



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna

Papel de las subpoblaciones celulares del injerto autólogo en la evolución del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con linfoma de Hodgkin y no Hodgkin.

D. Eduardo José Salido Fierrez
2012

ABC	ATP-binding cassette
ABCG2	Receptor transportador de ATP perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette), subfamilia ABCG
ACD-A	Citrato-dextrosa formula A
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosina Trifosfato"
BD	Becton-Dickinson
BEAM	BCNU (carmustina), etopósido, citarabina y melfalán.
BFU-E	Erythroid burst-forming units
BUCY-2	Busulfán-ciclofosfamida
CD	Cluster de diferenciación
CFCs	Células formadoras de colonias
CFU-GM	Progenitores granulo-macrofágicos
CFU-L	Célula pluripotente linfoide
CFU-LM o CFU-GEMM ^{egL}	Célula madre totipotente linfomieloide
CFU-M o CFU-GEMM	Célula pluripotente mieloide
CFU-Mix	Progenitores mixtos mixtos (granulo-macrofágicos, eritroides y megacariocíticos)
CMN	Células mononucleadas
CSH	Células "stem" hematopoyéticas humanas primitivas de cordón umbilical
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación estándar
ECOG	Eastern Cooperative Oncologic Group
EICH	Enfermedad injerto contra huesped.
FEC-1	Factor estimulante de colonias-1
FLIPI	Folicular lymphoma International Prognostic Index
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HHV	Human herpesvirus
HLA	Human leukocyte antigen
HSC	Células madre hematopoyéticas
HSC	Hematopoietic stem cell
HTLV	Virus linfotropo T humano
IACR	International Agency for Research on Cancer
Ig	Inmunoglobulina
ILT	Immunoglobulin Like Transcripts
INE	Instituto Nacional de Estadística
IPI	Indice pronóstico internacional
IPI	Lymphoma International Prognostic Index
ITAM	Inmunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
ITIM	Inmunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
KIR	killer cell Ig-like receptors

LACE	CCNU (lomustina), etopósido, citarabina y ciclofosfamida.
LH	Linfoma de Hodgkin
LIR	Leukocyte Ig-like Receptors
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LNH	Linfoma no Hodgkin
LRC	Leukocyte Receptor Cluster
MAPC	Células progenitoras adultas multipotenciales
MHC	Major histocompatibility complex
MIC	MHC Class I Chain-related
MM	Mieloma múltiple
MSC	Mesenquimal stem cell
NCHS	National Center for Health Statistics
NK	Natural killer
NKC	NK Complex
NKC	NK Complex
NKG2D	Natural-killer group 2, member D
NOD/SCID	Ratones diabéticos no obesos con inmunodeficiencia severa combinada.
OMS	Organización mundial de la Salud
PBS	Buffer salino fosfato (phosphato buffer saline)
PHSP	Progenitores hematopoyéticos de sangre periférica
RA	Receptor activador
RAL	Recuento absoluto de linfocitos
RAN	Recuento absoluto de neutrófilos
RC	Respuesta completa
RELINF	Registro Español de Linfomas
rhIL3	Recombinant human interleukine 3
rh-SCF	Recombinant human stem-cell factor
RI	Receptor inhibidor
RL	Recuperación linfocitaria
ROC	Receiver Operating Characteristic
RP	Respuesta parcial
RPMI	Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
SG	Supervivencia global
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SLE	Supervivencia libre de eventos (progresión o recaída)
SLP	Supervivencia libre de progresión
SP	"Side population"
TAPH	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
TCR	Recetor de células T
TdT	Dioxinucleotidil-transferasa terminal
VEB	Virus de Epstein Barr
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.
Z-BEAM	Zevalin (ibritumomab tiuxetan marcado con itrio-90), BCNU (carmustina), etopósido, citarabina y melfalán.

	Página
INTRODUCCIÓN	7
1. EPIDEMIOLOGÍA. FACTORES ETIOLÓGICOS	8
1.1 Incidencia actual. Cambios.	10
1.2 Factores etiológicos.	16
1.2.1 Inmunodeficiencia y autoinmunidad.	16
1.2.2 Agentes infecciosos.	16
-Virus linfotropos humanos	17
-Virus de Epstein Bar	17
-Virus de la hepatitis C	17
-Helicobacter pylori	18
1.2.3 Asociación familiar y predisposición genética.	18
1.2.4 Pesticidas.	18
1.2.5 Estilo de vida.	19
1.2.6 Transfusión sanguínea.	19
2. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO. BASES FUNCIONALES.	20
2.1 Células madre. Progenitores y precursores hematopoyéticos.	20
2.2 El sistema linfoide.	24
2.2.1 Linfopoyesis primaria y secundaria.	24
-Linfopoyesis secundaria en la zona B.	28
-Linfopoyesis secundaria en la zona T.	30
2.2.2 El sistema linfoide. Fisiología de los linfocitos.	31
-Fisiología de los linfocitos B.	31
Respuesta B T-dependiente: respuesta primaria precoz y tardía.	31
Respuesta B T-independiente.	34
-Fisiología de los linfocitos T.	34
2.2.3 Células NK y receptores NK.	36
-Funciones de las células NK.	37
Función citotóxica de las células NK.	37
Función secretora de las células NK.	39
-Recetores de las células NK.	39
Receptores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas: receptores KIR.	40
Receptores tipo lectina C.	49
Otros receptores inhibidores en leucocitos.	51
3. LOS LINFOCITOS Y SU PAPEL EN EL RESULTADO DEL TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.	55
3.1 Papel de la recuperación linfocitaria precoz sobre la supervivencia. Estudio del efecto injerto contra tumor del injerto autólogo.	56
3.2 Papel de los linfocitos del autoinjerto sobre la supervivencia post-trasplante.	62
3.3 Papel del recuento sanguíneo de linfocitos pre-aféresis sobre la supervivencia.	67
3.4 Papel de las subpoblaciones celulares del injerto sobre la supervivencia post-trasplante.	71
3.4.1 Relación de las células progenitoras CD34+ infundidas sobre la supervivencia.	71
3.4.2 relación de los linfocitos maduros del injerto sobre la supervivencia.	73
3.5 Papel de la recuperación linfocitaria tardía sobre la supervivencia.	77
3.6 Papel del recuento sanguíneo de linfocitos al diagnóstico sobre la supervivencia.	78
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	79
1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.	80
2. OBJETIVOS.	82

PACIENTES Y MÉTODOS.	83
1. POBLACIÓN DE PACIENTES A ESTUDIO.	84
1.1 Características de los pacientes.	84
1.2 Tratamientos recibidos.	86
1.3 Situación clínica pre-trasplante y respuesta.	88
2. METODOLOGÍA DE LA MOVILIZACIÓN, RECOLECCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.	90
2.1 Movilización de progenitores hematopoyéticos.	90
2.2 Recolección y criopreservación de progenitores hematopoyéticos.	90
2.2.1 Recolección de progenitores hematopoyéticos.	91
2.2.2 Criopreservación de progenitores hematopoyéticos.	91
2.3 Metodología del trasplante.	93
2.3.1 Acondicionamiento.	93
2.3.2 Descongelación del producto a infundir.	94
2.3.3 Infusión de la bolsa de progenitores.	94
3. DISEÑO DEL ESTUDIO.	96
3.1 Datos retrospectivos.	96
3.1.1 Datos clínicos y biológicos al diagnóstico.	96
3.1.2 Datos referentes a la movilización, recolecta e infusión de progenitores: aféresis y producto recolectado.	97
3.1.3 Datos clínicos referentes al trasplante y evolución post-trasplante.	97
3.2 Datos experimentales.	98
3.2.1 Protocolo de trabajo en el Laboratorio de Criobiología.	98
-Cálculo de las células monocleadas totales.	99
-Cálculo de los linfocitos totales.	99
-Cultivos de progenitores hematopoyéticos	100
3.2.2 Protocolo de citometría, marcaje y adquisición.	101
-Descripción del sistema LSR-II utilizado.	101
-Protocolo de marcaje.	101
-Protocolo de adquisición y análisis.	102
Determinación de células CD34+ y subpoblaciones de CD34+.	102
Determinación de linfocitos y subpoblaciones de linfocitos.	106
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	110
4.1 Objetivo principal.	110
4.1.1 Investigar el papel de las subpoblaciones celulares del injerto autólogo en el resultado del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con linfoma.	110
4.2 Objetivos secundarios.	112
4.2.1 Investigar la influencia del anticuerpo monoclonal Rituximab sobre la composición del injerto y la supervivencia.	112
4.2.2 Estudiar el papel de los linfocitos en distintos momentos de la enfermedad sobre la supervivencia.	112
4.2.3 Estudiar las posibles correlaciones de los cultivos clonogénicos con las células CD34 y sus subpoblaciones.	112
RESULTADOS	114
1. OBJETIVO PRINCIPAL: INVESTIGAR EL PAPEL DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES DEL INJERTO AUTÓLOGO EN EL RESULTADO DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN PACIENTES CON LINFOMA.	115
1.1. Análisis de las principales poblaciones del injerto: CMN, células CD34+ totales y linfocitos totales; influencia de los procesos de congelación y descongelación.	115
1.2 Análisis de las principales subpoblaciones del injerto.	122
1.2.1 Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos CD34+.	122

Análisis de progenitores CD34+ según la expresión de CD38 y DR.	124
Análisis de progenitores CD34+ según la expresión de CD133+	129
Análisis de progenitores CD34+ según la expresión de CD177, CD133, CD38 y DR.	131
1.2.2 Subpoblaciones de linfocitos.	135
-Principales subpoblaciones linfocitarias	137
-Subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+, TCRγδ+ y células NK.	138
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	140
2.1 Investigar la influencia del anticuerpo monoclonal Rituximab sobre la composición del injerto y la supervivencia.	140
2.2 Estudiar el papel de los linfocitos en distintos momentos de la enfermedad sobre la supervivencia.	144
2.2.1 Influencia del RAL al diagnóstico sobre la supervivencia.	144
2.2.2 Influencia del RAL previo a la recolección sobre la supervivencia.	146
2.2.3 Influencia de la RL precoz sobre la supervivencia.	148
-Factores relacionados con la RL precoz	149
2.2.4 Influencia de la RL tardía sobre la supervivencia.	152
2.3. Estudiar las posibles correlaciones de los cultivos clonogénicos con las células CD34 y sus subpoblaciones.	153
3. ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS.	157
3.1 Análisis univariante	157
3.2 Análisis multivariante	161
3.2.1 Factores asociados con mayor recolección de células CD34+CD133+DR+CD38bajo	163
-Células CD34+ obtenidas antes de la congelación.	165
-Células CD34+ obtenidas después de la descongelación.	166
-CMN.	167
-CFU-GM obtenidas después de la descongelación.	169
DISCUSIÓN.	170
1. OBJETIVO PRINCIPAL: INVESTIGAR EL PAPEL DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES DEL INJERTO AUTÓLOGO EN EL RESULTADO DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN PACIENTES CON LINFOMA.	171
1.1 Caracterización funcional de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo.	175
1.2 ¿Existe un efecto “injerto contra linfoma” en el trasplante autólogo?	182
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS:	186
2.1 Influencia del rituximab sobre la composición del injerto y la supervivencia.	186
2.2 Papel de los linfocitos en distintos momentos de la enfermedad sobre la supervivencia.	188
2.2.1 Influencia del RAL al diagnóstico sobre la supervivencia.	188
2.2.2 Influencia del RAL previo a la recolección sobre la supervivencia.	189
2.2.3 Influencia de la RL precoz sobre la supervivencia.	191
2.2.4 Influencia de la RL tardía sobre la supervivencia.	191
2.3. Correlación de los cultivos clonogénicos con las células CD34 y sus subpoblaciones.	192
CONCLUSIONES.	195
REFERENCIAS.	197
ANEXO. DIFUSIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS.	216

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA. FACTORES ETIOLÓGICOS.

Las neoplasias linfoides están formados por diferentes entidades histológicas y biológicas, cada una de ellas poco conocidas desde el punto de vista etiológico y epidemiológico.

La información epidemiológica disponible sobre el linfoma en España es escasa.

Las tasas de mortalidad por linfoma ajustadas por sexo, por cien mil habitantes, durante el año 1997 para la población española, publicadas por el Ministerio de Sanidad (Centro Nacional de Epidemiología) a partir de las notificaciones de los boletines de defunción del Instituto Nacional de Estadística (INE) son para el linfoma no Hodgkin (LNH) de 5,38 para hombres y 3,46 para mujeres. Para el linfoma de Hodgkin (LH), estas tasas son de 0,73 para hombres y de 0,37 para mujeres [1].

Las cifras publicadas por la *International Agency for Research on Cancer* (IACR) para España, a partir de los Registros de Cáncer, mostraban unas tasas de incidencia de LNH (estandarizadas por la población europea) de 13,3 casos por cien mil habitantes y año para los varones y 8,5 casos por 100.000 habitantes/año en las mujeres; para el LH, 2,9 casos por cien mil habitantes y año para los varones y 1,9 casos por 100.000 habitantes/año en las mujeres [2]. Estas cifras son muy similares a las publicadas por esa misma institución para países como el Reino Unido y Holanda [2]. En USA, las tasas publicadas por el National Center for Health Statistics (NCHS) son parecidas a las tasas españolas de incidencia publicadas por el IARC para el mismo año (15,8 casos por cien mil habitantes y año para el LNH y 3 casos para el LH) [3].

Los LNH representan un grupo de neoplasias que en su conjunto constituyen la quinta causa más frecuente de cancer, así como de mortalidad por cáncer. Representan aproximadamente el 70% de todos los linfomas [4].

En el momento actual, en países donde existen registros de base poblacional, como en USA, se postula que existe una tendencia ascendente en la incidencia, sobre todo en el caso de los LNH [4]. Este aumento podría explicarse por el aumento de uno o varios de los siguientes factores de riesgo:

1. La inmunodepresión es uno de los factores reconocidos que puede producir el desarrollo de linfomas. Entre las causas que pueden provocar esta inmunodepresion están las causas congénitas, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el tratamiento tras trasplante de órganos y las enfermedades autoinmunes.

2. Agentes infecciosos como el virus de Epstein Barr (VEB), que según los criterios de la IARC existe suficiente evidencia de su efecto carcinógeno asociado a los linfomas [4]. Igualmente parecen asociarse virus hepatotropos como los de la hepatitis B y C.

3. Cambios medioambientales a los que han estado sometido ciertas poblaciones en los últimos años. De estos cambios pueden haber surgido exposiciones a ciertas sustancias que pudieran provocar linfoproliferación maligna como ciertos antibióticos, vacunas, productos químicos, radiaciones ultravioleta, etc.

4. Finalmente los cambios en la estructura poblacional producidos por la inmigración y el envejecimiento de la población pueden igualmente contribuir al aumento de la incidencia de la enfermedad.

1.1 INCIDENCIA ACTUAL: CAMBIOS RECIENTES EN LA INCIDENCIA Y MORTALIDAD POR LINFOMA.

La incidencia del linfoma no Hodgkin aumenta progresivamente con la edad (pico de aproximadamente 60 años), suponen el 4% de todas las neoplasias, son el tumor maligno más frecuente en adultos (tercero más común en niños) y constituyen la causa del 3% de la mortalidad por procesos neoplásicos en el total de la población de nuestro medio [5-7].

Desde la década de 1970 se ha registrado un aumento en la incidencia de LNH entre la población general y, paralelamente a la extensión de la infección por el VIH, un aumento sustancial en su incidencia entre los adultos jóvenes. Como grupo, son cuatro veces más frecuentes que los linfomas de Hodgkin, y tienen asimismo una tasa de mortalidad 10 veces mayor que la de éstos. La mayoría de los LNH aparecen en la edad adulta (media de 55-66 años), pero algunos tipos se presentan de forma preferente en la edad infantil, y otros muestran, de manera característica, una distribución bimodal. La incidencia es discretamente mayor en los varones (1,4:1). Algunas de las entidades incluidas en el grupo de LNH tienen una distribución geográfica o poblacional peculiar, que probablemente responde a la relación etiológica descrita entre algunos de estos procesos y factores como las radiaciones ionizantes, la exposición a ciertos productos químicos (pesticidas, derivados del benceno, etc.) o la infección por determinados virus (HTLV-1, VEB, HHV-6 Y 8), [6,7].

Los LNH de fenotipo B son entre 8-9 veces más frecuentes que los de fenotipo T [5-7], excepto en la edad pediátrica, en la que los linfomas T son dos veces más frecuentes que los B, y adquieren, con mucha frecuencia, un comportamiento leucémico. Este dato contrasta con el hecho de que en el tejido linfoide y en sangre periférica, la población T es, al menos, 3-4 veces superior a la población B. Se desconoce cuál es la razón del predominio de los linfomas B, pero es posible que los mecanismos celulares implicados en la proliferación y diferenciación de las células B (expansión clonal en el folículo linfoide, reordenamientos y mutaciones repetidas del material genético, activación y desactivación continuada de los procesos reguladores de supervivencia y muerte celular o apoptosis) determinen que esta población tenga más probabilidades de sufrir una transformación neoplásica [6,7].

En Europa las neoplasias linfoides representan en los varones el 6,3% de todos los cánceres registrados en el periodo 1993-1997, siendo la 5ª causa más frecuente de cáncer. En las mujeres son la 3ª causa, representando el 5,8% de todas las neoplasias diagnosticadas [8].

Existen importantes variaciones geográficas en la incidencia. Las cifras más altas se dan en América y oeste de Europa y las más bajas en el este de Europa y Asia [8].

En España la mortalidad por LNH ha aumentado sustancialmente (1952-1996). La media anual de incremento ha sido entre el 5,8-6,5% en mujeres y del 4,7-5,7% en hombres lo que coloca a los LNH como uno de los tumores cuya incidencia ha aumentado más [9,10]. Sin embargo, durante la década de los 90 la mortalidad por esta causa se ha estabilizado a partir de 1996 debido a la disminución de la incidencia de los linfomas en pacientes con infección por VIH [10].

Los resultados del estudio RELINF (Registro Español de Linfomas) llevado a cabo en España durante el 2003 aportan los siguientes datos [11]:

Para el LNH la tasa bruta global de incidencia fue de 12,33 para los hombres y 10,85 para las mujeres por 100.000 habitantes/año. Para el LH las tasas bruta global de incidencia fueron 3,18 para los hombres y 1,93 para las mujeres.

Las tasas de incidencia estandarizadas por la población mundial que se obtuvieron para los LNH fueron para los hombres 10,2 casos por 100.000 habitantes/año (ligeramente inferior a las tasas publicadas por el IARC, 13,4 habitantes/año), y para mujeres 8,3 casos por 100.000 habitantes/año (ligeramente superiores a las de IARC: 6,2 habitantes/año). Para el LH las tasas del RELINF fueron superiores a las tasas reportadas por el IARC para España: 3,2 y 2,9 casos por habitantes/año para hombres y 1,9 y 1,6 casos por habitantes/año para mujeres:

Tabla 1. Tasas de incidencia estandarizadas para la población mundial por edad y sexo y por 100.000 habitantes /año para el LNH (RELINF, 2005).

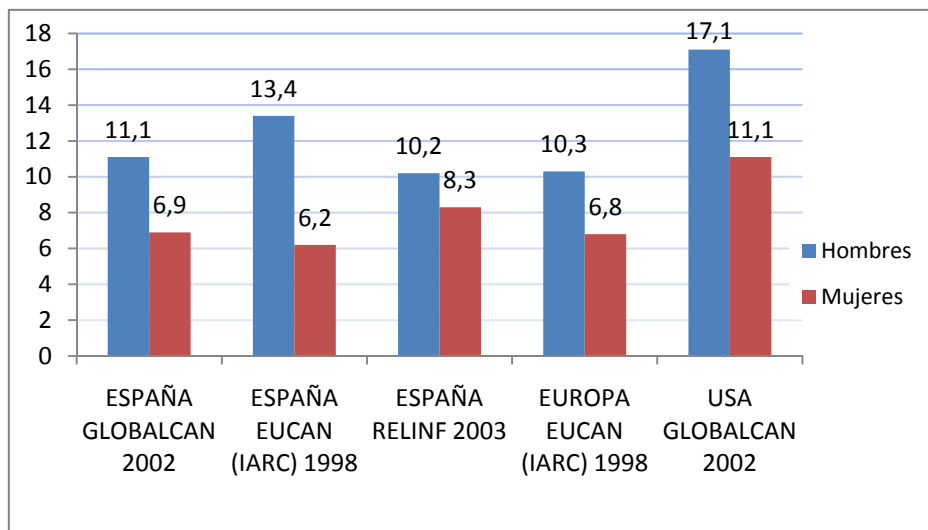
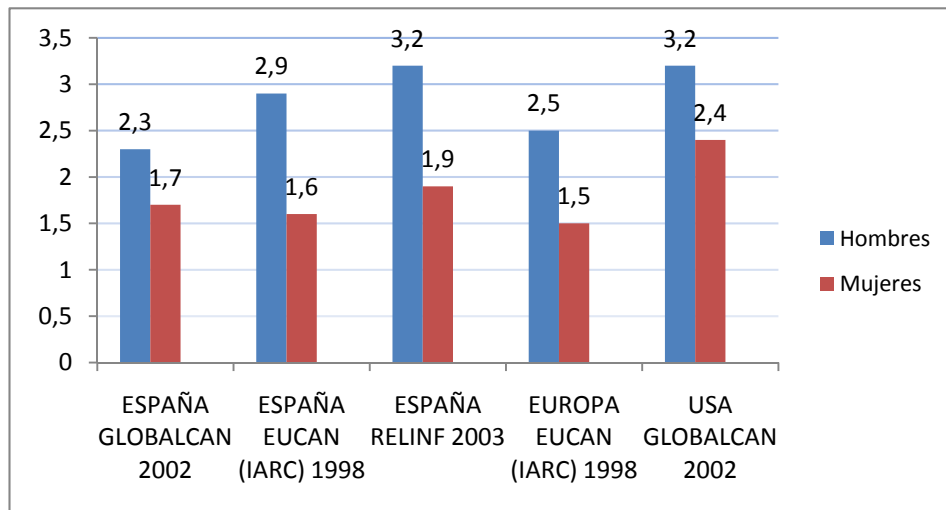


Tabla 2. Tasas de incidencia estandarizadas para la población mundial por edad y sexo y por 100.000 habitantes/año para el LH. (RELINF, 2005).



En el RELINF se estimó de forma indirecta los casos de linfoma que se producirían en España en mayores de 14 años a partir de los datos de IARC, resultando un total de 5914 casos de linfoma en mayores de 14 años, lo que produce una tasa cruda global de 16,9 casos por 100.000 habitantes/año (2,8 para LH y 14,1 para LNH).

Estos datos confirman que la comparación de las tasas estandarizadas en ambos sexos, para todos los linfomas a partir de las estimaciones del IARC y del RELINF son similares para los distintos subtipos de linfomas y no se encontraron diferencias significativas con las tasas estimadas por el IARC para España.

En cuanto a mortalidad, según los datos más recientes que ofrece el Centro Nacional de Epidemiología del ISCIII (año 2007), la tasa de mortalidad por linfoma en España ajustada al estándar de la población mundial es la siguiente:

Tabla 3. Datos de mortalidad. Centro nacional de Epidemiología. ISCIII, 2007.

Tasa mortalidad ajustada por población mundial/100000 hab. y año	LNH	LH
Hombres	1,85	0,22
Mujeres	3,14	0,30

Según el estudio EUROCARE-4 [12] llevado a cabo en adultos europeos diagnosticados entre 1995 y 1999 y seguidos hasta 2003, la supervivencia relativa es del 54,6% y 83% a los 5 años para el LNH y el LH respectivamente (tabla 4 y gráfico 1).

Tabla 4. Supervivencia relativa a los 5 años por tipo de cáncer. Adaptado a partir de Berrino y Col. [12].

TUMOR	Número de casos	Supervivencia relativa 5 años (%)
Testículo	20435	93.8
Labio	8083	93.1
Tiroides	23158	86.5
Enfermedad de Hodgkin	15323	83.0
Melanoma	7578	82.0
Mama	414298	81.1
Cuerpo útero	6312	78.3
Próstata	276497	77.0
Pene	4714	73.9
Leucemia Linfática Crónica	25317	67.2
Cérvix	38430	66.5
Vejiga	131793	65.8
Glándulas salivares	5741	64.6
Laringe	30649	63.1
Tejido Conjuntivo	14187	59.3
Riñón	70846	59.2
Hueso	4796	58.4
Vagina	13457	57.8
Linfoma no-Hodgkin	91815	54.6
Colon	231514	53.9
Recto	140307	53.5
Todos	269986	51.9
Nasofaringe	2973	50.2
Boca	15794	48.5
Nariz	4553	48.2
Lengua	12437	45.4
Intestino delgado	7417	43.2
Ovario	61372	41.6
Orofaringe	9713	39.8
Leucemia mieloide crónica	9264	39.5
Mieloma múltiple	35550	34.4
Leucemia linfática aguda	3497	30.0
Hipofaringe	7181	25.5
Estómago	113840	24.1
Leucemia mieloide aguda	19396	19.0
SNC	40705	18.7
Tracto biliar	24330	14.1
Pulmón	343473	12.6
Esófago	48802	12.3
Hígado	33141	8.6
Pleura	11851	7.5
Páncreas	68854	5.5

Como puede observarse, la supervivencia a los 5 años en España se encuentra pareja a la media europea. Los datos de supervivencia global, tanto en hombres como en mujeres, indican tasas en España muy similares a los de la media europea y los países de nuestro entorno [12]:

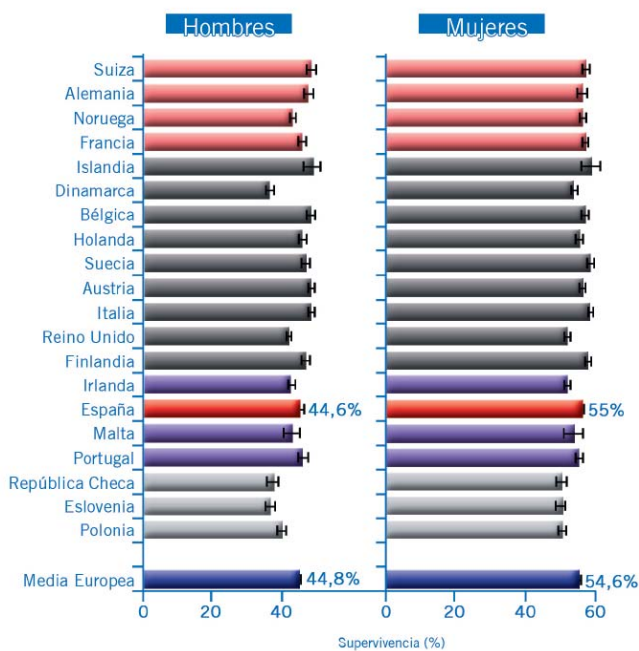


Gráfico 1. Datos de supervivencia global a 5 años. Adaptado a partir de Berrino y col. [12].

La siguiente ilustración describe las localizaciones tumorales más frecuentes por sexos. El LNH tiene una mayor prevalencia entre el sexo masculino [13].

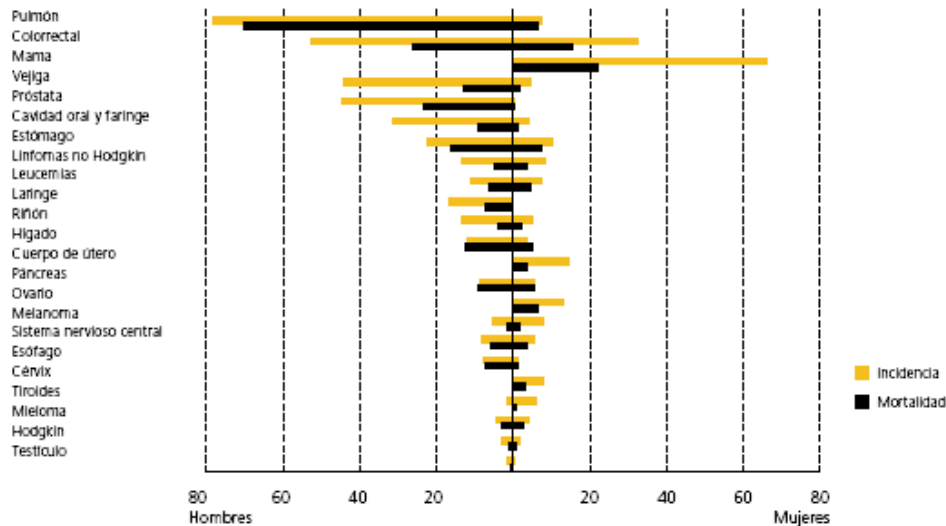


Gráfico 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en España por sexos. Adaptado de Ferlay y col. [13].

Desde el punto de vista histológico la mayoría de los casos de LNH son nodales (ganglionares), pero la enfermedad primaria extranodal (extraganglionar) actualmente acontece en un 20-30% de todos los casos. Las localizaciones extranodales más frecuentes son estómago, intestino delgado, piel y cerebro [5].

Los linfomas difusos son un 40% de los LNH y ocurren más frecuentemente en los hombres que en las mujeres, en la raza blanca que en la negra y en la edad media y avanzada de la vida. Los linfomas foliculares son un 20% de los LNH, y son dos veces más frecuentes en la raza blanca que en la negra, pero se dan por igual en ambos sexos. La mayoría de los nuevos casos de LNH son de grado intermedio (50%), seguidos de las de bajo grado (30%) y alto grado (10%) [5].

La enfermedad extranodal se ha incrementado más rápidamente que la nodal. Los porcentajes de incidencia se han incrementado 3-6,9% por año para la enfermedad extranodal en comparación con el incremento del 2,5% por año para los casos nodales, sufriendo mayor incremento en el cerebro y en otras áreas del sistema nervioso (224%) [5].

Histológicamente los LNH difusos son los que han sufrido mayor incremento en las dos últimas décadas, particularmente el linfoma difuso de células grandes y el inmunoblástico. El linfoma difuso de células pequeñas hendidas ha sido el único subtipo que ha disminuido, probablemente reflejando un cambio en el diagnóstico [4].

Las razones de estos incrementos son poco conocidas.

Como conclusión existe un aumento significativo de la mortalidad por LNH desde 1975 con una estabilización en la década de los 90 probablemente relacionado con el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) y con la mejoría de los tratamientos. Sin embargo la mortalidad por LH experimenta un descenso mantenido desde 1975 hasta 1998.

1.2 FACTORES ETIOLÓGICOS.

A continuación se exponen algunos de los factores de riesgo ya establecidos y otros que se postulan para el desarrollo de los LNH. Es importante remarcar que la mayoría de los factores de riesgo son aún desconocidos, aunque en los últimos años algunos estudios epidemiológicos han permitido identificar factores de riesgo asociados a los linfomas [14].

1.2.1 INMUNODEFICIENCIA Y AUTOINMUNIDAD.

La inmunodeficiencia, tanto primaria como adquirida, es el factor de riesgo conocido más fuerte que incrementa el riesgo de LNH. El LNH es la neoplasia más frecuente en jóvenes con ataxia-telangiectasia o síndrome de Wiskott-Aldrich, así como en niños con síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X o inmunodeficiencia combinada. No obstante, al parecer el virus de Epstein-Barr (VEB) parece ser un importante cofactor [15].

El riesgo de padecer LNH en pacientes infectados por VIH es más de 100 veces superior al de la población general. Estos linfomas son típicamente linfomas B de alto grado, principalmente linfomas difusos de células grandes y linfoma de Burkitt y frecuentemente ocurren en localizaciones extranodales, tales como el cerebro [15].

Otras causas de inmunodepresión también se asocian a LNH. Así, los pacientes tratados con fármacos inmunosupresores después de trasplante de un órgano sólido o de médula ósea, tienen incrementado el riesgo entre 30-50 veces [15].

Un aumento del riesgo de desarrollar LNH ha sido descrito igualmente en pacientes con enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico y enfermedad celíaca [16].

1.2.2 AGENTES INFECCIOSOS.

Los pacientes con SIDA tienen un riesgo elevado (50-100 veces) de presentar LNH. Tal y como se expone en el apartado anterior, la inmunodepresión causada por el VIH aumenta el riesgo de desarrollar linfomas B avanzados y de localización extranodal [17].

Además del VIH se ha postulado que diversos agentes infecciosos juegan un papel relevante en el desarrollo de los LNH como el VEB, el virus herpes humano tipo (VHH-8) [18], el virus linfotropo humano tipo I y II o virus de la leucemia de células T del adulto (HTLV-I y II), el *Helicobacter pylori* y el virus de la hepatitis C [18].

VIRUS LINFOTROPOS HUMANOS.

Diversos retrovirus humanos del grupo de los oncovirus y de los lentivirus se han asociado a enfermedades neoplásicas:

-Oncovirus E (oncovirus retrogénicos humanos).

- HTLV-I: asociado a leucemia-linfoma de células T del adulto, paraparesia espástica tropical y mielopatía. El HTLV-I es un retrovirus endémico en el suroeste de Japón y en la cuenca caribeña. La infección por HTLV-I, especialmente en niños, está fuertemente relacionada con la leucemia-linfoma de células T del adulto [17].

- HTLV-II: asociado a tricoleucemia T.

- HTLV-V: asociado a micosis fungoide y linfomas cutáneos de células T [19].

-Lentivirus: HTLV-III y IV (VIH 1 y 2).

VIRUS DE EPSTEIN BARR (VEB).

A diferencia del HTLV-I, el VEB es muy prevalente en la población adulta. El 90% de la población de los países desarrollados tienen evidencia de infección previa por el VEB en edades por encima de los 40 años. La asociación entre VEB y LNH está bien descrita en el linfoma de Burkitt y los LNH asociados a inmunodeficiencia. En la mayoría de los casos de linfoma de Burkitt de la variedad endémica (África y Nueva Guinea) se puede demostrar que contienen el genoma viral del VEB, pero la frecuencia disminuye a menos del 20% en la variedad esporádica (E.E.U.U. y países desarrollados). Aunque el VEB puede ser identificado en muchos linfomas, su impacto en la patogenia de los LNH se espera que sea pequeña, debido a la ubicuidad de la infección y a que la prevalencia de la infección no haya cambiado durante generaciones [20].

VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC).

La asociación del VHC con algunos linfomas B se ha demostrado en muchos casos y recientemente se ha demostrado la regresión de un linfoma esplénico de linfocitos vellosos después del tratamiento de la hepatitis C. Sin embargo, los hallazgos epidemiológicos que

intentan relacionar el VHC con los LNH de células B han sido contradictorios. La asociación entre VHC y LNH se ha encontrado en algunos estudios casos-control pero no en otros [21].

HELICOBACTER PYLORI.

La infección gástrica crónica por *H. Pylori* se ha ligado al desarrollo de linfomas de bajo grado: los linfomas de los tejidos linfoides asociados a mucosas (linfomas MALT), en especial del estómago. La seropositividad del *H. Pylori* está asociada a un incremento del riesgo en seis veces de padecer linfoma gástrico en estudios prospectivos [22].

1.2.3 ASOCIACIÓN FAMILIAR Y PREDISPOSICIÓN GENÉTICA.

Los antecedentes familiares de LNH y de otras neoplasias hematológicas, incrementan el riesgo de LNH en 2 a 3 veces. Los LNH poseen una asociación familiar en relación con defectos hereditarios del sistema inmune y, de forma más importante, por los determinantes medioambientales. Sin embargo, la predisposición familiar por si sola o, en asociación a factores ambientales o de exposición ocupacional, parece ocurrir sólo en una pequeña proporción de LNH (menos del 5%) y además no explica el incremento de incidencia de los LNH. Diversos estudios han demostrado que la exposición a pesticidas y al benceno es mayor entre individuos con historia familiar de cáncer. Por otro lado, se ha encontrado que el alcohol incrementa el riesgo de LNH solamente entre hombres con historia familiar de neoplasias hematológicas [23]. Estudios citogenéticos han demostrado que la mayoría de los LNH muestran anomalías cromosómicas y que algunas traslocaciones recíprocas están relacionadas con subtipos histológicos e inmunológicos. La identificación de familias con múltiples casos de neoplasias linfoides en familiares de primer y segundo grado hace pensar que existe un posible predisposición genética [23].

