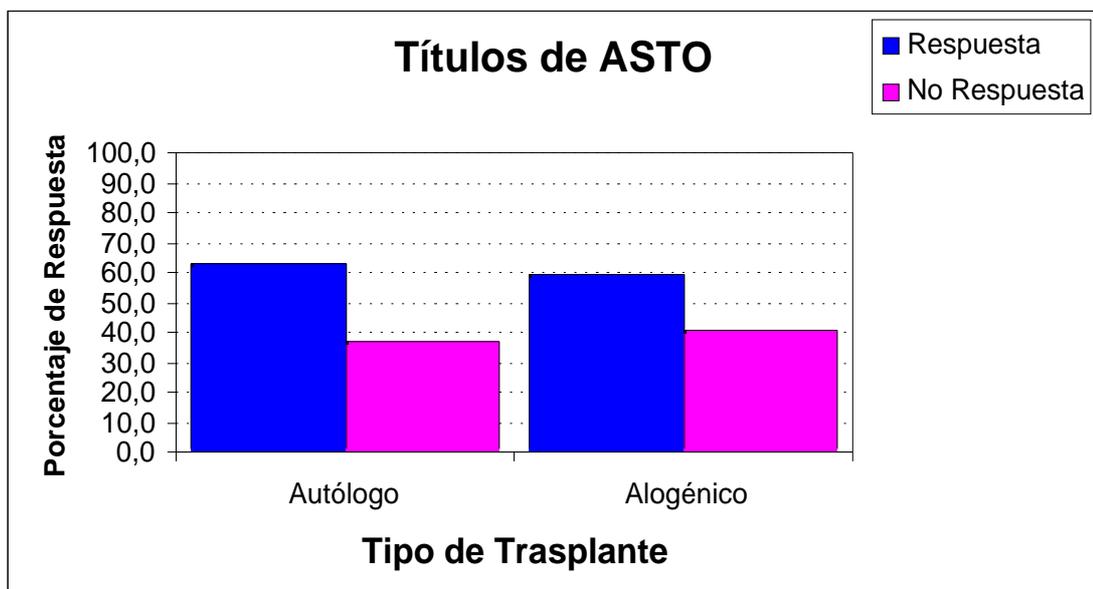


Gráfico 28. Títulos de Antiestreptolisina O (ASTO) en relación al tipo de trasplante utilizado. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta para cada uno de los tipos de trasplante.

4.4. RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA EN LOS RECEPTORES DE TRASPLANTE ALOGÉNICO SEGÚN EL DIAGNÓSTICO (ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS Y NO NEOPLÁSICAS)

4.4.1. Linfocitos Totales y Subpoblaciones Linfocitarias –

a) Linfocitos Totales:

En la tabla 29 se presentan los valores de linfocitos totales en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Fueron alcanzados valores normales, por encima de los 1100linfocitos/ μ l, a partir de los 3 meses post-TPH en los dos grupos de enfermedades. Se observa un leve aumento del número de linfocitos totales en los niños con diagnóstico de enfermedades neoplásicas respecto a las no neoplásicas, a lo largo del tiempo, excepto a los 6 meses (Gráfico 29) aunque no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 29. Linfocitos Totales \times Diagnóstico

Linfocitos Totales	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	740	16	1303	20	1544	19	2920	18	3195	18	3404
Enf. No Neoplásicas	10	713	13	1104	12	1886	13	1980	13	3096	11	3080

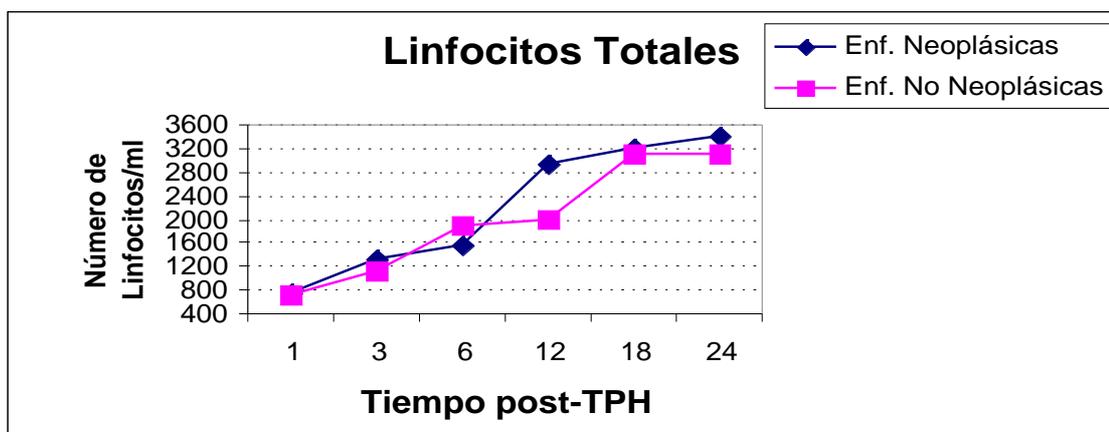


Gráfico 29. Valores de Linfocitos Totales en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

b) Linfocitos T CD3⁺:

En la tabla 30 se presentan los valores de los linfocitos T CD3⁺ en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Se alcanzaron valores normales, por encima de los 700linfocitos/ μ l, a partir de los 12 meses post-TPH. Se observa un ligero aumento del número de linfocitos T CD3⁺ en los niños con diagnóstico de enfermedades neoplásicas respecto a las no neoplásicas, a lo largo del tiempo, excepto a los 18 meses (Gráfico 30) si bien no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 30. Linfocitos T CD3⁺ \times Diagnóstico

Linfocitos T CD3 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	507	16	672	20	1074	19	1758	18	1812	18	2355
Enf. No Neoplásicas	10	386	13	438	12	670	13	1313	13	1857	11	2247

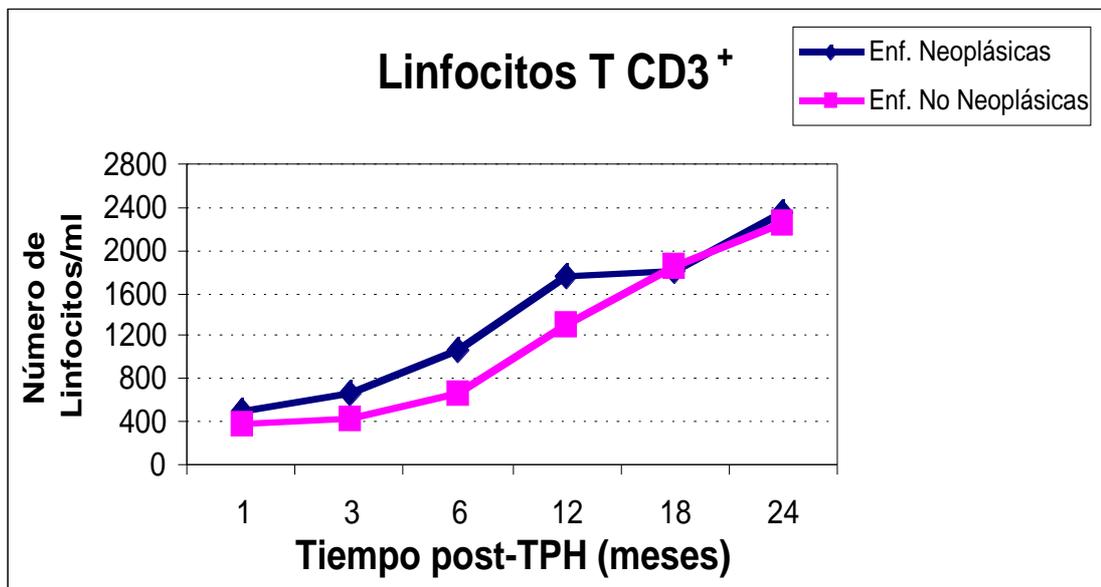


Gráfico 30. Valores de Linfocitos T CD3⁺ en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

c) Linfocitos T CD4⁺:

En la tabla 31 se presentan los valores de los linfocitos T CD4⁺ en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Se alcanzaron valores normales a partir de los 6 meses post-TPH, por encima de los 300linfocitos/ μ l. No se observaron diferencias significativas en los niños con diagnóstico de enfermedades neoplásicas respecto a las no neoplásicas (Gráfico 31).

Tabla 31. Linfocitos T CD4⁺ × Diagnóstico

Linfocitos T CD4 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	154	16	237	20	324	19	782	18	965	18	1168
Enf. No Neoplásicas	10	176	13	213	12	410	13	735	13	1137	11	932

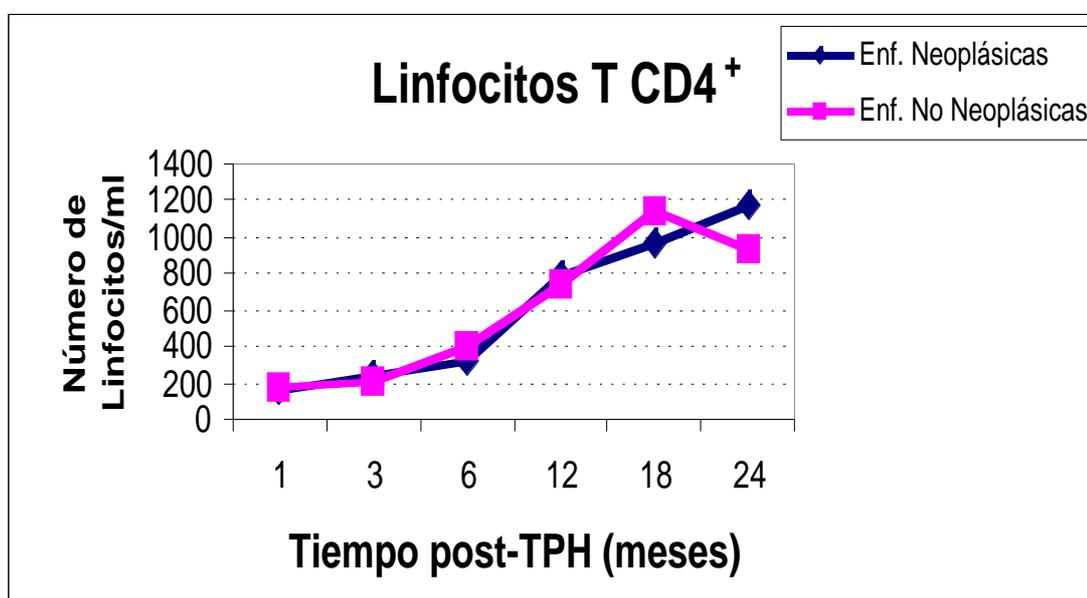


Gráfico 31. Valores de Linfocitos T CD4⁺ en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

d) Linfocitos T CD8⁺:

En la tabla 32 se presentan los valores de los linfocitos T CD8⁺ en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Fueron alcanzados valores normales ya a partir del mes post-TPH, con valores por encima de las 300 células/μl. Se observa un ligero aumento del número de linfocitos T CD8⁺ en los niños con diagnóstico de enfermedades neoplásicas respecto a las no neoplásicas, a lo largo del tiempo, excepto a los 24 meses (Gráfico 32) aunque tampoco las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Tabla 32. Linfocitos T CD8⁺ × Diagnóstico

Linfocitos T CD8 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	368	16	601	20	645	19	1210	18	899	18	1006
Enf. No Neoplásicas	10	365	13	298	12	435	13	583	13	854	11	1026