1.2.4 PESTICIDAS.

La asociación entre LNH y uso de pesticidas se ha observado repetidamente pero de forma inconsistente. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que el exceso de riesgo de los LNH está en relación con el uso de herbicidas del tipo del ácido fenoxiacéticos y triazinas, insecticidas organofosforados y fertilizantes químicos. Aunque la proporción de trabajadores de la agricultura en la población es pequeña y ha disminuido en el tiempo, la

exposición a pesticidas a través de los alimentos en la población general se ha incrementado debido al uso masivo en la agricultura [24].

1.2.5 ESTILO DE VIDA.

Poco se sabe acerca del papel de la dieta en la etiología de los LNH. El riesgo de LNH se ha ligado al consumo de proteínas de origen animal, grasa [25].

Varios estudios epidemiológicos han evaluado el papel del consumo del alcohol en la etiología de los LNH, pero los resultados son inconsistentes [25, 26].

El consumo de tabaco parece no tener relación con los LNH. La mayoría de los estudios no han demostrado asociación, o bien, un incremento modesto del riesgo, a menudo no significativo estadísticamente. Sin embargo, los fumadores con LNH se han relacionado con LNH de alto grado y foliculares [27].

En animales se ha podido demostrar que algunos colorantes del pelo contienen agentes mutagénicos y carcinogénicos. Muchos estudios han sugerido que el uso de tintes, particularmente los tintes permanentes oscuros, puede incrementar el riesgo, mientras que otros estudios no han podido demostrarlo [28].

1.2.6 TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA.

Existen hallazgos contradictorios entre la historia previa de transfusión sanguínea alogénica y el riesgo de LNH. La transfusión sanguínea se ha asociado con LNH de bajo grado y con LNH de alto grado extranodales. Este incremento del riesgo se ha atribuido a los efectos inmunosupresores de la transfusión sanguínea alogénica así como a la posible transmisión de microorganismos patógenos [29].

2. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO. BASES FUNCIONALES.

2.1 CÉLULAS MADRE. PROGENITORES Y PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS.

La célula madre o troncal es capaz de autorenovarse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las **células madre totipotenciales** son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las **células madre pluripotenciales** tienen la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las **células madre multipotenciales** son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria [30, 31].

Tradicionalmente se ha considerado a las células madre embrionarias como células pluripotenciales, a diferencia de las células madre adultas que se han caracterizado sólo como multipotenciales. Sin embargo existen células madre pluripotenciales en algunos órganos adultos con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias con lo que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor de la esperada [31].

Existen células madre adultas en la mayor parte de los tejidos adultos, incluidos el hematopoyético, neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas o pulmón. En modelos animales y cultivos in vitro se ha demostrado que las células madre adultas de un determinado tejido pueden diferenciarse en células de otras capas embrionarias, siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas, capaces de diferenciarse a hepatocitos, músculo cardíaco, endotelio o incluso neuronas [31].

En la médula ósea se han descrito diferentes tipos de células madre: hematopoyéticas (HSC), mesenquimales (MSC), las células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC) y las llamadas "*side population cells*" (SP) [35].

Aunque en la práctica se tiende a identificar las células madre por la expresión en su superficie del antígeno CD34 estudiado por citometría de flujo, también se pueden identificar mediante la evaluación de su capacidad funcional para emitir fluorescencia

cuando se incuban con determinados colorantes fluorescentes. Esto se basa en su mayor o menor capacidad para expulsar estos fluorocromos. Así se ha comprobado la existencia de 2 subpoblaciones de células primitivas: una con una fluorescencia muy tenue y otra con una emisión brillante. Las células hematopoyéticas primitivas tienen una mayor capacidad de eliminación del citofluorocromo *Hoechst 33342* y por tanto tienen una emisión débil de fluorescencia que se debe a la rápida expulsión del fluorocromo. Este flujo del colorante es mediado al menos por 2 transportadores que se unen con ATP y que son miembros de la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Estos son el ABCG2 (perteneciente a la subfamilia ABCG) y la glicoproteína P. La subpoblación de células madre de médula ósea que expresan el transportador ABCG2 y por tanto eliminan rápidamente el *Hoechst 33342* presenta un patrón característico en la citometría de flujo, que se denomina "*side population*" (SP), y define a una subpoblación de células madre muy primitiva, la mayoría de las cuales son CD34- (aunque se han detectado subpoblaciones CD34+) [32, 33, 34]. Las SP son capaces de diferenciarse a HSC, pueden integrarse en otros tejidos "*in vivo*" y diferenciarse en células especializadas como músculo cardíaco y endotelio [35, 36].

Las MAPC son células pluripotenciales con una capacidad diferenciadora similar a la de las células embrionarias e "*in vitro*" son capaces de proliferar sin aparente envejecimiento y diferenciarse a diversos tejidos. Tampoco expresan CD34 [37].

Las HSC son células madre multipotenciales capaces de dar lugar a todas las líneas hematopoyéticas y, en determinadas circunstancias, pueden ser más potentes de lo esperado, es decir, diferenciarse hacia tejidos derivados de distintas capas embrionarias (como músculo cardíaco, hepatocitos o tejido neuronal) no sólo fenotípicamente sino también funcionalmente y por tanto ser pluripotentes [38]. En general la ausencia de expresión de marcadores de línea, CD38-, c-kit, y la expresión de CD34 se ha asociado a poblaciones enriquecidas en HSC, aunque no se ha podido identificar los marcadores específicos de la célula madre hematopoyética multipotencial. Estas células madre no sólo contienen progenitores hematopoyéticos sino también células progenitoras endoteliales [38,39].

Las células sanguíneas se desarrollan a partir de las células "*madre*" hematopoyéticas multipotentes (HSC) y dan origen también al resto de los elementos formes de la sangre. Éstas dan lugar a células precursoras de tipo linfóide y mieloide, y las precursoras a las formas maduras de estas series. Las células hematopoyéticas reconocibles morfológicamente corresponden a las células más diferenciadas y se denominan precursores hematopoyéticos, mientras que las células más indiferenciadas o inmaduras, no reconocibles a través del microscopio óptico, se denominan progenitores hematopoyéticos y no poseen distintivos morfológicos precisos. Se trata de células mononucleadas pequeñas, agranulares, semejantes a pequeñas células linfóides cuya cuantificación se estima en 1 de cada 2000 elementos medulares nucleados (0,05%). Estas células pueden estudiarse mediante técnicas de cultivo "*in vitro*" y con el uso de

anticuerpos monoclonales contra antígenos de diferenciación de superficie; mediante estas técnicas se sabe que en el hombre existe una célula con capacidad de proliferación, diferenciación y autorrenovación denominada célula madre pluripotente o “stem cell”, también denominada célula madre linfomieloide (CFU-LM) o CFU-GEMM_{MegL} debido a su capacidad de producir *in vitro* colonias constituidas por granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos, osteoclastos y linfocitos T y B o CFU-S (célula formadora de colonias esplénicas en el ratón). A partir de la CFU-LM aparecen las células germinales pluripotentes (ilustración 1), a saber, la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide (CFU-M, CFU-Mix o CFU-GEMM). La célula germinal multipotente mieloide da lugar, estimulada por el microambiente, a otras poblaciones comprometidas hacia la diferenciación de una o varias de las líneas mieloideas, que pueden ser monopotentes o bipotentes; estas células se denominan **células formadoras de colonias (CFC)** o **unidad formadora de colonias (CFU)** de las que se conocen distintos tipos: BFU-E o CFU-E para la línea eritroide, CFC-GM, CFC-G y CFC-M para la granulomonocítica, CFC-Oe para los osteoclastos, CFC-Eo para los eosinófilos, CFC-Ba para los basófilos y BFU-Meg y CFU-Meg para los megacariocitos; las BFU-E y las CFU-Meg comparten un progenitor común [40-43].

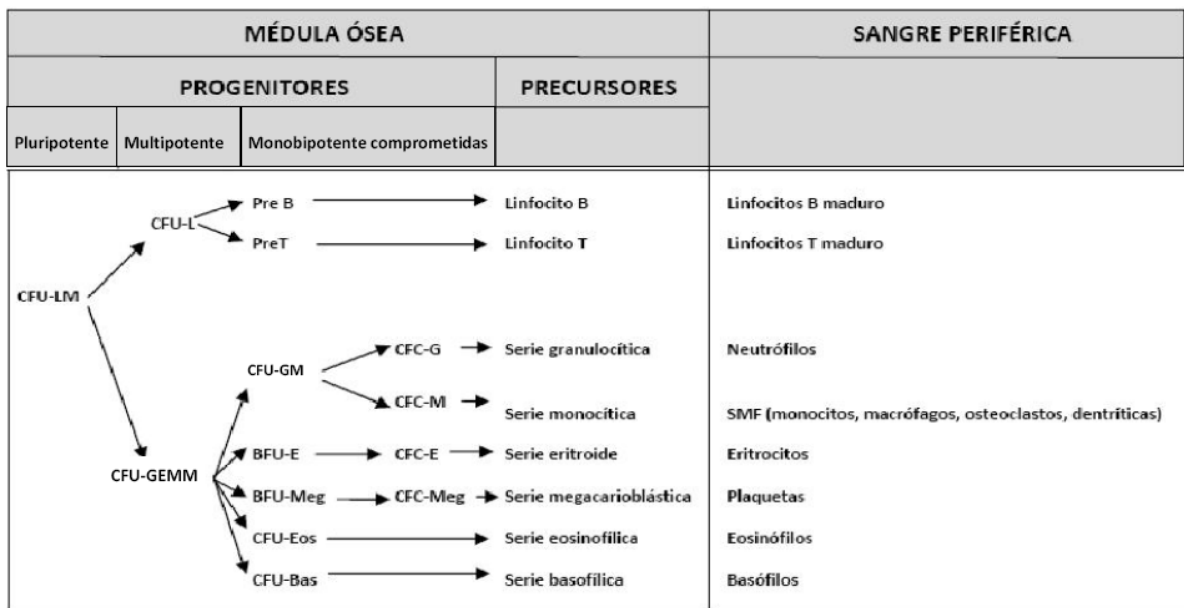


Ilustración 1. Progenitores hematopoyéticos, precursores hematopoyéticos y células maduras periféricas.

Las células progenitoras hematopoyéticas (inmaduras) no poseen distintivos morfológicos pero por medio de análisis inmunofenotípicos con marcadores de superficie o citoplasma se pueden identificar los distintos progenitores mieloideos. Las células progenitoras están englobadas dentro de una pequeña población medular muy heterogénea, que se caracteriza por expresar el antígeno CD34 y débilmente el CD45. El antígeno CD34 identifica las células *stem* (madre) hematopoyéticas, tanto con capacidad granulopoyética

como linfopoyética, y también da lugar a progenitores endoteliales con capacidad angiogénica [44].

Los progenitores hematopoyéticos pluripotentes se definen como células con capacidad de autorenovación y diferenciación en linajes hematopoyéticos maduros. Se caracterizan inmunofenotípicamente por ser CD34+CD90+ y faltarles la expresión de CD38 y HLA-DR [45].

Entre estas células CD34 se han identificado varios subtipos de progenitores en diferentes estadios madurativos. Uno de ellos es la célula **CD34+CD38- sin expresión de HLA-DR**, que se identifica como la célula madre común pluripotente o tronco (CFU-LM), con capacidad para dar lugar al progenitor multipotente. La diferenciación de estas células va asociada a la pérdida de CD34 y al inicio de la expresión de otros antígenos característicos de estadios de diferenciación más avanzados [45, 47].

Las células multipotentes mieloide (CFU-M o CFU-GEMM) y linfoide (CFU-L) expresan junto a CD34 el HLA-DR y son positivas para CD33 y CD19, respectivamente [46, 47].

En contraste con los progenitores multipotentes, los progenitores con linaje comprometido (unipotentes) se caracterizan por ser CD34+CD38+ con coexpresión de los antígenos restrictivos de línea: CD33 (mieloide), CD15 (mieloide tardío), CD64 (granulomonocítica), CD71 (eritroide), CD61 (megacariocítica), CD7 (células T) y CD19 (células B). Los progenitores mieloides comprometidos han sido definidos como células formadoras de colonias (CFCs) por su capacidad de formar colonias de células mieloides maduras (CFU-GM, BFU-E, CFU-Eos) en cultivos clonogénicos en soportes semisólidos clonogénicos tras 10-18 días de incubación [45, 46].

Cuando la célula pluripotente mieloide presenta compromiso hacia la línea granulomonocítica y pasa a CFU-GM, además del CD34 y CD33, expresa CD13, antígeno específico de línea y que conserva posteriormente durante toda su maduración hasta granulocito. La línea monocítica tiene como marcador el CD14, los progenitores eritroides comparten el CD34 y CD33, así como la glicoforina C (la glicoforina A la adquieren en estadios más avanzados). Los progenitores megacariocíticos comparten el CD34 y CD33 con el CD61 y el CD41, que se expresan durante toda su maduración. El promegacarioblasto adquiere el CD42, que junto con los otros marcadores, permite identificar la línea megacariocítica [47].

El antígeno HLA-DR se expresa en estadios muy tempranos de la célula CFU-GEMM, y desaparece en estadios todavía tempranos de la diferenciación, excepto en la serie monocito-macrófago, en la que permanece también en los estadios maduros [47].

Por otra parte, dentro de las células más indiferenciadas, se ha podido identificar un grupo celular que presenta, además de CD34, el antígeno *c-kit* o receptor para el FEC-1 factor estimulante de colonias-1), que se identifica como CD117 y el antígeno CD133 [47].

2.2 EL SISTEMA LINFOIDE.

2.2.1 LINFOPOYESIS PRIMARA Y SECUNDARIA.

Las células linfoides se encuentran mayoritariamente en la sangre, linfa y órganos linfoides como el timo, los ganglios linfáticos y el bazo. El número de linfocitos contenidos en el cuerpo humano es, aproximadamente de 2×10^{12} , por lo que su masa, en conjunto, es comparable a la del hígado u otros grandes órganos [48].

Los linfocitos que forman el sistema inmunitario de los vertebrados se diferencian a partir de células primordiales pluripotenciales y se organizan en tejidos y órganos, denominándose en conjunto sistema linfoide [48].

Durante la década de 1960 [48], se descubrió que había dos clases de linfocitos: los linfocitos T (T de timo), responsables de la inmunidad celular, y los linfocitos B (B de *bursa* en referencia a que en las aves se originan en la *bursa de Fabricio*, órgano linfoide asociado al intestino), responsables de la inmunidad humoral. Los linfocitos T se caracterizan por presentar un receptor de membrana (receptor de células T) de carácter proteico, constituido por dos subunidades que pueden ser de tipo α y β , o de tipo γ y δ , capaz de reconocer antígenos presentados en las moléculas de histocompatibilidad. Los linfocitos B maduros expresan en su superficie el antígeno CD20, fosfoproteína de membrana de función poco conocida, e inmunoglobulinas de superficie [48, 49].

En la década siguiente se describieron dos grandes subclases de células T [38]; una subclase la constituyen las células T-cooperadoras (*T-helper cells*) identificadas por la expresión de la molécula CD4 y que “ayudan” a que los linfocitos B produzcan una respuesta humoral. La otra subclase está integrada por linfocitos T capaces de destruir de manera directa células diana, conocidos como linfocitos T-citotóxicos y reconocidos por la expresión de la molécula CD8. Además, se reconoce otros tipos de linfocitos T con capacidad de regular y suprimir diversos aspectos de la respuesta inmunitaria [48, 49].

Las “células precursoras linfoides” B y T son blastos pequeños (linfoblastos) que pronto pierden la expresión de CD34 y se multiplican, para luego diferenciarse en linfocitos pequeños maduros [48, 49].

Las células precursoras de la serie B (linfoblastos B) se caracterizan por expresar los antígenos CD79a, CD43 y CD10 así como la enzima TdT (dioxinucleotidil-transferasa terminal) [49], pero en sus etapas iniciales no expresan el antígeno CD20. Estas células son

sometidas a un proceso de reordenamiento de los genes que codifican las cadenas de inmunoglobulinas (Igs), proceso en el que interviene la TdT y permite obtener, a partir de una célula “madre”, numerosas poblaciones de linfocitos B capaces de reconocer una gran variedad de antígenos. Los linfocitos B que como consecuencia de este proceso de recombinación finalmente reaccionan frente a antígenos propios, son eliminados por apoptosis. Igualmente los linfocitos T maduros se originan a partir de células precursoras T precursoras (linfoblastos T), que reordenan los genes que codifican el receptor de las células T [50].

Los linfocitos precursores de la serie T se caracterizan por expresar los antígenos CD7, CD43, y CD10 (de manera variable), así como la enzima TdT, pero en sus etapas iniciales no expresan los antígenos CD3, CD4 o CD8. Estas células son sometidas a un proceso de reordenamiento de los genes que codifican las cadenas del receptor de linfocitos T. Este proceso, en el que interviene la TdT, permite obtener, a partir de la célula madre, una gran variedad de células T capaces de reconocer antígenos muy diversos [50, 51].

Las células del sistema inmunitario se organizan en órganos y tejidos. Desde el punto de vista funcional, los órganos y tejidos linfoides se dividen en **primarios o centrales** (médula ósea y timo) y **secundarios o periféricos** (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a piel y mucosas) [50, 51].

En el embrión, se produce la **linfopoyesis primaria**. En ésta se generan linfocitos B y T maduros a partir de células “madre” precursoras (linfoblastos) que no entran en contacto con ningún antígeno. Ésta se inicia, al igual que el resto de la hematopoyesis, en el saco vitelino, y luego se traslada al hígado, bazo y timo y, finalmente, a la médula ósea, que es el único órgano con capacidad linfopoyética primaria en la vida postnatal, junto al timo [50, 51].

Los linfocitos fetales expresan CD7 pero son negativos para CD3, CD4 y CD8, es decir, carecen todavía de capacidad cooperadora, supresora o citotóxica; cuando entran en contacto con el timo sufren un complejo proceso que, por una parte, elimina por apoptosis las células con capacidad de reconocer antígenos propios y, por otra, determina que las células seleccionadas para sobrevivir maduren hasta formar las dos poblaciones presentes en el individuo adulto: linfocitos T CD3+CD4+ y linfocitos T CD3+CD8+. Las células T y B maduras, finalmente se establecen en áreas concretas (zonas B y zonas T) los órganos linfoides secundarios [50, 51, 52].

Los linfocitos maduros generados en los órganos linfoides primarios son células “vírgenes” que todavía no han entrado en contacto con ningún antígeno.

En la linfopoyesis primaria se generan linfocitos inmunocompetentes; dicha inmunocompetencia se adquiere cuando los linfocitos maduros forman genes funcionales para el receptor del antígeno T y para las cadenas pesadas y ligeras de las

inmunoglobulinas por reordenamiento de los segmentos genéticos V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante). Durante este proceso se formarán genes que codifican receptores de células T e inmunoglobulinas para antígenos extraños y para antígenos propios del organismo; en condiciones normales los primeros serán seleccionados positivamente y los segundos negativamente [52].

A la corteza tímica llegan los precursores de linfocitos T procedentes de otros órganos linfoides primarios y en su médula se diferencian a linfocitos T maduros. En el timo los linfocitos T sufren procesos de selección positiva (corteza) y negativa (médula) en los que intervienen diferentes células y de forma esencial las moléculas de histocompatibilidad que presentan antígenos propios para favorecer la eliminación de los linfocitos T autorreactivos y promover la maduración de los linfocitos T capaces de desarrollar una respuesta adecuada (ilustración 2), [50, 51, 52].

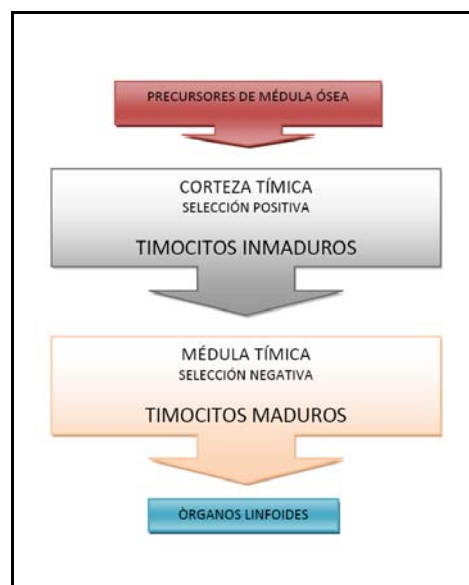


Ilustración 2. El timo. Organización funcional.

Después de estos procesos los linfocitos T emigran a los órganos linfoides secundarios donde podrán reconocer los antígenos de forma específica [50, 51, 52].

En el caso de los linfocitos B la selección negativa se produce en la médula ósea en la fase de linfocito B inmaduro, de tal manera que de la médula ósea sólo salen linfocitos B que no reconocen antígenos propios. En la médula ósea, estas células pasan por diferentes estadios, desde células primitivas B que todavía no han reordenado los genes de las inmunoglobulinas (y por tanto no expresan inmunoglobulinas) hasta el linfocito B maduro pero todavía “virgen”, que aún no han entrado en contacto con ningún antígeno. Durante este proceso los linfocitos adquieren diversos cambios en su fenotipo y aumentan la expresión de inmunoglobulinas de membrana.

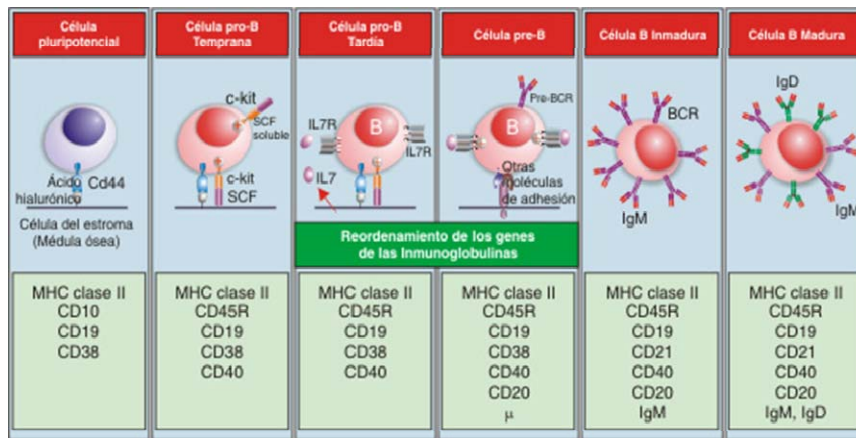


Ilustración 3. Diferenciación y cambios fenotípicos de los linfocitos B durante la linfopoyesis primaria (médula ósea). Son comunes en todos los estadios la expresión de MHC-II, CD19 y CD45. Es antígeno independiente. Adaptado a partir de J.R. Regueiro González y col. [40].

Finalmente los linfocitos B maduros recién formados migran a los **órganos linfoides secundarios** por vías sanguínea o linfática.

En la vida postnatal se produce la **linfopoyesis secundaria**. Con ella, se generan nuevas células linfoides a partir de linfocitos maduros, por estimulación antigénica y es por tanto antígeno dependiente. En la linfopoyesis secundaria, se generan linfocitos maduros que al entrar en contacto por un antígeno y ser estimulados por éste, se transforman en blastos linfoides grandes (centroblastos e inmunoblastos). Los centroblastos e inmunoblastos primero se multiplican, y luego se diferencian dando lugar a linfocitos maduros antígeno-específicos. Durante este proceso, los linfocitos B pueden adquirir mutaciones en los genes que codifican las inmunoglobulinas (mutaciones somáticas); por el contrario las células T no adquieren mutaciones en los genes que codifican su receptor. Este fenómeno permitirá seleccionar las poblaciones B con mutaciones que favorezcan una mayor afinidad en el reconocimiento del antígeno [50, 51, 52].

A finales de la década de 1980 se definió una tercera población de linfocitos: las células NK (*natural killer*) [48, 49], que se corresponden con los linfocitos grandes granulares de la sangre periférica. Estas células no expresan los antígenos propios de las células B o T como CD20 o CD3, pero comparten algunos antígenos con los linfocitos citotóxicos, como CD56 y CD57. Estas células tienen la capacidad innata de lisar células tumorales, células infectadas por virus y algunas células normales, sin necesidad de sensibilización previa. Es posible que los linfocitos NK compartan un ancestro común con las células precursoras T, pero no se descarta que las células NK deriven de las células “madre” hematopoyéticas pluripotentes medulares a través de células precursoras independientes.

LINFOPOYESIS SECUNDARIA EN LA ZONA B.

Para eliminar del organismo un antígeno extraño, el sistema inmunitario debe responder de forma específica, rápida y potente, y debe capacitarse para responder de forma todavía más rápida y eficaz ante una nueva intrusión de este antígeno. Este último fenómeno se conoce como “memoria inmunológica” [49]. Así, el sistema inmune se organiza para detectar y reconocer los antígenos extraños, seleccionar poblaciones linfoides que respondan de manera específica a los mismos y multiplicar dichas poblaciones de manera que sean capaces de responder de manera más intensa y rápida ante un segundo encuentro. Todos estos procesos requieren poblaciones celulares con funciones específicas.

Desde los tres meses de vida fetal, aparecen en los órganos linfoides secundarios acumulaciones esféricas de linfocitos denominadas folículos primarios. En la vida postnatal, por acción de un antígeno, los linfocitos de los folículos pueden estimularse y dividirse, transformándose en células linfoides grandes de carácter blástico, que se acumulan en el centro del folículo. La estructura resultante se denomina folículo secundario [49, 55].

En este tipo de folículos, se distingue una zona periférica denominada manto folicular, integrada en su mayor parte por linfocitos pequeños que todavía no han sufrido la transformación blástica, y una zona central denominada centro germinal caracterizada por la presencia de blastos linfoides grandes [54].

En algunos órganos linfoides, como en el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos y las placas de *Peyer*, puede existir por fuera del manto una segunda capa integrada por células linfoides de tamaño intermedio y citoplasma claro, denominada zona marginal. Esta zona representa probablemente una acumulación de células de memoria. El folículo linfoide constituye así la unidad funcional fundamental de la zona B [52, 53].

Los linfocitos pequeños B constituyen la población predominante de los folículos linfoides primarios y del manto folicular de los folículos secundarios. Éstos llegan a los folículos procedentes de la médula ósea [48, 49, 55].

Desde la médula ósea, el linfocito B maduro todavía “virgen” migra a los órganos linfoides secundarios donde entrará en contacto con los antígenos específicos, activándose, diferenciándose y generando células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas y células B de memoria [48, 49, 55, 56, 57, 60]. En el curso de la respuesta a un antígeno, los linfocitos “vírgenes” (células pequeñas no hendidas) pasan del manto al centro germinal para ser activados por la colaboración de las células T y proliferar. El centroblasto (célula grande no hendida) es el elemento proliferativo de la estirpe B en el centro germinal, y su

función es multiplicar el número de células que, durante la respuesta primaria tardía y la respuesta secundaria, van a responder a un antígeno [48, 49, 56, 57, 62]. El centrocito (célula pequeña hendida) constituye, junto con el centroblasto, la población predominante de los centros germinales de los folículos secundarios. Se originan a partir de los centroblastos y, por consiguiente, es posible observar en el centro germinal normal células de morfología y tamaño intermedios (centrocitos grandes o células grandes hendidas).

Los linfocitos B que han seguido el proceso de estimulación y transformación en el centro del folículo linfoide hasta el estadio de células no hendidas de gran tamaño, salen del centro del folículo y se sitúan en los cordones medulares, donde siguen aumentando de tamaño hasta transformarse en inmunoblastos. Los inmunoblastos pueden seguir el proceso de estimulación hasta las células plasmáticas o bien regresar al estado quiescente del linfocito B pequeño de memoria y pasar a integrarse al reservorio de linfocitos B recirculantes del manto (ilustración 4) [57, 58, 61, 62].

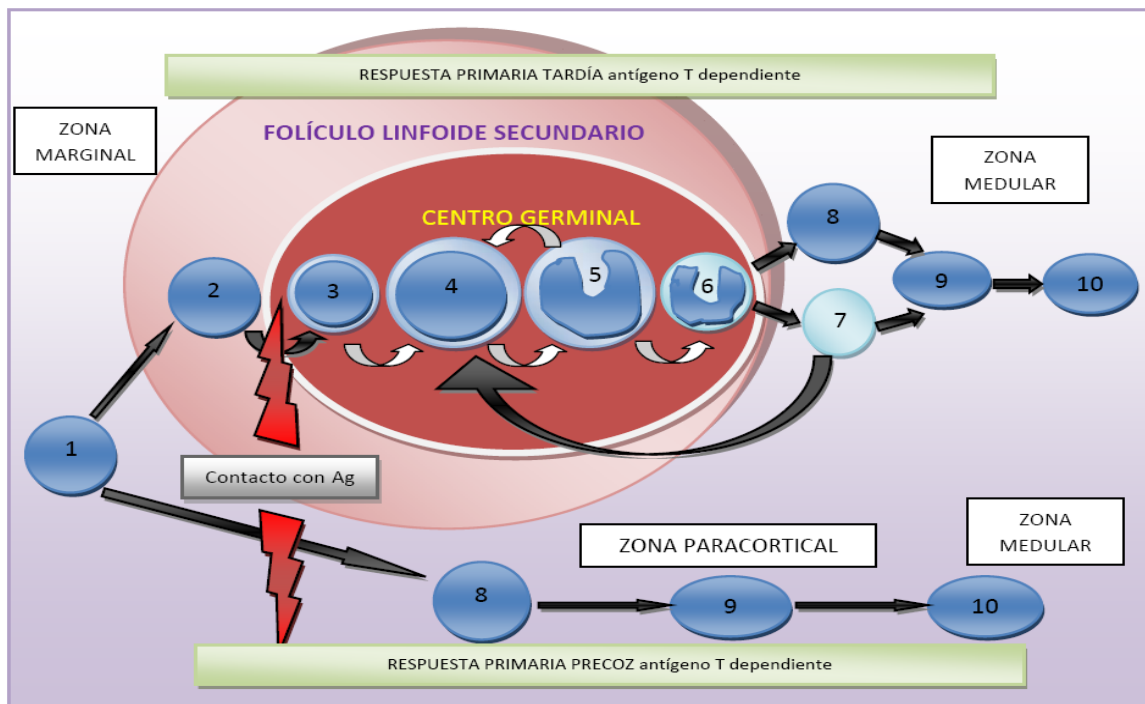


Ilustración 4. Representación esquemática de las fases de la linfopoyesis secundaria en el folículo linfoide secundario (respuesta primaria tardía T dependiente) y en la zona paracortical (respuesta primaria precoz T dependiente). 1 Linfocito B maduro "virgen" o "naive". 2 Linfocito del manto. 3 Célula pequeña no hendida. 4 Centroblasto (célula grande no hendida). 5 Célula grande hendida (centrocitos grandes). 6 Célula pequeña hendida (centrocitos pequeños). 7 Célula de la zona marginal. 8 Inmunoblasto B. 9 Célula linfoplasmocitoide. 10 Célula plasmática. **En la zona paracortical puede desarrollarse también una respuesta antígeno T-independiente (similar a la respuesta primaria precoz antígeno T-dependiente, pero sin contacto antigénico).**

El inmunoblasto también puede derivar directamente de linfocitos B "vírgenes", que en la zona T, serían activados por un antígeno y posteriormente se diferenciarían hacia células plasmáticas. Estas células plasmáticas residirían en el propio ganglio linfático y serían las

responsables de generar los anticuerpos de baja afinidad típicos de la fase inicial de la respuesta inmune primaria precoz.

La célula de la zona marginal constituye la población mayoritaria de la zona marginal de los folículos linfoides del bazo, placas de *Peyer* y ganglios mesentéricos. La relación de las células de la zona marginal con los otros tipos celulares de la línea B no es bien conocida aunque su capacidad para convertirse en célula plasmática o célula memoria si está bien establecida [58].

LINFOPOYESIS SECUNDARIA EN LA ZONA T.

En la zona T, tanto los linfocitos B como los T “vírgenes” pueden entrar en contacto con un antígeno y transformarse en blastos grandes (inmunoblastos) que son capaces de multiplicarse y de diferenciarse después en células antígeno-específicas. Sin embargo, mientras que las células B resultantes del proceso de activación antigénica son morfológicamente muy diferentes (células plasmáticas) de las células B “vírgenes” (linfocitos pequeños), las células T resultantes del proceso de activación antigénica son linfocitos pequeños morfológicamente indistinguibles de los linfocitos T “vírgenes” [56-58].

En la zona T se desarrolla la **respuesta inicial precoz** al antígeno, mientras que en la zona B se producen las respuestas secundarias (**respuesta inicial tardía y respuestas a nuevas exposiciones** al mismo antígeno) [48, 49, 54]. Los linfocitos T pequeños, constituyen la población predominante en la zona T, pero son también abundantes en los folículos linfoides, donde se sitúan de manera preferente entre los mantos foliculares y los centros germinales [48, 49, 62].

El inmunoblasto T es una célula grande en cuya superficie se detecta la expresión de los mismos antígenos que los linfocitos pequeños T; procede de la activación de los linfocitos T pequeños presentes en la zona T, pero no se conoce con exactitud su espectro de diferenciación posterior. Desde el punto de vista morfológico, los linfocitos T antígeno-específicos, que derivan del inmunoblasto T, son indistinguibles de los linfocitos T “vírgenes” [48, 49, 54].

2.2.2 EL SISTEMA LINFOIDE. FISIOLÓGÍA DE LOS LINFOCITOS.

FISIOLÓGÍA DE LOS LINFOCITOS B.

El papel fundamental del sistema linfóide es reaccionar frente a un antígeno, generando, a partir de linfocitos B “vírgenes”, células plasmáticas productoras de anticuerpos más o menos específicos. Durante la linfopoyesis primaria, y mediante el reordenamiento de los genes que codifican los segmentos variables de las cadenas de inmunoglobulinas, se obtienen numerosas clonas de linfocitos B vírgenes capaces de reconocer a una gran variedad de antígenos y, para que durante la linfopoyesis secundaria estos linfocitos B vírgenes respondan a la mayor parte de los antígenos, es esencial la colaboración de los linfocitos T; por ello, estos antígenos son conocidos como antígenos “T-dependientes” o timo-dependientes [48, 49]. Para otros antígenos, la colaboración de las células T no es esencial, por lo que reciben el nombre de antígenos “T-independientes” o timo-independientes [48, 49].

Respuesta B T-dependiente: respuesta primaria precoz y tardía.

Durante la linfopoyesis secundaria de las células B, la adquisición de grados crecientes de afinidad en los anticuerpos producidos por las mismas se basa en la selección de poblaciones linfoides que expresan receptores de alta especificidad para el antígeno mediante la generación de mutaciones somáticas en los genes que codifican los segmentos variables de las cadenas de inmunoglobulinas. Este proceso se halla directamente modulado por los linfocitos T colaboradores [48, 49, 62]. Por esta razón, los anticuerpos generados frente a antígenos “T-dependientes” poseen mayor afinidad. Las mutaciones sufridas durante este proceso, se reflejan en modificaciones en las zonas de reconocimiento del antígeno, las cuales, de manera progresiva, se adaptan con mayor precisión a los epítomos antigénicos ganando afinidad [62].

La respuesta a un antígeno “T-dependiente” de los linfocitos B pequeños vírgenes situados en la zona T que correspondería a lo que se denomina **respuesta primaria precoz**, y se iniciaría al segundo día de la llegada del antígeno y finalizaría a los 4-5 días [48, 49, 54, 48]. De manera simultánea se inicia la **respuesta primaria tardía**. El antígeno es reconocido como extraño por las células reticulares interdigitantes, es fragmentado, procesado y sus epítomos expuestos (presentados) en la superficie celular mediante los antígenos de histocompatibilidad de clase II (HLA-II) al receptor específico de las células T (TCR)[48, 49]; esta sucesión de eventos dura aproximadamente entre 1 y 2 días. Los linfocitos T activados en el

curso de este proceso se transforman en inmunoblastos T, que se multiplican y se diferencian dando lugar a diferentes subpoblaciones de linfocitos T pequeños cooperadores antígeno-específicos, algunos de los cuales se desplazarían al folículo linfoide. En el folículo linfoide les es presentado el antígeno por células linfoides B “vírgenes”. Estos linfocitos B, en una primera fase, habrían captado de manera específica al antígeno a través de las moléculas de inmunoglobulinas IgD o IgM que expresan en su superficie. Los linfocitos T cooperadores antígeno-específicos, al entrar en contacto con el antígeno presentado por los linfocitos B foliculares inducen la activación del linfocito B, iniciando el proceso que daría lugar a la aparición del centro germinal. A los 3 días de la llegada del antígeno, los linfocitos pequeños se transformarían primero en células pequeñas no hendidas y, posteriormente, en centroblastos y se multiplican rápidamente (ciclos celulares de 6-7 horas), adquiriendo mutaciones somáticas en los genes que codifican los segmentos variables de las cadenas de inmunoglobulinas. Posiblemente, la activación de bcl-6 a través de la inhibición de la actividad de p53 tenga un papel facilitador en la acumulación de estas mutaciones. Los centroblastos dan lugar a los centrocitos, que expresan inmunoglobulinas de superficie de tipo IgM, IgG o IgD con las que interaccionarán los antígenos. El antígeno, probablemente en forma de complejos “antígeno-anticuerpo”, es presentado a los centrocitos por las células reticulares dendríticas del centro germinal. Estas células poseen receptores para el complemento (CD21) y para el segmento Fc de las inmunoglobulinas (CD23), y por tanto, pueden fijar estos complejos. Es posible que el anticuerpo generado durante la fase precoz de la respuesta primaria intervenga en el proceso al formar complejos con el antígeno [48-58].

La exposición de los centrocitos a los antígenos permitiría, por una parte, eliminar las células con mutaciones que hayan disminuido la afinidad de sus inmunoglobulinas para el antígeno (selección negativa), y, por otra, favorecer la supervivencia y expansión de las células con mutaciones que hayan aumentado esta afinidad (selección positiva). La selección negativa se realiza por el hecho de que los centrocitos que reconocen en menor medida al antígeno son desplazados de la superficie de las células dendríticas por los centrocitos con inmunoglobulinas de mayor afinidad por el mismo [56, 57]. Al perder el contacto con el antígeno y la célula dendrítica, los centrocitos desplazados entran en apoptosis y son fagocitados por los macrófagos del centro germinal. Las células que continúan en contacto con el antígeno pueden eludir los mecanismos de apoptosis, quizás a través de la expresión del antígeno CD40, que sería reconocido por las células T CD4+ del centro germinal, que expresan un ligando específico [61]. Las células seleccionadas por este u otros mecanismos volverían a entrar en el ciclo celular, lo que les permitiría sufrir nuevas mutaciones en los genes de sus inmunoglobulinas, que podrían determinar un aumento de su afinidad, y su expansión clonal.

Esta sucesión de ciclos de expansión clonal y selección negativa y positiva de los centrocitos podría repetirse varias veces. Desde el punto de vista genómico, esto se traduciría, en un incremento creciente del número de mutaciones somáticas (hipermutaciones somáticas)

en las células supervivientes, en las zonas que codifican las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulinas. Al final de cada uno de estos ciclos de selección y expansión, los centrocitos resultantes expresarían inmunoglobulinas de afinidad creciente de forma que, en un centro germinal, al final del proceso, probablemente no existan más de 3 o 4 clones distintos de centrocitos, todos ellos con inmunoglobulinas altamente afines por el antígeno que inició la respuesta [56, 57]. Así pues, el centro germinal es una estructura que permite que los mecanismos de “selección natural” actúen a gran velocidad para asegurar la supervivencia y expansión de los elementos más “capaces”. En el curso de este proceso de selección, más del 90% de los centrocitos son eliminados por apoptosis.

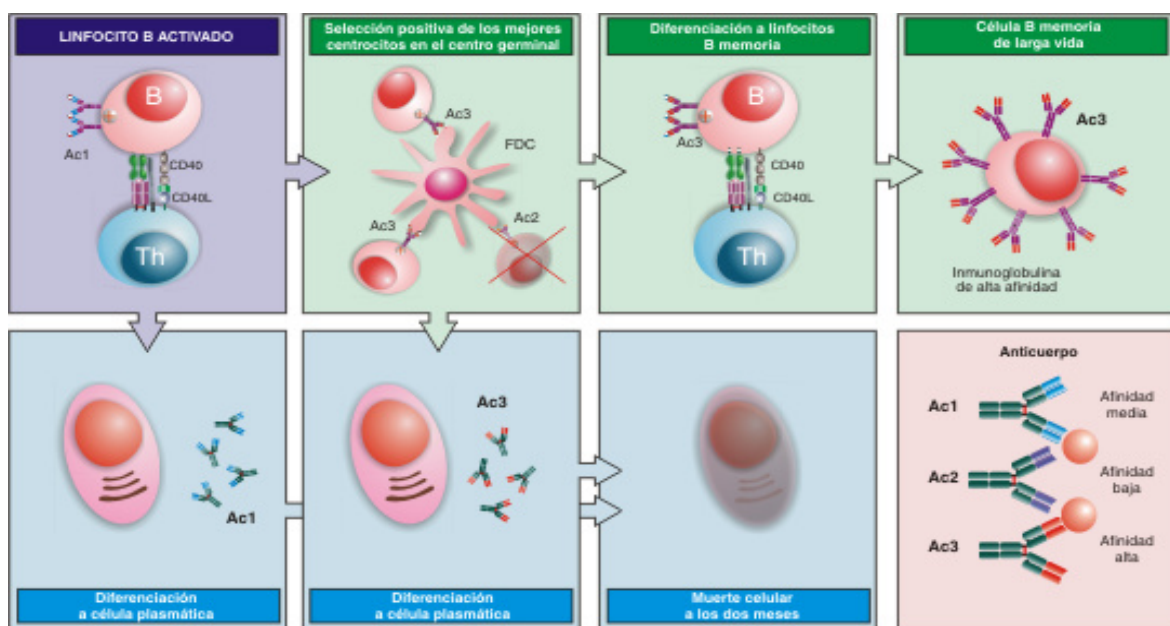


Ilustración 5. Proceso de selección positiva y diferenciación de los linfocitos B en el centro germinal durante la respuesta primaria tardía. Los linfocitos B activados pueden generar directamente células plasmáticas con inmunoglobulinas de baja o media afinidad o migrar al centro germinal donde pueden pulir su especificidad a través de mutaciones somáticas. Los que lo logran son seleccionados positivamente por las células dendríticas foliculares y abandonan el centro germinal para generar, dependiendo de señales externas, células plasmáticas o de memoria con inmunoglobulinas de alta afinidad; los que fracasan son eliminados por apoptosis. Adaptado a partir de J.R. Regueiro González y col. [40].

Algunos de los centrocitos resultantes de cada ciclo de este proceso pueden transformarse en células productoras de anticuerpos (células plasmáticas) en el mismo centro germinal, pero la mayor parte de los mismos emigrarán a la médula ósea para transformarse allí en oleadas sucesivas de células plasmáticas productoras de anticuerpos de afinidad creciente. Otros centrocitos se transformarán en células de memoria capaces de sobrevivir largo tiempo. El proceso de formación del centro germinal y la aparición de la primera oleada de células plasmáticas de alta afinidad dura entre 3 y 4 semanas, y es lo que se denomina respuesta primaria tardía [45, 48, 49]. Una vez ha finalizado la respuesta primaria y se ha

eliminado el antígeno, las células de memoria son capaces de reentrar en el centro germinal y reiniciar el proceso de expansión y selección por afinidad, si entraran en contacto de nuevo con el mismo antígeno. Este fenómeno se denomina “respuesta secundaria”. Existen datos que sugieren que una de las posibles expresiones morfológicas de las células de memoria podrían ser las células de la zona marginal de algunos de los órganos linfoides [58].

Respuesta B, T-independiente.

La respuesta a los **antígenos “T-independientes”** se llevaría a cabo en la zona paracortical, es similar a la respuesta primaria precoz frente a los antígenos “T-dependientes” pero sin contacto con antígeno; las células plasmáticas resultantes secretarían anticuerpos de baja afinidad, y se acumularían en la zona medular de los ganglios linfáticos [55, 56].

FISIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS T.

El conocimiento de los procesos madurativos que tienen lugar en la población linfoide T es mucho menor del que disponemos de los linfocitos B, probablemente debido al hecho de que la estructuración del tejido linfoide T no es tan elaborada como la del tejido B, por lo que las diferentes fases madurativas difícilmente pueden ser correlacionadas con aspectos morfológicos concretos.

La función del tejido linfoide T es por un lado, la de “transmitir” los sucesos inmunológicos al tejido linfoide B y, asimismo, velar por la eficacia y eficiencia del proceso desencadenado por la activación de la respuesta B y por otro, regular y dirigir los diferentes mediadores de la respuesta inmunitaria así como una participación directa en la lucha contra el agente extraño.

Posiblemente, para desempeñar esta función de forma adecuada, el tejido linfoide T ha tenido que dispersarse por todo el organismo, y estructurar zonas T alrededor de áreas vascularizadas donde poder detectar los antígenos (bazo, ganglios), o situarse entre las células de los epitelios de superficie que se hallan en contacto con el medio exterior (piel y mucosas) [48, 49, 54].

El inicio del proceso madurativo de los linfocitos T se realiza en el timo. Esta estructura está muy desarrollada en los fetos y recién nacidos, pero involuciona para desaparecer prácticamente en la vida adulta. El timo tiene la función de adecuar las características de los linfocitos T a las funciones que deben desempeñar. Si en el folículo linfoide el proceso se debía regir por el objetivo de obtener células con cada vez mayor afinidad por el antígeno, en el timo el objetivo es generar una población de linfocitos T efectiva en el

reconocimiento de antígenos extraños, y eficaz en su capacidad de modulación de la respuesta inmunológica [48-51].

La característica definitoria de los linfocitos T es el reordenamiento de los genes que codifican el receptor de células T. El TCR es una molécula de características similares a las de una inmunoglobulina (son, de hecho, proteínas con un origen común), y que ejerce una función esencial de reconocimiento [50]. En función del tipo de subunidades que forman el TCR, se definen dos poblaciones de linfocitos T:

- Los linfocitos T $\gamma\delta$ (receptor TCR1) constituyen una pequeña población (5% del total) y se sitúan en el timo, en el revestimiento de los sinusoides esplénicos y en los epitelios.

- Los linfocitos T $\alpha\beta$ (receptor TCR2), que son los más abundantes (95% del total), integran la mayoría de la celularidad de las zonas T. El reordenamiento $\alpha\beta$ sólo se adquiere cuando el reordenamiento $\gamma\delta$ no ha sido efectivo (es lo que sucede con más frecuencia). El proceso de reordenamiento de los genes que codifican las cadenas γ y δ en los linfocitos T $\gamma\delta$ o el de las cadenas α y β en los linfocitos T $\alpha\beta$, añade variabilidad a la molécula del TCR, lo que le permite reconocer un mayor espectro de antígenos.

La expresión diferencial de los antígenos CD4 y CD8 se asocia a la función, cooperadora o supresora respectivamente, desempeñada por los linfocitos T $\alpha\beta$. La expresión de CD4 permite el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad MHC II y, por tanto, la interacción con células presentadoras de antígenos y modulación de la respuesta B (de ahí el nombre, T-“*helper*” o “*cooperadoras*”). La expresión de CD8, por el contrario, permite reconocer los antígenos MHC I, expresados, por ejemplo, por las células epiteliales infectadas por un virus, lo que capacita al linfocito TCD8+ para lisar estas células (células T-“*citotóxicas*”). La respuesta citotóxica está destinada principalmente a la eliminación de los patógenos intracelulares [48-51].

Los péptidos derivados de los patógenos son presentados por moléculas MHC-I y son capaces de activar a los linfocitos T cooperadores (CD4+ o Th). Dependiendo de las citoquinas producidas por las células presentadoras de antígenos (lo cual depende del patógeno en cuestión), el linfocito T cooperador (Th0) se diferencia a células efectoras Th1 que median una respuesta Th1 inflamatoria o celular, destinada principalmente a favorecer la fagocitosis por los macrófagos y la eliminación de patógenos intracelulares; o una respuesta Th2 o humoral destinada principalmente a una activación de los clones específicos de linfocitos B (previamente activados por el antígeno). Esta respuesta humoral está destinada principalmente a la eliminación de patógenos extracelulares [48, 49, 54].

Los linfocitos T CD4+ se hallan en una proporción de 2:1 respecto a los linfocitos T CD8+, si bien esta proporción se altera con frecuencia en las infecciones virales y, especialmente, en la infección por el VIH. Los linfocitos T $\gamma\delta$ no suelen expresar ninguno de estos dos antígenos, y su función no es bien conocida [48-54].

2.2.3 CÉLULAS NK Y RECEPTORES.

Las células NK se definen como linfocitos citotóxicos, que participan en la primera línea defensiva frente a infecciones por algunos virus, parásitos, bacterias y células neoplásicas, promueven la activación de células del sistema mononuclear-fagocítico, favorecen el desarrollo de una respuesta Th1, y regulan la hematopoyesis. Por otra parte, pueden también intervenir en la respuesta contra determinados tumores e injertos [63-65].

Las células NK se desarrollan de un progenitor celular CD34+ en la médula ósea en presencia de citocinas como IL-15 y constituyen un linaje celular del sistema inmunitario especializado en atacar, sin sensibilización previa, células infectadas por virus y aquellas involucradas en procesos neoplásicos [63-65]. Debido a su producción temprana de citoquinas y a la capacidad de lisar células diana sin sensibilización previa, las células NK son componentes cruciales del sistema inmunológico innato [66].

Las células NK constituyen aproximadamente el 15% de los linfocitos circulantes. Fueron identificadas originariamente por su capacidad citotóxica y de lisar células tumorales. Aunque funcional y morfológicamente recuerdan mucho a los linfocitos T citotóxicos, se diferencian claramente de ellos tanto fenotípicamente como en la forma que tienen ambos de reconocer sus células dianas. Una de las principales características de los linfocitos NK es que para ejercer su actividad citolítica no necesitan una inmunización previa [66].

Desde el punto de vista de su papel en la respuesta inmune y su fenotipo, las células NK pueden dividirse en dos subgrupos principales en función de la expresión en la superficie celular de la molécula CD56 fuerte o débil [66]. La expresión débil de CD56 (CD56+) caracteriza a un subconjunto de células NK con actividad citotóxica natural, que además expresan de forma habitual y con alta densidad el receptor para la fracción constante de las inmunoglobulinas Fc-gamma III (CD16), y de forma frecuente receptores *killer cell Ig-like receptors* (KIR). Por el contrario, las NK con expresión elevada de CD56 (CD56++) tienen una expresión negativa o débil de CD16 y no suelen expresar KIR. A diferencia de las NK con expresión débil de CD56, las de expresión elevada no son citotóxicas, pero tienen la capacidad de producir abundantes citoquinas [66].

Marcador	Linfocitos T citotóxicos	Células NK
CD3	+	-
CD5	+	-
CD8	+	Algunas
CD2	+	+
CD16	Algunas	+
CD56	Algunas	+
CD57	Algunas	Algunas

Tabla 5. Inmunofenotipo de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos [66].

Por tanto, aunque clásicamente se han definido las células NK como linfocitos CD3-CD16+CD56+, hoy en día sabemos que a éstas, hay que sumarles una subpoblación de linfocitos NK CD16-CD56++ con una función fundamentalmente reguladora, y secretora de citoquinas, mientras que los NK clásicos poseen una función fundamentalmente de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Así podríamos definir claramente tres poblaciones:

- CD16+56+: son las NK mayoritarias
 - CD16+56-: minoritarias
 - CD16-56++: secreción de citoquinas.
- } Actividad ADCC

De esta manera se podría decir que las principales funciones de los linfocitos NK son la citolisis y la producción de citocinas. Dichas funciones están reguladas por un complejo equilibrio que se establece entre señales contrapuestas, activadoras e inhibidoras.

FUNCIONES DE LAS CÉLULAS NK.

Función citotóxica de las células NK.

Para que las células NK ejerzan su función citotóxica se requiere la identificación, a través de los receptores implicados, de las células diana. Entre estos receptores destacan receptores de activación y otro grupo de receptores que tienen como ligando moléculas HLA de clase I y que pueden ser de tipo inhibidor o activador (ilustraciones 6 y 8). En este fenómeno además intervienen ciertas citocinas y moléculas de adherencia facilitadoras de la interacción celular [83, 84].

Los mecanismos de citotoxicidad celular de las células NK pueden ser de dos tipos [83, 84]:

A. Citotoxicidad NK dependiente de anticuerpo (ADCC).

Las células NK son capaces de lisar células (blanco) que presentan anticuerpos de isotipo IgG unidos a algún componente de su superficie. Este reconocimiento se produce a través de la molécula CD16 en la superficie de las células NK al unirse a la fracción constante de la IgG en la célula blanco. El receptor CD16 transmite una señal de activación a la célula NK que, una vez activada puede ejercer su acción citotóxica liberando al medio perforinas y citocinas (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e, IL-3) capaces de activar otros linajes celulares importantes en la erradicación de infecciones y tumores. La transducción de la señal de activación se realiza a través de una proteína asociada covalentemente al CD16, que en muchos casos es la cadena δ del TCR.

B. Citotoxicidad NK independiente de anticuerpo (citotoxicidad natural).

Las células NK también son capaces de lisar células que no están recubiertas de anticuerpos. Para reconocer sus células diana de esta forma, las células NK utilizan un complejo sistema de receptores activadores (RA) e inhibidores (RI). Aunque no se conoce con detalle el funcionamiento de la citotoxicidad NK independiente de anticuerpo, el modelo más aceptado se basa en que las células NK funcionan combinando señales a través de receptores de activación e inhibición. Según este modelo la señal inhibitoria es dominante sobre la activadora, de forma que la célula NK lisará su diana sólo si está recibiendo una señal activadora en ausencia de señal inhibitoria o bien cuando la primera sea más intensa (ilustraciones 6 y 7).

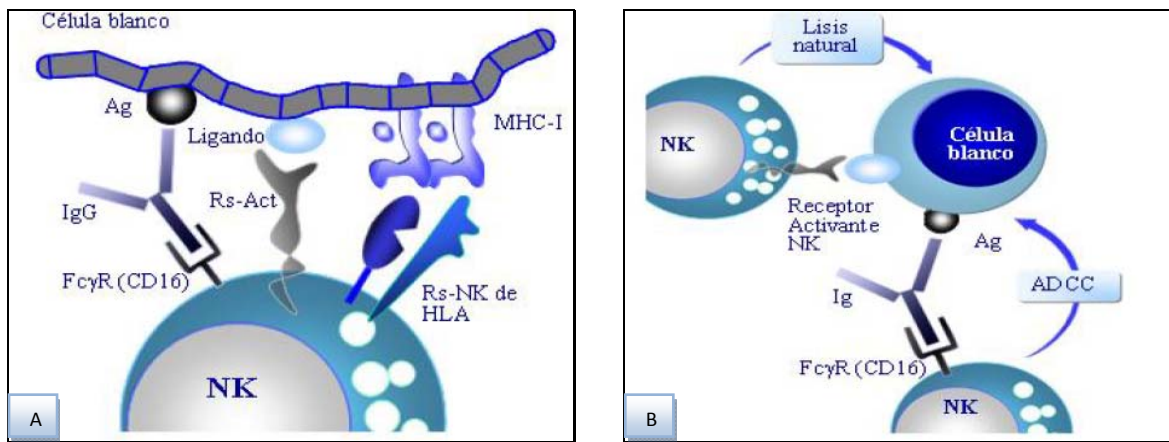


Ilustración 6. A. Vista general de los receptores de las células NK: CD16 (FcγR), receptor activador (Rs-Act) y receptores de moléculas HLA de clase I. B. Esquema de los dos tipos de citotoxicidad: citotoxicidad directa natural a través de un receptor activador y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) a través de CD16. Adaptado a partir de M. López-Botet y col. [72]

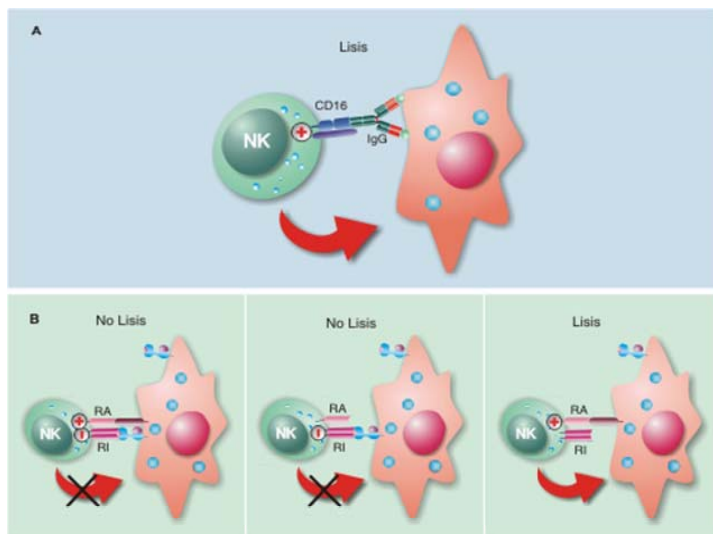


Ilustración 7 A) Mecanismo de ADCC. B) Mecanismo de citotoxicidad independiente de anticuerpos y modelo de doble receptor (RA: receptor activador y RI: receptor inhibidor) e interacción con HLA-I. Adaptado a partir de J.R. Regueiro González y col. [40].

Función secretora de las células NK.

Además de la acción citotóxica, las células NK tienen la propiedad de sintetizar y liberar diversos tipos de citoquinas de gran importancia en la regulación del sistema inmunitario, en la actividad de las propias células NK y en otras funciones como es la hematopoyesis [83].

RECEPTORES DE LAS CÉLULAS NK.

Para que las células NK desarrollen su función tienen que identificar a la célula diana. Para ello las células NK poseen diferentes tipos de receptores, aparte de CD16, con función de reconocimiento de moléculas en las células blanco y en consecuencia de activar la maquinaria citolítica y/o secretora de citoquinas [83]. Los receptores responsables de la actividad citolítica pueden ser activadores o inhibidores; existen un gran número de receptores activadores e inhibidores de las células NK. Estos receptores no se parecen al TCR ni están codificados por genes que sufran reordenamientos.

A. Receptores responsables de la citotoxicidad natural.

Son receptores activadores responsables de la citotoxicidad natural [83]. Los receptores de citotoxicidad natural, han sido descritos de manera mayoritaria por el grupo de *Moretta* [87] mediante ensayos en donde lo que se ha analizado es la capacidad de inhibir la lisis de determinadas líneas celulares bloqueando dichas molécula mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a dichos receptores. Entre estos receptores destacan tres: NKp46, NKp44 y NKp30.

B. Receptores NK específicos de moléculas HLA de clase I.

El descubrimiento de receptores presentes en células NK que reconocen moléculas de histocompatibilidad y que tienen funciones reguladoras de la función de estas células ha abierto una importante puerta para entender la biología de éstas células [71, 72, 77-83].

Los receptores NK específicos de antígenos HLA clase I son un grupo heterogéneo de glicoproteínas que pertenecen a distintas familias de moléculas y se expresan en células NK

pero también en ciertos subtipos de linfocitos T [73, 74]. Atendiendo a su estructura estos receptores se dividen en [77-83]:

1. Receptores formados por proteínas que pertenecen a la **superfamilia de las inmunoglobulinas: receptores NK tipo KIR** (*killer cell Ig-like receptors*).
2. Receptores formados por proteínas que pertenecen a la **superfamilia de las lectinas: receptores NK tipo lectina**.
3. Otros receptores formados por proteínas que pertenecen también a la **superfamilia de las inmunoglobulinas: Receptores NK tipo ILT** (*immunoglobulin like transcripts*).

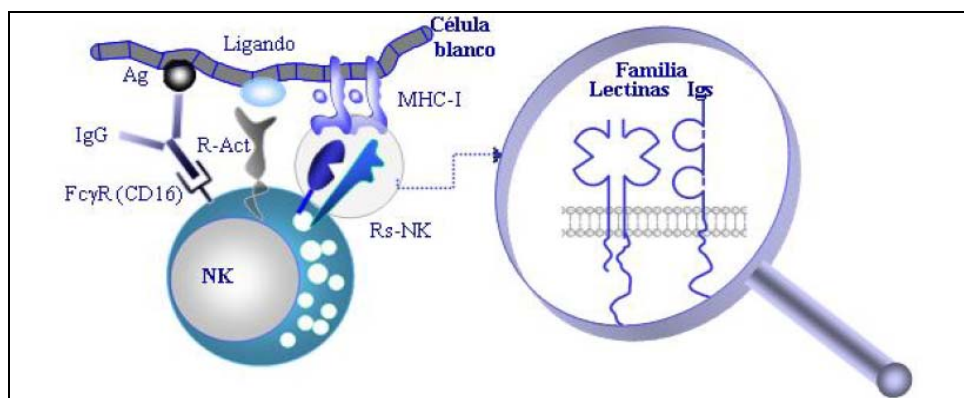


Ilustración 8. Receptores de las células NK y vista ampliada de los receptores de moléculas HLA de clase I. Estos receptores pertenecen a la familia de las lectinas (CD94 y NKG2D) y a la familia de las inmunoglobulinas (KIR y ILT) Adaptado a partir de M. López-Botet y col. [72]

1. Receptores NK pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas: receptores KIR.

Los receptores de la familia KIR son proteínas de membrana de tipo inmunoglobulina, que interactúan con moléculas HLA de clase I, regulando la función de las células NK [76-80]. Estos receptores tienen al menos un dominio similar a los de las inmunoglobulinas.

Están codificados por genes localizados en la región LRC (*Leukocyte Receptor Cluster*) en la región cromosómica 19q13.4 y se expresan en células NK y diversas subpoblaciones de linfocitos T (ilustración 9). Esta región se extiende a lo largo de 1 Mb y en ella se localiza una familia de 16 genes que a su vez ocupan cerca de 150 Kb. De estos receptores, los mejor conocidos son los KIR [83, 84].

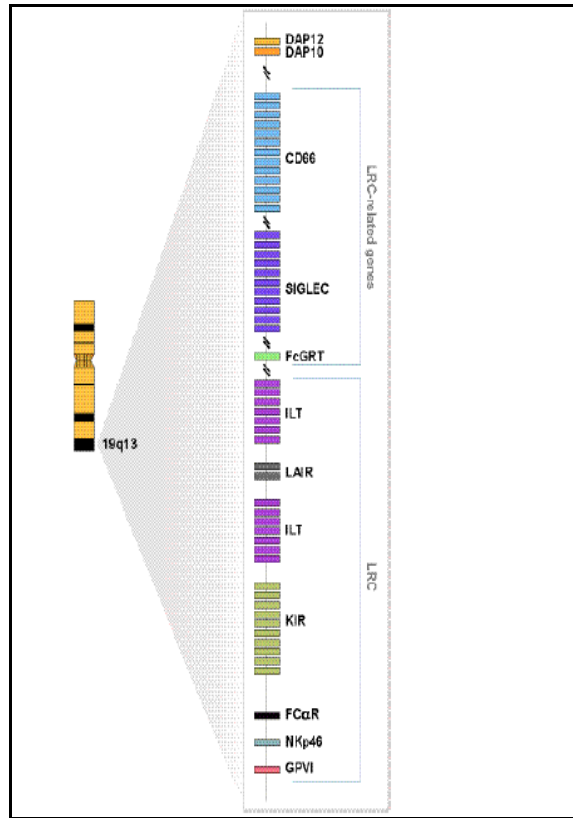


Ilustración 9. Mapa del complejo LRC. Adaptado a partir de Trowsdale y col. [85].

La región donde se encuentran localizados estos genes ha presentado contracciones y expansiones a lo largo de la evolución del genoma. El estudio de la coevolución KIR-HLA es importante debido a que se trata de genes poco conservados y de rápida evolución que se traduce en variabilidad [86]. Existe evidencia de que el sistema KIR es exclusivo de los primates, aunque se sabe que sistemas con funciones muy parecidas se han desarrollado en otros linajes de mamíferos como, por ejemplo, en los ratones [86].

El análisis de la herencia y estructura genómica de los genes KIR es complejo dado que se segregan en haplotipos conformados por presencia o ausencia de genes, que codifican para moléculas con propiedades inhibitoras o activadoras, y que al mismo tiempo presentan polimorfismos que se asocian con su especificidad y la frecuencia y densidad de expresión dependientes de dosis génica [65, 82]. Como consecuencia, existe una probabilidad baja de que dos individuos no genéticamente relacionados, seleccionados al azar, tengan el mismo genotipo de receptores KIR.

Según el número de dominios de tipo Ig extracelulares presentes en la molécula del receptor, a la sigla KIR, se añaden los sufijos 2D y 3D. La letra L (*long*) o S (*short*) se añade según que la cola citoplasmática de estas moléculas sea larga o corta respectivamente (ilustración 10). Estos receptores pueden ser de tipo inhibitor (generalmente asociados a colas citoplasmáticas largas) o de tipo activador (generalmente asociados a colas

citoplasmáticas cortas). En este último caso estos receptores se asocian con la molécula DAP-12 que transmite señales de activación [83, 84].

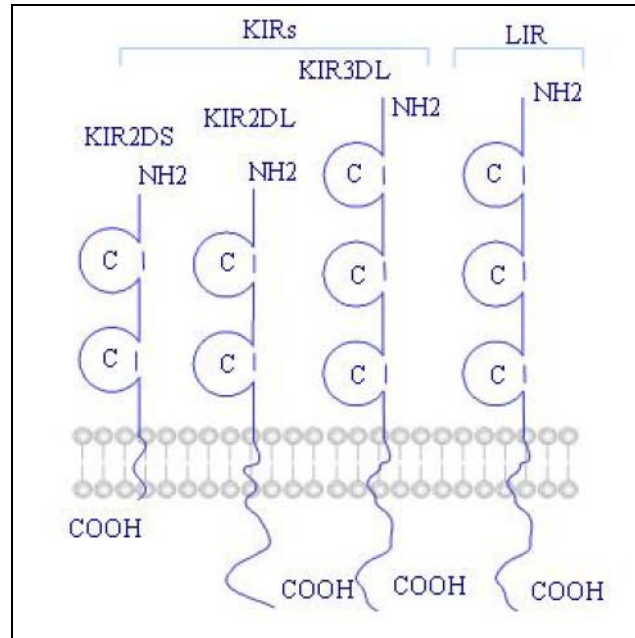


Ilustración 10. Principales receptores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas: KIR. Adaptado a partir de M. López-Botet y col. [72]

La distribución de estos receptores en las células NK no es homogénea y cada clon NK puede expresar uno o varios tipos de estos receptores. Se aprecian claras diferencias en la expresión de cada receptor cuando se estudian distintos individuos, y hay indicios de que el repertorio de estos receptores está regulado durante el desarrollo por factores genéticos, incluyendo presumiblemente la influencia del propio HLA [86]. A estos receptores se les ha dado la denominación de CD158 seguido de una letra (entre a y k) según el tipo de receptor.

Los KIR son proteínas de membrana altamente especializados en el reconocimiento de moléculas HLA de clase I, y de las distintas combinaciones de receptores KIR y ligandos HLA se derivan distintos fenotipos, importantes en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas, inflamatorias y neoplásicas [64, 65, 67, 68, 81, 82, 88].

Los receptores KIR también pueden encontrarse expresados en linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, y parecen ser característicos de células T CD8+ de memoria y pueden modificar la respuesta a antígenos [81,88]. La expresión de KIR inhibidores por linfocitos T durante una respuesta de activación puede ayudar a células T citotóxicas para enfocar su actividad sobre células infectadas. Las células T que adquieren receptores KIR activadores pueden ser perjudiciales, y lisar células sanas, si no se expresa el inhibidor adecuado. De manera

opuesta, aquellos linajes que expresan KIR inhibidores de la acción citotóxica pueden no ser efectivos para lisar células blanco.

Mecanismo de acción de los KIR. Vías de señalización intracelular.

Los KIR actúan a través de un mecanismo de citotoxicidad independiente de anticuerpo.

En condiciones fisiológicas normales, las células NK están programadas para matar y requieren señales inhibitorias de células normales para prevenir ataques no deseados. Los ligandos de KIR con mayor afinidad son moléculas HLA de clase I, en particular la región $\alpha 1/\alpha 2$ [89] y por orden de importancia las moléculas HLA-C, HLA-B y HLA-A [81]. La acción inhibitoria ejercida por los receptores inhibidores después de reconocer a su ligando (HLA clase I) en las células diana tiene gran importancia fisiológica, pues previene la destrucción de las células normales del huésped. La mayoría de las células del organismo expresan moléculas de HLA de clase I, y es precisamente cuando una célula deja de expresar moléculas de histocompatibilidad (por infecciones o transformaciones tumorales), cuando puede ser destruida por las células NK al no ser frenada su actividad por no actuar los receptores de tipo inhibidor [83]. Por tanto, la función de las células NK está controlada por el reconocimiento específico de moléculas HLA de clase I, de modo que la pérdida patológica de las mismas confiere susceptibilidad a la actividad NK [67-70].

Las células NK pueden expresar distintas combinaciones de estos receptores, cuyo repertorio varía entre diferentes individuos. Se acepta que durante su proceso de maduración la célula NK adquiere aleatoriamente al menos un receptor inhibidor para moléculas HLA propias, cuya acción prevalece en condiciones basales sobre los receptores activadores, contribuyendo a preservar la tolerancia frente a células autólogas normales. La influencia de las señales inhibitorias queda circunscrita al área de contacto intercelular, y la respuesta final de la célula dependerá de la intensidad relativa a la de las señales activadoras [75, 76].

El mecanismo de acción de los receptores activadores e inhibidores es el siguiente: un receptor innato activador reconoce un antígeno en la superficie de la célula diana mientras que otro receptor innato (KIR) de la célula NK reconoce el HLA de clase I; éste es un receptor inhibidor por lo que si hay HLA de clase I predomina la señal inhibitoria y la célula no es lisada (ilustración 11).

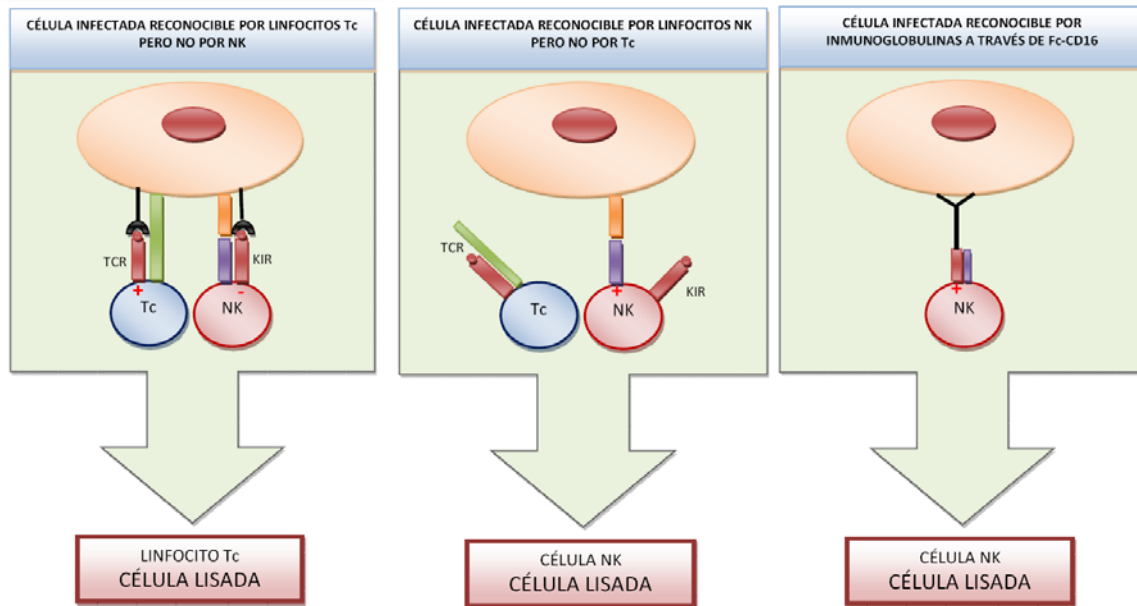


Ilustración 11. Los linfocitos NK lisan de manera innata células infectadas que han perdido la expresión HLA-I y que no pueden ser lisadas por los linfocitos Tc. Ambos respetarán a las células no infectadas bien porque no las reconocen (Tc) bien por inhibición (NK). A) Lisis mediada por Tc y HLA-I. La célula NK no actúa al estar inhibida por el reconocimiento del HLA-I por el KIR. B) Pérdida de las moléculas de HLA-I: se pierde la capacidad de citotoxicidad por Tc pero se produce la lisis por la célula NK gracias a la pérdida de la señal inhibitoria mediada por el receptor KIR y predominio de la señal activadora. C) Citotoxicidad NK a través de la señal activadora de CD16.