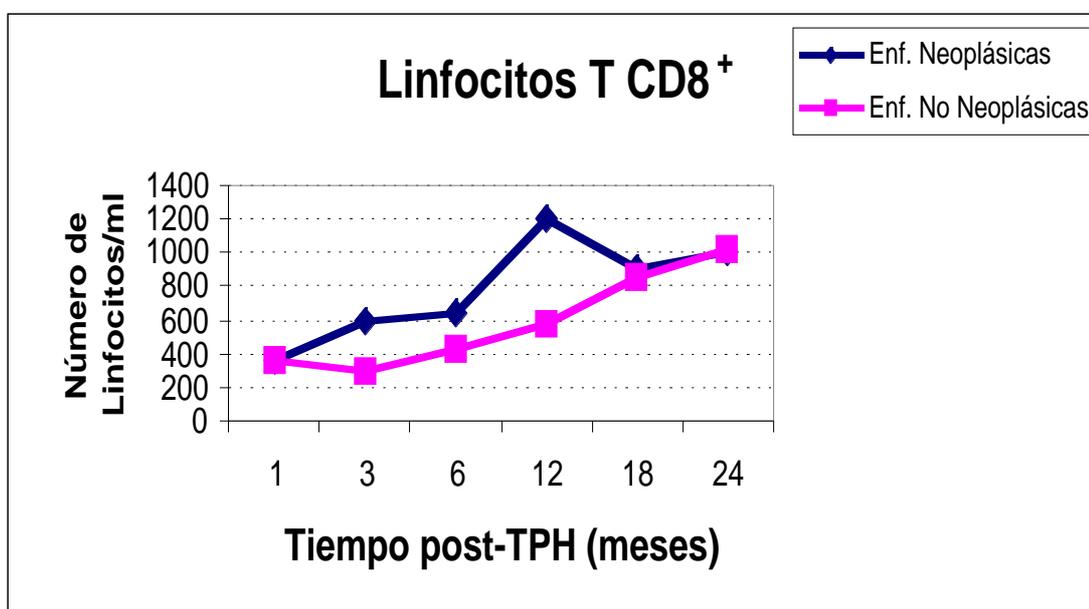


Gráfico 32. Valores de Linfocitos T CD8⁺ en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

e) Relación CD4⁺/CD8⁺:

En la tabla 33 se presentan las relaciones entre los linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Se observa un cociente inferior a la unidad hasta los 12 meses post-TPH, que empieza a normalizarse a partir de los 18 meses. Entre los 3 y 24 meses se observa un aumento en este cociente en los dos grupos de pacientes (Gráfico 33). No se observan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 33. Relación CD4⁺/CD8⁺ × Diagnóstico

Relación CD4/CD8	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	0,40	16	0,34	20	0,50	19	0,76	18	1,13	18	1,29
Enf. No Neoplásicas	10	0,50	13	0,39	12	0,68	13	0,96	13	1,16	11	1,21

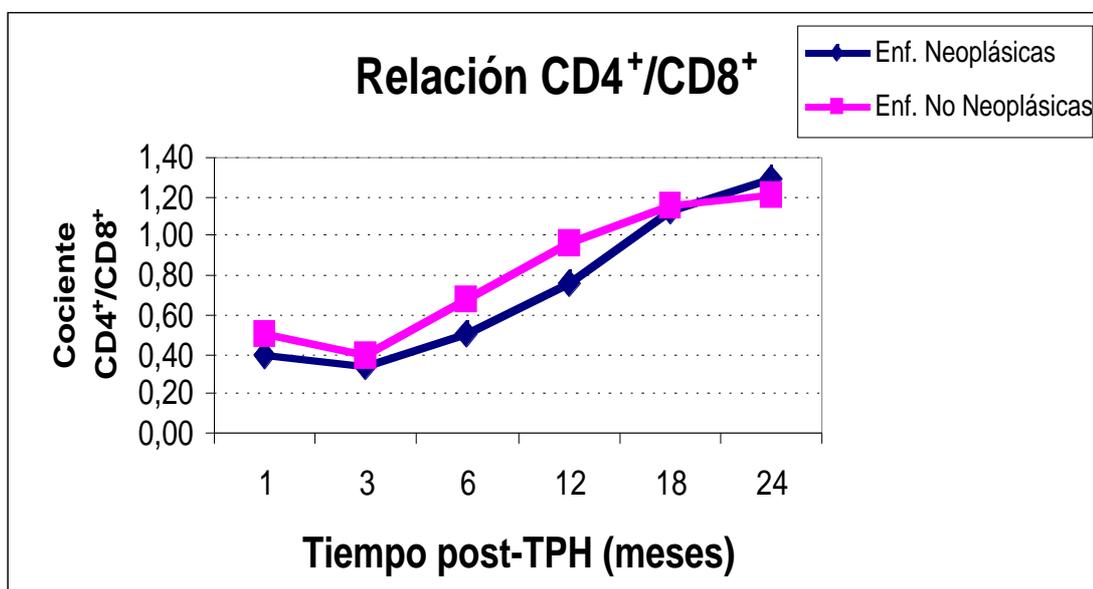


Gráfico 33. Cociente CD4⁺/CD8⁺ en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio

f) Linfocitos B CD19⁺:

En la tabla 34 se presentan los valores de los linfocitos B CD19⁺ en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Se observa un bajo número hasta los tres meses, pero a partir del sexto mes hay un incremento en este valor, alcanzando valores normales a partir de los 12 meses post-TPH, con niveles por encima de los 200linfocitos/ μ l, que siguió en elevación hasta los 24 meses. Existe un leve aumento del número de linfocitos T CD19⁺ en los niños con diagnóstico de enfermedades neoplásicas respecto a las no neoplásicas, a partir de los 12 meses (Gráfico 34) pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 34. Linfocitos B CD19⁺ × Diagnóstico

Linfocitos B CD19 ⁺	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
Diagnóstico	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	0	16	27	20	188	19	622	18	719	18	727
Enf. No Neoplásicas	10	13	13	11	12	188	13	316	13	605	11	701

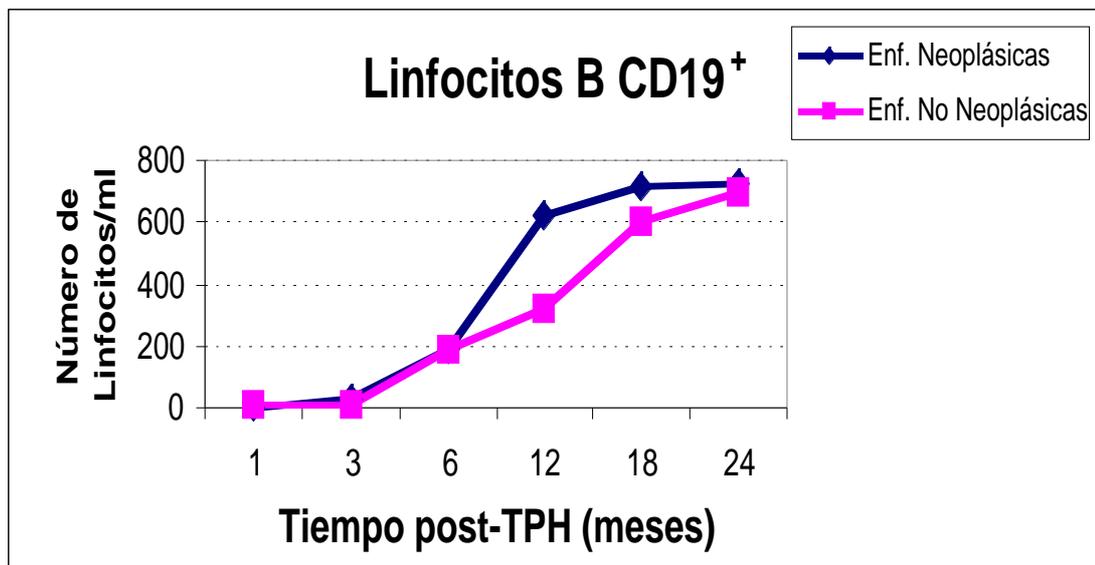


Gráfico 34. Valores de Linfocitos B CD19⁺ en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

g) Células Natural Killer (NK):

En la tabla 35 se presentan los valores de las células NK en los TPH alogénicos según el diagnóstico. Fueron alcanzados valores normales ya a partir del mes post-TPH, con valores por encima de las 90 células/ μ l. Se observa un aumento del número de células NK en los niños con diagnóstico de enfermedades no neoplásicas respecto a las neoplásicas, a lo largo del tiempo (Gráfico 35) siendo las diferencias estadísticamente significativas a los 18 y 24 meses.

Tabla 35. Células NK \times Diagnóstico

Células NK	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses*		24 meses*	
P									p < 0,04		p < 0,05	
Diagnóstico	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Enf. Neoplásicas	13	179	16	334	20	247	19	228	18	294	18	232
Enf. No Neoplásicas	10	260	12	390	12	422	13	343	13	441	11	376

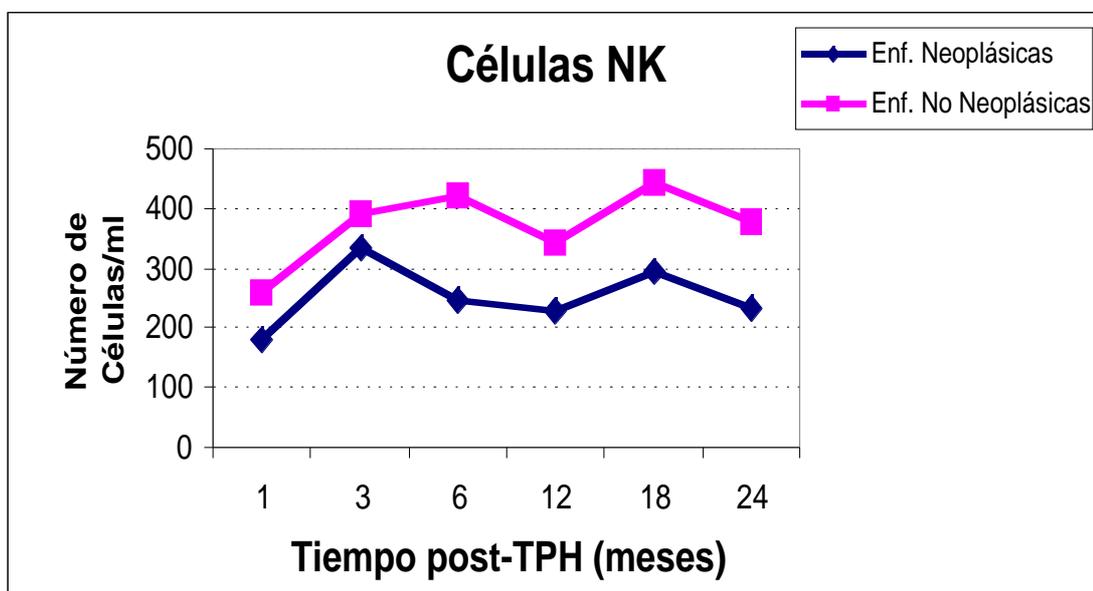


Gráfico 35. Valores de las Células NK en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

4.4.2. Función Linfocitaria T –

La función linfocitaria T está representada en las tablas 36 - y 36 - para cada tipo de diagnóstico en los trasplantes alogénicos. Se observa que la respuesta tras estimulación fue en su mayoría de parcial (P) a normal (N) a partir del primer mes post-TPH en los dos grupos de pacientes. Hubo un predominio de la respuesta normal, con una mejor recuperación funcional, en los pacientes con diagnóstico de enfermedades neoplásicas en los meses 3, 6 y 18. En los pacientes con enfermedades no neoplásicas hubo un predominio de la respuesta normal en los meses 12 y 24 (Gráfico 36) pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 36 - I. Función Linfocitaria T (respuesta a PHA y OKT3) × Diagnóstico

Función Linfocitaria	1 mes			3 meses			6 meses		
	Aus.	Parc.	Norm.	Aus.	Parc.	Norm.	Aus.	Parc.	Norm.
Enf. Neoplásicas n	1	3	9		2	14		1	18
%	7,7	23,1	69,2		12,5	87,5		5,3	94,7
Enf. No Neoplásicas n	2	1	4	1	2	9		2	9
%	28,6	14,3	57,1	8,3	16,7	75,0		18,2	81,8

Tabla 36 - II. Función Linfocitaria T (respuesta a PHA y OKT3) × Diagnóstico

Función Linfocitaria	12 meses			18 meses			24 meses		
	Aus.	Parc.	Norm.	Aus.	Parc.	Norm.	Aus.	Parc.	Norm.
Enf. Neoplásicas n		4	15		3	15		4	13
%		21,1	78,9		16,7	83,3		23,5	76,5
Enf. No Neoplásicas n		2	9	1	2	7		1	8
%		18,2	81,8	10,0	20,0	70,0		11,1	88,9

Gráfico 36. Estudio de la Función Linfocitaria T tras estimulación con PHA y OKT3 en los trasplantes alogénicos en relación al diagnóstico y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función del porcentaje de respuesta (A, P, N) para cada uno de los tipos de enfermedades.

Gráfico 36

4.5. RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA EN RELACIÓN A LA EICH Y EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR UTILIZADO

Entre los 33 niños que realizaron TPH alogénico, 28 desarrollaron EICH aguda, siendo 13 (46,4%) en el grado I; 10 (35,7%) en el grado II y 5 (17,9%) en el grado III. En relación a la EICH crónica, 15 niños la desarrollaron, 6 (40%) en la forma localizada y 9 (60%) en la forma extensa.

El tratamiento inmunosupresor utilizado en la EICHa en los 28 pacientes fue el siguiente: en 21 (77,8%) se administró solo metilprednisolona, (régimen 1); metilprednisolona + ciclosporina se administró a 2 niños (7,4%), (régimen 2); se administró metilprednisolona + ciclosporina + anti-IL-2R (anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL- 2) a 1 niño (3,7%), (régimen 3) y 3 niños (11,1%) recibieron metilprednisolona + azatioprina + talidomida o metilprednisolona + anti IL-2R, (régimen 4). El régimen de inmunosupresión fue más intensivo en los grados superiores de EICHa (Gráfico 37). De los 13 niños que desarrollaron EICHa grado I, en uno no fue necesario ningún tipo de tratamiento, en 11 (91,7%) se administró el régimen 1 y en 1 (8,3%) se administró el régimen 2. De los 10 niños que la desarrollaron en grado II, en 9 (90%) se administró el régimen 1 y en 1 (10%) se administró el régimen 2. De los 5 niños que desarrollaron grado III, en 1 (20%) se administró el régimen 1, en otro (20%) fue administrado el régimen 3 y en 3 niños (60%) el régimen 4 (Tabla 37).

Tabla 37. EICHa × Tratamiento Inmunosupresor.

E I C H A			Tratamiento Inmunosupresor				Total
	Grados		Régimen 1	Régimen 2	Régimen 3	Régimen 4	
A g u d a	1	n	11	1	0	0	12
		%	91,7	8,3	0	0	44,4
	2	n	9	1	0	0	10
		%	90,0	10,0	0	0	37,0
	3	n	1	0	1	3	5
		%	20,0	0	20,0	60,0	18,5
Total	n	21	2	1	3	27	
	%	77,8	7,4	3,7	11,1	100,0	

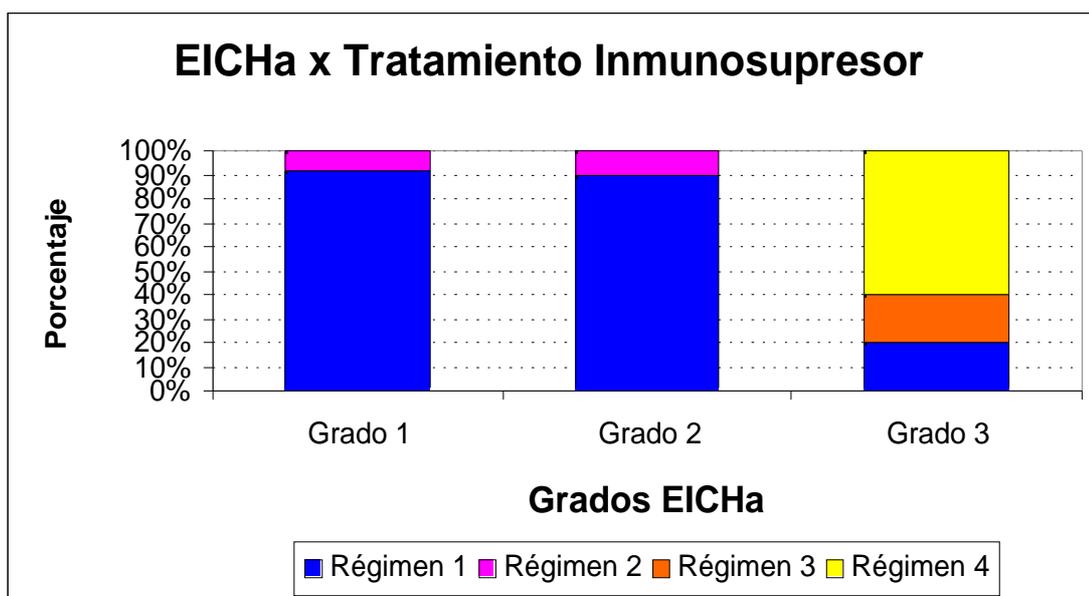


Gráfico 37. Tratamiento Inmunosupresor utilizado en la EICHa.

En la EICHa grado I, los linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y la subpoblación linfocitaria B CD19⁺, alcanzaron valores normales a partir de los 6 meses post-TPH y los linfocitos T CD8⁺ y las células NK, a partir del mes post-TPH. Los linfocitos T tuvieron una función normal ya a partir del mes post-TPH.

En relación a la EICHa grado II, la recuperación fue similar a la EICHa grado I, con un mayor retraso en los linfocitos B CD19⁺, que solo tuvieron valores normales a los 12 meses del TPH.

En la EICHa grado III, los linfocitos T CD3⁺ alcanzaron valores normales a los 12 meses y los linfocitos T CD8⁺ y linfocitos B CD19⁺ a los 6 meses. Los linfocitos T CD4⁺ y las células NK alcanzaron valores normales a los 6 y 1 mes post-TPH respectivamente. Por el contrario, la función linfocitaria T no fue normal hasta los seis meses post-TPH.

El tratamiento inmunosupresor utilizado en la EICHc no siguió protocolos uniformizados. Cada niño recibía su pauta de inmunosupresión según las manifestaciones clínicas presentadas.

Respecto a la EICHc localizada, las subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺ y B CD19⁺ alcanzaron valores normales a los 12 meses post-TPH y la subpoblación T CD8⁺, a los 3 meses. Los linfocitos T CD3⁺ totales, las células NK y la función linfocitaria T presentaron valores normales en todo el estudio.

En la EICHc extensa, los linfocitos T CD3⁺ y CD4⁺ y los linfocitos B CD19⁺ alcanzaron valores normales a partir de los 12 meses post-TPH. Los linfocitos T CD8⁺ tuvieron valores casi normales ya a partir del mes post-TPH y las células NK y la función linfocitaria T fueron normales en todo el estudio.

4.6. GRADO DE RESPUESTA A LAS VACUNAS (TÉTANOS Y HEPATITIS) RESPECTO A LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINA G

4.6.1. Tétanos –

En la tabla 38 se presentan las cifras de la IgG respecto a los grados de respuesta de los niños inmunizados con la vacuna del tétanos. Se observa que los valores de IgG son mayores en los pacientes que tuvieron una buena respuesta en relación aquellos que tuvieron una respuesta parcial (Gráfico 38). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 38. Inmunoglobulina G × Vacuna del Tétanos

Anticuerpos Anti-Tétanos	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
Respuesta Parcial	1	620	4	701	5	557	5	543	4	703	4	680
Buena Respuesta	24	1050	35	827	38	594	38	662	40	827	41	907

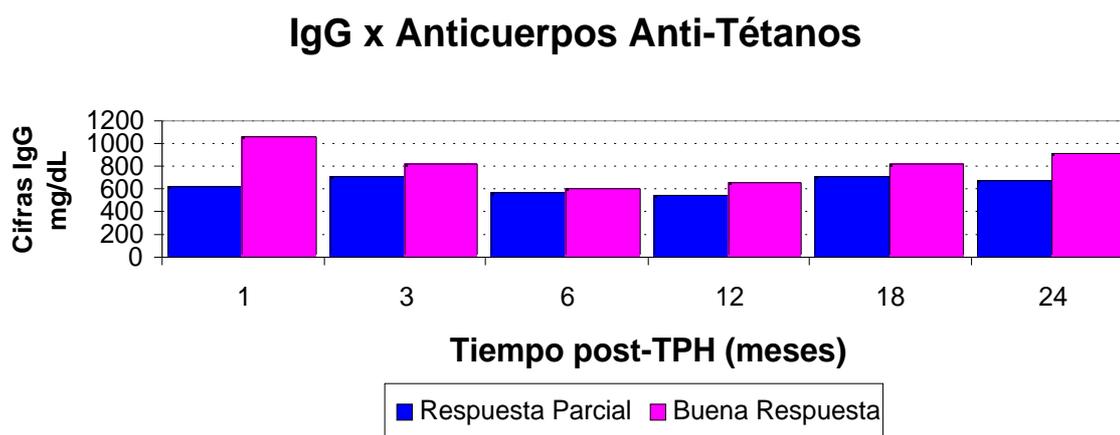


Gráfico 38. Cifras de IgG en relación con la respuesta a la vacuna del Tétanos y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio.

4.6.2. Hepatitis –

En la tabla 39 se presentan las cifras de la IgG respecto a los grados de respuesta de los niños inmunizados con la vacuna de la Hepatitis B. Se observa que los valores de IgG son mayores en los pacientes que tuvieron respuesta en relación aquellos que no la tuvieron en los meses 1, 3 y 6. A partir de entonces estos valores fueron similares (Gráfico 39). Se observaron diferencias estadísticamente significativas a los 1 y 3 meses, si bien en estos meses se administró GGev, por lo que no es valorable.

Tabla 39. Inmunoglobulina G x Vacuna de la Hepatitis B

Ac Anti-Hepatitis B	1 mes#		3 meses#		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md	n	md
No Respuesta	10	880	17	796	18	527	22	660	21	830	20	959
Respuesta	15	1140	22	911	25	618	21	642	23	778	25	889

IgG x Anticuerpos Anti-Hepatitis B

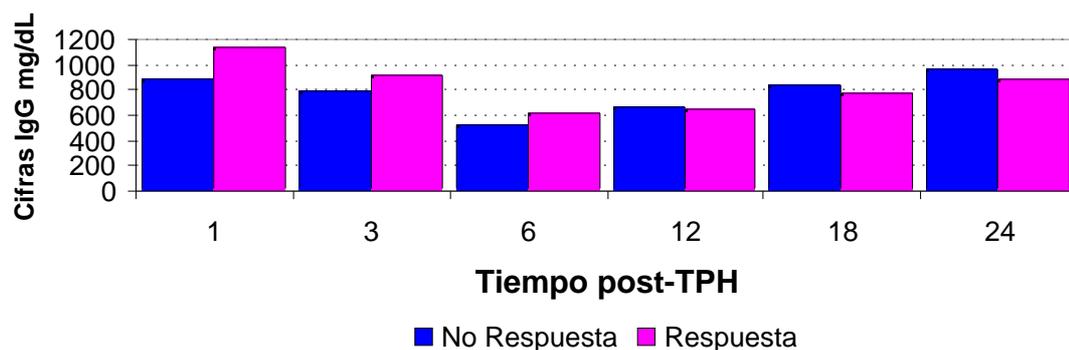


Gráfico 39. Cifras de IgG en relación con la respuesta a la vacuna de la Hepatitis B y al tiempo transcurrido después del trasplante. Resultados expresados en función de la mediana (md) en cada punto del estudio. # tratamiento con GGev en TPH alogénicos.

5. DISCUSIÓN

El empleo del TPH como tratamiento de elección en un número creciente de enfermedades hematológicas malignas y no malignas, oncológicas, inmunodeficiencias congénitas y algunos errores metabólicos congénitos, es un hecho constatado a lo largo de los últimos años.

Los tratamientos quimioterápicos y inmunosupresores previos al TPH y en los primeros meses post-TPH, originan una importante alteración del sistema inmune^{61, 150} que puede estar presente por un largo periodo de tiempo^{39, 151}, lo cual conlleva una serie de riesgos, muy especialmente procesos infecciosos.