Los receptores inhibidores se caracterizan por tener una cola citoplasmática larga en la que aparecen motivos ITIM (*Inmunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) o de inhibición, al contrario que los receptores activadores que contiene motivos ITAM, de activación (*Inmunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Cuando el receptor KIR se une a su ligando (HLA-I), los ITIM traducen una señal de inhibición (desfosforilación de sustratos), mediante la unión de los motivos ITIM a las tirosinfosfatasas SHP-1 y SHP-2, y así producir inhibición de la citotoxicidad [81, 83, 84]. Cuando los receptores interaccionan con sus ligandos, los residuos de tirosina de los motivos ITIM se fosforilan por quinasas de la familia Src, propiciando que la fosfatasa SHP-1 se asocie al receptor [89-93]. Este fenómeno es un elemento crucial en la transmisión de la señal negativa. El ITIM N-terminal parece necesario y suficiente para reclutar SHP-2, mientras que el ensamblaje de SHP-1 requiere de ambos ITIM [81, 83, 84, 94].

Los KIR activadores (denominados KIR2DS y KIR3DS) carecen de motivos ITIM, pero tienen un aminoácido cargado (Lys) en su región transmembrana a través del cual se asocian con la molécula activadora DAP12 (*DNAX activation protein 12*), también miembro de la familia de las inmunoglobulinas; esta molécula también conocida como KARAP (*killer cell activating receptor-associated protein*) contiene dominios ITAM que transducen la señal activadora implicando a tirosinquininas (ZAP70 y syk) [81, 83, 84]. El receptor activador CD16 (mediador de la ADCC) también posee motivos ITAM.

La acción inhibitoria que ejercen las moléculas HLA sobre las células portadoras de los receptores KIR, estimula la tolerancia inmune cuando la expresión de HLA en la superficie celular se mantiene en niveles adecuados. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas, el nivel de expresión de moléculas HLA de clase I se ve alterado, como en aquellas provocadas por infecciones virales o procesos de génesis de cáncer, abatiendo la inhibición de las células NK vía señalización por KIR [64]. La actividad resultante de dicha pérdida de inhibición es la citotoxicidad y la producción de citocinas por parte de la célula NK. Este concepto se denomina pérdida de identidad o *missing-self* [95, 96]. En resumen, el balance entre señales activadoras e inhibitorias vía estimulación de moléculas KIR controla la actividad efectora de este linaje celular [65].

Nomenclatura y estructura de los genes KIR.

La nomenclatura más comúnmente empleada para clasificar los productos de los genes KIR deriva como ya hemos visto de su estructura proteica (2D o 3D) y las características de la cola intracitoplásmica (L o S). Se añade un último dígito que hace referencia a las diferencias entre estructuras codificadas por diferentes genes [97].

Las moléculas KIR también han sido nombradas de acuerdo con la nomenclatura CD (cluster de diferenciación), como CD158a, CD158b, etc, basado en la proximidad del orden centromérico o telomérico de los genes en el cromosoma 19. Esta nomenclatura CD no refleja la estructura, función, expresión o localización de las moléculas [84].

Los 16 genes que codifican los receptores KIR poseen regiones promotoras independientes localizadas hasta 500 pares de bases (pb) antes del primer codón de transcripción. La estructura básica de dichos genes comprende un arreglo básico que consiste en una secuencia de señal codificada por los dos primeros exones, un dominio tipo inmunoglobulina (D0, D1 y D2, siempre comenzando por N-terminal) correspondiente a cada uno de los exones siguientes (3 al 5), las regiones de unión y transmembrana se encuentran cada una en un exón (6 y 7, respectivamente) y por último la región intracitoplásmica en dos exones finales [84]. En esa región se han identificado dos pseudogenes KIR (2DP o 3DP), el gen 2DP1, el cual comparte alta similitud en su secuencia con los genes KIR de dos dominios, y 3DP1 que es similar a la estructura del 3DL3 en ciertas porciones del gen; se piensa que dichos pseudogenes son parte de genes KIR ancestrales.

Dada la cercanía entre los distintos genes KIR, por lo general segregan en haplotipos con alto desequilibrio de ligamiento que sugiere la presencia de asociaciones semiconservadas.

Tradicionalmente se distinguen dos grupos de haplotipos: el grupo A (que contiene principalmente genes de inhibición) y el grupo B (con mayor número de genes activadores), lo cual genera diversidad de asociaciones de presencia-ausencia de genes y de polimorfismos entre los presentes en cada genotipo. Cabe resaltar que la región se

encuentra regulada por ciertas señales genómicas que aseguran recombinación de genes homólogos entre haplotipos; así, la región donde se encuentra el complejo génico está flanqueada por genes conservados (3DL3 y 3DL2 en las regiones centromérica y telomérica del transecto, respectivamente, así como 3DP1 y 2DL4 en los límites de la región de recombinación recíproca), cuya posición y permanencia en los haplotipos es prácticamente universal [84, 88].

Por lo que respecta a su especificidad, los receptores KIR2D mejor caracterizados reconocen alelos de HLA-C. El receptor KIR3DL1 reconoce alelos de HLA-B que presentan el determinante Bw4 en los residuos 77-83 del dominio $\alpha 1$ [98, 99]. Por otra parte el receptor KIR3DL2 se ha implicado en el reconocimiento de los alelos HLA-A3 [100, 101]. Los péptidos unidos a la molécula HLA de clase I influyen en la interacción con los receptores KIR2D y KIR3D [102-104].

En la siguiente tabla (tabla 6) se resumen la nomenclatura, estructura, función y ligandos de los productos proteicos del sistema KIR.

Tabla 6. Receptores de la familia KIR. A: encontrado en haplotipos A y B; B: encontrado en haplotipos B únicamente; C: gen conservado en la mayoría de los haplotipos.

KIR	NOMBRE ALTERNATIVO	HAPLOTIPO	FUNCIÓN	LIGANDO	SEÑALIZACIÓN
KIR2DL1	CD158a p58.1	A	INHIBICIÓN	HLA-C2	ITIM
KIR2DL2	CD158b p58.2	B	INHIBICIÓN	HLA-C1	ITIM
KIR2DL3	CD158b p58.2	A	INHIBICIÓN	HLA-C1	ITIM
KIR2DL5	Ninguno	B	INHIBICIÓN	Desconocido	ITIM
KIR3DL1	p70	A	INHIBICIÓN	HLA-Bw4	ITIM
KIR3DL2	P140	C	INHIBICIÓN	HLA-A	ITIM
KIR3DL3	Ninguno	C	INHIBICIÓN	Desconocido	ITIM
KIR2DS1	CD158a p50.1	B	ACTIVACIÓN	HLA-C2 (Cw4)	DAP12
KIR2DS2	CD158b p50.2	B	ACTIVACIÓN	HLA-C1	DAP12
KIR2DS3	Ninguno	B	ACTIVACIÓN	Desconocido	DAP12
KIR2DS4	PAX p50.3	A	ACTIVACIÓN	HLA-C2 (Cw4)	DAP12
KIR2DS5	Ninguno	B	ACTIVACIÓN	Desconocido	DAP12
KIR2DL4	Ninguno	C	ACTIVACIÓN	HLA-G1	Desconocido
KIR3DS1	Ninguno	B	ACTIVACIÓN	Desconocido	DAP12

Genotipos KIR y enfermedad.

Una característica importante de los genes KIR es la falta de conservación entre diferentes especies y su rápida evolución [105]. El genotipo homocigoto AA se encuentra en aproximadamente el 56% de la población japonesa mientras que, en individuos aborígenes de Australia se encuentra en 15%. Aunque esas frecuencias podrían considerarse en el contexto de las frecuencias de los ligandos HLA de clase I, estas diferencias sugieren que diferentes poblaciones pueden tener sistemas de regulación de la actividad de células NK con propiedades funcionales particulares.

Si la evolución de los genes KIR ha estado determinada por la presencia de ciertos patógenos, es de esperar que parte de su diversidad correlacionara con la resistencia o susceptibilidad a ciertas enfermedades infecciosas. En este contexto, diversos estudios han demostrado la presencia de combinaciones específicas entre los genes KIR y sus ligandos HLA que parecen influir el curso clínico de diferentes enfermedades. A pesar que los datos genotípicos sugieren asociación con diversas enfermedades, para otras muchas no existe evidencia funcional de relevancia de la actividad NK en su patogenia.

Por un lado, los haplotipos homocigotos AA tienen tendencia a tener respuestas atenuadas mientras que los haplotipos homocigotos BB tienen tendencia a tener respuestas exacerbadas, ya que en los primeros existe un predominio de genes KIR inhibidores mientras que los segundos tienen un repertorio de activadores más amplio. Los genotipos que contienen menos receptores inhibidores pueden aparecer como tendentes a una mayor activación, ya que pocas clonas de células NK podrían estar bajo el control de los receptores inhibidores.

Se han propuesto modelos de combinaciones específicas KIR-HLA que determinan la tendencia activadora o inhibidora de las células NK y que, además, determinan la susceptibilidad o resistencia o modifican el curso clínico de ciertas patologías [67, 106, 107]. Así, se han documentado asociaciones interesantes entre el KIR3DS1 y un subgrupo de alelos HLA que tienen el epítipo compartido Bw4 con la progresión lenta de la infección por VIH [108]. En el caso de infección por virus de hepatitis C, se ha descrito que la homocigocia para HLA-C del grupo 1 y la presencia de KIR2DL3 se asocia con la eliminación espontánea de la infección. Las combinaciones de ciertos genotipos KIR-HLA también se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Como ejemplo está la combinación KIR2DS1 y/o KIR2DS2 adicional a la homocigocia de un grupo de HLA-C que favorece la susceptibilidad a artritis psoriática [109]. De manera similar, la combinación de KIR2DS2 con HLA-C1, en ausencia de HLA-C2 y Bw4 determina la susceptibilidad a diabetes tipo 1 en población caucásica [110].

En los últimos años se ha hecho énfasis en la importancia de los genotipos KIR en la supervivencia de los injertos en el trasplante de órganos. Aunque hay diferencias significativas en los resultados de los genotipos KIR como marcadores de la supervivencia de los injertos, se ha demostrado que la incidencia de enfermedad de injerto contra huésped es mayor en receptores que reciben médula ósea de donantes HLA-idénticos, pero que muestran diferencias en el genotipo KIR. Adicionalmente, se ha encontrado una correlación entre menor supervivencia y diferencias en los genes KIR3DL1 o KIR3DS1 en trasplante de progenitores hematopoyéticos entre individuos HLA-idénticos [111, 112]. Por otro lado, la presencia de KIR3DL1 y su ligando Bw4 se asocia con menor mortalidad y la presencia de KIR2DS3 como protector para el desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped [113]. Así pues existe controversia en relación con las combinaciones específicas entre genes KIR y HLA que determinan la susceptibilidad o resistencia a diferentes tipos de enfermedades infecciosas, inflamatorias y tumorales.

Genotipos KIR y trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Estudios recientes han demostrado que las células NK influyen en el resultado del trasplante de progenitores hematopoyético haploidéntico de forma importante, con resultado favorable cuando las células NK son aloreactivas en dirección donante-receptor, en base a la teoría de pérdida de identidad o *missing self* [111, 114-116].

El 100% de los individuos poseen receptores KIR2DL2 y/o KIR2DL3 específicos para HLA-C1, por tanto los individuos que tengan alelos HLA-C1, poseerán células NK aloreactivas contra individuos que no expresen los alelos HLA-C1. De igual forma entre el 85% y el 99% (según poblaciones) de los individuos poseen el receptor KIR2DL1 para HLA-C2. Si estos individuos poseen alelos HLA-C2 en su tipaje HLA, tendrán células NK aloreactivas contra células de otro individuo que no expresen alelos de HLA-C2. Finalmente, aproximadamente el 90% de los individuos poseen receptores KIR3DL1 para alelos HLA-Bw4; en éstos, los que tengan alelos HLA-Bw4 en su sistema HLA tendrán células NK aloreactivas contra células de otro individuos que no expresen alelos HLA-Bw4 [97, 98, 111, 114-116]. Aprovechando estas características de aloreactividad NK en dirección donante-receptor, esta aloreactividad ha demostrado ser un factor crucial en el resultado del trasplante haploidéntico [111, 114-116]. Se reduce el riesgo de recaída leucémica, no causa enfermedad injerto contra huésped e incide marcadamente en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en diversas series [116].

Además se produce una protección contra infecciones mediada por receptores KIR de tipo activador. Estos receptores podrían aumentar la secreción de citoquinas de las células NK y producir citotoxicidad contra las células infectadas por un patógeno en el contexto del modelo *missing self* [108, 117].

Como conclusión, hoy día el tipaje KIR es indispensable para seleccionar el mejor donante HLA compatible y el trasplante haploidéntico se ha convertido en una opción viable en pacientes con leucemia candidatos a trasplante.

2. Receptores tipo Lectina C.

Estos receptores tienen como característica común dominios de tipo lectina y son por tanto proteínas sin relación evolutiva con la familia de las inmunoglobulinas. Todos estos receptores son glicoproteínas de membrana de tipo II, pertenecen a la superfamilia de las lectinas de tipo C y se expresan en la membrana como homodímeros unidos por puentes disulfuro [118-120].

Los genes que codifican estos receptores están agrupados en una región del cromosoma 12p13.1 denominada NKC (*NK Complex*). Existen varios receptores de esta familia y al igual que con los KIR, existen receptores activadores e inhibidores.

Receptores CD94-NKG2: el receptor activador NKG2D y las moléculas MIC.

El sistema CD94-NKG2 constituye otro tipo de receptores de células NK de tipo inhibidor implicados en el reconocimiento del HLA, y más concretamente del HLA-E.

Estos receptores son heterodímeros formados por dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente: una cadena común (CD94) unida por un puente disulfuro a otra proteína de la familia NKG2 [118-120]. Ambas pertenecientes a la familia de las lectinas tipo C. Mientras que CD94 está codificado por un gen único, esencialmente monomórfico [121], hay tres genes que pueden codificar las proteínas de la familia NKG2: NKG2A, NKG2C y NKG2E [122, 123]. El procesamiento alternativo de los genes NKG2A y NKG2E da lugar a las proteínas NKG2A o B y NKG2E o H, respectivamente.

Los receptores NKG2 difieren entre sí en la estructura de las regiones extracelular y citoplasmática [122-124]. CD94 posee una región citoplasmática muy corta, carece aparentemente de capacidad para transducir señales [121]. Su función primordial parece ser la de permitir el ensamblaje y transporte de los receptores NKG2 a la superficie celular [118].

El heterodímero CD94-NKG2A es el mejor conocido y tiene una función inhibitoria, al igual que CD94-NKG2B mientras que CD94-NKG2C, CD94-NKG2E y CD94-NKG2H tienen funciones activadoras (tabla 7).

Al igual que los KIR, los receptores inhibidores tienen colas citoplasmáticas con motivos ITIM y los receptores activadores se ayudan de una tercera proteína (DAP12) que contiene

motivos ITAM. CD94/NKG2A se asocia a tirosinfosfatasas (como SHP-1) a través de los motivos ITIM de la subunidad NKG2A [125, 126]. Por el contrario, la asociación de CD94 a NKG2C, homólogo a NKG2A pero carente de motivos ITIM, constituye un receptor activador capaz de unirse a la molécula adaptadora DAP12 [127, 128], que tiene motivos ITAM en su región citoplasmática y que transmite señales activadoras, implicando a otras tirosinquininas (ilustración 12).

Los clones NK expresan CD94/NKG2A o CD94/NKG2C, aunque hay indicios en los que la misma subpoblación de células NK puede presentar ambos tipos de receptores [129]. El ligando para CD94/NKG2A, CD94/NKG2B y CD94/NKG2C es HLA [130-133] mientras que se desconocen los ligandos para NKG2E y NKG2H.

Tabla 7. Receptores CD94/NKG2.

RECEPTOR	GEN	FUNCIÓN	LIGANDO
NKG2A	NKG2A	INHIBIDORA	HLA-E
NKG2B	NKG2A	INHIBIDORA	HLA-E
NKG2C	NKG2C	ACTIVADORA	HLA-C
NKG2E	NKG2E	ACTIVADORA	??
NKG2H	NKG2E	ACTIVADORA	??

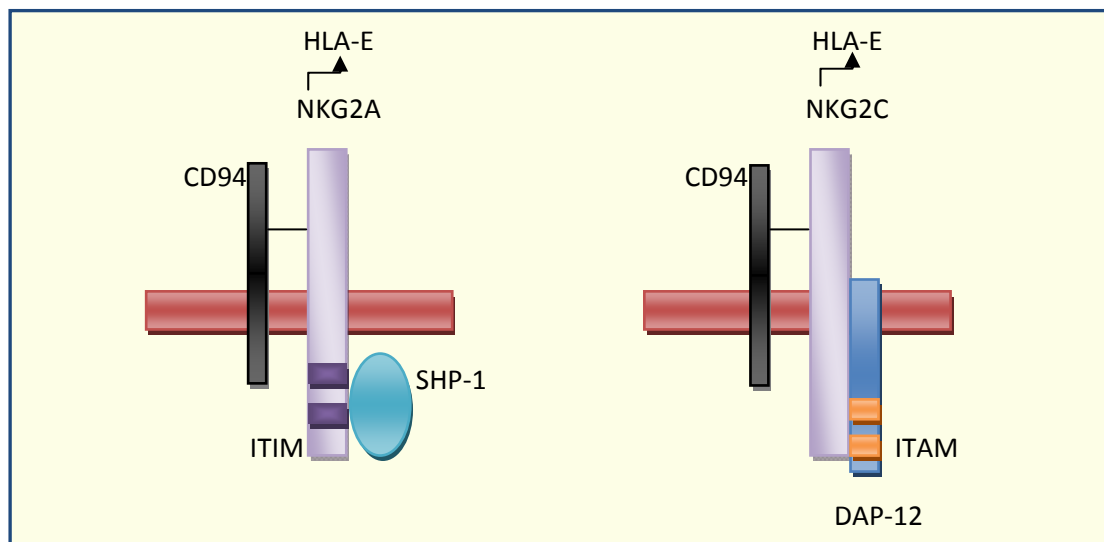


Ilustración 12. Estructura de los receptores CD94/NKG2.

Otra lectina de tipo C denominada NKG2D es un receptor claramente diferenciado y no pertenece estrictamente a la familia NKG2. Los receptores NKG2D se expresan en células NK y en subpoblaciones de linfocitos T, y están implicados en el reconocimiento de moléculas HLA de clase I [83, 136]. NKG2D no forma dímeros con CD94 [122-124] y es un

receptor activador que, como casi todos los receptores activadores, se une a una proteína adaptadora (DAP 10) que transduce la señal de activación al interior celular [134]. El ligando de NKG2D son las proteínas MIC (*MHC Class I Chain-related*), parientes lejanos de las moléculas HLA. Las moléculas MIC están codificadas por genes situados dentro del complejo HLA y aunque la homología de las secuencias aminoacídicas entre MIC y HLA es pobre, la estructura tridimensional de ambos tipos de moléculas es parecida. MIC se expresa fundamentalmente en situaciones de estrés celular en células epiteliales [134, 135] (por ejemplo altas temperaturas) y de esta manera la célula diana llama la atención de las células NK que pueden activarse a través de NKG2D (ilustración 13).

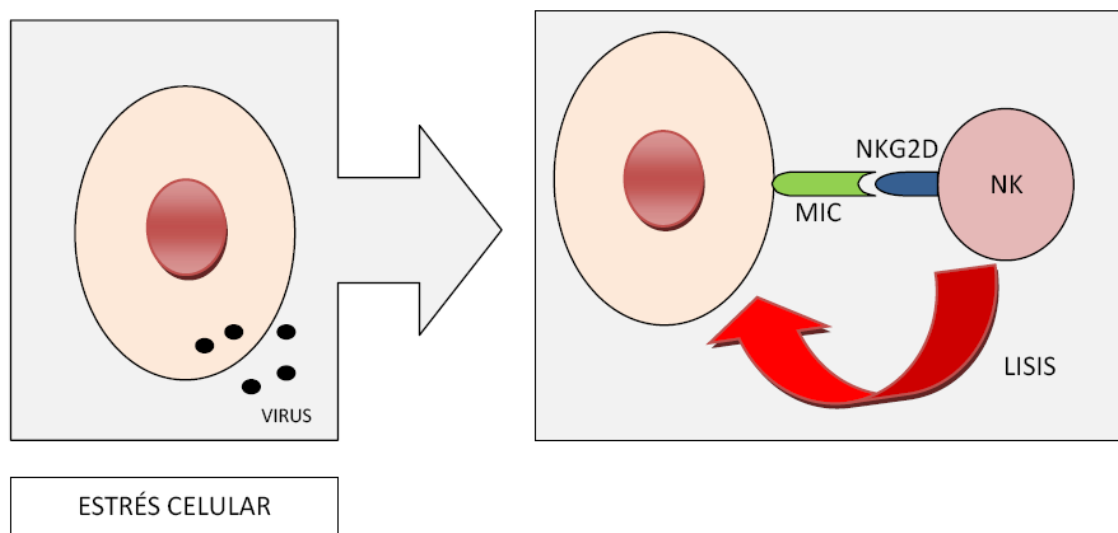


Ilustración 13. En situaciones de estrés o de ciertas infecciones víricas, las células diana inducen la expresión MIC para “llamar la atención” de las células NK que se activan y las lisan.

3. Otros receptores inhibidores en leucocitos.

Otros miembros de receptores, igualmente pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, son los denominados ILT (*Immunoglobulin Like Transcripts*) o LIR (*Leukocyte Ig-like Receptors*). También reconocen moléculas HLA de clase I, fundamentalmente moléculas HLA-G (tabla 8). A estos receptores se le ha dado la denominación de CD85 seguido de una letra para definir el tipo de receptor.

Los genes ILT se localizan en la misma región del cromosoma 19q13.4 que los genes KIR (ilustración 9). A diferencia de los KIR, los receptores ILT/LIR no son específicos de células NK y linfocitos T, sino que tienen una extensa distribución y se expresan en otros linajes hematopoyéticos, predominantemente en células del sistema mononuclear-fagocítico [137] y también en los linfocitos B de sangre periférica [138] y en granulocitos.

Tabla 8. Receptores leucocitarios de la familia ILT/LIR. Adaptado a partir de F. Navarro y M. López-Botet [143].

	Nombre Alternativo	Región extracelular	Región transmembrana	Ligandos	AcMo
<i>Receptores inhibidores</i>					
ILT2	LIR1, MIR7, CD85	4 dominios de tipo Ig	4 ITIM	HLA-A, -B y -G1	HP-F1, GHI/75, VMP55, 28C8, 40H2
ILT4	LIR2, MIR10	4 dominios de tipo Ig	3 ITIM	HLA-A, -B y -G1	42D1, 27D6, 28C8, 40H2
ILT5	LIR3, HL9	4 dominios de tipo Ig	4 ITIM	?	7H5, 40H2
LIR8	----	4 dominios de tipo Ig	2 ITIM	?	----
ILT3	LIR5, HM18	2 dominios de tipo Ig	3 ITIM	?	ZM3.8, ZM4
<i>Receptores activadores</i>					
ILT1	LIR7	4 dominios de tipo Ig	se asocia a FcR γ	?	135
ILT7	----	4 dominios de tipo Ig	se asocia a FcR γ	?	----
LIR6a	----	4 dominios de tipo Ig	se asocia a FcR γ	?	40H2
ILT8	----	4 dominios de tipo Ig	se asocia a FcR γ	?	----
<i>Receptores solubles</i>					
ILT6	LIR4, HM31, HM43	4 dominios de tipo Ig		?	----

Existen otros receptores inhibidores de membrana, con motivos ITIM citoplasmáticos, cuyo número ha ido aumentando en los últimos años y pueden ejercer una función inhibidora en el sistema inmunitario; además de los KIR, ILT/LIR y NKG2A, se incluyen en este grupo moléculas tales como: Fc γ RIIB, PIR-B, LAIRs, SIRP-a, CD72, gp49B1, PD-1, Ly49, CD66, CD22 y MAFA (tabla 9) [143].

La mayor parte de estos receptores se expresan en células de origen hematopoyético, aunque SIRP-a se expresa además en otros tejidos. Fc γ RIIB, ILTs/LIRs, PIR-B y LAIRs tienen un patrón de distribución amplio, mientras que los KIRs, Ly49, NKG2A, CD22, gp49B1, CD72, PD-1, CD66 y MAFA tienen una distribución más restringida [143].

Tabla 9. Receptores leucocitarios con función inhibidora. Adaptado a partir de F. Navarro y M. López-Botet [143].

Receptor	Especie	Expresión	Ligando	Fosfatasa unida
<i>Superfamilia de las Inmunoglobulinas</i>				
Fc γ RIIB	Humano, ratón	Basófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos y células B	IgG	SHIP
KIR	Humano	Células NK y subpoblación de linfos T	HLA de clase I	SHP-1 SHP-2
SIRP α	Humano, ratón, rata	Células hematopoyéticas y no hematopoyéticas	CD47	SHP-1 SHP-2
LAIR-1	Humano	Monocitos y linfocitos	?	?
ILT/LIR	Humano	Células mieloides y linfoides	HLA de clase I y otros sin caracterizar	SHP-1
PIR-B	Ratón	Células mieloides	?	SHP-1 SHP-2
gp49B1	Ratón	Mastocitos y células NK	?	?
CD22	Humano, ratón	Células B	a. siálico	SHP-1
PD-1	Humano, ratón	Células mieloides y linfocitos activados	?	?
CD66a	Humano	Neutrófilos	?	SHP-1
<i>Superfamilia de las lectinas de tipo C</i>				
Ly49	Ratón	Células NK y subpoblación de linfos T	H-2 clase I	SHP-1 SHP-2
MAFA	Humano, ratón	Mastocitos, basófilos y células NK	?	?
NKG2A/B	Humano	Células NK y subpoblación de linfos T	HLA-E	SHP-1 SHP-2
CD72	Humano, ratón	Células B	?	SHP-1

La mayoría de los genes que codifican para los receptores de tipo inmunoglobulina con motivos ITIM se localizan en el cromosoma 19 humano (19q13.1-19q13,4) [139, 140], mientras que algunos de los genes que codifican para los receptores de tipo lectina se localizan en el complejo génico NK, en el cromosoma 12 humano [141, 143]. La naturaleza de los ligandos reconocidos por estos receptores inhibidores está definida sólo en algunos casos. Por otra parte el mecanismo de transducción de señales es análogo en todos ellos; cuando se produce la unión del receptor a su ligando las tirosinas de los motivos ITIM son

fosforiladas, supuestamente por tirosinquinazas de la familia Src, y así se asocian con fosfatasa como SHP-1, SHP-2 o SHIP [142] que están implicadas en la acción represora.

Una característica general de estas familias de receptores es que incluyen otros miembros con función activadora. Tal es el caso de FcγRIIB y FcγRIIIA, KIR; PIR-A y PIR-B, ILT; SIRP-a y SIRP-b, Ly49A y Ly49D/H, NKG2A y NKG2C.

Algunos pares de receptores inhibidores y activadores comparten incluso el mismo ligando y, en todos los casos, la afinidad del receptor inhibidor es superior. Además, un mismo tipo de leucocito puede expresar varios de estos receptores inhibidores. Las células NK presentan KIRs, ILT2 y CD94/NKG2A; los mastocitos expresan FcγRIIB, MAFA, gp49B1 y PIR-B; en las células B se detectan FcγRIIB, CD72, PIR-B, ILT2 y CD22 [143]. Así pues, la coexpresión de varios receptores confiere a la célula mecanismos alternativos y complementarios para controlar el proceso de activación celular en respuesta a diferentes ligandos.

3. LOS LINFOCITOS Y SU PAPEL EN EL RESULTADO DEL TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) obtenidos de sangre periférica mejora la supervivencia en pacientes seleccionados con determinadas hemopatías malignas como el mieloma múltiple, linfomas no Hodgkin quimiosensibles en recaída y linfoma de Hodgkin en recaída o refractario [144].

A pesar de este beneficio en la supervivencia, las recaídas post-trasplante oscilan entre el 40-70%. Clásicamente, el beneficio se ha atribuido a las altas dosis de quimioradioterapia y, el alto porcentaje de recaídas, a la incapacidad de las altas dosis de quimioterapia de erradicar la enfermedad mínima residual [144].

En contraste, el porcentaje de recaídas en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es mucho menor que en el autólogo; este hecho se atribuye al efecto “injerto contra tumor” que posee el injerto alogénico [144].

Revisaremos a continuación el papel de los linfocitos sobre el resultado del TAPH desde diversos puntos de vista:

-Revisando la importancia, muchas veces minusvalorada, del recuento de linfocitos al diagnóstico.

-Contenido y composición de linfocitos del injerto.

-La recuperación linfocitaria precoz y tardía.

3.1 PAPEL DE LA RECUPERACIÓN LINFOCITARIA PRECOZ SOBRE LA SUPERVIVENCIA. ESTUDIO DEL EFECTO “INJERTO CONTRA TUMOR” DEL INJERTO AUTÓLOGO.

A finales de la década de los 90, diversos trabajos sugirieron que los pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos que tenían una recuperación linfocitaria (RL) precoz tras el mismo conseguían una supervivencia más prolongada [145,146]. Este hecho se aceptó como una obviedad en el contexto del trasplante alogénico y está relacionado con el efecto “injerto contra tumor”; los pacientes con una RL precoz tenían un efecto “injerto contra tumor” mayor (las recaídas eran menores) y, en contraposición, desarrollaban enfermedad injerto contra huésped [145,146].

Posteriormente, en los primeros años de la década de los 2000, este hallazgo se estudió más ampliamente en pacientes sometidos a TAPH y se comprobó, en distintas hemopatías malignas, que en los pacientes con una recuperación linfocitaria precoz la supervivencia era mayor en términos de supervivencia libre de eventos (SLE) (progresión/recaída) y supervivencia global (SG). Además, ha demostrado ser una variable pronóstica independiente en diversos trabajos [147-151]. Este hallazgo ha dado pie a considerar en dichos trabajos un posible efecto inmune beneficioso sobre el tumor dependiente del injerto autólogo. Sin embargo no están claros los factores celulares dependientes del injerto responsables de dicho fenómeno.

El autor que más ha estudiado el efecto de la reconstitución linfoide precoz sobre el resultado del TAPH ha sido *L.F. Porrata* (División de Hematología, Clínica Mayo; Rochester, MN, USA), quien en 2001 establecía por primera vez la correlación entre la RL precoz y los resultados clínicos en pacientes sometidos a TAPH [147].

En la mayoría de los trabajos se define la RL precoz como el tener un recuento absoluto de linfocitos (RAL) en el día 15 post-TAPH igual o superior de $0,5 \times 10^9/L$, que es el punto de corte que normalmente corresponde con la mediana de RL. De esta forma se pueden comparar en términos de supervivencia ambos grupos de pacientes. La mayoría de los trabajos ofrecen resultados estadísticamente significativos tanto en términos de SG como de SLE (estimación *Kaplan-Meier* y análisis univariantes), favorables a los pacientes que tienen una RL precoz tras el TAPH, demostrando además en los análisis multivariantes que la RL precoz es un factor pronóstico independiente de otros factores pronósticos clásicos. En la tabla 10 se exponen los resultados de los trabajos publicados en este campo.

Tabla 10. Principales publicaciones que demuestran impacto en la supervivencia de la RL precoz.

ENFERMEDAD	PACIENTES	PUNTO DE CORTE (RAL-15)	SG media (meses)	p	SLE (meses)	media	P
Mieloma múltiple	126	0,5x10 ⁹ /L	33 vs 12	<0,0001	16 vs 8		<0,0001
LNH	104	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 6	<0,0001	No alcanzada vs 4		<0,0001
<i>Porrata LF et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. Blood; 2001; 98:579-85. [147].</i>							
LH	82	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 42	<0,0001	57 vs 15		0,002
<i>Porrata LF et al. Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. Br Journal Haematol 2002; 117:629-33. [151].</i>							
LMA	45	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 10	<0,0009	105 vs 9		0,008
<i>Porrata LF et al. Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. Leukemia 2002; 16: 1311-1318. [158]. (LMA: leucemia mieloblástica aguda).</i>							
LNH y LH*	90	0,667x10 ⁹ /L	No alcanzada en ambos grupos	0,27	No alcanzada vs 16		0,02
<i>Gordan LN et al. Correlation of early lymphocyte recovery and progression-free survival after autologous stem-cell transplant in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma. Bone Marrow Transplant 2003; 31:1009-13. [159].</i>							
Mieloma múltiple	59	1x10 ⁹ /L	37,26 vs 23,19	0,0156	18,72 vs 9,11		0,0243
<i>Kim H et al. Early lymphocyte recovery predicts longer survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. Bone Marrow Transplant 2006; 37:1037-42. [161].</i>							
Amiloidosis sistémica	145	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 53	<0,003	No alcanzada vs 27		<0,0001
<i>Porrata LF et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with primary systemic amyloidosis. Clin Cancer Res 2005; 11: 1210-1218. [162].</i>							
LNH	274	0,5x10 ⁹ /L	Cinética recup. Linfocitaria rápida	<0,0001	Cinética recup. Linfocitaria rápida		<0,0001
<i>Yoong Y et al. The effect of absolute lymphocyte count recovery kinetics on survival after autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma. 2005 Sep;46(9)1287-94. [163].</i>							
LNH manto	42	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 30	0,01	No alcanzada vs 16		0,0006
<i>Joao C et al. Early lymphocyte recovery after autologous stem cell transplantation predicts superior survival in mantle-cell lymphoma. Bone Marrow Transplant. 2006 May;37(9):865-71. [164].</i>							
Linfomas T	33	1x10 ⁹ /L (RAL-25)	No alcanzada vs 7	0,0119	No alcanzada vs 4,5		0,0117
<i>Kim H et al. Lymphocyte recovery as a positive predictor of prolonged survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma. Bone Marrow Transplant. 2004 Jul;34(1):43-9. [165].</i>							
LNH	50	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 5,4	<0,0001	No alcanzada vs 3,3		<0,0001
<i>Porrata LF et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma: a prospective study. Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jul;14(7):807-16. [166].</i>							
Cáncer de mama	29	0,5x10 ⁹ /L	No alcanzada vs 14	<0,0001	No alcanzada vs 3,3		<0,0001
<i>Porrata LF et al. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. Bone Marrow Transplant. 2001; 28:865-871. [148].</i>							

* En este caso no se obtiene una ventaja significativa de la SG (sí la SLE), pero sí una clara tendencia a una mejor supervivencia.

Diversos trabajos con menor número de pacientes estudiados han demostrado el papel beneficioso de la RL precoz post-trasplante en pacientes con LH [167], otros síndromes linfoproliferativos [168,169], en pacientes con cáncer de mama [170], con cáncer de ovario [171] y diversos tumores sólidos [172]. Como podemos comprobar se ha demostrado el efecto beneficioso de la RL precoz post-TAPH no sólo en diversas hemopatías malignas sino también en tumores sólidos, síndromes linfoproliferativos y amiloidosis sistémica [162].

Además, la RL precoz se ha estudiado en diversos modelos multivariantes. Los resultados se reproducen en los diversos trabajos publicados. La RL precoz se comporta como el factor pronóstico independiente de mayor impacto sobre la SG y la SLE, en comparación con otros factores pronósticos clásicos descritos, como β_2 -microglobulina, *index-labelling* de las células plasmáticas, respuesta previa al tratamiento, infiltración de células plasmáticas al diagnóstico, etc. en el caso del mieloma múltiple [147, 152, 153, 161]; de la misma manera ha demostrado ser el único factor pronóstico independiente para los pacientes con LNH en comparación con los factores pronósticos clásicos como LDH, estadio, *performance status*, Índice pronóstico Internacional (IPI) [154, 163, 164, 165, 183], junto con el *status* de la enfermedad pre-TAPH (remisión completa vs. Remisión parcial) [164, 165].

En el caso de la LMA, el análisis multivariante mostró la RL precoz como el único factor pronóstico independiente para la SG y la SLE en los pacientes con leucemia aguda sometidos a TAPH, siendo superior a otros factores pronósticos estudiados como la presencia de citogenética de riesgo intermedio o desfavorable o la situación de respuesta completa (RC) tras el TAPH [158]. Igualmente, en el caso del cáncer de mama metastásico, la RL precoz se comportó como el único factor pronóstico independiente para la SG y la SLE junto con el número de sitios metastásicos presentes [148]. Idénticos resultados se obtienen para el LH donde el análisis multivariante nuevamente demuestra que la RL precoz es el único factor pronóstico significativo detectado para la SG [151].

La posible explicación de la ventaja en la supervivencia de los pacientes que tienen una RL precoz es que la reconstitución inmune precoz podría tener un efecto protector contra la progresión de la enfermedad, esto es, se demostraría un efecto “injerto contra tumor” en el TAPH, análogo al que se produce en el trasplante alogénico en el cual el responsable de dicho efecto es el sistema inmune del donante capaz de erradicar la enfermedad mínima residual del huésped [147].

Este estudio demuestra la importancia de la reconstitución inmune precoz tras el TAPH, con mejores resultados en términos de supervivencia en los pacientes con RL precoz y es el primer trabajo que describe la asociación entre la RL precoz post-TAPH y la supervivencia prolongada [147].

A pesar de la unanimidad de los resultados obtenidos en cuanto a la importancia pronóstica de la RL precoz en el TAPH, el origen de los linfocitos reconstituidos post-trasplante no está estudiado, pero se postulan tres hipótesis [147]:

1. *Stem cell* progenitoras contenidas en el injerto y que se diferencian a linfocitos maduros.
2. Linfocitos maduros contenidos en el injerto, que han sido recolectados previamente y son reinfundidos.
3. Linfocitos del huésped que sobreviven al régimen de acondicionamiento.

Porrata et al. no encuentran correlación entre la RL precoz y la cantidad de células CD34 infundidas, por lo que postulan que el origen de estos linfocitos podría deberse a los linfocitos presentes en el injerto o a linfocitos del huésped que han sobrevivido al acondicionamiento [147, 158]. Tampoco se identifica correlación entre RL con otras variables (aparte de la cantidad de CD34) como la cantidad de CMN infundidas y el recuento de neutrófilos en el día 15 post-trasplante [148], ni con el régimen de acondicionamiento administrado, la fuente de progenitores utilizada o el injerto plaquetar en el día 15 post-trasplante [151].

Estos datos sugieren la posibilidad de que la reconstitución linfocitaria provenga de otras fuentes que no son las células progenitoras trasplantadas, tales como linfocitos del huésped que sobreviven al régimen de acondicionamiento o linfocitos maduros presentes en el autoinjerto y que son infundidos.

Sin embargo, *Gordan et al* [159], obtienen resultados contradictorios. Tanto en el análisis de supervivencia (tabla 10) como en el análisis multivariante (tabla 11), el grupo con RL precoz se asoció significativamente con una SLE mejor pero no con una mejor SG. Además obtuvieron como factores predictores independientes para SLE y para SG la cantidad de células CD34+ infundidas ($\geq 4 \times 10^6/\text{Kg}$) y el haber recibido ≥ 3 líneas de tratamiento previas al TAPH.

Tabla 11. Análisis multivariante: influencia de RL precoz, las cifras de células CD34 infundidas y de las líneas de tratamiento previas al TAPH sobre la SLP y la SG. Adaptado de *Gordan et al* [159].

	SLP	SG
RL en el día 15 ($\geq 0,667$ vs $<0,667 \times 10^9/\text{L}$)	0,014	0,49
CD34+ INFUNDIDAS (≥ 4 vs $<4 \times 10^6/\text{Kg}$)	0,049	0,0025
Nº LÍNEAS PRE-TAPH	0,0011	0,0025

La influencia de la RL precoz sobre la supervivencia, si bien en la mayoría de los trabajos es independiente de la cantidad de células CD34 infundidas, es éste resulta ser dependiente. Este hecho hace plantearse a los autores que si bien los pacientes con una RL precoz tienen significativamente mejor supervivencia libre de progresión (SLP), también tienen mayor cantidad de células CD34 infundidas y la ventaja en la supervivencia podría ser dependiente de éstas células en vez de los linfocitos. Ciertamente, el uso de dosis altas de CD34 reduce el tiempo de injerto de los neutrófilos y además, según estos resultados, es esencial para una rápida recuperación inmune. Se reproduce la asociación entre la RL

precoz y la supervivencia, pero en este caso, el recuento de linfocitos post-TAPH y por tanto, la recuperación inmune post-TAPH, dependería de la dosis de células CD34 infundida [159].

De este trabajo se deduce que es esencial una alta concentración de células CD34 infundidas para una rápida reconstitución inmune y mejor resultados del trasplante y se establece la hipótesis de que la RL precoz depende de la cantidad de células progenitoras presentes en el injerto, es decir, los linfocitos post-trasplante provienen de las células progenitoras infundidas y no de los linfocitos maduros presentes en el autoinjerto.

Corroborando esta hipótesis existen datos que demuestran mejores resultados después del trasplante singénico utilizando $\geq 3 \times 10^8$ CMN/Kg [160]. Además, la infusión de dosis altas de células CD34+ después del TAPH se asocia con una reconstitución hematopoyética más corta, menor requerimiento transfusional de plaquetas y mejor calidad de vida.

Como se expuso previamente, una explicación posible de la supervivencia más favorable que ofrece una RL precoz es la protección contra la progresión de la enfermedad residual existente tras el TAPH mediada por una reconstitución inmune temprana. La reconstitución inmune completa cuantitativa y cualitativa de linfocitos T y B ocurre meses incluso años tras el TAPH. Sin embargo, las células NK muestran una recuperación normal a las dos semanas post-TAPH. Las células NK poseen una importante actividad antitumoral en el linfoma de Hodgkin [157] por lo que podrían ser el componente celular responsable del beneficio en la supervivencia en la RL precoz [151].

La limitación de todos estos trabajos es su carácter retrospectivo y la imposibilidad de analizar las subpoblaciones de linfocitos implicadas.

Recientemente una publicación con diseño prospectivo [166] estudia en 50 pacientes con LNH (ver tabla 10) el papel de la RL precoz. El estudio demostró una mejor supervivencia en los pacientes con RL precoz y además se identificaron las células NK (CD16+/56+/CD3-) como las únicas que se relacionaron con la mejor supervivencia de estos pacientes. Los pacientes con un recuento de células NK $\geq 80/\mu\text{L}$ tenían mejor SLE y SG en comparación con el grupo de pacientes con un recuento menor ($p < 0,0001$ para ambos tipos de supervivencias). El análisis multivariante reveló que las células NK eran un factor pronóstico independiente predictor de supervivencia para estos pacientes. Este es el primer estudio que confirma de forma prospectiva el papel de la RL precoz como factor pronóstico e identifica las células NK como probable subtipo de linfocitos implicados en el beneficio sobre la supervivencia derivado de la reconstitución inmune precoz [166].

Sin embargo, aunque el beneficio de la RL precoz se ha demostrado ampliamente en la mayoría de los trabajos publicados, existen algunos que no han conseguido demostrar beneficio sobre la supervivencia (ver tabla 12).

Tabla 12. Publicaciones que no demuestran impacto en la supervivencia de la RL precoz.

ENFERMEDAD	PACIENTES	PUNTO DE CORTE (RAL-15)	SG (p)	SLE (p)
LH	143	0,6x10 ⁹ /L	No estudiada	0,5
		1,1x10 ⁹ /L (RAL-90)	No estudiada	0,5
<i>Seshadri T et al. The relationship between absolute lymphocyte count with PFS in patients with Hodgkin's lymphoma undergoing autologous hematopoietic cell transplant. Bone Marrow Transplant. 2008;42:29-34.[173].</i>				
LNH bajo grado	109	0,5x10 ⁹ /L	0,88	0,35
LNH Int-alto grado	147	0,5x10 ⁹ /L	0,97	0,20
<i>D Tiwari et al. Prognostic significance of early lymphocyte recovery after post-autografting administration of GM-CSF in non-Hodgkin's lymphoma. Bone Marrow Transplant. 2007 Oct;40(7):671-5.[174]</i>				
Cáncer de mama	41	0,5x10 ⁹ /L	0,6249	0,6249
<i>Schrama JG et al. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. Bone Marrow Transplant. 2003;31:141-142.[156].</i>				

En este trabajo tampoco se demuestra correlación entre el recuento de linfocitos en el día 15 con la cantidad de células CD34 infundidas o con el dato de injerto de neutrófilos e injerto plaquetar [173]. Una explicación de la pérdida del beneficio de la RL precoz podría deberse al uso de factores estimulantes de colonias tipo GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) o G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*) post-TAPH. El uso de G-CSF produce una alta regeneración de linfocitos CD8+ y CD56+ en comparación con GM-CSF y podría alterar la capacidad inmune de los linfocitos regenerados tempranamente [174].

En resumen, en la mayoría de las publicaciones se demuestra que la reconstitución linfocitaria precoz después del TAPH es un factor pronóstico sólido e independiente para la supervivencia en pacientes con diversas enfermedades como linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia mieloide aguda y amiloidosis sistémica primaria. Sin embargo hay trabajos con resultados contradictorios y no parece estar clara la causa de esta contradicción. Tampoco parecen estar claros los factores asociados a una reconstitución linfocitaria más rápida y dada la naturaleza retrospectiva de todos los trabajos reseñados, tampoco se ha podido investigar el papel que desempeñan las subpoblaciones linfocitarias del injerto en la reconstitución inmune.

Por tanto, en el contexto del TAPH, la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión parecen estar asociadas con la recuperación del sistema inmune autólogo y la capacidad de éste de eliminar las células tumorales residuales post-trasplante. Aún hoy día, este hecho no es universalmente aceptado dado que existen resultados contradictorios.

3.2 PAPEL DE LOS LINFOCITOS DEL AUTOINJERTO SOBRE LA SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE.

Los factores que se asocian a una mejor RL más temprana no están bien identificados y se necesita aclarar si ésta depende de la cantidad de linfocitos infundida, de linfocitos residuales en el huésped que han resistido al régimen de acondicionamiento o directamente de la cantidad de progenitores infundida.

A este respecto, la mayoría de las conclusiones establecidas apoyan la hipótesis de que la RL precoz es independiente de la dosis de CD34 infundida [148, 158], aunque hay resultados contradictorios [147, 150]. No obstante, parece lógico pensar que depende más de la composición del injerto (ya sea de linfocitos maduros o de progenitores linfopoyéticos presentes en el autoinjerto) que de linfocitos residuales supervivientes en el huésped.

Existen estudios que identifican una relación directa entre la cantidad de linfocitos infundidos y la RL precoz y demuestran que la cantidad de linfocitos infundida tiene pues un fuerte impacto sobre la supervivencia tras el TAPH [175, 176].

De forma retrospectiva *Porrata et al* demostraron que los pacientes que tuvieron una RL precoz (día 15 con $\geq 0,5 \times 10^9$ linfocitos/L) recibieron cantidades mayores de linfocitos, con una media de 680×10^6 /Kg en los pacientes con LNH [175] y de 640×10^6 /Kg con mieloma múltiple [176], en comparación con los pacientes que no alcanzaron una RL precoz que recibieron dosis de linfocitos significativamente menores (media de 340×10^6 /Kg, $p < 0,0001$), (gráfico 3).

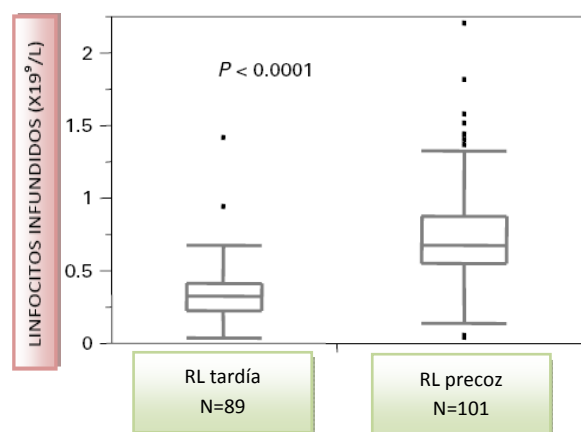


Gráfico 3. Representación gráfica de la cantidad de linfocitos infundidos en dos grupos de pacientes: uno con RL precoz (día 15 con $\geq 0,5 \times 10^9$ linfocitos/L) y el otro con una RL tardía (día 15 con $< 0,5 \times 10^9$ linfocitos/L). La línea horizontal en cada "box" representa la media de linfocitos infundidos. Las líneas inferiores y superiores de cada "box" representan los percentiles 25 y 75, respectivamente. Las líneas exteriores de los "box" representan valores que exceden estos límites. Adaptado a partir de *Porrata et al* [175].

Tanto en pacientes con LNH [175] como con mieloma múltiple [176] se observa una fuerte correlación lineal y positiva entre el recuento de linfocitos en el día 15 post-trasplante y la cantidad de linfocitos presentes en el autoinjerto y por tanto infundidos (gráfico 4).

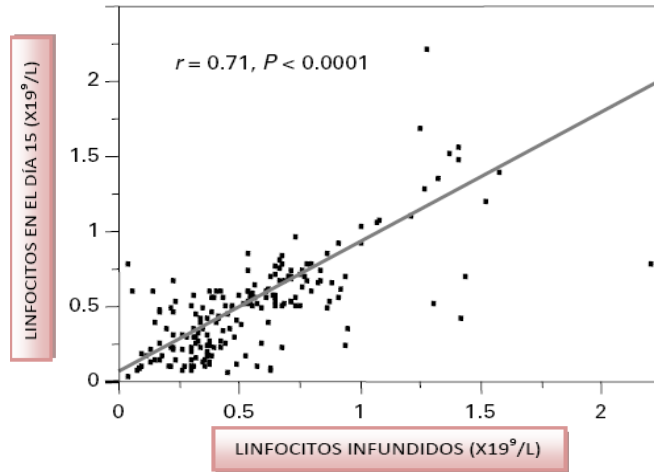


Gráfico 4. Diagrama de correlación según estimación de Spearman entre la cantidad de linfocitos en el día 15 y la cantidad de linfocitos infundida. Se observa una fuerte correlación (Rho de Spearman=0,71, p<0,0001). Adaptado a partir de Porrata et al [175].

Si la RL depende pues de la cantidad de linfocitos infundida, es lógico pensar que debería afectar a la supervivencia. Efectivamente, el análisis de SG y SLE demuestra claras diferencias en ambas curvas de supervivencia en función de la dosis de linfocitos infundida a favor de los pacientes que reciben mayor cantidad de linfocitos [175, 176]. En la tabla 13 se muestran los datos de supervivencia en función de la cantidad de linfocitos infundidos ($\geq 500 \times 10^6/\text{Kg}$ vs $< 500 \times 10^6/\text{Kg}$) en la que se observa que, los pacientes que reciben una cantidad $\geq 500 \times 10^6$ linfocitos/Kg tienen una SG y SLE mejor que los que reciben menos.

Tabla 13. Estudios que demuestran el impacto de la cantidad de linfocitos infundidos en la supervivencia.

ENFERMEDAD	PACIENTES	PUNTO DE CORTE (linfocitos infundidos)	SG media (meses)	p	SLE media (meses)	P
LNH	190	$500 \times 10^6/\text{Kg}$	76 vs 17	<0,0001	49 vs 10	<0,0001
<i>Porrata LF et al. fused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count correlates with day 15 absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. Bone Marrow Transplant 2004; 33:291-8. [175].</i>						
Mieloma múltiple	267	$500 \times 10^6/\text{Kg}$	58 vs 30	0,0002	22 vs 15	0,0001
<i>Porrata LF et al. The dose of infused lymphocytes in the autograft directly correlates with clinical outcome after autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. Leukemia 2004; 18:1085-92. [176]</i>						

Más aun, el análisis multivariante demostró que una cifra de linfocitos en el injerto $\geq 500 \times 10^6$ /Kg fue el único factor pronóstico independiente para SG y para SLE ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente) en comparación con otros factores pronósticos como LDH, número de sitios extranodales afectados y *performance status* para los pacientes con LNH [165]. También para los pacientes con mieloma múltiple [176], ($p < 0,027$ y $p < 0,0001$, respectivamente para SG y SLE). Otros factores pronósticos independientes obtenidos fueron la citogenética, el *index labeling* de las células plasmáticas y la proteína C reactiva.

La importante correlación existente entre el recuento de linfocitos y la cantidad de linfocitos infundidos apoya la hipótesis de que la RL precoz depende directamente de la dosis de linfocitos infundida. Ambas variables son factores pronósticos independientes, sin embargo, desafortunadamente, no se incluye la RL precoz en el análisis multivariante en estos dos estudios, por lo que se desconoce su valor pronóstico real.

El hecho de que la cantidad de linfocitos infundida tiene un fuerte impacto en el resultado del TAPH, ha llevado a investigar qué factores podían influir en la recolección linfocitaria, es decir, como afectaba el tipo de movilización empleada y el procedimiento de aféresis en la cantidad de linfocitos recolectados.

A este respecto se realizó un trabajo [177] en el que se postulaba si el mecanismo de aféresis podría afectar a la recolección linfocitaria. Para ello se estudió una cohorte de 127 pacientes con linfoma no Hodgkin que recibieron un TAPH y que fueron recolectados con diferentes equipos de aféresis (*COBE Spectra*, *Baxter Amicus* y *Fenwal CS3000 plus*). Todos los pacientes estaban en remisión completa o parcial previamente a la recolección y no hubo diferencias entre los diferentes grupos de estudio en las características basales de los pacientes, el esquema de movilización realizado (G-CSF sin quimioterapia), o en el volumen de sangre procesado. Tampoco, hubo asociación entre las características basales de los pacientes, el esquema de movilización realizado (G-CSF sin quimioterapia), ni el volumen de sangre procesado. No se encontró asociación entre las características basales de los pacientes o sus factores pronósticos con la RL precoz ni con la cantidad de linfocitos recolectada. Las aféresis se realizaron cuando los CD34 eran $\geq 10/\mu\text{L}$ hasta recolectar un mínimo de 2×10^6 CD34/Kg. Todo esto hacía sugerir que el principal factor que afecta a la cantidad de linfocitos recolectada ocurriría durante el mismo proceso de recolección. En el análisis efectuado se identificó que los pacientes recolectados con *COBE Spectra* tenían mayor cantidad de linfocitos comparados con los otros sistemas (*Baxter Amicus* y *CS3000 plus*). No hubo diferencias entre los tres instrumentos en cuanto a la cantidad de CD34 recolectadas, ni en el recuento de linfocitos existente previo a la recolección, ni en el recuento de linfocitos previo a la movilización (tabla 14).

Tabla 14. Comparación de las recolecciones obtenidas entre diferentes instrumentos de aféresis. Adaptado a partir de Katipamula et al [177].

	COBE Spectra	BAXTER Amicus	Fenwal CS3000 plus	p
Cantidad linfocitos($\times 10^9$ /Kg)	0,52	0,37	0,41	<0,05
Cantidad CD34 ($\times 10^6$ /Kg)	4,01	4,79	4,12	0,244
Ratio Linfocitos/CD34	0,52	0,37	0,41	<0,05
Linfocitos pre-aféresis ($\times 10^9$ /L)	4,3	4,1	4,46	0,858
Linfocitos pre-movilización ($\times 10^9$ /L)	1,3	1,3	1,45	0,422

El análisis de supervivencia mostró una ventaja significativa en términos de SG y de SLP en los pacientes recolectados con *COBE Spectra* con respecto a los otros sistemas al igual que lo fue que la RL precoz en el día 15 (gráfico 5):

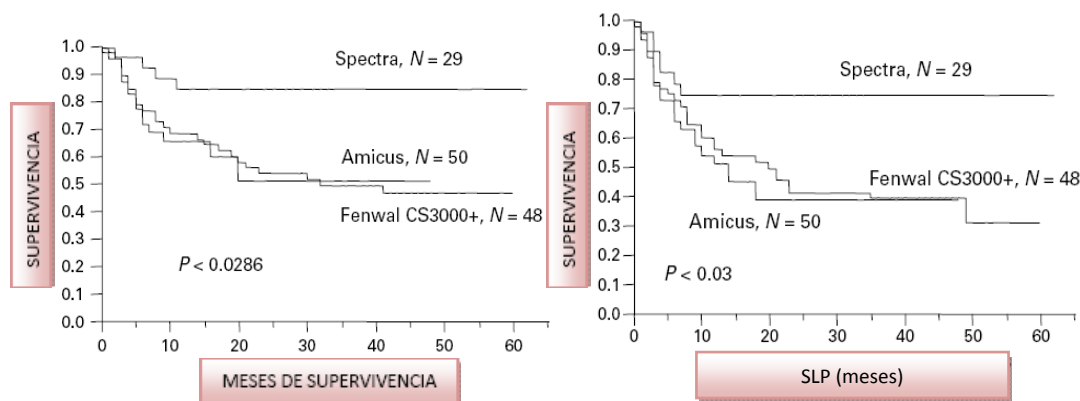


Gráfico 5. Estimación Kaplan-Meier de SG (izquierda) y SLP (derecha) de pacientes sometidos a TAPH recolectados con COBE Spectra, Baxter Amicus, y Fenwal CS3000 Plus. La media de SG y SLP no fue alcanzada para COBE Spectra. Para Baxter Amicus la media de SG tampoco fue alcanzada y para SLP fue de 14 meses. Para Fenwal CS3000 la media de SG fue de 32 meses y para SLP fue de 21 meses. El %SG a los 3 años fue de 84, 54 y 39%, respectivamente y de SLP de 74, 47 y 34%, respectivamente ($p < 0,0286$ y $0,03$, respectivamente). Adaptado a partir de Katipamula et al [177].

Sin embargo, no se obtienen diferencias significativas en cuanto a supervivencia, al comparar las curvas de SG de los pacientes en los que se recolectó $\geq 0,5 \times 10^9$ linfocitos/Kg (gráfico 6):

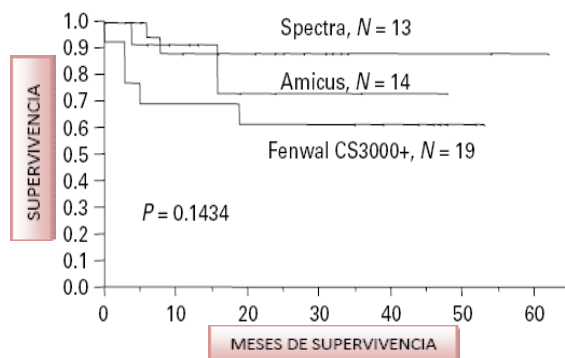


Gráfico 6. Estimación Kaplan-Meier de SG comparando los tres sistemas de recolección en pacientes en los que se obtuvo un producto con $\geq 0,5 \times 10^9$ linfocitos/Kg ($p = 0,01434$). Adaptado a partir de Katipamula et al [177].

En el análisis univariante, la cantidad de linfocitos recolectados, el estadio de la enfermedad y el instrumento de aféresis resultaron significativos para SG y para SLE. En el análisis multivariante, solamente resultó significativo la cantidad de linfocitos recolectados para la SG ($p < 0,0092$) y SLP ($p < 0,0156$), lo que indica que fue el único factor predictivo independiente para la SG y SLE y que la diferencia entre los métodos de recolección utilizados se debe a la diferente capacidad de cada uno de los equipos para recolectar más o menos cantidad de linfocitos [177].

Al igual que en el estudio anterior, se observó una fuerte correlación positiva entre la cantidad de linfocitos recolectados y el recuento absoluto de linfocitos en el día 15.

Hay que destacar que este estudio es el único que demuestra una fuerte asociación entre el instrumento de aféresis y los resultados en términos de supervivencia, en relación a los parámetros: cantidad de linfocitos recolectados e infundidos y RL en el día 15, es decir, cuanta mayor recolección de linfocitos, más fuerte es el impacto positivo sobre la supervivencia [177].

Estas diferencias en cuanto a los equipos de aféresis utilizados podrían ser explicadas por el hecho de que *COBE Spectra* está diseñada para recolectar una amplia banda de células mononucleares mientras que *BAXTER Amicus* y *Fenwal CS3000* recolectan menor contenido de CMN con las mismas células CD34. De hecho, el ratio de linfocitos recolectados/CD34 es significativamente mayor en la cohorte de *COBE Spectra* con respecto a los otros dos métodos [177].

Sin embargo, estos resultados entran en contradicción con los descritos en la publicación de *Kim et al* [161] en la que la RL precoz en el día 23, definida como un recuento absoluto de linfocitos $\geq 1 \times 10^9/L$, era un factor pronóstico independiente para SG y SLE, pero no tenía correlación con la cantidad de linfocitos infundidos, lo que llevó a los autores a sugerir que factores distintos a la cantidad de linfocitos maduros presentes en el autoinjerto eran los responsables de la reconstitución linfocitaria temprana post-trasplante.

3.3 PAPEL DEL RECUENTO SANGUÍNEO DE LINFOCITOS PRE-AFÉRESIS SOBRE LA SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE.

Hasta ahora se han expuesto datos que apoyan la hipótesis de que tanto la cantidad de linfocitos infundidos como la RL precoz tienen un fuerte impacto en la SG y en la SLP. Si como parece ser la RL precoz depende directamente de la dosis de linfocitos infundida, cabría pensar que cuanto mayor sea el recuento absoluto de linfocitos en sangre periférica en el momento de realizar la aféresis, mayor será la cantidad de linfocitos recolectados y podría influir directamente sobre la supervivencia.

En otro trabajo, referido anteriormente, *Porrata et al.* se plantearon que factores podían estar relacionados con el rendimiento en la recolección linfocitaria en pacientes con mieloma múltiple y, por tanto, podían influir en el contenido de linfocitos del autoinjerto [176].

Del análisis multivariante llevado a cabo para aclarar este respecto, solamente las cifras de linfocitos pre-aféresis en sangre periférica se asociaron significativamente a una recolección más abundante de linfocitos en dichos pacientes, mostrando una correlación fuerte lineal y positiva (gráfico 7).

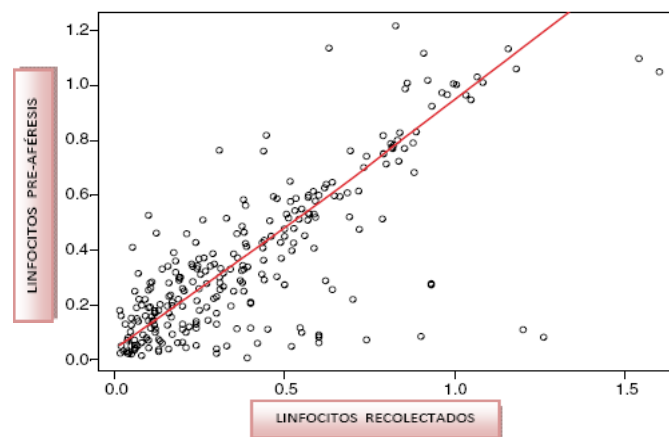


Gráfico 7. Diagrama de correlación entre los linfocitos pre-aféresis y la cantidad de linfocitos recolectados. Se observa una fuerte correlación positiva (Rho de Spearman=0,70, $p=0,0001$). Adaptado a partir de *Porrata et al* [176].

Basándose en estos resultados, se evaluaron diferentes puntos de corte de cifras sanguíneas de linfocitos preaféresis que predijeran una mayor tasa de recolección linfocitaria, identificándose el valor de $0,5 \times 10^9$ linfocitos/L como el umbral predictor de una recolección de $\geq 0,5 \times 10^9$ linfocitos/Kg.

No se encontraron asociaciones entre las distintas características basales de los pacientes o los factores pronósticos con la cantidad de linfocitos pre-aféresis. No obstante, sí se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la cantidad de linfocitos pre-aféresis en pacientes movilizados con factor sólo (GM-CSF) y los pacientes movilizados con quimioterapia (ciclofosfamida) más factor ($0,77 \times 10^9/L$ vs $0,28 \times 10^9/L$). Estos datos sugieren que el régimen de movilización podría influir en el rendimiento de la recolección linfocitaria.

Existen dos apuntes aislados en la literatura al respecto. La primera referencia es el trabajo comentado en el apartado anterior [175] donde se analizan 190 pacientes diagnosticados de linfoma no Hodgkin que reciben un TAPH. La principal conclusión es que se obtiene una fuerte correlación entre la RL en el día 15 y la cantidad de linfocitos presentes en el autoinjerto; sin embargo no se encuentra ninguna asociación entre las características basales de los pacientes y la cantidad de linfocitos recolectada (tabla 15):

Tabla 15. Correlación entre la cantidad de linfocitos del injerto (A) y la cantidad de linfocitos pre-aféresis (B) con las características basales de los pacientes y diversos factores pronósticos. Sólo existe asociación entre la cantidad de linfocitos presentes en el injerto con el RAL preaféresis. Adaptado a partir de *Porrata et al* [175].

CARACTERÍSTICAS BASALES/FACTORES PRONÓSTICOS	A	B
CD34 INFUNDIDOS	0,80	-
SITUACIÓN CLÍNICA PRE-TRASPLANTE	0,44	0,24
RC PRE-TRASPLANTE	0,35	0,15
HISTOLOGÍA	0,45	0,30
IPI AL TRASPLANTE:		
-Edad (≥ 60 vs < 60)	0,73	0,30
-Afectación extranodal (≥ 2 vs < 2)	0,54	0,64
-LDH (normal vs aumentada para edad/sexo)s	0,19	0,48
-“Performance status” (≥ 2 vs < 2)	0,33	0,09
-Estadio (I/II vs III/IV)	0,98	0,88
NºLÍNEAS PRE-TRASPLANTE	0,21	0,13
SEXO	0,45	0,93
LINFOCITOS PRE-MOVILIZACIÓN	0,70	0,44
LINFOCITOS PRE-AFÉRESIS	<0,0001	-
LINFOCITOS INJERTO	-	<0,0001

Hay que destacar que en este trabajo el único factor asociado a una mejor recolección linfocitaria fue el recuento absoluto de linfocitos existente en el momento previo a la recolección. Tampoco influyeron las características basales de los pacientes y los factores pronósticos sobre el recuento absoluto de linfocitos existente en el momento de la aféresis.

Por tanto, parece como si unos niveles más elevados de linfocitos en sangre periférica en el momento de la aféresis permitieran obtener una cantidad mayor de linfocitos en el injerto, lo que tiene un fuerte impacto positivo en la supervivencia post-trasplante. El régimen de movilización no fue analizado en este estudio pues todos los pacientes recibieron el mismo régimen de movilización (G-CSF), aunque datos preliminares parecen demostrar que los pacientes con mieloma múltiple movilizados con quimioterapia más factor (G-CSF o GM-CSF) [176] obtienen peor recolección linfocitaria comparados con los pacientes de este estudio, y con linfoma no Hodgkin, que recibieron sólo G-CSF [175].

En un estudio reciente [173], citado previamente, en el que se analizaron 143 pacientes con linfoma de Hodgkin y en el que no se encontró asociación entre la RL precoz en el día 15 y tardía (día 90) y la SLP, sin embargo, si se encontró que el recuento de linfocitos pre-aféresis resultó ser predictor de mejor SLP. Esto fue así cuando se dicotomizaron dos grupos en función de la media del recuento absoluto de linfocitos presente en el momento de iniciar la recolección ($\geq 1,2 \times 10^9/L$ vs $< 1,2 \times 10^9/L$, $p=0,073$) lo que parecía conferir algún papel al sistema inmunitario en el control de la enfermedad.

En este sentido, se han estudiado los factores que pueden influir en la optimización de la recolección linfocitaria, como el tiempo transcurrido desde la administración del último ciclo de quimioterapia y la recolección, demostrándose una fuerte correlación entre éste con la cantidad de linfocitos recolectados, estableciéndose el punto de corte de ≥ 55 días como el momento óptimo en el que normalmente se debería haber alcanzado la recuperación inmune tras el último ciclo de quimioterapia (gráfico 8), [178].

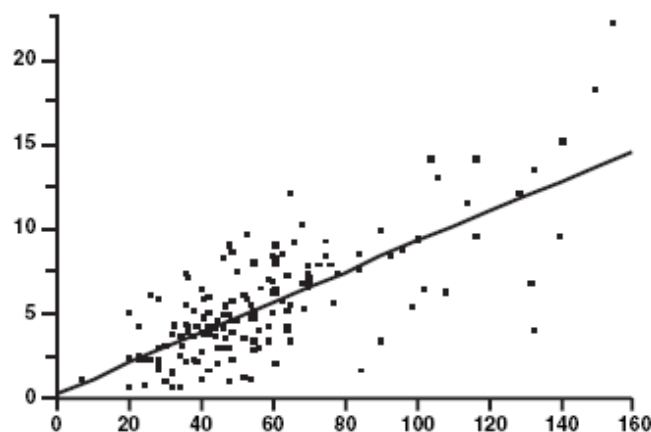


Gráfico 8. Correlación entre el intervalo (días) entre el último ciclo de quimioterapia (ordenadas) y el número de linfocitos en el momento de iniciar a aféresis (abscisas). Se observa una fuerte correlación positiva (Rho de Spearman 0,067; $p<0,0001$). Adaptado a partir de *Holtan et al* [178].

En dicho trabajo, todos los pacientes fueron movilizados con G-CSF y no se llevaron a cabo procedimientos de selección celular. Además se estudió la asociación con la supervivencia

obteniéndose mejores resultados en términos de SLP y de SG en los pacientes en los que se produjo la recolección a partir de los 55 días del último ciclo de quimioterapia (tabla 16).

Tabla 16. Estimación *Kaplan-Meier* para la SG y SLP en función del tiempo transcurrido entre el último ciclo de quimioterapia y el momento de iniciar la aféresis. La media de SG no se alcanzó para el grupo de ≥ 55 días y fue de 21 meses para el grupo de < 55 días. La SG a los 5 años fue del 64% y 39%, respectivamente ($p < 0,0008$). La media de SLP fue de 76 meses para el grupo de ≥ 55 días y de 9 meses para el grupo de < 55 días. La SG a los 5 años fue del 52% y 31%, respectivamente ($p < 0,0025$). Adaptado a partir de *Holtan et al* [178].

Tiempo desde último ciclo	SG (meses)	P (Kaplan-Meier)	SLP (meses)	P (Kaplan-Meier)
≥ 55 días	Media no alcanzada	$< 0,0008$	76 meses	$< 0,0025$
< 55 días	21 meses		9 meses	

El análisis multivariante demostró que el tiempo transcurrido entre el último ciclo de quimioterapia y el momento de la aféresis fue un factor pronóstico independiente predictor de SG y SLP [178].

Estos datos apoyan la hipótesis de que el estado inmunológico del paciente en el momento de realizar la aféresis es importante y tiene implicaciones en la supervivencia tras el TAPH.