Existen varios factores que pueden interferir en la reconstitución inmunológica post-TPH, y podríamos citar como los más importantes, la fuente de progenitores hematopoyéticos infundidos (MO, SCU o SP), el tipo de trasplante (autólogo o alogénico), la situación clínica del paciente antes del trasplante, su enfermedad de base (neoplásica o no neoplásica), la quimioterapia previa, el tratamiento de condicionamiento utilizado, el método usado para la profilaxis contra la EICH, y el desarrollo o no de la EICH (aguda o crónica) y su terapia^{54, 71, 75, 152, 153}. Otros factores incluyen el número de células trasplantadas y las manipulaciones efectuadas en el producto infundido (deplección de células T, selección positiva de células CD34 y otros tratamientos “ex-vivo”), que no se comentan en nuestro trabajo.

La reconstitución inmunológica post-TPH en la población infantil hasta el momento ha sido poco estudiada¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ si se compara con los estudios realizados en la población adulta^{78, 150, 153, 158, 159, 160, 161}.

En el presente estudio se evaluó de una forma secuencial la reconstitución inmunológica en una serie de 61 niños en un periodo de 24 meses, analizando las distintas subpoblaciones linfocitarias T, B y NK, la función linfocitaria T y función linfocitaria B, con el objetivo de analizar que factores son determinantes en la cinética de recuperación linfocitaria T y B.

La mayoría de los datos publicados sobre la reconstitución inmunológica en niños se basan en comparaciones individualizadas, de acuerdo con las características del grupo estudiado (según la fuente de los progenitores, según el tipo de trasplante, etc.). Nuestro estudio se ha realizado sobre todos los niños trasplantados en un periodo determinado de tiempo, por lo que se discutirán cada grupo en particular haciendo las comparaciones pertinentes a cada parámetro estudiado.

- Reconstitución Inmunológica en relación con la fuente de Progenitores Hematopoyéticos (MO, SCU y SP)

En nuestro estudio, el número de linfocitos totales y linfocitos CD3⁺ alcanzó valores normales, a partir del mes post-TPH cuando se utilizó como fuente de PH la SCU y la SP, y a partir de los 3 meses para los linfocitos totales y de los 6 meses para los linfocitos CD3⁺ ¹⁶² cuando se utilizó la MO. Estas diferencias pueden ser debidas al hecho de que la SCU y la SP contienen una mayor proporción de células progenitoras más diferenciadas en comparación con la MO ¹⁶²⁻¹⁶⁸. Las peculiaridades fenotípicas y funcionales de las “stem cells” y linfocitos inmaduros en la SCU pueden motivar el rápido aumento en el número de linfocitos ^{157, 161, 169, 170}. Cuando se hizo tratamiento en las células a infundir (selección positiva de células CD34⁺, depleción de linfocitos T) incluso en hermanos HLA idénticos ¹⁷¹ o se utilizaron donantes no emparentados o parcialmente compatibles, la recuperación de los linfocitos totales y CD3⁺ en los trasplantes de SP ¹⁵³ así como en los de MO ^{154, 155} y SCU ¹⁵⁶ fue más lenta.

Los **linfocitos CD4⁺**, que tienen funciones inductoras/colaboradoras para las células B y para las células T efectoras (CD8⁺), se hallaron en número reducido en el periodo inmediato post-TPH (los primeros tres meses). La recuperación de estos linfocitos es lenta ^{151, 154, 156, 158, 172} tanto en números absolutos como en respecto al total de linfocitos ^{155, 173, 174} y en algunos estudios esto es independiente del tipo de fuente utilizada ¹⁵⁰ o de la manipulación de las células infundidas ¹⁵³. *En nuestra serie se alcanzaron los límites de normalidad a partir de los tres meses para la SCU y a*

los seis meses para el total de las tres fuentes. En otras series pediátricas se describen la recuperación de los linfocitos CD4⁺ a los 2 meses post-ATPSP¹⁷⁵ (auto-trasplante de precursores de sangre periférica), a los 12 meses post TPH con SCU de donantes no emparentados¹⁷⁶ y a los dos o tres años post-TMO deplecionado de células T procedentes de donantes no emparentados o parcialmente compatibles¹⁵⁵. Este periodo de recuperación es más lento en los trasplantes de MO, como se describe en los estudios en adultos, entre los 12^{150, 162, 177, 178} y los 18 meses¹⁷² cuando se comparó con los trasplantes de SP^{161, 162, 164, 167} y SCU, al igual que ocurre en las otras subpoblaciones linfocitarias. Algunos autores han comprobado que cuando se depleciona en linfocitos T el producto infundido, tanto en pacientes con donantes no emparentados o parcialmente compatibles¹⁵⁵ así como en pacientes con donantes hermanos HLA idénticos¹⁷¹, el periodo de recuperación es más prolongado.

Se resalta la importancia de la recuperación de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores, por la síntesis de citocinas y en colaboración con los linfocitos B, por lo que se podría deducir que el SCU es mejor para la reconstitución inmunológica.

Por el contrario, los **linfocitos CD8⁺**, que tienen funciones citotóxicas y son células claves en los mecanismos de respuesta antiinfecciosa en el periodo inmediato postrasplante, tuvieron una recuperación más rápida. En algunos estudios, ya desde la primera semana postrasplante se observaron valores normales^{154, 158, 161, 175}. La infusión de PH de SP parece favorecer esta recuperación más temprana de poblaciones citotóxicas¹⁵⁰, algunos autores relatan valores por encima del rango normal desde el primer mes post-TMO, alcanzando valores normales a los 18 meses¹⁷². En relación con los receptores de MO no tratada, el número de células CD8⁺ puede rápidamente normalizarse y permanecer elevado por un largo periodo post-TPH¹⁷⁴. En aquellos que recibieron trasplantes con células T deplecionadas, si bien se ha descrito que la recuperación puede ser rápida¹⁷⁹ esto no es lo habitual, sugiriendo que las células T maduras del donante deben contribuir a esta elevación de células CD8⁺^{154, 180, 181}. En algunos estudios en pacientes con EICH crónica, la proporción de linfocitos CD8⁺ en SP está aumentada y se ha sugerido que estas células podrían tener un papel en la patogenéesis de la EICH por una asociación

temporal¹⁸² y por estudios histopatológicos²⁰⁵. En otros estudios en niños trasplantados con MO deplecionada de células T de donantes no emparentados o parcialmente compatibles, no se observó un aumento de linfocitos CD8⁺ en el periodo inmediato post-TPH, retrasándose la recuperación a los 18 meses post-TPH¹⁵⁵; en este estudio, cuando se hizo la comparación entre número absoluto y porcentaje, se observó que la recuperación fue más lenta en números absolutos y aun dentro del rango normal en porcentaje; por ese motivo nuestro estudio está basado en valores absolutos de las subpoblaciones linfocitarias. *En nuestro estudio, así como en otros*^{153, 162, 171} *tuvimos valores normales de CD8⁺ a partir del primer mes post-TPH para las tres fuentes, con un mayor número cuando se utilizaron PH de SCU y SP.* En estudios en los trasplantes alogénicos de PH de SP, sea con selección positiva de las células CD34⁺ o con depleción de células T o con células no manipuladas, la recuperación de células CD8⁺ no se afectó, alcanzando niveles normales al mes post-TPH¹⁵³, hallazgos similares a los encontrados en los trasplantes alogénicos de MO^{72, 171, 177}.

Dado que los linfocitos CD4⁺ se encontraron en número reducido y los linfocitos CD8⁺ en número aumentado post-TPH, el **cociente CD4⁺/CD8⁺** aparece invertido a lo largo del primer año en la mayoría de las series estudiadas, independientemente de la fuente de PH infundida^{150, 154, 155, 157, 172, 177, 183, 184}; sólo en un estudio no se evidenció esta inversión¹⁵⁶. *En nuestra muestra el cociente solo empezó a normalizarse a partir de los 12 meses post-TPH, aunque los valores en los pacientes que recibieron PH de SP fueron algo inferiores a los de los receptores de SCU y MO.*

La subpoblación de **linfocitos B CD19⁺** presentó una reconstitución lenta en el periodo temprano post-TPH, siguiendo una progresión entre los 3 y 6 meses¹⁷¹. *En nuestra muestra, se alcanzaron valores normales a partir de los 3 meses para la SP y a partir de los 6 meses para la SCU y MO, con valores más elevados en los receptores de SCU coincidiendo con otras series de niños estudiados*^{176, 185, 186}. En otros estudios en que se infundió SCU de donantes no emparentados se observó una recuperación más rápida, a los tres meses post-TPH en niños^{156, 157, 183} y adultos¹⁸⁷.

La recuperación del número de células CD19⁺ con la infusión de MO en adultos fue más lenta según atestiguan varios trabajos, llegando a los 8 meses o más^{152, 154, 155, 184, 188}. En algunos estudios no se halló correlación entre la regeneración linfóide B y la fuente de PH infundido^{150, 152, 158, 161, 189} y en relación con la manipulación de las células infundidas¹⁵³. La reconstitución numérica de células B no parece afectarse significativamente por la eliminación de las células B del producto infundido mediante anticuerpos monoclonales anti-células B¹⁸⁸.

Las **células NK** o citotóxicas naturales, (CD3⁻CD16⁺/CD56⁺), tienen un importante papel en el periodo post-TPH en la respuesta inicial frente a las infecciones virales⁹⁰ y pueden tener un papel regulador en la linfohematopoyesis¹⁵⁵. Son capaces de destruir algunas células tumorales, sobretodo las de origen hematopoyético, y se ha descrito que estas células incluso pueden actuar sobre el control de la enfermedad mínima residual¹⁹⁰ y con papel facilitador del implante del injerto a través de la inhibición de subpoblaciones T citotóxicas¹⁹¹. Algunos investigadores sugieren que las células NK también pueden además tener función de efectoras de EICH¹⁹². Su reconstitución ocurre de forma muy temprana^{158, 177}, a partir de la primera semana post-TPH^{191, 193, 194}, con una recuperación en el primer momento más rápida cuando se infunde SP, alcanzando niveles normales ya a partir de las 2 semanas en los trasplantes de SP¹⁵⁰ y al mes, en los de SCU¹⁵³ y de MO¹⁷¹. Otros autores no han observado diferencias en relación con el empleo de SP o MO^{158, 161, 162, 166, 195}. *En nuestra serie, a partir del mes post-TPH el número de células NK alcanzó niveles normales para las tres fuentes, observándose una reconstitución más rápida cuando se utilizó la SCU y SP.* En otras series de niños se ha observado un número absoluto normal de células NK ya en el curso de los primeros tres meses post-TPH de MO¹⁵⁵ y SCU^{156, 176}, permaneciendo normal a lo largo de todo el estudio, siendo el seguimiento más largo a los 72 meses post-TPH¹⁵⁵. En algunos estudios se observó la elevación del número de células entre el segundo y tercer meses postrasplante de MO, estabilizándose a lo largo de los 18 meses posteriormente¹⁷². El significado funcional de este aumento en los pacientes que recibieron un trasplante de MO se ha asociado a un incremento de su actividad citotóxica, sobretodo en aquellas células NK con fenotipo CD8^{+174, 196}.

- Reconstitución Inmunológica en los diferentes Tipos de Trasplantes (Autólogo y Alogénico)

A pesar de que existan semejanzas en la reconstitución inmunológica después de un TPH alogénico^{61, 177} y autólogo^{149, 162}, los dos tipos de trasplantes presentan particularidades y su utilización depende de las condiciones del paciente así como de las características de su enfermedad¹⁵¹.

El **trasplante alogénico** supone el desarrollo, en la mayoría de casos, de la EICH y la utilización de terapia inmunosupresiva para su profilaxis y control, la cual interfiere en las etapas más precoces de la reconstitución inmunológica¹⁶². Aunque exista identidad en el sistema HLA, la aparición de la EICH complica la evolución de un 40% de estos enfermos¹⁵¹ y por sí misma es responsable de múltiples alteraciones inmunológicas no estrictamente debidas a la reconstitución linfocítica post-TPH^{197, 198, 199}. Los TPH alogénicos presentan la ventaja de inducir la reacción del injerto contra la leucemia¹⁹⁸, que es beneficiosa para prevenir recidivas¹⁵¹.

El **trasplante autólogo**, por el contrario, no ocasiona EICH ni el empleo de fármacos inmunosupresores, presentando una más rápida reconstitución inmune post-TPH^{161, 162, 200-202}. Sin embargo, la ausencia de reacción del injerto contra la leucemia, predispone a un riesgo mayor de recidiva tumoral¹⁵¹.

De acuerdo con estos datos, en *nuestro estudio los linfocitos totales alcanzaron cifras moderadamente superiores en los pacientes que recibieron un TPH autólogo y las subpoblaciones linfocitarias T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ y los linfocitos B CD19⁺ tuvieron una reconstitución más rápida antes de los 18 meses post-TPH. También hubo una mejor recuperación funcional T en los pacientes que recibieron un trasplante autólogo.*

No se observó ninguna diferencia en la reconstitución de las subpoblaciones T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ entre ambos tipos de trasplantes si se excluye aquellos pacientes que han recibido un TPH de MO alogénico y que presentaron en el curso

del estudio una EICH aguda o crónica (grados II-IV)^{151, 172}. Asimismo, tampoco se evidenció diferencias en el estudio funcional a través de la respuesta proliferativa de los linfocitos T al estímulo de PHA entre ambos tipos de trasplante. Por el contrario, la recuperación del porcentaje normal de los linfocitos B fue más rápida en los pacientes que recibieron un TPH de MO autólogo y las células NK estuvieron elevadas durante el primer año postrasplante, y aunque en ambos tipos de trasplantes se normalizó su porcentaje a los 12 meses, el patrón de reconstitución fue diferente¹⁵¹.

Las células NK se mantuvieron en números normales a lo largo del estudio en los dos tipos de trasplante, siendo el número discretamente elevado en los pacientes que recibieron un TPH alogénico entre los 3 y los 12 meses post-TPH. Estos datos coinciden con los de un estudio previo¹⁶¹.

En conjunto y siempre que la enfermedad de base (tumoral principalmente) lo permite, el TPH autólogo consigue una recuperación algo más rápida y con menos complicaciones que el TPH alogénico compatible.

- Reconstitución Inmunológica en los receptores de Trasplantes Alogénicos según el diagnóstico (Enfermedades Neoplásicas y no Neoplásicas)

Las **enfermedades neoplásicas** (hematológicas y tumores sólidos) ocasionan una mayor afectación del paciente en el periodo previo al trasplante por las características de la propia enfermedad, y del tratamiento quimio y/o radioterápico empleado previamente al trasplante.

Las **enfermedades no neoplásicas** (hemopatías congénitas, anemia aplásica severa e inmunodeficiencias) también afectan el estado general del paciente según el tipo de enfermedad (anemia, leucopenia, infecciones de repetición, como en las IDP). La no utilización de tratamientos quimio y/o radioterápicos intensivos previos, en teoría deben tener un efecto menos inmunosupresor.

En nuestra muestra se encontraron niveles ligeramente más elevados de linfocitos $CD3^+$ y $CD8^+$ a lo largo del estudio en los niños con enfermedades neoplásicas. Los linfocitos B $CD19^+$ se mantuvieron normales pero con un leve aumento a partir de los 12 meses en los receptores de TPH con enfermedades neoplásicas. Los linfocitos $CD4^+$ no mantuvieron un patrón regular a lo largo del estudio, y no se observaron diferencias significativas en los niños con diagnóstico de enfermedades neoplásicas respecto a las no neoplásicas.

Por el contrario, las células NK alcanzaron los niveles normales un poco más rápido en los niños con diagnóstico de enfermedades no neoplásicas, de los cuales la mayoría tenían el diagnóstico de Inmunodeficiencia Severa Combinada (IDSC) y presentan más frecuentemente EICH (ver ejemplo en la figura 3 del estudio por citometría de flujo). Este grupo de pacientes presenta una mayor variabilidad en la recuperación inmunológica y depende en parte del tipo de IDSC y los inmunosupresores utilizados en el control de la EICH. Dado el reducido número de estos pacientes no se pudo realizar análisis estadístico.

La función linfocitaria T evolucionó en su mayoría de parcial a normal a partir del primer mes post-TPH en los dos grupos de pacientes. Hubo un predominio de la respuesta normal, con una recuperación funcional discretamente mejor en los pacientes con diagnóstico de enfermedades neoplásicas en los primeros 6 meses.

Por lo tanto, el tipo de enfermedad no parece conllevar a diferencias notables en la reconstitución inmunológica post-TPH en los niños estudiados.

En la gran mayoría de las series estudiadas las enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, fueron evaluadas en conjunto^{151, 155, 156, 171, 172} o por separado^{150, 153, 158, 161}. El único estudio en que se comparó la reconstitución inmunológica en relación al tipo de enfermedad presentada no se encontró diferencias significativas¹⁷².

- Reconstitución Inmunológica según la severidad de la Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH) Aguda y Crónica y el Tratamiento Inmunosupresor Utilizado

Los **grados II y III** de la **EICH Aguda** y en mayor proporción la **EICH Crónica**, retrasan la velocidad de la reconstitución inmunológica, por una probable destrucción física del sistema inmune^{177, 197}. Los inmunosupresores utilizados para prevenir o tratar la EICH y su propia presencia impiden la reconstitución inmunológica^{54, 75, 152, 155, 173, 177}.

La **EICH Aguda (EICHa)** estuvo presente en los grados **I, II y III** en *nuestra serie* de niños estudiados. Cuando más alto el grado de EICHa más intensivo el tratamiento inmunosupresor utilizado, hecho que puede repercutir en la reconstitución inmunológica, como han demostrado otros estudios^{177, 188}.

*En nuestra serie, los niños que desarrollaron la **EICHa grado I**, tuvieron una recuperación similar a la serie que no desarrolló la EICH. La recuperación de la subpoblación linfocitaria B CD19⁺ fue más lenta que la serie sin EICH. Los linfocitos T tuvieron una función normal luego después del TPH.*

*Aquellos que desarrollaron la **EICHa grado II**, presentaron una recuperación similar a la EICHa grado I, con un mayor retraso en la recuperación de los linfocitos B CD19⁺.*

*Los niños que desarrollaron la **EICHa grado III**, presentaron una recuperación aún más lenta tanto en las subpoblaciones linfocitarias T como en la B. Las células NK también tardaron un poco más en recuperar, así como la función linfocitaria T.*

Por lo tanto, en los grados inferiores de **EICHa (I-II)**, donde la inmunosupresión fue menos intensiva, con la administración de pocos fármacos (uno o dos), se observó una menor o casi ninguna influencia de la EICH en la

reconstitución inmunológica. Por el contrario, en los grados superiores de **EICHa** (>III), se observó una tendencia a una recuperación más lenta, lo que indica que el desarrollo de los grados superiores de **EICHa** conlleva a un retraso en la reconstitución inmunológica, sobretodo en la subpoblación linfocitaria B CD19⁺. A pesar de haber un reducido número de pacientes que desarrollaron EICH en nuestra muestra, es posible observar la referida tendencia.

La **EICH Crónica (EICHc) localizada y extensa** implica en un mayor retraso en la reconstitución inmune. El tratamiento inmunosupresor fue utilizado por un periodo prolongado de tiempo en la mayoría de los pacientes que la desarrollaron, hasta conseguir la remisión de los síntomas, en algunos pacientes más de 24 meses (periodo de seguimiento de los pacientes en este estudio), lo que conllevó a una lenta reconstitución inmunológica.

*En nuestra serie, el desarrollo de la **EICHc localizada**, supuso un retraso en la recuperación de las subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺. Los linfocitos T CD3⁺ totales, las células NK y la función linfocitaria T no fueron afectados en nuestra muestra en cuanto a la reconstitución inmunológica.*

*Aquellos niños que desarrollaron la **EICHc extensa** tuvieron un mayor retraso en alcanzar los valores normales para la mayoría de las subpoblaciones linfocitarias. Las células NK y la función linfocitaria T no presentaron cambios debido a la **EICHc** cuando comparamos con aquella serie de niños que no presentaron EICH.*

Cuando analizamos la **EICHc** en conjunto (**localizada y extensa**), los valores observados no difirieron de aquellos observados en la **EICHc forma extensa**.

Por lo tanto en la **EICHc**, debido a la utilización de varios tipos de fármacos inmunosupresores por largos periodos de tiempo, la reconstitución inmunológica es más retrasada, *como demuestra nuestra serie de niños*, respecto a los que no la presentan.

- Reconstitución Inmunológica según el grado de respuesta a las vacunas del Tétanos y Hepatitis en relación con los niveles de Inmunoglobulinas G

La inmunización de los receptores de un TPH es una práctica habitual y es necesario conocer la respuesta a las distintas vacunas. Hemos escogido dos de ellas, la del tétanos y la de la hepatitis B.

El **Tétanos**, a pesar de ser una infección que no presenta mayor incidencia en los pacientes trasplantados que en la población general, sin embargo, es una infección prevenible por vacunación y la existencia de vacunas muy eficaces y seguras justifican su administración a estos pacientes⁹⁶. Incluso en los pacientes con EICHc su aplicación está indicada y se obtienen resultados muy buenos, aunque se requieren varias dosis para obtenerse respuesta^{94, 128, 203}. Su administración en la población infantil es más importante, sobretodo en los niños en periodo escolar, que se exponen a mayores riesgos.

Los **anticuerpos anti-tétanos** son indetectables en la mayoría de casos tras el TPH autólogo o alogénico^{128, 203, 204}. Cerca de 50% de los pacientes seropositivos pretrasplante pierden sus anticuerpos al año del TPH²⁰⁴. La deficiente situación inmunitaria pretrasplante de muchos de los pacientes sumado a la negativización de los anticuerpos, hace que la mayoría de los pacientes no estén protegidos frente al tétanos en el periodo post-TPH. El hecho de que en España el tétanos sigue teniendo una incidencia considerable, una de las más altas de Europa⁹⁴, con un porcentaje reducido de individuos inmunes entre la población adulta, con sólo un 20% a 30% de los adultos con anticuerpos adecuados⁹⁴, refuerza la utilización de esta vacuna.

La **Hepatitis B** ya es considerada una infección más grave y/o frecuente en los pacientes receptores de un TPH que en la población general, habiéndose comprobado respuesta vacunal satisfactoria⁹⁶. Los receptores de un TPH, en general, al tener que pasar por una fase prolongada de pancitopenia, reciben un volumen importante de hemoderivados, sobretodo concentrados de hematíes y plaquetas. A pesar de los estudios serológicos de cribado que se realizan en los hemoderivados, el

riesgo de infección transfusional por el virus de la hepatitis B ha sido disminuido pero no eliminado. Esta razón, sumada al hecho de que España es un país de endemicidad intermedia de hepatitis B, hace necesario proteger a los pacientes mediante inmunización. Además, las vacunas disponibles son de ingeniería genética y tienen un excelente perfil de seguridad. La presencia de EICH no contraindica la vacunación⁹⁶.

La **inmunidad humoral** se reconstituye lentamente tras el TPH, sobre todo en aquellos pacientes con EICH, por lo que la respuesta inmunitaria frente a las vacunas puede disminuir o incluso ser nula. Las subclases IgG₂ y IgG₄ son las que más tardan en alcanzar concentraciones normales, especialmente en niños menores de 2 años. Cuanto más tarde administremos una vacuna en el periodo post-TPH mejor respuesta podemos obtener, por la existencia de mayores posibilidades de tener un sistema inmunológico ya reconstituido⁹⁶. Por esto, *en nuestro estudio los niveles de anticuerpos fueron medidos un año post-TPH y a partir de un mes post-vacuna.*

No existen aún calendarios de vacunación ampliamente consensuados en niños después de un TPH, si bien la menor incidencia de EICHc en el niño que en el adulto puede permitir la aplicación de vacunas regladas en un porcentaje mayor en los pacientes pediátricos⁹⁴. Pero hay pautas de vacunación consensuadas para todos los pacientes que se exponen en el apartado de material y métodos y recomendaciones del Grupo Europeo de Trasplante de Médula Ósea.