El mejor momento para realizar el TAPH, atendiendo el estado de la enfermedad, es con el paciente con enfermedad mínima residual o en remisión completa, sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado el mejor momento de realizar la aféresis atendiendo la situación inmunológica del paciente.

3.4 PAPEL DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES DEL INJERTO SOBRE LA SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE.

Parece obvio que si la RL precoz es un factor pronóstico importante para la SLE y la SG y si ésta depende de la cantidad de linfocitos infundidos, el siguiente paso sea estudiar los subtipos de linfocitos del que depende este efecto beneficioso.

La explicación más aceptada para esta ventaja en la supervivencia es que la reconstitución inmune temprana puede tener un efecto protector contra la enfermedad mínima residual tras el TAPH. Éste sería un efecto análogo al efecto “*graft versus host*” del aloinjerto en pacientes sometidos a alo-TPH y al efecto “*lymphocyte versus host*” en los paciente que reciben infusión de linfocitos del donante, efecto sobradamente demostrado y en el que el sistema inmune del donante es considerado como el responsable de la erradicación de la enfermedad.

La limitación de los estudios previamente analizados es su carácter retrospectivo y por tanto la incapacidad de determinar que subtipos de linfocitos podrían haber estado implicados en la recuperación linfocitaria precoz en al TAPH y, con ello, su relación con el resultado clínico del trasplante y la supervivencia.

3.4.1 RELACIÓN DE LAS CIFRAS DE CÉLULAS PROGENITORAS CD34+ INFUNDIDAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA (potenciales progenitores linfopoyéticos existentes en el autoinjerto).

La mayoría de las trabajos reseñados [147, 148, 151, 158], no han encontrado relación entre las cifras de células CD34 infundidas y la RL precoz, por lo que parece evidente que son necesarios más estudios para tratar de determinar el impacto real del recuento y calidad de los progenitores hematopoyéticos CD34+ infundidos sobre la recuperación linfoide.

Múltiples trabajos [180-182] han demostrado un injerto rápido y una rápida recuperación hematológica con dosis altas de progenitores CD34+, siendo claramente dependiente del número y tipo de progenitores CD34 infundidos. El incremento de la dosis de CD34, disminuye el tiempo de injerto de los neutrófilos y plaquetas, reduce los requerimientos

transfusionales de plaquetas, aunque parece no influir sobre la RL precoz [147, 148, 151, 158].

Los análisis multivariantes realizados para determinar los factores predictivos de la recuperación hematológica tras el TAPH han concluido que la dosis de células CD34+ trasplantadas es un factor predictor altamente significativo de una rápida recuperación hematológica y disminuye las complicaciones y la toxicidad del procedimiento [180-182]. Sin embargo, otras variables, incluyendo el diagnóstico de base, el régimen de acondicionamiento y las complicaciones peritrasplante parecen alterar el efecto de la dosis de CD34 sobre la recuperación hematológica.

Así, *Weaver et al* [180] observaron que aumentando la dosis de CD34 por encima de $2,5 \times 10^6/\text{Kg}$, el tiempo medio para alcanzar una cifra de neutrófilos por encima de $0,5 \times 10^9/\text{L}$ disminuía drásticamente. Más aún, utilizando la estimación *Kaplan-Meier*, el número de días requerido por el 95% de los pacientes para alcanzar dicho recuento de neutrófilos disminuía llamativamente, al igual que lo hacían los días libres de transfusión de plaquetas ($\geq 20 \times 10^9/\text{L}$) cuando la dosis de de CD34 se incrementaba por encima de 5 a $10 \times 10^6/\text{Kg}$. Desafortunadamente, en estos trabajos sólo se estudió la recuperación hematológica en términos de injerto de neutrófilos y de plaquetas, sin prestar atención a la RL.

En este sentido sólo el trabajo de *Gordan et al.* [159] ha encontrado que la RL precoz es un factor pronóstico independiente para la SLE pero la cantidad de células CD34 infundidas tenía más potencia estadística y era también un factor pronóstico independiente tanto para la SLP como para la SG, sugiriendo que las RL precoz dependía de la cantidad de progenitores CD34 infundidos. Sin embargo, *Rutella et al.* [183], estudiaron la reconstitución inmune durante los 4 primeros meses post-trasplante en dos cohortes: pacientes con selección positiva CD34 y pacientes sin manipulación del producto. En el grupo con selección positiva se produjo una RL más lenta, lo que va en contra de esta hipótesis, ya que el número de células CD34 infundidas fue igual en ambos grupos.

En otros trabajos [46, 184-186] en los que se analizan las cifras de progenitores CD34 trasplantados, los datos obtenidos sugieren que los progenitores hematopoyéticos más indiferenciados (CD34+CD33-/CD34+CD133+) son los que están implicados en una recuperación hematológica más rápida, tanto en progenitores obtenidos de sangre periférica como de médula ósea, mientras que la dosis de células progenitoras más diferenciadas (CD34+CD33+/CD34+CD133-), no se correlaciona con una recuperación hematológica más rápida. No obstante, la repercusión de estos progenitores más indiferenciados sobre la RL es actualmente un tema de debate.

3.4.2 RELACIÓN DEL CONTENIDO DE LINFOCITOS MADUROS DEL INJERTO SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

Normalmente, la recuperación de neutrófilos y plaquetas se considera como el punto final de la recuperación hematológica después del TAPH, produciéndose normalmente durante en el primer mes post-trasplante. Sin embargo la recuperación inmunológica, punto final considerado de escasa importancia y poco estudiado, es un proceso lento y gradual que no se completa sino meses o incluso años después del TAPH [179, 187]. Esta lenta recuperación afecta sobre todo a los linfocitos B y T [187, 188], sin embargo, estudios sobre la recuperación inmunológica post-TAPH han demostrado que las células NK se recuperan precozmente, en número absoluto en el primer mes después del TAPH [179, 187, 189]. De hecho, parece que las células NK alcanzan cifras absolutas y funcionalismo normal a las dos semanas del TAPH [179, 190]. También se produce esta rápida recuperación de células NK en la fase de recuperación hematológica en pacientes tras trasplante alogénico [191] y en pacientes tras haber recibido quimioterapia [192].

Se sabe que tras el TAPH se producen diversas alteraciones inmunológicas que, en general, son más atenuadas cuando se utilizan progenitores procedentes de sangre periférica [188], teniendo una recuperación inmune más acelerada del ratio CD4/CD8, de la regeneración de NK, y de la actividad mitótica T. Todo ello, probablemente sea el resultado de un mayor contenido de linfocitos T del injerto de sangre periférica [179, 183, 188].

Cuando se analizan los resultados publicados sobre el efecto de las distintas subpoblaciones linfocitarias en la reconstitución inmune tras el TAPH podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los recuentos y actividad funcional de monocitos y células NK se recuperan rápidamente, normalmente dentro del primer mes post-trasplante, seguidas de los linfocitos CD8, B y mas tardíamente los CD4 [179, 188].
2. Las subpoblaciones CD34 son diferentes en función de su origen: médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón. Aunque la concentración en médula ósea es mayor, las células CD34 procedentes de médula ósea poseen una capacidad clonogénica inferior a las procedentes de sangre periférica o sangre de cordón y por tanto la reconstitución hematopoyética es más lenta. Además existe una mayor proporción de progenitores mieloides en sangre periférica y sangre de cordón que en médula ósea lo que contribuye también a esta rápida recuperación [179, 189].
3. Los linfocitos B reaparecen sobre el día +30 tras TAPH alcanzando cifras hemoperiféricas normales después de los tres meses post-trasplante autólogo y alogénico en ausencia de

enfermedad injerto contra huésped (EICH), pues se retrasa en presencia de EICH. Las cifras de linfocitos B se recuperan más tempranamente que las de los T, aunque su recuperación funcional es más lenta, quizás debido a la necesaria colaboración de las células T, alargándose el periodo de hipogammaglobulinemia [179, 188, 190].

4. La recuperación de los linfocitos T también ocurre lentamente, generalmente en los 6 primeros meses post-trasplante, con un ratio CD4/CD8 marcadamente disminuido durante un período largo. Los linfocitos T que aparecen post-trasplante son CD45RO⁺ linfocitos T maduros de memoria. Los linfocitos CD4+CD45RA⁺ (vírgenes) permanecen disminuidos tras el trasplante autólogo y alogénico, aunque puede deberse a que la mayoría de los pacientes estudiados son adultos y por tanto con timos atróficos. Los pacientes menores de 18 años poseen mayor cantidad de linfocitos CD4+CD45RA⁺ y menos tasas de infecciones, sin embargo, tras el trasplante, las células CD4+CD45RO⁺ se recuperan rápidamente, y con mayor rapidez en el autólogo. Estas células inducen a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas y a los linfocitos T CD8⁺ a desarrollar su función citotóxica [190].

5. Los linfocitos T CD8⁺ tanto CD45RO como CD45RA, recuperan sus cifras normales dentro del primer mes post-trasplante autólogo y de los tres primeros meses post-trasplante alogénico. Esta recuperación, como la de las células NK, es timo-independiente y se cree que son células regeneradas y no procedentes de linfocitos maduros infundidos [190, 195].

6. También existen diferencias funcionales en la recuperación linfocitaria según la fuente de progenitores utilizada: existe una tendencia a la recuperación más rápida de los linfocitos CD4, NK y linfocitos T inmaduros (CD45RA) usando sangre periférica y de los CD8, linfocitos B y linfocitos memoria (CD45RO) usando médula ósea. La recuperación más rápida de los linfocitos NK y T utilizando sangre periférica podría contribuir a obtener mejores resultados clínicos [179, 188].

7. La manipulación del producto puede afectar a la calidad de la reconstitución linfocitaria [183]:

-A pesar de que la recuperación de las cifras normales de linfocitos se produce de forma rápida y satisfactoria en todos los pacientes, los pacientes en los que el injerto es sometido a selección positiva de CD34, presentan una recuperación más lenta.

-Esta disminución afecta globalmente a todas las subpoblaciones linfocitarias, aunque los más afectados son los linfocitos CD4, que permanecen muy disminuidos durante los primeros meses post-trasplante. Las células CD8⁺ sufren una recuperación rápida en ambos grupos, mayor en los pacientes sin selección positiva, produciendo una expansión supranormal lo que se traduce en una importante

disminución del cociente CD4/CD8; al cabo de 2 meses post-TAPH caen a niveles normales y se normaliza el cociente CD4/CD8.

-El uso de factores de crecimiento (G-CSF y GM-CSF) puede ayudar a aumentar el injerto granulopoyético y linfopoyético; ambos factores pueden aumentar la reconstitución inmune, en particular los linfocitos CD8 en el caso de G-CSF y de los linfocitos CD4 en el de GM-CSF, sin afectar a los linfocitos B ni a los linfocitos NK.

Siguiendo la hipótesis de *Porrata et al*, el hecho de que la reconstitución linfoide en general sea mejor en los pacientes en los que no se ha utilizado selección positiva, apoya la hipótesis de que ésta depende directamente de los linfocitos maduros presentes en el autoinjerto. Sin embargo, existen argumentos contradictorios que apuntan a que son linfocitos regenerados tras el trasplante, como parece indicar el ratio CD45RA/CD45RO post-trasplante [190]. Además la reconstitución linfocitaria T, en el adulto, al tener suprimida la función tímica, se produciría fundamentalmente a partir de células progenitoras T contenidas en el injerto. Como consecuencia, los adultos y adolescentes receptores de trasplante de progenitores, son incapaces de regenerar células T CD4 vírgenes (“naive” o CD45RA) lo que produce una severa inmunodeficiencia; sin embargo, no habría diferencias en la reconstitución de la inmunidad T CD8 y NK (independiente del timo) [196, 197].

Desafortunadamente, existe tan sólo un trabajo realizado directamente sobre los subtipos de linfocitos del injerto. En este trabajo [198] se estudian sólo 7 pacientes (3 con mieloma múltiple y 4 con linfoma no-Hodgkin); los pacientes con linfoma no Hodgkin fueron movilizados con G-CSF a dosis de 10 µgr/Kg/día durante 5-7 días consecutivos y los pacientes con mieloma múltiple con ciclofosfamida 1,5 gr/m² + G-CSF a dosis de 10 µgr/Kg/día. Las aféresis se realizaron el día 5 de factor, procesando de 10-20 litros/día a 50-60 ml/min. Los pacientes se sometieron diariamente a aféresis hasta conseguir $\geq 2 \times 10^6$ células CD34/Kg. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. RL precoz (día 15 post-TAPH) y subpoblaciones linfocitarias del autoinjerto (células x 10⁶/Kg). Adaptado a partir de *Porrata et al* [198].

Paciente	Diagnóstico	RL-15	CD3+	CD4+	CD8+	CD19+	CD16+/56+/3-
1	MM	415	143	110	33	0,91	49
2	MM	750	50,7	34,6	25,3	0,53	102,6
3	MM	480	79,3	48	21	0,18	26
4	LNH	175	14	3,4	6,6	0,7	8,4
5	LNH	560	190	47	137	16	53
6	LNH	600	277	67	213	0,18	49
7	LNH	620	218	176	47,7	1,65	164

Tabla 18. Relación entre el número absoluto de los diversos subtipos de linfocitos contenidos en el autoinjerto y la RL precoz (día 15 post-TAPH), (r=rho de Spearman). Adaptado a partir de *Porrata et al [198]*.

Subtipos de linfocitos	Índice de correlación (r)*	P
CD3	0,21	0,64
CD4	0,32	0,48
CD8	0,39	0,38
CD19	0,14	0,76
CD16+/CD56+/CD3-	0,77	0,04

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la mayoría de los linfocitos recolectados son linfocitos T y NK, lo que concuerda con los datos obtenidos por *Verbik et al.* en 1985 [199] quien analizando inmunofenotípicamente los productos de las aféresis de sangre periférica obtuvo como poblaciones predominante los subtipos T y NK. En este estudio tampoco se encuentra correlación entre la dosis de CD34 infundida y RL precoz en el día 15.

En resumen, la razón última para la reconstitución linfoide post-trasplante precoz, continua siendo desconocida. Las células NK y CD8 juegan un importante papel en la inmunovigilancia precoz después del trasplante, y parecen ser el principal subtipo celular responsable del efecto “*injerto contra tumor*” del autoinjerto en el TAPH; sin embargo, se desconoce si éstas células que se recuperan tempranamente proceden de las células linfoides maduras presentes en el autoinjerto o bien de los progenitores inmaduros linfopoyéticos CD34 infundidos.

3.5 PAPEL DE LA RECUPERACIÓN LINFOCITARIA TARDÍA SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

El único trabajo realizado sobre la RL tardía [200] se trata de una serie de 190 pacientes diagnosticados de mieloma múltiple, sometidos a un primer TAPH, donde se analiza la recuperación linfocitaria más tardía (días 30, 60, 100, 180 y 365 post-TAPH). Los resultados obtenidos muestran que sólo la RL tardía en el día 30 (recuento absoluto de linfocitos $\geq 1 \times 10^9/L$) influyó significativamente sobre la SLE y la SG. Mientras que la RL tardía en los días 60, 100, 180 y 365 no predijeron mejor SLE ni mejor SG (tabla 19).

Tabla 19. Datos de supervivencia en función de la RL tardía en el día 30 ($\geq 1 \times 10^9$ vs $< 1 \times 10^9$ /L). Adaptado a partir de *Hiwase D.K. et al* [200].

RL día 30	SG (meses)	P	SLE	P
$\geq 1 \times 10^9$ vs $< 1 \times 10^9$ /L	96 vs 48	0,04	43 vs 29	0,03

También se estudió la relación de la RL tardía con la cantidad de linfocitos infundidos: los pacientes que tenían más cantidad de linfocitos en el producto infundido ($\geq 0,2 \times 10^9/Kg$) tuvieron mejor recuperación linfocitaria en todos los puntos, siendo significativa en los días 60 y 100 (tabla 20).

Tabla 20. Datos de recuperación linfocitaria en diversos momentos durante el primer año post-TAPH en relación a la dosis de linfocitos infundida ($\geq 0,2 \times 10^9/Kg$ vs $< 0,2 \times 10^9/Kg$). Adaptado a partir de *Hiwase D.K. et al* [200].

PUNTO CORTE	RL día-15	RL día-30	RL día-60	RL día-100	RL día-180
Linfocitos	0,25 vs $0,19 \times 10^9/L$	1,2 vs $0,99 \times 10^9/L$	1,9 vs $1,01 \times 10^9/L$	1,58 vs $1,03 \times 10^9/L$	1,33 vs $1,01 \times 10^9/L$
p	0,3	0,08	0,013	0,016	0,1

Sin embargo, existen trabajos con resultados contradictorios. *Seshadri et al* [173], en 143 pacientes trasplantados con enfermedad de Hodgkin, en recaída o refractaria, no encuentran asociación entre la RL tardía en el día 90 y la SLE. Tampoco *Kim et al* [161], quien describió el punto de RL tardía en el día 23 ($\geq 1000/mm^3$) como factor pronóstico independiente para SG y para SLE, encuentra correlación con la cantidad de linfocitos infundidos, sugiriendo que otros factores, podrían influir en la RL tardía.

3.6 PAPEL DEL RECUENTO SANGUÍNEO DE LINFOCITOS AL DIAGNÓSTICO SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

Otro dato que sugiere un importante papel de la inmunidad en el pronóstico de la enfermedad de base, lo constituye el hecho de que el recuento absoluto de linfocitos al diagnóstico ha demostrado comportarse como un importante factor pronóstico y fuerte predictor de la supervivencia.

El impacto pronóstico del recuento de linfocitos al diagnóstico está bien establecido y se ha estudiado en pacientes con linfoma folicular [202] y con linfoma difuso de células grandes [203-205]. Los pacientes con un recuento absoluto de linfocitos al diagnóstico $\geq 1 \times 10^9/L$ poseen una SG mayor, es además un factor pronóstico independiente del FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) [202] y del IPI (*International Prognostic Index*) [205] y predice una buena respuesta al tratamiento quimioterápico [202, 203].

Plonquet et al [204] demostraron prospectivamente el valor del recuento absoluto de linfocitos y de las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica al diagnóstico (en concreto de las células NK), en un subgrupo de alto riesgo de pacientes jóvenes con linfoma B difuso de células grandes tratados con altas dosis de quimioterapia sin rituximab. De nuevo vuelven a aparecer datos de células NK asociados a buen pronóstico, esta vez al diagnóstico [205].

Una vez más el valor pronóstico positivo del recuento absoluto de linfocitos en el momento del diagnóstico refleja el papel importante que juega el sistema inmunitario del huésped, y en concreto, del papel de los linfocitos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

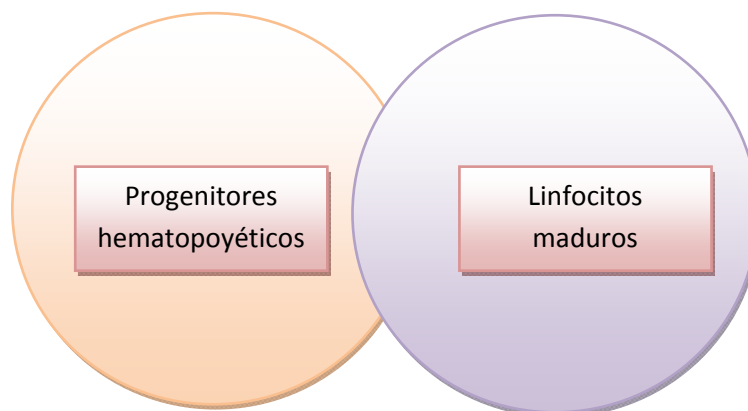
El sistema inmunitario del huésped juega un papel importante en el pronóstico de los pacientes con linfomas.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto este efecto en dos momentos evolutivos de la enfermedad: al diagnóstico, en relación con el recuento de linfocitos que posee el paciente en este momento y tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos, en relación con una recuperación linfoide precoz. El primero es un hecho contrastado y aceptado, mientras que el segundo, aunque la mayoría de los trabajos realizados en este sentido demuestran un efecto beneficioso, otros sin embargo no consiguen reproducirlo y por tanto es controvertido.

Clásicamente, el beneficio del trasplante autólogo se atribuye exclusivamente a las altas dosis de quimioterapia y a las cifras más o menos elevadas de progenitores CD34+ trasplantados. Sin embargo, trabajos recientes atribuyen un papel importante a la RL precoz y a un efecto injerto contra tumor dependiente de ésta.

Más ambiguo es aún el origen de estos linfocitos precoces. Existe la hipótesis de que son linfocitos maduros presentes en el auto-injerto y que depende directamente de la cantidad de linfocitos infundida, aunque no ha sido posible excluir que se puedan tratar de células regeneradas a partir de los progenitores hematopoyéticos.

EFFECTO INJERTO CONTRA LINFOMA:



Nuestra hipótesis se basa en el principio de la importancia del sistema inmune en la respuesta antitumoral. En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es que si podemos demostrar la existencia de un verdadero efecto injerto contra tumor en el trasplante autólogo y dilucidar qué factores celulares dependientes del injerto son los responsables de tal efecto (células hematopoyéticas progenitoras *versus* linfocitos maduros y distintas subpoblaciones de éstos), podríamos establecer nuevos factores pronósticos que permitieran mejorar las técnicas de recolección y de selección de los progenitores hematopoyéticos y con ello promover mejores supervivencias globales y/o libre de eventos.

Por otro lado, dado que los tratamientos actuales de primera línea en el linfoma no Hodgkin incluyen el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab^R), un antígeno presente en la superficie de los linfocitos B (15), quisimos investigar específicamente el impacto de este agente biológico, tanto en la recolección como en la recuperación inmune, hipotetizando que el uso del Rituximab tendría un efecto inmunomodulador relevante.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL.

Investigar el papel de las subpoblaciones celulares del injerto autólogo en el resultado del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con linfoma.

OBJETIVOS SECUNDARIOS.

1. Investigar la influencia del anticuerpo monoclonal Rituximab sobre la composición del injerto y la supervivencia.
2. Estudiar el papel de los linfocitos en distintos momentos de la enfermedad sobre la supervivencia.
3. Estudiar las posibles correlaciones de los cultivos clonogénicos con las células CD34 y sus subpoblaciones.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE PACIENTES A ESTUDIO.

La población a estudio la constituyeron 55 pacientes, diagnosticados en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca entre Febrero de 1995 y Abril 2007, de LNH (43 pacientes) y LH (12 pacientes) en recaída o refractarios y sometidos a TAPH (gráfico 9). Los trasplantes se llevaron a cabo entre el Marzo de 1996 y Febrero de 2008. La fecha final de inclusión de pacientes fue la de las infusiones realizadas hasta el 01/08/2008, con una mediana de seguimiento de 72 meses (6 años).

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.

La distribución por sexos fue de 35 hombres y 20 mujeres. La mediana de edad del grupo total de pacientes al diagnóstico fue de 45 años (rango 13-71). Las características de los pacientes para los dos tipos de linfomas incluidos en el estudio se expresan a continuación (tabla 21 y gráfico 9).

Tabla 21. Datos demográficos. La edad se expresa en mediana (rango) de años.

	LINFOMA NO HODGKIN	LINFOMA DE HODGKIN
Edad al diagnóstico	46 (16-71)	33 (13-49)
Edad al trasplante	48 (17-72)	37 (15-52)
Hombres	27	8
Mujeres	16	4

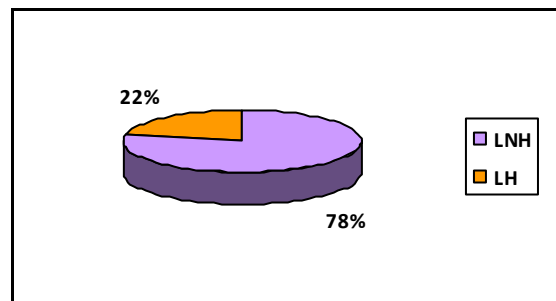
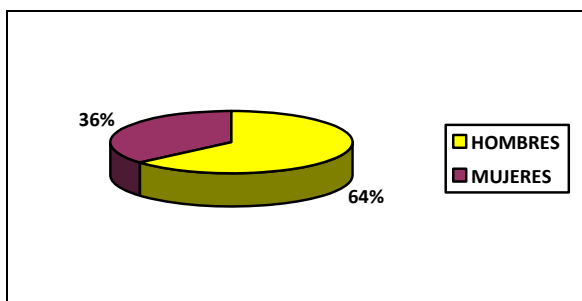


Gráfico 9. Distribución por sexos y por tipo de linfoma.

El subtipo del linfoma según clasificación OMS, estadio *Ann Arbor* al diagnóstico y los factores pronósticos se exponen en la tabla 22.

Tabla 22. Clasificación de la OMS, estadio Ann Arbor y factores pronósticos.

LINFOMA NO HODGKIN (43)			LINFOMA DE HODGKIN (12)		
	N	%		N	%
DIAGNÓSTICO OMS			DIAGNÓSTICO OMS		
Linfoma difuso de células grandes B	9	20,9	Linfoma de Hodgkin clásico	12	100
Linfoma B mediastínico primario	2	4,6	-Esclerosis nodular	11	91,7
Linfoma folicular	18	41,8	-Celularidad mixta	0	0
Linfoma de células del manto	5	11,6	-Rico en linfocitos	0	0
Linfoma extranodal zona marginal (MALT)	1	2,3	-Depleción linfoide	1	8,3
Linfoma de Burkitt	3	6,9	Predominio linfocítico nodular	0	0
Linfoma T periférico (angiocéntrico)	1	2,3			
Linfoma linfocítico de células pequeñas B	1	2,3			
Linfoma T primario mediastínico	1	2,3			
Linfoma T anaplásico CD30 (-/+ ALK (-)	1	2,3			
Linfoma extraganglionar primario	1	2,3			
ESTADIO ANN-ARBOR			ESTADIO ANN-ARBOR		
I	5	11,6	I	0	0
II	4	9,3	II	6	50
III	10	23,2	III	0	0
IV	24	55,8	IV	6	50
FACTORES PRONÓSTICOS			FACTORES PRONÓSTICOS		
Edad \geq 60 años	8	18,6	Edad \geq 60 años	0	0
LDH aumentada	12	27,9	LDH aumentada	1	8,3
B ₂ microglobulina aumentada	15	34,8	B ₂ microglobulina aumentada	2	16,7
Sitios nodales > 4	19	44,1	Sitios nodales > 4	3	25
Performance status (ECOG) \geq 2	29	67,4	Performance status (ECOG) \geq 2	9	75
Afectación extranodal	26	60,4	Afectación extranodal	8	66,7
Sitios extranodales \geq 2	10	23,2	Sitios extranodales \geq 2	1	8,3
Estadios III/IV	33	76,7	Estadios III/IV	6	50
IPI Intermedio/alto	18	41,8	IPI Intermedio/alto	2	16,7
Hemoglobina < 120 gr/L	15	34,8	Hemoglobina < 120 gr/L	8	66,7
Afectación esplénica	12	27,9	Afectación esplénica	3	25
Masa Bulky	11	25,5	Masa Bulky	5	41,6

1.2 TRATAMIENTOS RECIBIDOS.

Todos los pacientes recibieron tratamiento de inducción pretrasplante quimioterápico con o sin radioterapia y con o sin rituximab (en pauta estándar acompañando a la quimioterapia o de mantenimiento). Todos recibieron de 1 a 3 líneas de tratamiento quimioterápico antes del trasplante como se detalla en las tablas 23 y 24. En la tabla 23 se exponen los tratamientos administrados a los pacientes con LNH previos al TAPH.

Tabla 23. Pacientes con LNH. Tratamientos recibidos previos al TAPH.

PACIENTE Nº	TRATAMIENTO PRE-TRASPLANTE	LÍNEAS	RADIOTERAPIA pretrasplante	RITUXIMAB pretrasplante
1	R-CHOP +ESHAP	2	NO	SI
2	CHOP	1	NO	NO
3	CHOP + ESHAP	2	NO	NO
4	R-CHOP + R-FMD	2	NO	SI
5	CHOP	1	NO	NO
6	HIPER CVAD + RITUXIMAB	1	NO	SI
7	FMD x 6 + RITUXIMAB	1	NO	SI
8	CHOP + ESHAP	2	SI	NO
9	CHOP + R-FMD	2	NO	SI
10	R-CHOP +R-FMD	2	SI	SI
11	CVP + R-CHOP + ESHAP	3	SI	SI
12	CVP +Promace-Cytabon + FMDx6	3	SI	NO
13	CHOP + MINE	2	NO	NO
14	CHOP +MINE	2	NO	NO
15	R-CHOP + R-FMC	2	NO	SI
16	CHOP	1	NO	NO
17	CHOP + FMD	2	SI	NO
18	R-CHOP + hyperCVAD	2	NO	SI
19	CHOP	1	NO	NO
20	MEGA-CHOP+McMASTER	2	NO	NO
21	MINE + M-BACOP + RITUXIMAB	2	SI	SI
22	McMASTER + CHOP + ESHAP	3	SI	NO
23	R-CHOP	2	NO	SI
24	CHOP + ESHAP	2	NO	NO
25	CHOP + MACOP-B + dexaBEAM	3	NO	NO
26	FMD + RITUXIMAB + R-CHOP	2	NO	SI
27	CHOP + MINE + ESHAP	3	NO	NO
28	R-CHOP + ESHAP	2	NO	SI
29	R-CHOP +FLUDARABINA + R-CNOP	3	SI	SI
30	R-CHOP	1	NO	SI
31	CHOP + ESHAP	2	NO	NO
32	MACOP- B + MINE	2	NO	NO
33	R-CHOP + ESHAP	2	NO	SI
34	MEGACHOP	1	NO	NO
35	CHOP	2	NO	NO
36	CHOP	1	NO	NO
37	CHOP+ FLUDARABINA + RITUXIMAB	3	SI	SI
38	McMASTER	1	NO	NO
39	CHOP + FMD + RITUXIMAB	2	NO	SI
40	CHOP	1	SI	NO
41	CHOP +RITUXIMAB	1	NO	SI
42	CHOP + ESHAP + RITUXIMAB	2	NO	SI
43	R-MEGACHOP + R-IFE	2	NO	SI

En el gráfico 10 se representa el porcentaje de pacientes que recibieron rituximab previo al TAPH:

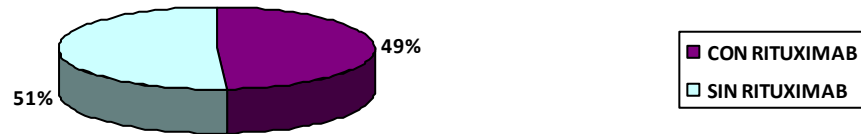


Gráfico 10. Pacientes con linfoma no Hodgkin que recibieron rituximab pretrasplante (21 pacientes).

En el gráfico 11 se representa el porcentaje de pacientes que recibieron radioterapia pretrasplante:



Gráfico 11. Pacientes con linfoma no Hodgkin que recibieron radioterapia pretrasplante (10 pacientes).

En la tabla 24 se exponen los tratamientos administrados a los pacientes con LH previos al TAPH.

Tabla 24. Pacientes con LH. Tratamientos recibidos previos al TAPH.

PACIENTE Nº	TRATAMIENTO PRE-TRASPLANTE	LINEAS	RADIOTERAPIA pretrasplante
1	ABVD + BACOPP	2	NO
2	CMOP/ABVD + ESHAP	2	SI
3	HIBRIDO + ESHAP	2	NO
4	ABVD + C-MOPP + ESHAP	3	NO
5	ABVD + ESHAP	2	NO
6	ABVD + CMOPP + ESHAP	3	SI
7	ABVD + CNOOP + ESHAP	3	NO
8	ABVD + ABVD + DHAP	2	NO
9	EH-SEOP 2003 + ESHAP	3	SI
10	ABVD + ABVD	2	SI
11	ABVD	1	SI
12	HIBRIDO(COPP) + ABVD + ESHAP	3	NO

1.3 SITUACIÓN CLÍNICA PRE-TRASPLANTE Y RESPUESTA.

Los criterios de respuesta se basaron en las guías internacionales.

Para el linfoma no Hodgkin se siguieron las guías internacionales del “*NHL International Workshop*” [206]. La respuesta completa se definió como una completa remisión de la enfermedad medible o evaluable, incluyendo pruebas radiológicas y pruebas biológicas. Los criterios de respuesta parcial son la reducción en $\geq 50\%$ del diámetro longitudinal y perpendicular de la lesión con una disminución de $\geq 30\%$ de la hepatomegalia o esplenomegalia (desde el reborde costal). La enfermedad estable fue definida como respuesta menor que la parcial pero sin progresión. Enfermedad en progresión fue definida como $\geq 25\%$ de incremento en el diámetro longitudinal y perpendicular de la lesión con respecto al estudio previo al tratamiento, la aparición de lesiones nuevas o incremento de > 2 cm del tamaño del bazo o hígado debido al linfoma, con respecto a estudios previos. Enfermedad en recaída fue definida como la aparición de nuevas lesiones o incremento $> 50\%$ de los tamaños de las lesiones previas.

Para el linfoma de Hodgkin se definió respuesta completa a la desaparición de todas las anormalidades, clínicas y radiológicas, atribuidas al linfoma, por al menos 4 semanas después de terminado el tratamiento y la negativización de la biopsia ósea cuando era positiva. Se consideró respuesta parcial una reducción mayor a 50% de las masas medibles, por al menos 4 semanas. Enfermedad estable fue definida como respuesta menor que la parcial pero sin progresión. Fracaso o refractariedad a una reducción menor a 50% de las masas medibles o muerte durante el tratamiento [207].

En la fecha de fin de reclutamiento de pacientes (1 de Agosto de 2008), globalmente, las respuestas al tratamiento de inducción y trasplante fueron:

- Respuesta completa: 48 pacientes.
- Respuesta parcial: 4 pacientes.
- Progresión de la enfermedad tras el trasplante: 1 paciente.
- No respuesta/enfermedad estable: 1 paciente.
- Mortalidad relacionada con el trasplante: 1 paciente.

Los resultados clínicos del trasplante se resumen en las tablas 25 y 26:

Tabla 25. Pacientes con LNH. Situación clínica pre y post-trasplante (RC1: 1ª respuesta completa; RC2: 2ª respuesta completa; RC3: 3ª respuesta completa; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial).

CARACTERÍSTICAS (N=43)	N	%
SITUACIÓN PRE-TRASPLANTE		
• RC1	14	32,5
• RC2	14	32,5
• RC3	2	4,6
• RP	13	30,2
• REFRACTARIO	0	0
SITUACIÓN POST-TRASPLANTE		
• RC	40	93
• RP	2	4,6
• PROGRESIÓN	1	2,3

Tabla 26. Pacientes con LH. Situación clínica pre y post-trasplante (RC1: 1ª respuesta completa; RC2: 2ª respuesta completa; RC3: 3ª respuesta completa; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial).

CARACTERÍSTICAS (N=12)	N	%
SITUACIÓN PRE-TRASPLANTE		
• RC1	0	0
• RC2	5	41,7
• RC3	2	16,7
• RP	3	25
• REFRACTARIO PRIMARIO	2	16,7
SITUACIÓN POST-TRASPLANTE		
• RC	9	75
• RP	1	8,3
• NO RESPUESTA	1	8,3
• EXITUS (mortalidad relacionada con el trasplante)	1	8,3

2. METODOLOGÍA DE LA MOVILIZACIÓN, RECOLECCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

2.1 MOVILIZACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

Los pacientes recibieron uno de los siguientes esquemas de movilización:

1. **G-CICLO:** Ciclofosfamida 1,5 gr/m² el día -10 + G-CSF 10-20 µgr/Kg/día desde el día -4 hasta finalizar el proceso de recolección.
2. **G-CSF:** Factor estimulante de crecimiento de colonias sólo: G-CSF 10-20 µgr/Kg/día desde el día -4 hasta finalizar el proceso de recolección.
3. **Quimioterapia + G-CSF:** G-CSF 10-20 µgr/Kg/día desde el día -4 hasta finalizar el proceso de recolección tras la quimioterapia.
4. **Ciclofosfamida sólo:** Ciclofosfamida 3 gr/m² el día -10.