Generalmente, en el TPH se consigue una correcta respuesta a las vacunas a través de la administración de dosis repetidas de las mismas⁹⁶ para aumentar el porcentaje de células de memoria para cada antígeno vacunal. Por otro lado, puede darse la transferencia de inmunidad del donante al receptor, cuando el donante tenga su calendario vacunal actualizado previamente a la donación de PH. Los linfocitos de memoria son capaces de inducir en el receptor la producción de anticuerpos a títulos protectores de una forma más precoz en el postrasplante. Está demostrado esta

transferencia para el virus de la **hepatitis B**, para el **tétanos** y también para el *H. influenzae*⁹⁶, sí bien que en nuestro grupo no se determinó esta respuesta.

*En nuestra serie, los niveles de **IgG** alcanzaron valores normales (>600mg/dL) a partir de los 12 meses en los TPH autólogos, que no tuvieron la influencia de la administración de inmunoglobulina i.v. como fue el caso de los TPH alogénicos.*

*En el grado de respuesta a la **vacuna anti-tétanos** respecto a los niveles de **IgG**, se observó que los valores de IgG fueron mayores en los pacientes que tuvieron una buena respuesta en relación aquellos que tuvieron una respuesta parcial a la vacuna, a igual de la respuesta a la **vacuna anti-hepatitis B**. Todos los niños tuvieron cierto grado de respuesta a la vacuna antitetánica, en general por encima del 80%, sin embargo apenas una parte tuvo respuesta a la vacuna de la hepatitis B, por encima del 50%.*

Algunos estudios, la mayoría en adultos, demuestran que la vacunación después del TPH se asocia a buenas tasas de seroconversión (70% a 100%) para la hepatitis B^{205, 206}, aunque un porcentaje importante de pacientes puede perder posteriormente los anticuerpos. Para el tétanos, también se encontraron buenas tasas de seroconversión en la población adulta (90% a 100%), siempre que se emplearon más de dos dosis de la vacuna¹²⁸.

El análisis de los niveles de anticuerpos naturales (ASTO) es un método sencillo y de gran valor orientativo. En el post-TPH aún no había sido estudiado hasta la actualidad por los grupos de trabajo del TPH. Su estudio tiene particular interés en la población pediátrica pues ha demostrado ser un buen parámetro en el estudio de la función linfocitaria B, y la capacidad de producción de anticuerpos. Se utilizan en todas las pautas de definición de inmunodeficiencia de la respuesta humoral. Otros anticuerpos naturales como las isohemaglutininas son IgM y sin valor en los estudios de reconstitución inmunológica en niños.

Los datos analizados en este trabajo sobre una población de niños trasplantados, de los que no hay mucha información en la literatura, pueden ser de gran utilidad en la modificación de protocolos existentes tanto inmunosupresores como inmunomoduladores (vacunas), por la obtención de unos mejores resultados tanto en la curación completa de las enfermedades tratadas, como en la reconstitución inmunológica necesaria para disminuir las complicaciones infecciosas tan frecuentes en esta modalidad terapéutica.

6. CONCLUSIONES

1. La completa reconstitución inmunológica de la subpoblación linfocitaria B CD19⁺ es **más lenta** que la de las subpoblaciones linfocitarias T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺. El cociente CD4⁺/CD8⁺ aparece **invertido** a lo largo del primer año del estudio por una reducción de los linfocitos T CD4⁺.

2. Las células citotóxicas naturales (NK) tienen una recuperación muy **temprana** tanto en relación a las fuentes utilizadas (MO, SCU y SP), como con los tipos de trasplante y la enfermedad de base.

3. La SCU y la SP son las fuentes de PH que presentan un patrón de reconstitución inmunológica en relación a las subpoblaciones linfocitarias más **rápido** respecto a MO.

4. Los grados superiores de EICH Aguda (> III) y la EICH Crónica conllevan a un nítido **retraso** en la reconstitución inmunológica post-TPH, debido a la utilización de fármacos inmunosupresores por largos periodos de tiempo.

5. El tipo de enfermedad de base del niño **no** parece conllevar a **diferencias significativas** en los hallazgos en la reconstitución inmunológica post-TPH.

6. La recuperación funcional de los linfocitos T no presenta diferencias estadísticamente significativas según los tipos de PH utilizados, ni por el tipo de trasplante empleado o por el tipo de enfermedad de base del niño, si bien la recuperación es **más lenta** en los receptores de trasplante de SCU y en los pacientes receptores de TPH alogénico.

7. La mayoría de los niños que tienen anticuerpos anti-tétanos pre-vacuna (vacunación de la infancia), tienen buena respuesta en anticuerpos post-vacuna. Cuando no se detectaron anticuerpos previos, la respuesta a la vacunación fue **buena** en la mayoría de los casos.

8. La **negativación** de los anticuerpos anti-hepatitis B ocurre en una mayor proporción que la de los anticuerpos anti-tétanos, y la respuesta post vacunación en conjunto fue menor en porcentaje que la anti-tétanos.

9. La producción de anticuerpos naturales medida por la determinación de los títulos de antiestreptolisina O (ASTO) en los niños mayores de 2 años, fue **mayor** en los niños que recibieron TPH de MO y de SP respecto a los que recibieron TPH de SCU y en los niños que recibieron TPH autólogo, respecto al alogénico.

En conjunto, la reconstitución inmunológica, observada a partir de un año post-TPH y tras vacunación, es más **variable** en relación a las fuentes de PH utilizadas (MO, SCU y SP) que según los tipos de trasplante (autólogo y alogénico) y la enfermedad de base del niño (neoplásica o no neoplásica).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Good RA. Early studies in transplantation biology: discovery of two separate systems of immunity. In: Johnson FL, Pochedly C, eds. *Bone Marrow Transplantation in Children*. Raven Press, Ltd. New York. 1990: 1-15.
2. Ortega JJ, Olivé T, Díaz de Heredia C, et al. Trasplante de médula ósea en pediatría. *Anal Esp Pediatr* 1996; 82 (Livro de Actas I): 77-80.
3. Long GD, Blume KG: Allogeneic and autologous marrow transplantation. In Williams. *Hematology*. Fifth Edition. McGraw-Hill, Inc. 1995: 172-194.
4. Sanders JE: Bone marrow transplantation in pediatric oncology. In Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Third Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997:357-373.
5. Guinan EC, Bierer BE: Principles of Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. In Nathan and Oski's. *Hematology of Infancy and Childhood*, 5th Edition. W.B. Saunders Company, 1998; Vol 1: 336-372.
6. De Santes KB, Cowan MJ. Pediatric bone marrow transplantation. *Curr Opin Pediatr* 1992; 4: 92-101.
7. Pinkel Donald. Bone marrow transplantation in children. *J Pediatr* 1993; 122: 331-341.
8. Sanders JE. Bone Marrow Transplantation for Pediatric Malignancies. *Pediatr Clin North Am* 1997; 44: 1005-1020.
9. Vlachos A, Lipton JM. Bone marrow failure in children. *Curr Opin Pediatr* 1996; 8: 33-41.

10. Parkman R. Transplantation Biology. In: Hoffman R, Benz EJ, Shatill SJ. *Hematology – Basic Principles and Practice*. First published. Churchill Livingstone. 1991: 225-249.
11. Madero L, Muñoz A, Díaz MA. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en hematooncología pediátrica. In : Madero L, Muñoz A. *Hematología y Oncología Pediátricas*. Ediciones Ergon, S.A. 1997: 309-334.
12. Ribas-Mundó M. Estado y nuevas estrategias en el trasplante de progenitores hemopoyéticos. *Med Clín* 1999; 112: 618-620.
13. Gil JS, Mauri SB. Autotrasplante de progenitores hemopoyéticos en la leucemia aguda mieloblástica. *Med Clín* 1997; 108: 221-223.
14. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, et al. Factors Associated With Outcome After Cord Blood Transplantation in Children With Acute Leukemia. *Blood* 1999; 93: 3662-3671.
15. Yaniv I, Goshen J, Stein J, et al. Peripheral Blood Stem Cells as a Source for Hemopoietic Recovery Following Autologous Bone Marrow Transplantation in Childhood Malignancy. *Isr J Med Sci* 1994; 30: 634-639.
16. Madero L, Benito A, Díaz MA. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en pediatría. *An Esp Pediatr* 1997; 46: 424-426.
17. Urbano-Ispizua A. Trasplante Alogénico de progenitores hemopoyéticos de sangre periférica: un paso adelante? *Med Clín* 1997; 108: 230-235.
18. Ringdén O, Runde V, Häggglund H, et al. Transplantation of peripheral blood progenitor cells from unrelated donors. *Transplantation* 1998; 66: 142-143.

19. Celada A. Origen de las células del sistema inmunitario. In: *Inmunología Básica*. Celada A. Editorial Labor, S.A. 1994: 43-74.
20. Ortega JJ. Trasplante de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Aplicaciones clínicas y resultados. *Rev Esp Trasplantes* 1995; 4: 202-209.
21. Ramírez M, Civin CA. Fisiología de hematopoyesis. In: Madero L, Muñoz A. *Hematología y Oncología Pediátricas*. Ediciones Ergon, S.A. 1997: 1-19.
22. Osgood EE, Riddle MC, Matthews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous bone marrow; case report. *Ann Intern Med* 1939; 13: 357-358.
23. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EL, et al. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med* 1950; 35: 746-750.
24. Jacobson LO, Marks EK, Robson JM, et al. Effect of spleen protection on mortality following X irradiation. *J Lab Clin Med* 1949; 34: 1538-1542.
25. Santos GW. History of bone marrow transplantation. *Clin Haematol* 1983; 12: 611-639.
26. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, et al. Modifications of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; 12: 197-201.
27. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257: 491-497.

28. Mathé G, Jammet H, Pendic B, et al. Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés a ahute dose accidentellment. *Rev Franç Etudes Clin et Biol* 1959; 16: 258-261.
29. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970; 9: 571.
30. Gatti RA, Meawissen HJ, Allen HD, et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; 2: 1366-1369.
31. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, et al. Bone marrow transplantation in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968; 2: 1364.
32. De Koning J, Dooren LJ, van Bekkum DW, et al. Transplantation of bone marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969; 1: 1223.
33. Bortin MM, Bach FH, van Bekkum DW, et al. 25th Aniversary of the first successful allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 211-212.
34. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone marrow transplantation. *N Eng J Med* 1975; 292: 832.
35. Dalal I, Reid B, Doyle J, et al. Matched unrelated bone marrow transplantation for combined immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 613-621.
36. Ortega JJ. Resultados del Trasplante de Médula Ósea con donantes no emparentados en niños. *Sangre* 1995; 40 (supl.3): 19-26.

37. Gingrich R, Howe CWS, Goecken R, et al. The use of partially matched unrelated donors in clinical bone marrow transplantation. *Transplantation* 1985; 39: 526-532.
38. Hows J, Bradley BA, Gore S, et al. Prospective evaluation of unrelated donor marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 371-380.
39. Howard MR, Howns JM, Gore SM, et al. Unrelated donor marrow transplantation between 1977 and 1987 at four United Kingdom Centers. *Transplantation* 1990; 49: 547-553.
40. Beattly PG, Anasetti C, Hansen JA, et al. Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: Effect of mismatching for one HLA locus. *Blood* 1993; 81: 193-200.
41. Behringer D, Bertz, Schmoor C, et al. Quantitative lymphocyte subset reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation from matched related donors with CD34⁺ selected grafts, unselected PBPC grafts or BM grafts. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 295-302.
42. Finke J, Behringer D, Bertz H, et al. Comparison of immune reconstitution and GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with or without CD34⁺ selection. *Blood* 1996; 88: 616a (abstr).
43. Robertson KA. Trasplante de Médula Ósea. In Nelson. *Tratado de Pediatría*. Mc Graw-Hill Interamericana. 15a. Edición. 1997; 132: 750-763.
44. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, et al. Analysis of 462 Transplantations From Unrelated Donors Facilitated By The National Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 1993; 328: 593-602.