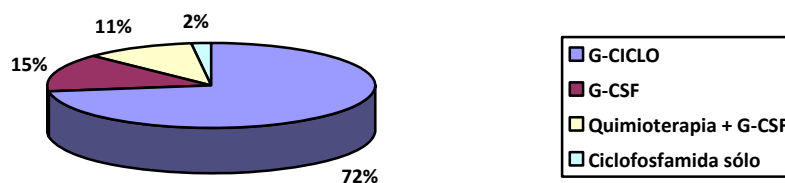


Gráfico 12. Esquemas de movilización utilizados.

Según el grupo de linfoma el protocolo de movilización empleado se muestra en la tabla 27.

Tabla 27. Esquemas de movilización empleados.

MOVILIZACIÓN	LNH	LH
CICLOFOSFAMIDA + G-CSF	33	7
G-CSF	6	2
QUIMIOTERAPIA + G-CSF	4	2
CICLOFOSFAMIDA SÓLO	0	1

Las movilizaciones y posteriores recolecciones se programaron individualmente para cada paciente, una vez terminada la quimioterapia de inducción y valorada la respuesta. Todas se realizaron en situación de respuesta clínica (excepto en un paciente con LH que fue refractario primario).

2.2 RECOLECCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

2.2.1. RECOLECCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

Las aféresis se realizaron a través de un catéter venoso central (tipo *Hickman* o *Shaldon*) mediante un separador celular de flujo continuo (*Fenwal CS3000; Baxter, Deerfield, IL*) a un flujo de 60-80 ml/minuto. En cada proceso de aféresis se procesaron 4 volemias (aféresis de alto volumen).

Para evitar la coagulación de la sangre durante el proceso de aféresis se perfundió una mezcla de heparina sódica (*Rovi S.A.*) más citrato-dextrosa formula A (*ACD-A; Baxter, Deerfield, IL*): 10 UI de heparina por ml de ACD-A.

Se realizó recuento de células CD34 mediante citometría de flujo con un citómetro *FACSCalibur (Becton-Dickinson, BD)*, equipado con un láser de argón que emite a 488 nm, mediante procedimiento estándar con los anticuerpos monoclonales anti-CD34 (*PE conjugated, clone HPCA-2, BD*), anti-CD45 (*PerCp-conjugated, clone M5E2, BD*) y anti-CD14 (*FITC-conjugated, clone 2D1, BD*). Se adquirieron un mínimo de 50000 eventos. Los datos fueron analizados mediante el software *paint-a-gate* (BD).

En los pacientes movilizados con G-CSF las aféresis comenzaron el día +5 de iniciar el G-CSF, en los movilizados con ciclofosfamida o ciclofosfamida más G-CSF, comenzaron al día +10 de la ciclofosfamida, y entre los días +15 y +20 en los pacientes movilizados con quimioterapia + G-CSF, cuando el recuento leucocitario era $\geq 2,5 \times 10^9/L$. Se continuaba diariamente con las aféresis hasta alcanzar $\geq 1,9 \times 10^6$ células CD34+/Kg.

A dos pacientes con LNH se les realizó selección positiva de células CD34+ por método inmuno-magnético (*Isolex 300i. Baxter*), para el resto de casos, el trasplante se llevo a cabo con el producto de aféresis no manipulado.

2.2.2 CRIOPRESERVACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

Los productos obtenidos de la aféresis fueron procesados bien inmediatamente después de su recogida o bien tras almacenamiento durante la noche a 4 ° C.

La criopreservación se realizó a una concentración final de células igual o inferior a 150×10^6 /ml. La mezcla de criopreservación se preparó con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 10% de DMSO en plasma autólogo. La mezcla de criopreservación se enfrió a 4-6°C, y se mezcló lentamente (durante unos 10 minutos) con el producto de la aféresis en las bolsas de congelación de etileno acetato de vinilo (*Cryocyte Freezing Container; Nexell Therapeutics, Irvine, CA*), bien sobre el hielo picado o bien sobre bloques acumuladores de frío. Además, se transfirieron tres alícuotas de 0,5 ml de la suspensión celular a criotubos de polipropileno (*criovial, Simport plásticos Inc, Beloeil, Quebec, Canadá*) para la evaluación de control.

Tanto las bolsas como los criotubos se congelaron con un equipo con tasa de congelación controlada (CM-25, y Carburos Metálicos, Barcelona), bajando la temperatura a razón de 1-2 °C/min hasta llegar a -120 °C. Después del proceso de congelación, las bolsas y los criotubos fueron transferidos a los contenedores de nitrógeno líquido de almacenamiento.

Para la descongelación, las bolsas y/o los criotubos fueron retirados del nitrógeno líquido, colocados en un baño de agua a 40°C, agitando suavemente y retirándolos inmediatamente tras la descongelación.

Alícuotas de 0,5 ml del producto de la bolsa o del criotubo de control se diluyeron a una dilución 1/10 (v/v) en PBS (*phosphato buffer saline*) y se dejaron en hielo picado hasta su procesamiento.

2.3 METODOLOGÍA DEL TRASPLANTE.

2.3.1 ACONDICIONAMIENTO.

Los esquemas de acondicionamiento utilizados se exponen en la tabla 28:

Tabla 28. Esquemas de acondicionamiento.

ACONDICIONAMIENTO	LINFOMA NO HODGKIN	LINFOMA DE HODGKIN
BEAM	39	12
Z-BEAM	2	0
LACE	1	0
BUCY-2	1	0

FÁRMACOS	DOSIS DIARIA	DÍAS
BEAM		
Carmustina (BCNU)	300 mgr/m ²	-6
Etopósido	200 mgr/m ²	-5, -4, -3, -2
Citarabina	400 mgr/m ²	-5, -4, -3, -2
Melfalán	140 mgr/m ²	-1
Z-BEAM		
Rituximab	250 mgr/m ²	-21, -14
Ibritumomab-tiuxetan	0.4mci/kg	-14
Carmustina (BCNU)	300 mgr/m ²	-6
Etopósido	200 mgr/m ²	-5, -4, -3, -2
Citarabina	400 mgr/m ²	-5, -4, -3, -2
Melfalán	140 mgr/m ²	-1
BUCY-2		
Busulfán	16 mgr/Kg	-7, -6, -5, -4
Ciclofosfamida	60 mgr/Kg	-3, -2
LACE		
Lomustina (CCNU)	200 mgr/m ²	-7
Etopósido	1 gr/m ²	-7
Citarabina	2 gr/m ²	-6, -5
Ciclofosfamida	1,8 gr/m ²	-4, -3, -2

La infusión de progenitores se realizó el día 0 previa descongelación de los progenitores.

Todos los pacientes recibieron profilaxis antibacteriana con quinolonas (ciprofloxacino o levofloxacino), antivírica con aciclovir y antifúngica con fluconazol desde el día previo al inicio del acondicionamiento.

Todos los pacientes recibieron G-CSF a dosis de 300 $\mu\text{gr}/\text{Kg}/\text{día}$ a partir de día +4 hasta que se produjo el injerto granulocitario.

Todos los pacientes recibieron terapia transfusional profiláctica de concentrados de plaquetas irradiados cuando la cifra de plaquetas era $< 20 \times 10^9/\text{L}$ y de concentrados de hematíes irradiados cuando la concentración de hemoglobina era $< 80 \text{ gr}/\text{L}$.

2.3.2 DESCONGELACIÓN DEL PRODUCTO A INFUNDIR.

Antes de descongelar el producto criopreservado para un paciente al que se le va a infundir, se comprueba el nombre del paciente preguntándose personalmente y cotejándolo con el impreso en los demográficos de la etiqueta.

Las descongelaciones se realizaron en un baño con agua destilada a una temperatura de 37-40° C, inicialmente dentro de una bolsa de nutrición parenteral para evitar pérdidas celulares. Posteriormente, pasados 30 segundos, una vez comprobada la ausencia de fugas celulares, se extrae la bolsa del producto de la bolsa de nutrición parenteral y se reintroduce en el baño, agitándola suavemente, hasta que está completamente descongelada.

Posteriormente, en la cámara de flujo laminar se conecta un sistema de transfusión a la bolsa, se purga y se recogen 0,5ml para realizar controles biológicos.

2.3.3 INFUSIÓN DE LA BOLSA DE PROGENITORES.

Inicialmente se comprueba que las constantes del pacientes son apropiadas (presión arterial, pulso, temperatura, saturación de oxígeno). A continuación se lee en alto el nombre de la etiqueta que viene pegada a la bolsa de progenitores y se confirma que corresponde al paciente al que se le va a infundir. Igualmente se comprueba que se ha puesto la pre-medicación apropiada.

Se coloca un paño estéril debajo de la vía de acceso que se va a utilizar para la infusión. Se conecta la bolsa del producto a través de un sistema de transfusión con filtro de agregados en uno de los accesos de una llave de tres pasos previamente conectada a la vía de acceso y una jeringa de 50 cc en la otra conexión de la llave. Con la jeringa se aspira el producto y se infunde al paciente. Este paso se va repitiendo lentamente hasta que se completa la infusión total del producto, procurando que la infusión de cada bolsa se no dure más de 15-20 minutos.

Antes de finalizar la infusión se recoge una muestra de 1cc de producto pinchando para controles microbiológicos y de viabilidad celular.

En los días sucesivos, se monitoriza diariamente mediante hemogramas hasta la total recuperación hemoperiférica del paciente.

3. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trata de un estudio retrospectivo en el que tras la realización de los TAPH, se recogieron todos los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes. Junto a él se realizó un estudio experimental igualmente de forma retrospectiva, para analizar con más detalle la calidad de los inóculos en cada paciente mediante citometría de flujo multifuorescente. Esta parte del estudio se pudo llevar a cabo gracias a que se disponía de muestras de todos los pacientes, idénticas a las células infundidas, conservadas en criotubos.

Para la recogida de datos se procedió a la revisión de las Historias Clínicas de los pacientes y de los registros informáticos del Laboratorio.

3.1 DATOS RETROSPECTIVOS.

3.1.1 DATOS CLÍNICOS Y BIOLÓGICOS AL DIAGNÓSTICO.

Se recogieron los siguientes datos: fecha de diagnóstico, edad, sexo, “*performance status*” según escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncologic Group*), subtipo OMS de linfoma, estadiaje *Ann Arbor*, tipo de tratamiento y número de líneas de tratamiento recibidas antes del trasplante (incluido rituximab y radioterapia pretrasplante), factores pronósticos clínicos y biológicos al diagnóstico:

- IPI.
- Presencia de masa tipo Bulky.
- Número de sitios nodales afectados.
- Presencia de afectación extraganglionar y número de sitios extranodales afectados.
- LDH.
- β_2 -microglobulina.
- Concentración de hemoglobina.
- Recuento absoluto de linfocitos.

3.1.2 DATOS REFERENTES A LA MOVILIZACIÓN, RECOLECTA E INFUSIÓN DE PROGENITORES: AFÉRESIS Y PRODUCTO RECOLECTADO.

Se recogieron los siguientes datos: fecha de la aféresis, peso, talla, volemia, protocolo de movilización, número de procesos realizados, cifra de linfocitos en el momento de iniciar la aféresis y las características del producto recolectado e infundido:

- Volumen del producto.
- CMN.
- Linfocitos totales.
- Células CD34+.
- CFU-mixtas.
- CFU-GM.
- BFU-E.

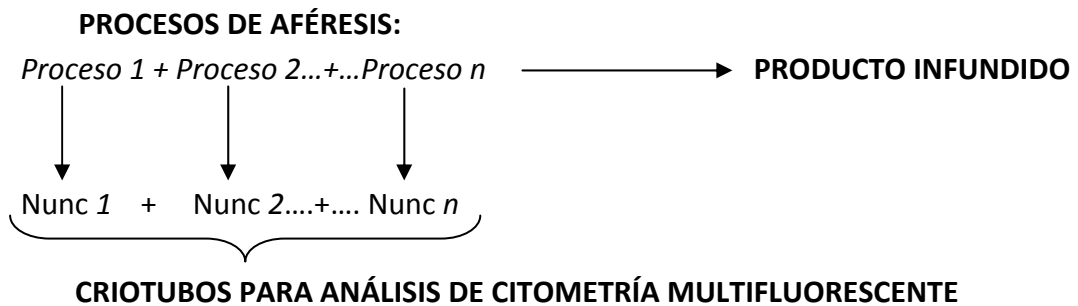
3.1.3 DATOS CLÍNICOS REFERENTES AL TRASPLANTE Y EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE.

Se recogieron los siguientes datos:

- Fecha del trasplante (día 0).
- Situación de la enfermedad previa al trasplante.
- Tipo de acondicionamiento utilizado para el trasplante.
- Evolución de la enfermedad post-trasplante (fecha de recaída/ progresión o muerte).
- Datos del injerto (el injerto de neutrófilos se definió como el primer día con $\geq 0,5 \times 10^9$ neutrófilos/L; el injerto plaquetar se definió como el primer día con $\geq 20 \times 10^9$ plaquetas/L con independencia transfusional).
- Cifra de linfocitos post-trasplante en los días 15, 30, 90, 180 y 365 post-trasplante.

3.2 DATOS EXPERIMENTALES. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL INÓCULO.

De cada una de las aféresis de cada trasplante realizado se cogió un tubo control criopreservado (*Nunc*) de 0,5 ml. Los tubos correspondientes a las diferentes aféresis de un mismo paciente correspondientes a las bolsas trasfundidas conjuntamente en el proceso de trasplante, se mezclaron para ser procesadas como una sola muestra.



3.2.1 PROTOCOLO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE CRIOBIOLOGÍA.

En el laboratorio de Criobiología se descongelan las muestras (un criotubo de 0,5 ml de cada proceso) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.3. Las muestras descongeladas se diluyen a 1/10 con PBS o medio de cultivo RPMI. A continuación se centrifugan (10 minutos a 2000 rpm) para retirar el sobrenadante, se resuspenden en 500µl de PBS o RPMI y se mezclan, en el caso de que se hubieran realizado varios procesos.

En todos los casos se comprobó la viabilidad celular con azul tripán obteniéndose en todas las muestras una viabilidad entre 70-90%.

Posteriormente se realiza recuento celular (hemograma) en un analizador hematológico modelo *Sysmex KX-21N* (Roche) y se diluye o se concentra para dejar una concentración final de 10-15x10⁹ células/L para posteriormente proceder al estudio citométrico del contenido celular del inóculo.

CÁLCULO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS (CMN) TOTALES.

La cantidad de CMN obtenidas en cada proceso de aféresis se calculó de la manera que se detalla a continuación, tanto para las células obtenidas antes de la congelación como en los productos de descongelación:

$$\text{CMN TOTALES (x10}^6\text{)} = \text{RECUENTO ABSOLUTO CELULAR x \% linfomonos / 100}$$

CMN antes de la congelación:

Recuento absoluto celular: suma de los recuentos absolutos de cada proceso, obtenido:

Volumen del proceso (ml) x Concentración celular obtenida del proceso (x10⁶/ml).

% de linfomonos: % de células mononucleares de cada proceso obtenido antes de congelar el producto.

CMN tras la descongelación:

Recuento absoluto celular (x10⁶): suma de recuentos absolutos de cada proceso, obtenido:

Volumen del proceso (ml) x Concentración celular del criotubo (después de descongelado) correspondiente a ese proceso (x10⁶/ml) x Viabilidad post-descongelación del criotubo (%) / 100

% de linfomonos: % de células mononucleares de cada proceso obtenido tras la descongelación de cada criotubo.

A continuación se suma la cantidad de todos los procesos de cada paciente y se divide por su peso para obtener la cantidad de CMN total obtenida por Kg de peso:

$$\text{CMN x10}^8\text{/Kg} = \text{CMN x 10}^8\text{ TOTALES / PESO (Kg)}$$

CÁLCULO DE LOS LINFOCITOS TOTALES.

La cantidad de linfocitos obtenidos en cada proceso de aféresis se calculó para las células obtenidas antes de la congelación:

$$\text{LINFOCITOS TOTALES (x10}^6\text{)} = \text{CONCENTRACIÓN DE LEUCOCITOS (x10}^6\text{/ml) x VOLUMEN del proceso (ml) x \%LINFOCITOS/100}$$

A continuación se suma la cantidad de todos los procesos de cada paciente y se divide por su peso para obtener la cantidad de linfocitos total obtenida por Kg de peso:

$$\text{LINFOCITOS } \times 10^6 / \text{Kg} = \text{LINFOCITOS TOTALES } \times 10^6 / \text{PESO (Kg)}$$

Para las células obtenidas en los productos de descongelación se calculó a partir de las CMN obtenidas en dichos productos de descongelación:

$$\text{LINFOCITOS } \times 10^6 / \text{Kg} = \text{CMN (} \times 10^8 \text{) / Kg} \times \% \text{LINFOCITOS} / 100$$

CMN x 10⁸/Kg: calculado previamente post-descongelación.

% linfocitos: % global de linfocitos obtenido sobre el total de CMN tras la descongelación y mezcla de todos los criotubos correspondientes a cada proceso.

CULTIVO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

Los cultivos celulares para el estudio de progenitores granulo-macrofágicos (CFU-GM), eritroides (BFU-E) y mixtos granulo-macrofágicos, eritroides y megacariocíticos (CFU-Mix) se realizaron en un medio *Iscove's* MDM y metilcelulosa comercial (*Methocult* H4434; *Stem Cell Technologies*, Vancouver, Canada) que contenía: suero bovino fetal, rh-SCF (*recombinant human stem-cell factor*), GM-SCF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), rhIL-3 (*recombinant human interleukine 3*), 2-mercaptoetanol, L-glutamina y rh-eritropoyetina.

Se sembraron 2×10^5 células/ml (muestras post-descongelación) en cuatro pocillos de 25mm de diámetro. Los cultivos se incubaron durante 14 días en una estufa a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

La lectura se realizó a los 14 días en microscopio de luz invertida. Se leyó toda la placa anotando el tipo y el número de colonias que se observaron de tipo CFU-GM, BFU-E y CFU-Mix.

La cantidad total de CFU-GM, BFU-E Y CFU-Mix infundidas en el trasplante se estimaron mediante regla de tres en relación a las células mononucleares totales recolectadas según al cálculo anterior.

3.2.2. PROTOCOLO DE CITOMETRÍA, MARCAJE Y ADQUISICIÓN.

El estudio de citometría se realizó en un citómetro tipo LSR-II (*Becton Dickinson*).

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA LSR-II UTILIZADO.

Es sistema LSR-II es un citómetro analizador de sobremesa que alberga 3 láseres refrigerados por aire y 12 detectores asociados. La luz captada desde la cubeta de análisis es transmitida a través de fibras ópticas hacia un sistema de detectores (filtros, dicroicos y tubos fotomultiplicadores) dispuestos en bloques configurados en octógono y triángulo. Este exclusivo sistema óptico está basado en la refracción de la luz y utiliza filtros y dicroicos intercambiables, incrementando la sensibilidad y permitiendo la libre configuración del citómetro por el usuario.

Posee un sistema electrónico digital continuo que elimina el tiempo muerto electrónico en el procesamiento de las señales, incrementándose la capacidad de señales detectadas, la resolución de los pulsos y por tanto aumentando la cantidad de información por partícula obtenida del análisis. Digitaliza todas las señales, fluorescencia y dispersiones, a razón de 10 millones de señales por segundo. El programa Diva Software de BD, para la adquisición y análisis, opera en Windows y permite realizar la compensación intra a inter-láseres durante el proceso de adquisición o durante el análisis posterior de los datos.

El LSR-II utilizado en este estudio está configurado con un láser de 488 nm (azul) que genera las dispersiones FSC/SSC (dos parámetros morfológicos, tamaño y complejidad celular, respectivamente) y 5 señales de fluorescencia (FITC, PE, PE-Alexa610, PE-Cy5 y PE-Cy7), un láser de 633 nm (rojo) con 3 detectores para fluorescencia asociado (APC, Alexa-700 y APC-Cy7) y un láser de 405 nm (violeta) al que se le asocian 2 detectores más (*AmCyan* y *Pacific blue*).

PROTOCOLO DE MARCAJE.

Se marcaron dos tubos con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales, el tubo 1 que contenía marcadores para estudiar los progenitores hematopoyéticos y el tubo 2 con marcadores para estudiar los subtipos de linfocitos y la expresión de moléculas KIR2D específicas para el reconocimiento de HLA-C (KIR2DL1/S1 y KIR2DL2/L3/S2). Todos los anticuerpos fueron titulados para utilizar la concentración más adecuada en cada caso.

El protocolo de marcaje fue el siguiente:

1. Se marcaron 5×10^5 células en 50 μ L de medio de cultivo con la cantidad de anticuerpo monoclonal fluorescente indicado en la tabla 29.
2. Agitación e incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
3. Adición de 4ml de solución lisante comercial (BD).
4. Incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Centrifugación 1800 r.p.m. durante 8 minutos.
6. Aspiración cuidadosa, mezclar y resuspender en 0,5ml. de PBS.
7. Mantenimiento de las células a 4°C y en oscuridad hasta adquirir.

Tabla 29. Paneles de anticuerpos monoclonales utilizado.

Fluorocromo	Tubo-1	Tubo-2
FITC	DR (5 μ l)	CD158b (5 μ l)
PE	CD133 (10 μ l)	CD158a (5 μ l)
PE-A610	CD19 (5 μ l)	CD19 (5 μ l)
PE-Cy5	CD117 (10 μ l)	TCR $\gamma\delta$ (5 μ l)
PE-Cy7	CD34 (5 μ l)	CD56 (10 μ l)
APC	CD38 (2.5 μ l)	NKG2D (10 μ l)
Alexa-700	-	CD8 (5 μ l)
APC-Cy7	CD45 (1 μ l)	CD16 (1 μ l)
Pacific Blue	CD14 (5 μ l)	CD4 (5 μ l)
AmCyan	-	CD3 (10 μ l)

PROTOCOLO DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS.

Se estudiaron dos grandes compartimentos celulares del injerto: células progenitoras CD34 y células linfoides maduras.

Determinación de células CD34+ y subpoblaciones de CD34.

Las células progenitoras se identificaron en base a la expresión del antígeno CD34 de membrana.

El protocolo de recuento de células CD34+ se realizó a través de un citograma SSC/CD34-PE realizado sobre selección previa con CD45FITC. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales CD34 PE-Cy7 y CD45 APC-Cy7 (Becton Dickinson, CA, USA). Se adquirieron un mínimo de 300.000 células CD45+ y se analizaron mediante el programa *Diva Software* de BD aplicando la estrategia de gateo descrita en el *Current Protocols in Cytometry (ISHAGE guidelines)* [208].

El número absoluto de células CD34+ se cuantificó con el método de doble plataforma, en el que el porcentaje de células CD34+ se determina por citometría siguiendo el protocolo de análisis descrito en la ilustración 14, y la cifra de leucocitos en el contador hematológico modelo *Sysmex KX-21N (Roche)*. Las células progenitoras CD34+ debían cumplir un criterio de baja/intermedia dispersión de FSC/SSC, clara positividad de CD34 y CD45 intermedio/débil y negatividad para CD14 (Ilustración 14).

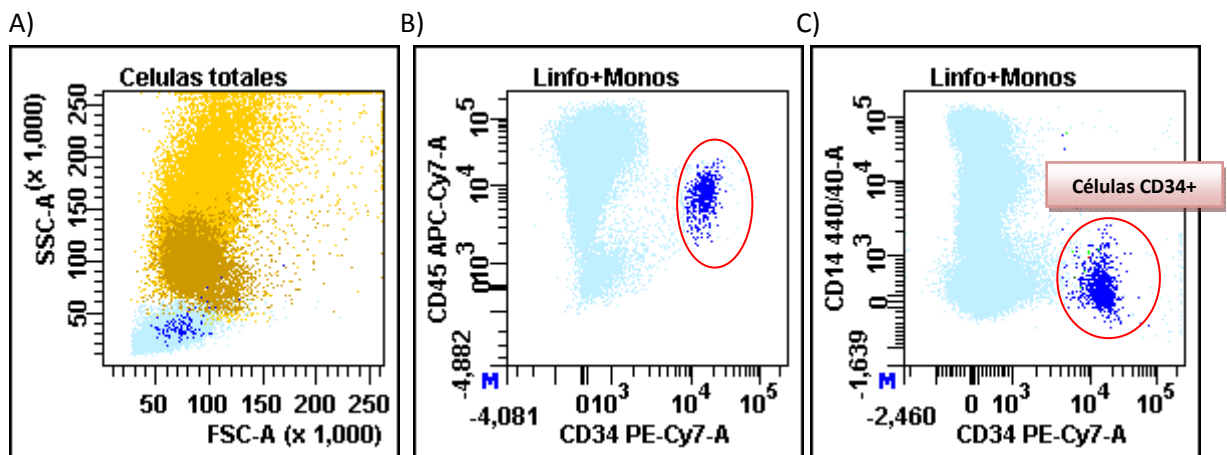


Ilustración 14. Gráficos de puntos biparamétricos de una muestra representativa de un paciente. A) Diagrama FSC/SSC. B) Diagrama CD34 PE-Cy7/CD45 APC-Cy7. C) Diagrama CD34 PE-Cy7/CD14 PB.

De manera similar a las CMN y a los linfocitos totales, se calculó la cantidad de células CD34 de cada proceso para las células antes de la congelación:

$$\text{CD34 TOTALES (x10}^6\text{)} = \text{RECUENTO ABSOLUTO CELULAR x VOLUMEN (ml) del proceso x \%CD34 / 100}$$

Recuento absoluto celular: suma de los recuentos absolutos de cada proceso, obtenido:

Volumen del proceso (ml) x Concentración celular obtenida del proceso (x10⁶/ml).

% de CD34: % de células CD34 de cada proceso obtenido antes de congelar el producto.

A continuación se suma la cantidad de todos los procesos de cada paciente y se divide por su peso para obtener la cantidad de CD34 obtenida por Kg de peso:

$$\text{CD34 x10}^6\text{/Kg} = \text{CD34 x 10}^6\text{ TOTALES / PESO (Kg)}$$

En los productos de descongelación se calculó la cantidad de células CD34 de cada proceso a partir de las CMN obtenidas tras la descongelación:

$$\text{CD34 TOTALES (x10}^6\text{)} = \text{CMN (x10}^8\text{)/Kg x \%CD34 / 100}$$

CMN x 10⁸/Kg: calculado previamente post-descongelación.

% CD34: % global de células CD34+ obtenido sobre el total de CMN tras la descongelación y mezcla de todos los criotubos correspondientes a cada proceso.

Para caracterizar a los diferentes subtipos de progenitores CD34, se emplearon los anticuerpos monoclonales CD133-PE (*Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania*), CD117-PE-Cy5, CD38-APC, DR-FITC (*Becton Dickinson, CA, USA*).

El conteo absoluto de cada subpoblación se calculó mediante regla de tres, una vez conocida las cifras de CD34 y los porcentajes de dichas subpoblaciones en el total de células CD34+.

Una vez seleccionada la población de células CD34+ se estudió la expresión de CD117 y CD133. En nuestro estudio todas las células CD34+ eran CD117+ (ilustración 15 A). Utilizamos el marcador CD133 para dividir a los progenitores en aquellos que son más “inmaduros” o indiferenciados (CD34+CD133+) de aquellos que son más “maduros” o diferenciados (CD34+CD133-), (ilustración 15 B):

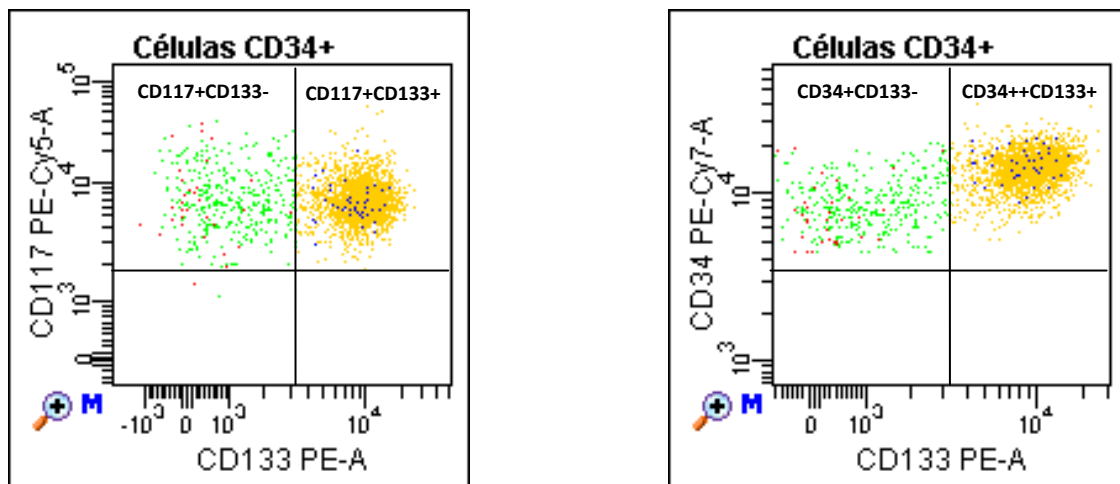
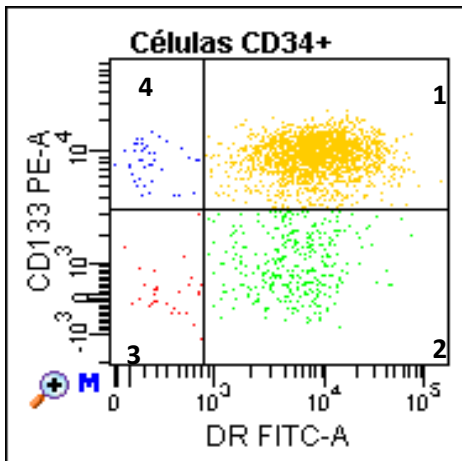


Ilustración 15. Gráfico de puntos biparamétrico de una muestra representativa de un paciente. A) Diagrama CD133 PE-A/CD117 PE-Cy5-A de las células CD34. B) Diagrama CD133 PE-A/CD34-PE-Cy7 de las células CD34.

Las células CD133+ mostraban una expresión intensa CD34++. En el subanálisis de las células CD34+, se determinó la expresión de CD38 y HLA-DR y se discriminaron 4 subpoblaciones de células progenitoras CD34+ claramente definidas en todos los pacientes (ilustración 16):

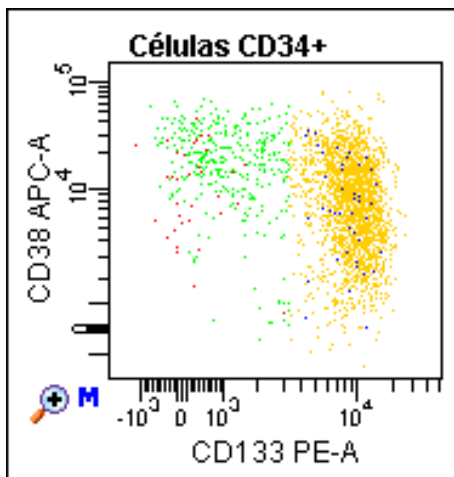


1. CD117+CD34++CD133+DR+CD38bajo
2. CD117+CD34+CD133-DR+CD38++
3. CD117+CD34+CD133-DR-CD38 bajo
4. CD117+CD34++CD133+DR+CD38alto/bajo

Ilustración 16. Gráficos de puntos biparamétricos de una muestra representativa de un paciente. Diagrama DR FITC-A/CD133-A de las células CD34.

La expresión de CD38 resultó ser intensa en las células CD133-DR+ mientras que en la otra subpoblación mayoritaria CD133+DR+ la expresión fue menos intensa (ilustración 17 A y B).

A)



B)

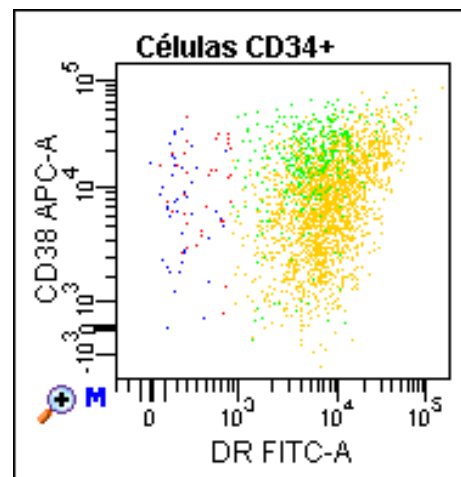


Ilustración 17. Gráficos de puntos biparamétricos de una muestra representativa de un paciente. A) Diagrama CD133 PE-A/CD38-APC-A de las células CD34. B) Diagrama DR FITC-A/CD38-APC-A de las células CD34.

También se identificaron y tuvieron en cuenta para su estudio las células: CD34+DR+, CD34+CD38+ y CD34+DR+CD38+.

Determinación de linfocitos y subpoblaciones de linfocitos.

Se distinguieron los siguientes tipos de linfocitos:

1. Linfocitos B (CD19+).

2. Linfocitos T totales (linfocitos CD3+):

-Linfocitos T- $\alpha\beta$ CD3+CD4+: linfocitos T cooperadores.

-Linfocitos T- $\alpha\beta$ CD3+CD8+: linfocitos T supresores.

-Linfocitos T- $\gamma\delta$ CD3+CD4-CD8-

3. Células NK: basadas en la expresión negativa de CD3 y CD19 en linfocitos y positiva de CD16/56.

4. Expresión de moléculas KIR específicas de HLA-C y NKG2D: En cada subgrupo de linfocitos T y NK se estudió la expresión de las moléculas KIR2D detectadas por los anticuerpos monoclonales CD158a/h (KIR2DL1/S1) y CD158b/j (KIR2DL2/L3/S2) y de NKG2D. Todas ellas moléculas relacionadas con regulación de la citotoxicidad de células T y NK.

Para el análisis de los diferentes tipos de los linfocitos partimos de un gráfico inicial de FSC/SSC del que se determina por tamaño (FSC bajo) y granulación (SSC bajo) la población de linfocitos; ésta se cuantifica sobre el total de células (ilustración 18):

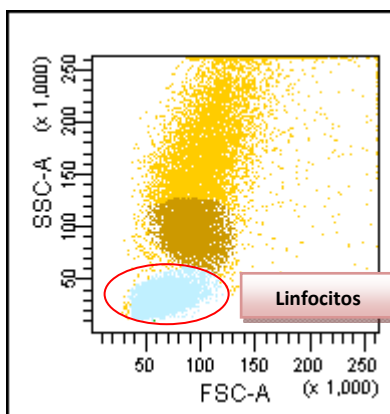
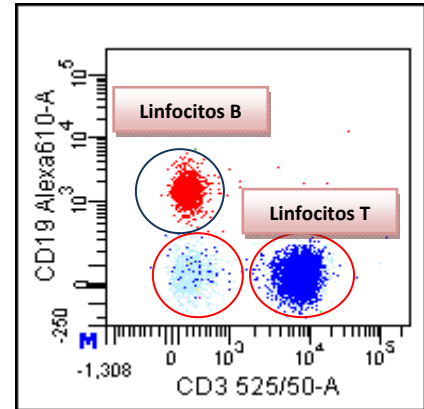


Ilustración 18. Gráfico de puntos biparamétrico inicial FSC/SSC y representación de la población de linfocitos.

A continuación se seleccionaron los linfocitos B (CD19+) y los linfocitos T (CD3+); los que no son linfocitos B ni T corresponden mayormente a la población de linfocitos NK (ilustración 19):

Ilustración 19. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra las subpoblaciones de linfocitos B (CD3-CD19+) y linfocitos T (CD3+CD19-).



Dentro de los linfocitos T se determinaron las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (CD4) y T supresores (CD8), (ilustración 20):

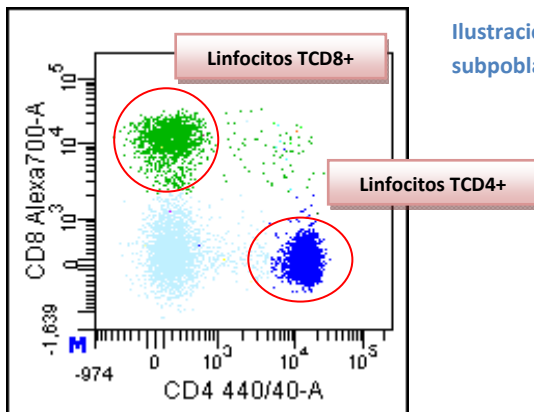


Ilustración 20. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra las subpoblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+.