45. Yaniv I, Danon YL. Immune reconstitution after chemotherapy for malignant solid tumours in children. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 1-3.
46. Yaniv I, Bouffet E, Irle C, et al. Autologous Bone Marrow Transplantation in Pediatric Solid Tumors. *Pediatr Hematol Oncol* 1990; 7: 35-46.
47. Bureo E, Ortega JJ, Muñoz A, et al. Bone marrow transplantation in 46 pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 353-359.
48. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1999; 340: 508-516.
49. Stephan JL, Vlekova V, Le Deist F, et al. Severe combined immunodeficiency: A retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *J Pediatr* 1993; 123: 564-572.
50. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, et al. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* 1994; 125: 876-885.
51. Villa M, Benito A, Díaz MA, et al. Trasplante alogénico de médula ósea en osteopetrosis maligna. *An Esp Pediatr* 1997; 47: 543-546.
52. Fischer A, Landais P, Friedrich W, et al. European experience of bone-marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *Lancet* 1990; 336: 850-854.
53. Haddad E, Le Deist F, Aucouturier P, et al. Long-Term Chimerism and B-Cell Function After Bone Marrow Transplantation in Patients With Severe Combined Immunodeficiency With B Cells: A Single-Center Study of 22 Patients. *Blood* 1999; 94: 2923-2930.

54. Parkman R, Weinberg KI. Immunological Reconstitution Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. 2nd ed. Malden, MA: Oxford University Press; 1998: 704-711.
55. Lenarsky C. Immune recovery after bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol* 1995; 2: 409-412.
56. Ljungman P. Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 (suppl 2): S72-S74.
57. Small TN. Immunologic reconstitution following stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 1996; 3: 461-465.
58. Otinger HD, Beelen DW, Scheulen B, et al. Improved Immune Reconstitution After Allogeneic Transplantation of Peripheral Blood Stem Cells Instead of Bone Marrow. *Blood* 1996; 88: 2275-2279.
59. Lum LG. Immune Recovery After Bone Marrow Transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 659-675.
60. Verma UN, Mazumder A. Immune Reconstitution following bone marrow transplantation. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 37: 351-360.
61. Lum LG. The Kinetics of Immune Reconstitution after Human Marrow Transplantation. *Blood* 1987; 69: 369-380.
62. Wimperis JZ, Brenner MK, Prentice HG, et al. Transfer of a functioning humoral immune system in transplantation of T-lymphocyte-depleted bone marrow. *Lancet* 1986; 3: 339-343.

63. Chaushu S, Chaushu G, Garfunkel A, et al. Salivary immunoglobulins in recipients of bone marrow grafts. II. Transient secretion of donor-derived-salivary IgA following transplantation of T-cell-depleted bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 925-928.
64. Sullivan KM, Kopecky KJ, Jocom J, et al. Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1990; 323: 705-712.
65. Parkkli T, Kayhry H, Ruutu T, et al. A comparison of early and late vaccination with Haemophilus influenzae type b conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccines after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 961-967.
66. Lortan JE, Vellodi A, Jorges ES, et al. Class-and subclass-specific pneumococcal antibody levels and response to immunization after bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 512-519.
67. Grill J, Robert-Le Deley MC, Valteau-Couanet D, et al. Immunité humorale et infections pendant l'autogreffe de moelle osseuse chez l'enfant: étude de 127 patients greffés successivement dans un même centre. *Arch Pédiatr*, 1994; 1: 463-469.
68. Haynes BF, Denning SM, Singer KH, et al. Ontogeny of T-cell precursors: A model for the initial stages of human T-cell development. *Immunol Today* 1989; 10: 86-91.
69. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor γ -chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993; 73: 147-157.
70. Bhatia SK, Tygett LT, Grabstein KH, et al. The effect of in vivo IL-7 deprivation of T cell maturation. *J Exp Med* 1995; 181: 1399-1409.

71. Atkinson K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation (Review). *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 209-226.
72. Keever CA, Small TN, Flomenberg N, et al. Immune Reconstitution Following Bone Marrow Transplantation: Comparison of Recipients of T-Cell Depleted Marrow with Recipients of Conventional Marrow Grafts. *Blood* 1989; 73: 1340-1350.
73. Godthelp BC, van Tol MJD, Vossen JM, et al. T-Cell immune reconstitution in pediatric leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation with T-cell-depleted or unmanipulated grafts: evaluation of overall and antigen-specific T-cell repertoires. *Blood* 1999; 94: 4358-4369.
74. Alanko S, Pelliniemi T-T, Salmi TT. Recovery of blood lymphocytes and serum immunoglobulins after treatment of solid tumors in children. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 33-45.
75. Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 413-425.
76. Weinberg K, Annett GM, Kashyap A, et al. The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995; 1: 18-23.
77. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Age, Thymopoiesis, and CD4⁺ T-Lymphocyte Regeneration after intensive chemotherapy. *N Eng J Med* 1995; 332: 143-149.
78. Ault KE, Antin JH, Ginsburg D, et al. Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med* 1985; 161: 1483-1502.

79. Noel DR, Witherspoon RP, Storb R, et al. Does graft-versus-host-disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on long-term survivors. *Blood* 1978; 51: 1087-1105.
80. Storek J, King L, Ferrara S, et al. Abundance of a restricted fetal B cell repertoire in marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 783-790.
81. Chaushu S, Chaushu G, Garfunkel AA, et al. Salivary immunoglobulin in recipients of bone marrow grafts. I. A longitudinal follow-up. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 871-876.
82. 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.
83. Witherspoon RP, Kopecky K, Storb RF, et al. Immunological recovery in 48 patients following syngeneic marrow transplantation for hematological malignancy. *Transplantation* 1982; 33: 143-149.
84. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, et al. T-Cell Regeneration After Bone Marrow Transplantation: Differential CD45 Isoform Expression on Thymic-Derived Versus Thymic-Independent Progeny. *Blood* 1993; 8: 2585-2594.
85. Jenkins MK, Schwartz RH, Pardoll DM. Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* 1988; 241: 1655-1658.
86. Stites DP, Rodgers RPC, Folds JD, et al. Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigens & Antibodies. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. *Medical Immunology*. 9th edition. Stamford, USA: Appleton & Lange. 1997: 211-253.

87. Cruse JM, Lewis RE. The Thymus and Lymphocytes. In: Cruse JM, Lewis RE *Atlas of Immunology*. CRC Press LLC.USA . 1999: 169-173.
88. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Maduración de las células T en el Timo/ Maduración de los Linfocitos B. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS *Inmunología Celular y Molecular*. Interamericana – McGraw – Hill. Tercera Edición. 1998: 71-211.
89. Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clinical Investigator* 1992; 70: 539-544.
90. Robertson MJ, Ritz J. Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. *Blood* 1990; 76: 2421-2438.
91. Crist WM, Heslop H. Trasplante de Médula Ósea. In Nelson. *Tratado de Pediatría*. Mc Graw-Hill Interamericana. 15a. Edición. 1997; 448: 1812-1813.
92. De la Cámara R, Bischofberger C, Campins M, et al. Inmunización postrasplante de progenitores hemopoyéticos: revisión y recomendaciones. *Med Clín* 1998; 110: 146-155.
93. Singhal S, Mehta J. Reimmunización after blood or marrow stem cell transplantatiion. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 637-646.
94. Cubells J. Vacunación del niño inmunodeprimido. In: *Vacunas*. Prous Science. 1997: 129-141.
95. Gerritsen EJA, Van Tol MJD, Van't Veer MB, et al. Clonal Dysregulation of the Antibody Response to Tetanus-Toxoid After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1994; 84: 4374-4382.

96. De la Cámara R. Vacunación y transplante de médula ósea. In: Campins M, Moraga FA, eds. *Vacunas 1997*. Prous Science. 1997: 151-164.
97. Chan CY, Molrine DC, Antin JH, et al. Antibody responses to tetanus toxoid and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines following autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 33-38.
98. Goldblatt D. Conjugate vaccines. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 1-3.
99. CDC. Advisory Committee on Immunization Practices. Update: Vaccine side effects, adverse reactions, contraindications, and precautions. *MMWR* 1996; 45 (RR-12): 1-35.
100. Ljungman P, Duraj V, Magnus L. Response to immunization against polio after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 89-93.
101. Engelhard D, Handsch R, Naparstek E, et al. Immune response to polio vaccination in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 295-300.
102. Ljungman P, Fridell E, Lonnqvist B, et al. Efficacy and safety of vaccination of marrow transplant recipients with a live measles, mumps and rubella. *J Infect Dis* 1989; 159: 610-615.
103. Pauksen K, Duraj V, Ljungman P, et al. Immunity to and immunization against measles, rubella and mumps in patients after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 427-432.

104. King S, Saunders E, Petric M, et al. Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 633.
105. Pauksen K, Linde A, Ljungman P, et al. Specific T and B cell immunity to measles after allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 807-813.
106. Dumont-Girard F, Roux E, Van Lier RA, et al. Reconstitution of the T-Cell Compartment After Bone Marrow Transplantation: Restoration of the Repertoire by Thymic Emigrants. *Blood* 1998; 92: 4464-4471.
107. Scheiermann N, Gesemann M, Maurer C, et al. Persistence of antibodies after immunization with a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine following two different schedules. *Vaccine* 1990; 8 (suppl.): S44-S46.
108. Polychronopoulou-Androulakaki S, Panagiotou JP, Kostaridou S, et al. Immune Response of Immunocompromised Children with Malignancies to a Recombinant Hepatitis B Vaccine. *Pediatr Hematol Oncol* 1996; 13: 425-431.
109. Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Eng J Med* 1997; 336: 196-204.
110. Nagler A, Ilan Y, Adler R, et al. Successful immunization of autologous bone marrow transplantation recipients against hepatitis B virus by active vaccination. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 475-478.
111. Li Volti S, Di-Gregorio F, Romeo MA, et al. Immune status and the immune response to hepatitis B virus vaccine in thalassemic patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 157-160.

112. Ljungman P. Immunization of transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 635-636.
113. Ljungman P, Cordonnier C, De Bock R, et al. Immunisations after bone marrow transplantation: results of a European survey and recommendations from the infectious diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 455-460.
114. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, et al. Manipulación de la Respuesta Inmunitaria. In: *Inmunobiología. El Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y Enfermedad*. 4ª Edición. 2000: 560-574.
115. Ada GL. The immunological principles of vaccination. *Lancet* 1990; 335: 523-526.
116. Rosen FS, Seligmann M. Introduction. In: *Immunodeficiencies*. Harwood Acad. Publ. 1993: 1-29.
117. Ljungman P. Immunization in the Immunocompromised Host. In: Plotkin SA, Orenstein WA. *Vaccines*. Third Edition. W.B. Saunders Company. 1999: 98-110.
118. Matos THS. Vacunaciones en niños en situaciones especiales. In: Campins M, Moraga FA, eds. *Vacunas 2000*. Prous Science. 2000: 119-130.
119. Frappaz D, Bonneval L, Bouteille M, et al. Vaccination contre l'hépatite B chez l'enfant immunodéprimé. A propos de 31 cas personnels. *Pediatrie* 1986; 7: 537-548.
120. Hovi L, Valle M, Siimes MA, et al. Impaired response to hepatitis B vaccine in children receiving anticancer chemotherapy. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 931-935.

121. Entacher U, Jürgenssen O, Thun-Hohenstein L, et al. Hepatitis B vaccination and immune response in children with malignant diseases. *Eur J Pediatr* 1985; 144: 160-163.
122. Hibberd PL, Rubin RH. Approach to Immunization in the immunosuppressed host. *Infect Dis Cl North Am* 1990; 4: 123-142.
123. Lout L. Vaccination of the Immunocompromised Patient. *Biologicals* 1997; 25: 231-236.
124. Pezzini C, Limonta M, Rovelli A, et al. Immunity to polioviruses and tetanus after bone marrow transplantation in children. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 331-336.
125. Ljungman P. Immunization in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis* 1995; 8: 254-257.
126. Sauerbrei A, Prager J, Hengst U, et al. Varicella vaccination in children after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 381-383.
127. Redman RL, Nader S, Zerboni L, et al. Early Reconstitution of Immunity and Decreased Severity of Herpes Zoster in Bone Marrow Transplant Recipients Immunized with Inactivated Varicella Vaccine. *J Infect Dis* 1997; 176: 578-585.
128. Ljungman P, Wiklund-Hammarsten M, Duraj V, et al. Response to Tetanus Toxoid Immunization after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Infect Dis* 1990; 162: 496-500.
129. Ljungman P, Levensohn-Fuchs I, Hammarström V, et al. Long-term immunity to measles, mumps and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 84: 657-664.

130. Guinan EC, Molrine DC, Antin JH, et al. Polysaccharide conjugate vaccine responses in bone marrow transplant patients. *Transplantation* 1994; 57: 677-684.
131. Ilan Y, Nagler A, Adler R, et al. Adoptive Transfer of Immunity to Hepatitis B Virus After T Cell-depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Hepatology* 1993; 18: 246-252.
132. Volti SL, Mauro L, Di Gregorio F, et al. Immune status and immune response to diphtheria-tetanus and polio vaccines in allogeneic bone marrow-transplanted thalassemic patients. *Bone Marrow Transplant* 1994;14: 225-227.
133. Somani J, Larson RA. Reimmunization After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Am J Med* 1995; 98: 389-398.
134. Pauksen K, Hammarström V, Ljungman P, et al. Immunity to poliovirus and immunization with inactivated poliovirus vaccine after autologous bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 547-552.
135. Pauksen K, Duraj V, Ljungman P, et al. Immunity to and immunization against measles, rubella and mumps in patients after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 427-432.
136. Schenker EL, Hultin LE, Bauer KD, et al. Evaluation of a dual-color flow cytometry immunophenotyping panel in a multicenter quality assurance program. *Cytometry* 1993; 14: 307-317.
137. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. *J Pediatr* 1997; 130: 388-393.

138. Stites DP, Folds JD, Schmitz J. Clinical Laboratory Methods for Detection of Cellular Immunity. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. *Medical Immunology*. 9th edition. Stamford, USA: Appleton & Lange. 1997: 254-274.
139. Wunderlich J, Shearer G, Livingstone A. Proliferative Assays for T Cell Function. *Curr Prot Immunol* 1991;1: 3.12.1-3.12.14.
140. Lockitch G, Halstead AC, Quigley G, et al. Age-and-Sex-Specific Pediatric Reference Intervals: Study Design and Methods Illustrated by Measurement of Serum Proteins with the Behring LN Nephelometer. *Clin Chem* 1988; 34: 1618-1621.
141. Meites S (ed): Pediatric Clinical Chemistry. Reference (Normal) Values. *American Association for Clinical Chemistry*. 3rd ed. Washington, DC. 1989.
142. Ramsay MEB, Corbel MJ, Redhead K, et al. Persistence of antibody after accelerated immunisation with diphtheria/tetanus/pertussis vaccine. *BMJ* 1991; 302:1489-1491.
143. Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F. Immune response to hepatitis B revaccination. *J Med Virol* 1988; 24: 377-384.
144. Todd JK. Infecciones Estreptococicas. In Nelson. *Tratado de Pediatría*. McGraw-Hill Interamericana. 15a. Edición. 1997; 12: 844-849.
145. Vilalta JS, Aalenta HP, Valeri EC, et al. *Manual de Bioestadística*. 2^a edición. Masson, S.A. 1995.
146. Armitage P, Berry G. *Estadística para la Investigación Biomédica*. 2^a Edición. Ediciones Doyma. 1992.
147. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. Fourth Edition. McGraw-Hill. 1997.

148. Parker L. Statistics in Medical Research. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 233-236.
149. Gardner MJ, Altman DG. Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Br Med J* 1986; 292: 746-750.
150. Hernández MD, Del Cañizo MC, González M, et al. Recuperación inmune tras trasplante autólogo de células progenitoras hemopoyéticas. Comparación entre células progenitoras de sangre periférica y de médula ósea. *Med Clín* 1998; 110: 768-773.
151. Parra C, Roldán E, Rodríguez C, et al. Reconstitución de los linfocitos de sangre periférica en pacientes tratados con trasplante de médula ósea: comparación entre el trasplante alogénico y el autólogo. *Med Clin* 1999; 113: 1-5.
152. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, et al. 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.
153. Martínez C, Urbano-Ispizua A, Rozman C, et al. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: Comparison of recipients of positive CD34⁺ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. *Exp Hem* 1999; 27: 561-568.
154. Foot ABM, Potter MN, Donaldson C, et al. Immune reconstitution after BMT in children. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 7-13.
155. Kook H, Goldman F, Padley D, et al. Reconstruction of the Immune System After Unrelated or Partially Matched T-Cell-Depleted Bone Marrow

Transplantation in Children: Immunophenotypic Analysis and Factors Affecting the Speed of Recovery. *Blood* 1996; 88: 1089-1097.

156. Abu-Ghosh A, Goldman S, Slone V, et al. Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/cytokines with the incidence of acute graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 535-544.
157. Locatelli F, Maccario R, Comoli P, et al. Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 1095-1101.
158. Ashihara E, Shimazaki C, Yamagata N, et al. Reconstitution of lymphocyte subsets after peripheral blood stem cell transplantation: two-color flow cytometric analysis. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 377-381.
159. Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, et al. Lymphoid Reconstitution After Autologous PBSC Transplantation With FACS-Sorted CD34⁺ Hematopoietic Progenitors. *Blood* 1998; 91: 2588-2600.
160. Soiffer RJ, Bosserman L, C Murray, et al. Reconstitution of T-Cell Function After CD6-Depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1990; 75: 2076-2084.
161. 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.

162. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune Reconstitution and Immunotherapy After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 1998; 92: 1471-1490.
163. To LB, Roberts MM, Haylock DN, et al. Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 277-284.
164. Otinger HD, Beelen DW, Scheulen B, et al. Improved Immune Reconstitution After Allogeneic Transplantation of Peripheral Blood Stem Cells Instead of Bone Marrow. *Blood* 1996; 88: 2275-2279.
165. Mitchell PLR, Shepherd VB, Proctor HM, et al. Peripheral blood stem cells used to augment autologous bone marrow transplantation. *Arch Dis Child* 1994; 70: 237-240.
166. Pavletic ZS, Bishop MR, Joshi SS, et al. Immunologic reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation: faster lymphocyte recovery correlates with better survival. *Blood* 1996; 88: 422a (abstr).
167. Storek J, Witherspoon RP, Maloney DG, et al. Improved reconstitution of CD4 T cells but worsened reconstitution of serum IgG levels after allogeneic transplantation of blood stem cells instead of marrow. *Blood* 1997; 89: 3891-3893.
168. Egner W, Price P, Sizer G, et al. Immune reconstitution after peripheral blood stem cell transplants. *Br J Hematol* 1997; 97: 35 (abstr).
169. Lamb LS Jr, Gee AP, Henslee-Downey PJ, et al. Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone

- marrow transplantation from partially mismatched related donors. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 461-471.
170. Vitucci A, Lucivero G, Locatelli F, et al. Lymphocyte subset reconstitution after HLA-identical placental blood transplantation (PBT) or PBT plus bone marrow transplantation (BMT) in three children with α -thalassemia major. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 743-747.
171. Davison GM, Novitzky N, Kline A, et al. Immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation depleted of T cells. *Transplantation* 2000; 69: 1341-1347.
172. Parra C, Roldán E, Rodríguez C, et al. Reconstitución inmunológica de los linfocitos de sangre periférica en pacientes tratados con trasplante de médula ósea. *Med Clin* 1996; 106: 169-173.
173. Lenarsky C. Mechanisms in Immune Recovery After Bone Marrow Transplantation. Management of post-transplant immune deficiency. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1993; 15: 49-55.
174. Atkinson K, Hansen JA, Storb R, et al. T cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human bone marrow transplantation I: Helper-inducer and cytotoxic-supressor subsets. *Blood* 1982; 59: 1292
175. Takaue Y, Okamoto Y, Lawano Y, et al. Regeneration of immunity and varicella-zoster virus infection after high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell autografts in children. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 219-223.
176. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; 96: 2703-2711.

177. Atkinson K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation (Review). *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 209-226.
178. Sugita K, Soiffer RJ, Murray C, et al. The phenotype and reconstitution of immunoregulatory T cell subsets after T-cell-depleted allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 1465.
179. Cowan MJ, McHugh T, Smith W, et al. Lymphocyte reconstitution in children receiving soybean agglutinin T-depleted bone marrow transplants. *Transplant Proc* 1987; 19: 2744.
180. Janossy G, Prentice HG, Grob JP, et al. T lymphocyte reconstitution after transplantation of T cell depleted allogeneic bone marrow. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 577.
181. Gratama JW, Naipal A, Oljans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4⁺ and T8⁺ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood* 1984; 63: 1416.
182. Soiffer RJ, Gonin R, Murray C, et al. Prediction of Graft-Versus-Host Disease by Phenotypic Analysis of Early Immune Reconstitution After CD6-Depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1993; 82: 2216-2223.
183. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *New Engl J Med* 1996; 335: 157:166.
184. Lamb LS Jr, Gee AP, Henslee-Downey PJ, et al. Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 461-471.

185. Giraud P, Thuret I, Reviron D, et al. Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 53-57.
186. Moretta A, Comoli P, Maccario R, et al. Immune recovery in children after transplantation of cord blood progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 (Suppl. 3): Abstr. 37.
187. Laughlin MJ, McKinnon K, Demarest J, et al. Immune recovery post unrelated allogeneic umbilical cord blood (UCB) transplantation in adult recipients. *Blood* 1997; 90: (Suppl. 1): 418a.
188. Storek J, Saxon A. Reconstitution of B cell immunity following bone marrow transplantation (Review). *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 395-408.
189. Storek J, Ferrara S, Ku N, et al. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 387-398.
190. 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; 79: 1351-1358.
191. Niederwieser D, Gasti G, Rumpold H, et al. 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.
192. Guillen FJ, Ferrara J, Hancock WW, et al. Acute cutaneous graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model. Evidence that large granular lymphocytes are effector cells in the immune response. *Lab Invest* 1986; 55: 35.

193. Aotsuka N, Asai T, Oh H, et al. Lymphocyte subset reconstitution following human allogeneic bone marrow transplantation: differences between engrafted patients and graft failure patients. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 345-349.
194. Leino L, Lilius EM, Nikoskelainen J, et al. The reappearance of 10 differentiation antigens on peripheral blood lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 339-344.
195. Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, et al. Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 101.
196. Leroy E, Calvo C, Divine M, et al. Persistence of T8⁺/HNK-1⁺ suppressor lymphocytes in the blood of long-term surviving patients after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 1986; 137: 2180-2189.
197. Lum LG. Immune Recovery After Bone Marrow Transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 659-675.
198. Rozman C. Enfermedad del injerto contra el huésped y reacción del injerto contra la leucemia. *Sangre* 1990; 35: 465-474.
199. Martin P, Hassen J, Storb R, et al. Human marrow transplantation: an immunological perspective. *Adv Immunol* 1987; 40: 379-438.
200. Talmadge JE, Reed E, Ino K, et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 161-172.
201. Henon PR, Liang H, Beckwirth G, et al. Comparison of haemopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 285-291.

202. To LB, Juttner CA, Stomski F, et al. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell autografting. *Bone Marrow Transplant* 1987; 2: 111-112.
203. Gerritsen EJA, Van Tol MJD, Van't Veer MB, et al. Clonal Dysregulation of the Antibody Response to Tetanus-Toxoid After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1994; 84: 4374-4382.
204. Ljungman P, Cordonnier C, De Bock R, et al. Immunisations after bone marrow transplantation: results of a European survey and recommendations from the infectious diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 455-460.
205. Li Volti S, Di-Gregorio F, Romeo MA, et al. Immune status and the immune response to hepatitis B virus vaccine in thalassemic patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 157-160.
206. Nagler A, Ilan Y, Adler R et al. Successful immunization of autologous bone marrow transplantation recipients against hepatitis B virus by active vaccination. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 475-478.