Las células NK se definieron como linfocitos CD3-CD19-; para estudiar los distintos tipos de NK se emplearon los marcadores CD16+ y CD56+. La gran mayoría de células NK se definen como CD3-CD16+CD56+. Sin embargo una pequeña población de linfocitos NK es CD16- y CD56 de alta intensidad (ilustración 21).

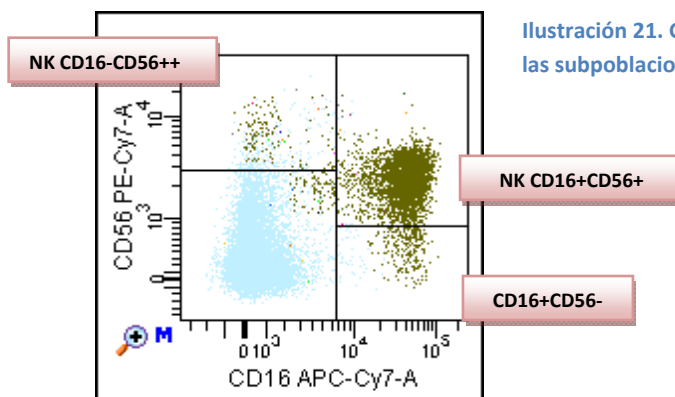


Ilustración 21. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra las subpoblaciones de linfocitos NK.

Dentro de la población de NK CD16+ podemos distinguir dos subpoblaciones: una que expresa CD56+ (la población mayoritaria) y una segunda que no expresa CD56.

Se determinaron los linfocitos TCR $\gamma\delta$; éstos se definieron como linfocitos CD3+ TCR $\gamma\delta$ + (ilustración 22). Las células T $\gamma\delta$ constituyen una porción minoritaria del total de células T, aproximadamente entre un 0.5-15% de las células T de sangre periférica pero se encuentran fundamentalmente en el MALT (tejido linfoide asociado a mucosas). La mayoría son CD4-CD8- por lo que no reconocen moléculas del MHC.

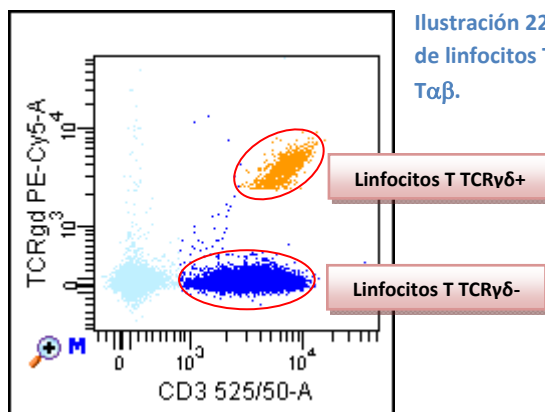
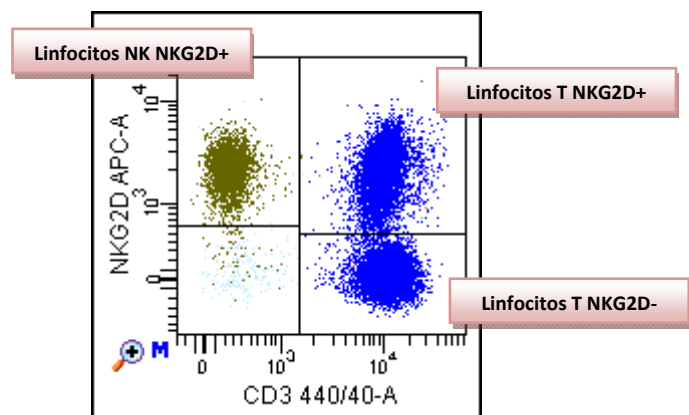


Ilustración 22. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra las subpoblaciones de linfocitos TCR $\gamma\delta$. Los linfocitos T TCR $\gamma\delta$ fueron considerados como linfocitos T $\alpha\beta$.

Finalmente se estudió la expresión de marcadores asociados a la función de las células NK y T a través de los anticuerpos monoclonales NKG2D, CD158a/h y CD158b/j. El receptor NKG2D se distribuye entre los linfocitos T (CD8 y TCR $\gamma\delta$ +) y NK (ilustración 23):

Ilustración 23. Gráficos de puntos biparamétrico que muestra la expresión de NKG2D en los linfocitos T (CD3+) y NK (CD3-).



La expresión de CD158a/h y CD158b/j se distribuye entre todos los subtipos de linfocitos (CD4+, CD8+, TCR $\gamma\delta$ + y NK) existiendo células que son CD158a+CD158b-, otras que son CD158a-CD158b+ y una minoría que son dobles positivas CD158a+CD158b+ (ilustración 24):

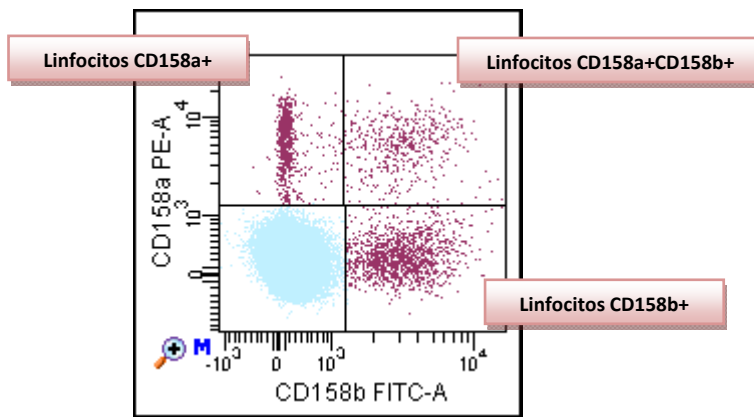


Ilustración 24. Histograma que muestra la expresión de los marcadores KIR.

La subpoblaciones linfocitarias estudiadas fueron los linfocitos T CD4+, CD8+ y $\gamma\delta$ + y las células NK, distribuidas en cada una de las subpoblaciones descritas en la tabla 30:

LINFOCITOS T CD4+	LINFOCITOS T CD8+	LINFOCITOS T $\gamma\delta$ +	LINFOCITOS NK
CD16+	CD16+	CD16+	CD16+
NKG2D+	NKG2D+	NKG2D+	NKG2D+
CD56+	CD56+	CD56+	CD56+
CD56++	CD56++	CD56++	CD56++
CD158a+	CD158a+	CD158a+	CD158a+
CD158b+	CD158b+	CD158b+	CD158b+
CD158a+ CD158b+	CD158a+ CD158b+	CD158a+ CD158b+	CD158a+ CD158b+
	CD158a+ CD16+		CD8+
	CD158a+ NKG2D+		
	CD158a+ CD56+		
	CD158a+ CD56++		
	CD158b+ CD16+		
	CD158b+ NKG2D+		
	CD158b+ CD56+		
	CD158b+ CD56++		

Tabla 30. Subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico se utilizaron el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows y *MedCalc* versión 11.4.3.0 para Windows.

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL.

4.1.1 Investigar el papel de las subpoblaciones celulares del injerto autólogo en el resultado del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con linfoma.

El posible efecto que la composición del injerto, en términos de contenido de las diferentes subpoblaciones de linfocitos y de progenitores tenía sobre la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de evento (SLE), progresión o recaída, se evaluó mediante diferentes tests estadísticos. Para ello, se consideraron puntos finales del seguimiento la presencia o ausencia de dos variables:

- Fallecimiento relacionado con la enfermedad linfomatosa.
- Recaída o progresión de la enfermedad durante el seguimiento post-trasplante.

La SG para cada paciente fue definida como el intervalo entre el trasplante y el fallecimiento (si se ha producido) o la fecha de la última revisión (hasta Agosto de 2008).

La SLE para cada paciente fue definida como el intervalo entre el trasplante y la fecha de recaída/progresión (si se ha producido).

Para comparar las variables cuantitativas (continuas) se utilizó la prueba de la t de *Student* para variables independientes como análisis univariante. Este procedimiento compara las medias de los grupos de estudio. Al hacer la comparación de medias se tuvo en cuenta previamente la distribución normal de ambos grupos mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* y la presencia o no de igualdad de las varianzas en cada grupo comparado mediante el test de hipótesis para la igualdad de las varianzas (test de *Levene*).

En nuestro caso se compararon las medias de los tiempos de SLE y SG con respecto a una serie de variables de agrupación:

-**Variables categóricas** (sexo, tratamiento con rituximab, radioterapia, etc...).

-**Variables continuas o cuantitativas.** Los pacientes se agruparon en dos grupos según las diferentes variables atendiendo a un punto de corte (por ejemplo cifras de linfocitos al diagnóstico $<1 \times 10^9/L$ ó $>1 \times 10^9/L$, edad al diagnóstico <60 ó >60 años, etc). La elección del punto de corte en cada caso fue la que presentaba mayores diferencias en el test χ^2 en los diferentes puntos de corte analizados para el “*log-rank test*”.

A fin de evaluar el tiempo medio de SLE y la SG se utilizó el análisis descrito por *Kaplan-Meier* [209]. Las diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia fueron comprobadas mediante el “*two tailed log-rank test*”. Para el análisis de supervivencia se incluyeron 54 pacientes siendo excluido un paciente por mortalidad relacionada con el trasplante.

Para analizar la relación de las diversas variables con la supervivencia y averiguar cuáles resultaban ser variables pronósticas independientes, aquellas variables que mostraron impacto en la supervivencia y significación en el análisis univariante, fueron incluidas en un análisis multivariante basado en la regresión de Cox [210]; se empleó la regresión de Cox con múltiples variables con el método anterógrado condicional.

Los coeficientes obtenidos en la regresión de Cox son medidas que cuantifican el riesgo de presentar cierta característica respecto a no presentarla en base a la variable de estudio, de manera que $\text{Exp}(\beta) = \text{Odds ratio}$ donde β es el coeficiente resultado de la regresión asociado a la variable participante en el modelo; es una forma de representar un riesgo mediante el cociente entre el número de veces que ocurre un suceso frente a cuántas veces no ocurre.

Cuando la variable independiente tratada es numérica como en nuestro caso (meses de supervivencia), este valor se interpreta como el cambio en el riesgo cuando se incrementa el valor de la variable, mientras que el resto de variables permanecen constantes.

Para el estudio de la recuperación inmune precoz y evaluar su relación con la supervivencia se procedió de la misma manera. Se determinó si existía efecto positivo de la recuperación inmune precoz si se mostraban diferencias en el análisis univariante y en las curvas de supervivencia. Su importancia se determinó en el análisis multivariante. Así mismo, para estudiar de qué factores celulares depende la recuperación linfocitaria precoz se realizaron análisis de correlación de *Pearson* y de *Spearman*.

Con los factores en los que se encontró una a relación lineal se realizó un análisis de regresión lineal para estimar el grado de asociación existente.

4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.

4.2.1 Investigar la influencia del anticuerpo monoclonal Rituximab sobre la composición del injerto y la supervivencia.

Para estudiar el efecto del rituximab sobre el injerto se realizó un análisis univariante consistente en una prueba de la t de *Student* para variables independientes, de igual forma que en el apartado anterior, con el objeto de comparar las diferencias de medias entre los distintos subpoblaciones del injerto analizadas en los pacientes que recibieron rituximab y los que no lo recibieron.

Para evaluar el tiempo medio de SLE y la SG se utilizó el análisis descrito por *Kaplan-Meier* [210] de igual forma que en el apartado anterior.

4.2.2 Estudiar el papel de los linfocitos en distintos momentos de la enfermedad sobre la supervivencia.

Se estudió la influencia del recuento absoluto de linfocitos sobre la supervivencia al diagnóstico, previo a la recolección de progenitores hematopoyéticos, y en diversos momentos durante la fase de recuperación post-trasplante (días 15 o RL precoz, día 30, 90, 180 y al año del trasplante).

La supervivencia fue analizada según el método descrito por *Kaplan-Meier* [209] de la forma ya descrita anteriormente.

El estudio como variables pronósticas, si procede, se realizó según análisis multivariante según la regresión proporcional de Cox [210].

4.2.3 Estudiar las posibles correlaciones de los cultivos clonogénicos con las células CD34 y sus subpoblaciones.

Para ello se realizó un análisis de correlación de *Pearson* y de *Spearman* entre las colonias de tipo CFU-GM, CFU-E, CFU-MIX obtenidas durante los procesos de aféresis y los distintos

subtipos de células CD34 progenitoras obtenidas. Intentaremos averiguar la importancia de estos controles.

RESULTADOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL.

Investigar el papel de las subpoblaciones celulares del injerto autólogo en el resultado del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con linfoma.

1.1. ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES POBLACIONES DEL INJERTO: CMN, CÉLULAS CD34 totales Y LINFOCITOS totales. INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN.

En este apartado se mostrarán los resultados obtenidos de CMN totales, células progenitoras CD34 totales y linfocitos totales del injerto, tanto con el cálculo precongelación como post-descongelación (cifra esta última que reflejará la cantidad infundida en cada paciente). Posteriormente se expondrán los resultados del análisis de supervivencia (análisis de *Kaplan-Meier*).

Los procesos de congelación y descongelación llevan consigo una pérdida celular que puede afectar a las poblaciones que tienen influencia en la supervivencia. Por ello, se estudiará también el efecto que han tenido dichos procesos sobre estos tipos celulares (CMN, CD34 y linfocitos totales) analizando la cantidad de células perdidas y si éstas son determinantes o no para el resultado del TAPH.

Para ello se realizaron los cálculos con los datos celulares de cada proceso de aféresis en dos momentos distintos: antes de realizar la congelación y después de realizar la descongelación. El cálculo obtenido después de la descongelación de los criotubos control es el que más reflejará la cantidad y calidad de las células infundidas al paciente.

En las tablas que se muestran a continuación (31,32,33) se exponen los resultados obtenidos de CMN, células CD34 totales y linfocitos totales antes de realizar la congelación y después de realizar la descongelación:

Tabla 31. Media, desviación estándar (DS), mediana y rango de las CMN obtenidas.

CMN $\times 10^8$ /Kg	MEDIA	DS	MEDIANA	RANGO
Pre-congelación	6,35	4,62	4,95	0,039-22,2
Post-congelación	5,92	4,36	5,43	0,041-19,8

Tabla 32. Media, desviación estándar (DS), mediana y rango de las células CD34+ obtenidas.

CD34 $\times 10^6$ /Kg	MEDIA	DS	MEDIANA	RANGO
Pre-congelación	3,43	1,76	2,81	1,05-9,56
Post-congelación	1,65	1,25	1,41	0,19-8,02

Tabla 33. Media, desviación estándar (DS), mediana y rango de los linfocitos totales obtenidos.

LINFOCITOS $\times 10^6$ /Kg	MEDIA	DS	MEDIANA	RANGO
Pre-congelación	303,76	236,71	241,55	0,11-1222
Post-congelación	182,24	169,63	137,01	0,011-848

Teniendo en cuenta el recuento celular existente antes de la congelación y después de realizar la descongelación, se calculó el porcentaje de pérdida celular y se compararon ambas medias (tabla 34):

Tabla 34. Porcentaje de pérdida celular.

	% DE PÉRDIDA CELULAR		
	CMN $\times 10^8$ /K	CD34 $\times 10^6$ /K	LINFOS $\times 10^6$ /K
MEDIA	6,77	51,89	38,69
P	0,07	<0,0001	<0,0001

El proceso de congelación-descongelación no afecta de forma significativa al recuento de CMN, sin embargo sí que se produce una pérdida significativa de linfocitos y células CD34+. Probablemente, en las CMN post-congelación se incluyen células grandes muertas no viables, que los contadores hematológicos aún detectan como células, pero que no se han incluido dentro del recuento de linfocitos y, sobre todo dentro del recuento de las CD34+ ya que las células no viables se perdieron en el proceso de marcaje y en la selección de las ventanas de análisis de los datos de citometría de flujo.

En las siguientes tablas (35, 36 y 37) se muestran los resultados del análisis de supervivencia según la estimación *Kaplan-Meier*, en función de la cantidad de células administradas para CMN, linfocitos y CD34+, respectivamente. Para ello se comparan dos grupos utilizando varios puntos de corte, que incluyen puntos por encima y por debajo de la mediana.

Respecto a las CMN (tabla 35), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los puntos de corte analizados, mayor o menor a 2, 3, 4, 5, 6 y 7×10^8 células/Kg, ni para la SLE ni para la SG:

Tabla 35. CMN infundidas (pre-congelación y post-descongelación) y su relación con la supervivencia. χ^2 para “log-rank-test” y P en los distintos puntos de corte para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

CMN INFUNDIDAS (pre-congelación)	SLE		SG	
	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
≥ 2 vs $< 2 \times 10^6$ /Kg	0,221	0,638	0,078	0,78
≥ 3 vs $< 3 \times 10^6$ /Kg	0,726	0,394	1,902	0,161
≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	1,163	0,281	0,593	0,441
≥ 5 vs $< 5 \times 10^6$ /Kg	0,364	0,546	0,131	0,718
≥ 6 vs $< 6 \times 10^6$ /Kg	1,101	0,577	0,631	0,729
≥ 7 vs $< 7 \times 10^6$ /Kg	2,152	0,142	1,911	0,167
CMN INFUNDIDAS (post-descongelación)	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
≥ 2 vs $< 2 \times 10^6$ /Kg	1,246	0,264	0,805	0,369
≥ 3 vs $< 3 \times 10^6$ /Kg	1,196	0,166	0,373	0,542
≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	0,021	0,884	0,039	0,843
≥ 5 vs $< 5 \times 10^6$ /Kg	0,169	0,681	0,061	0,805
≥ 6 vs $< 6 \times 10^6$ /Kg	0,033	0,856	0,001	0,974

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas con los linfocitos en ninguno de los puntos de corte analizados (mayor o menos de 100, 200, 300, 400, 500 y 600×10^6 /Kg) ni con la SG ni con la SLE (tabla 36):

Tabla 36. Linfocitos totales pre-congelación y post-descongelación y relación con la supervivencia. χ^2 para “log-rank-test” y P en diferentes puntos de corte en función de la cantidad de linfocitos obtenidos para las curvas de Kaplan-Meier de SLE y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

LINFOCITOS INFUNDIDOS (pre-congelación)	SLP		SG	
	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
≥ 100 vs $< 100 \times 10^6$ /Kg	0,0001	0,9898	0,136	0,713
≥ 200 vs $< 200 \times 10^6$ /Kg	0,291	0,59	0,27	0,603
≥ 300 vs $< 300 \times 10^6$ /Kg	0,983	0,322	0,022	0,881
≥ 400 vs $< 400 \times 10^6$ /Kg	0,602	0,438	0,615	0,433
≥ 500 vs $< 500 \times 10^6$ /Kg	0,044	0,834	0,002	0,968
≥ 600 vs $< 600 \times 10^6$ /Kg	0,0001	0,988	0,033	0,856
LINFOCITOS INFUNDIDOS(post-descongelación)	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
≥ 50 vs $< 50 \times 10^6$ /Kg	0,067	0,938	0,088	0,767
≥ 75 vs $< 75 \times 10^6$ /Kg	0,02	0,898	0,471	0,493
≥ 100 vs $< 100 \times 10^6$ /Kg	0,055	0,815	0,205	0,651
≥ 200 vs $< 200 \times 10^6$ /Kg	0,009	0,926	0,005	0,943
≥ 300 vs $< 300 \times 10^6$ /Kg	2,699	0,1	0,019	0,889
≥ 400 vs $< 400 \times 10^6$ /Kg	0,181	0,67	0,166	0,683

Por tanto ni la cantidad de CMN ni de linfocitos totales presentes en el injerto parecían influir sobre la supervivencia de nuestros pacientes.

Respecto a las cifras de células progenitoras CD34+ sí que obtuvimos influencia sobre la supervivencia. En relación con los productos de aféresis obtenidos antes de la congelación, los pacientes que obtienen $>4 \times 10^6$ células CD34+/Kg poseen una SLE significativamente mayor; no llega, sin embargo, a alcanzarse diferencias estadísticamente significativas respecto a la SG (tabla 37 y gráfico 14).

Cuando se analizan los pacientes en función de las células cuantificadas en las muestras de descongelación (que es lo que realmente recibieron los pacientes), se pudo comprobar que con cifras superiores a $1,5 \times 10^6$ células CD34+/Kg se obtenían SLE significativamente mayores que en los pacientes con cifras por debajo de ese punto de corte. La SG fue significativamente mejor cuando las cifras fueron superiores a 1×10^6 células CD34+/Kg (tabla 37 y gráfico 14).

Tabla 37. Células CD34 obtenidas (pre-congelación y post-congelación) y su relación con la supervivencia. χ^2 para “log-rank-test” y P en los distintos puntos de corte elegidos para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

CD34+ INFUNDIDAS (pre-congelación)	SLE		SG	
	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
≥ 2 vs $< 2 \times 10^6$ /Kg	1,294	0,255	0,708	0,4
$\geq 2,81$ vs $< 2,81 \times 10^6$ /Kg	1,926	0,165	0,532	0,466
≥ 3 vs $< 3 \times 10^6$ /Kg	2,555	0,11	1,102	0,294
$\geq 3,5$ vs $< 3,5 \times 10^6$ /Kg	2,771	0,096	1,371	0,242
≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	4,865	0,027	2,136	0,144
≥ 5 vs $< 5 \times 10^6$ /Kg	1,800	0,180	0,702	0,402
CD34+ INFUNDIDAS (post-descongelación)	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	2,807	0,149	4,879	0,027
$\geq 1,41$ vs $< 1,41 \times 10^6$ /Kg	3,534	0,06	3,816	0,05
$\geq 1,45$ vs $< 1,45 \times 10^6$ /Kg	4,127	0,042	3,001	0,083
$\geq 1,5$ vs $< 1,5 \times 10^6$ /Kg	4,127	0,042	3,001	0,083
≥ 2 vs $< 2 \times 10^6$ /Kg	0,162	0,203	1,106	0,293

Por tanto, las células CD34 infundidas sí influyen sobre la supervivencia, tanto con el cálculo realizado antes de la congelación (mejor SLE) como tras la descongelación (mejor SLE y SG). Las diferencias, sin embargo, no llegan a ser estadísticamente significativas con el cálculo pre-congelación respecto a la SG (tabla 37).

Estos datos claramente indican que, al menos en nuestros pacientes, haya sido más importante el cálculo post-congelación.

Como es de esperar existe una alta correlación entre las cifras pre-congelación y post-descongelación de células CD34+ obtenidas. A continuación se muestran los niveles de correlación y el gráfico de regresión lineal obtenido con su ecuación (tabla 38 y gráfico 13):

Tabla 38. Correlación entre las cifras de células CD34 antes y después de la descongelación.

Pearson		Spearman	
Índice de correlación	p	Rho	p
0,3	0,03	0,45	0,001

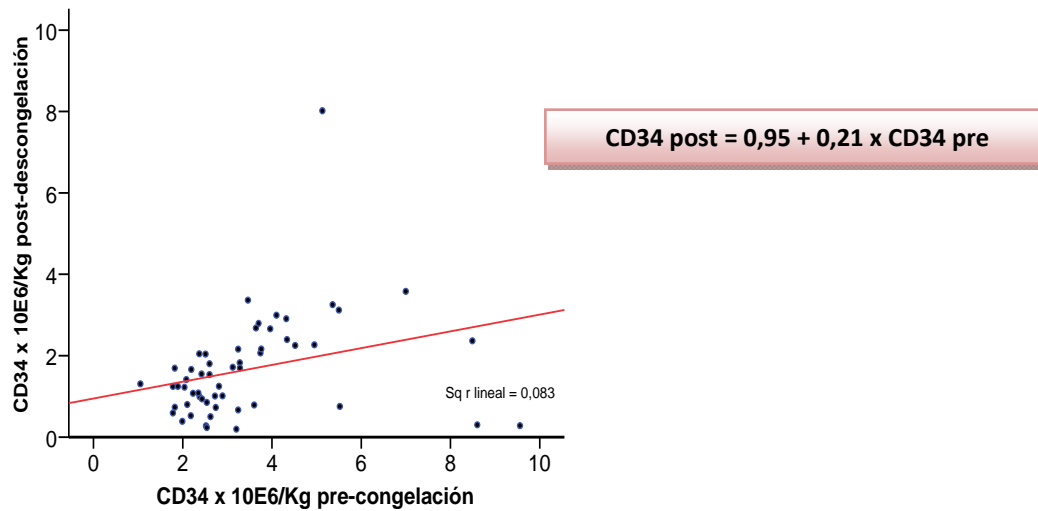


Gráfico 13. Correlación y análisis de regresión entre las cifras de CD34 pre-congelación y post-descongelación.

Atendiendo a la recta de regresión obtenida, para conseguir un nivel superior a 1,45-1,5 x 10⁶ células CD34+/Kg de CD34 tras la descongelación, debemos obtener al menos 2,62x10⁶ células CD34+/Kg. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis final multivariante y que como describiremos son cifras importantes a tener en cuenta para conseguir una SLE y SG significativamente mejores (ver más adelante).

A continuación (gráfico 14) se exponen las curvas de supervivencia según la estimación *Kaplan-Meier*.

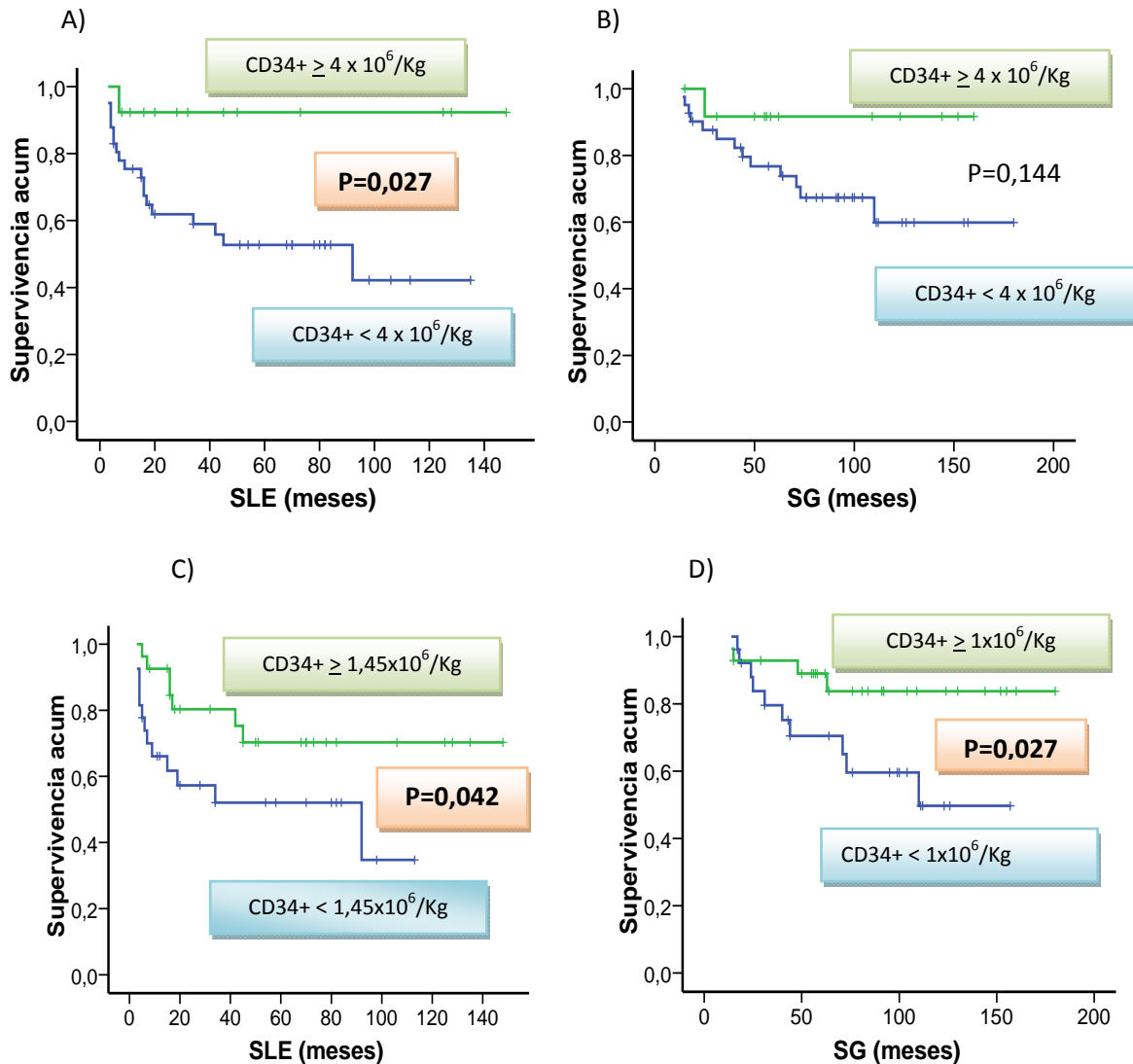


Gráfico 14. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+ obtenidas (pre-congelación): $\geq 4 \times 10^6/\text{Kg}$ vs $< 4 \times 10^6/\text{Kg}$. La media de SLE para el grupo de $\geq 4 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 53 vs 41 meses el grupo de $< 4 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,049$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+ obtenidas (pre-congelación): $\geq 4 \times 10^6/\text{Kg}$ vs $< 4 \times 10^6/\text{Kg}$. La media de SG para el grupo de $\geq 4 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 80 vs 74 meses el grupo de $< 4 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,144$). No se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas para SG. C) Curva de SLE en función de la cantidad total de células CD34+ obtenidas con el cálculo post-congelación. La media de SLE para el grupo de $\geq 1,45 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 55 vs 34 meses para el grupo de $< 1,45 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,042$). D) Curva de SG en función de la cantidad total de células CD34+ obtenidas con el cálculo post-congelación. La media de SG para el grupo de $\geq 1 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 84 vs 32 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,027$).

A continuación, en representación gráfica de tallos, podemos comprobar que la media de SLE y SG fue significativamente mayor cuando se infundieron $\geq 1,5 \times 10^6/\text{Kg}$ y $\geq 1 \times 10^6/\text{Kg}$ respectivamente (gráfico 15).

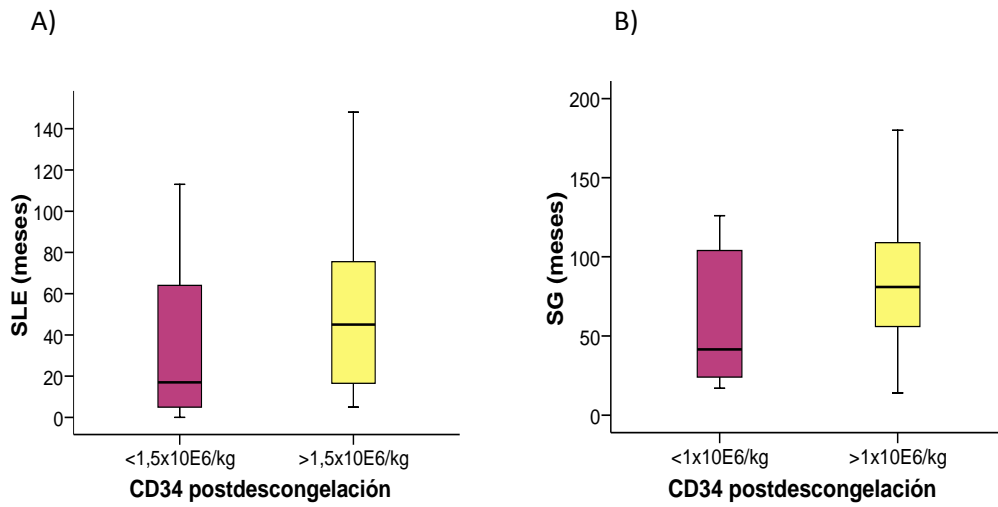


Gráfico 15. A) Gráfico de cajas que nos muestra en función de la cantidad total de células CD34+ (cálculo post-descongelación) obtenidas la SLE alcanzada. La línea interior de la caja representa la mediana de supervivencia (Q2), el límite inferior de la caja el Q1 (25%) y el superior el Q3 (75%). La media de SLP para el grupo de $\geq 1,5 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 55 meses vs 34 ($p=0,042$). B) Ídem con SG. La media de SG para el grupo de $\geq 1 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 84 meses vs 32 ($p=0,027$). Se corresponde con las curvas mostradas en el gráfico 14.

1.2. ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES SUBPOBLACIONES DEL INJERTO: SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS CD34 Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS.

En este apartado mostramos los resultados obtenidos de la composición del injerto en base a las distintas poblaciones celulares que lo componen. Se mostraran los datos estadísticos descriptivos de la composición celular del injerto y los datos del análisis de supervivencia. En este caso, sólo disponemos de los datos obtenidos tras la descongelación. Estos datos reflejan la cantidad y calidad de las células infundidas al paciente pero no podemos analizar cómo se han comportado tras los procesos de congelación y descongelación al no tener el análisis pre-congelación.

1.2.1 SUBPOBLACIONES DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CD34.

El estudio de estas subpoblaciones se realizó sobre muestras descongeladas, conservadas en tubos de criopreservación. Por tanto, todos los cálculos reflejados a continuación se llevaron a cabo a partir del total de CMN obtenido después de la descongelación (ver tabla 31). El valor medio de células progenitoras CD34+ fue de $1,65 \times 10^6/\text{Kg}$ (tabla 39). En esta tabla, igualmente se muestran los resultados obtenidos para células CD34+ con o sin expresión de los antígenos CD38 y DR.

Tabla 39. Progenitores CD34+. Expresión de CD38 y DR.

	CD34+ (totales) $\times 10^6/\text{Kg}$	CD34+DR+ $\times 10^6/\text{Kg}$	CD34+CD38+ $\times 10^6/\text{Kg}$	CD34+CD38+DR+ $\times 10^6/\text{Kg}$
MEDIA	1,65	1,58	1,50	1,46
DS	1,25	1,22	1,12	1,1
MEDIANA	1,41	1,4	1,13	1,23
RANGO	0,19-8,02	0,18-7,77	0,13-6,7	0,12-6,55

En la siguiente tabla (tabla 40) mostramos los resultados obtenidos de las células progenitoras en función de la expresión de CD133+ (progenitores inmaduros) y CD133- (progenitores más diferenciados):

Tabla 40. Progenitores hematopoyéticos CD34+CD133+ y CD34+CD133-.

	CD34+ (totales) x10 ⁶ /Kg	CD34+CD133+ x10 ⁶ /Kg	CD34+CD133- x10 ⁶ /Kg
MEDIA	1,65	1,11	0,55
DS	1,25	0,97	0,39
MEDIANA	1,41	1,23	0,48
RANGO	0,19-8,02	6,20-0,09	1,82-0,07

Que a su vez podemos subdividir en función de la expresión de CD38 y DR (tabla 41):

Tabla 41. Progenitores CD34+CD117+ en función de CD133, CD38 y DR.

	TOTALES x10 ⁶ /Kg	CD133+DR-CD38-/+ x10 ⁶ /Kg	CD133+DR+CD38-/+ x10 ⁶ /Kg	CD133-DR+CD38++ x10 ⁶ /Kg	CD133-DR-CD38-/+ x10 ⁶ /Kg
MEDIA	1,66	0,02	1,09	0,47	0,08
MEDIANA	1,41	0,01	0,76	0,42	0,06
DS	1,26	0,02	0,97	0,35	0,07
RANGO	0,19-8,02	0,0-0,09	0,9-6,17	0,06-1,53	0-0,40

Los progenitores mayoritariamente obtenidos corresponden a CD34+CD133+, que son progenitores multipotentes indiferenciados. En el siguiente gráfico se representa la distribución de los 4 subtipos de progenitores descritos.

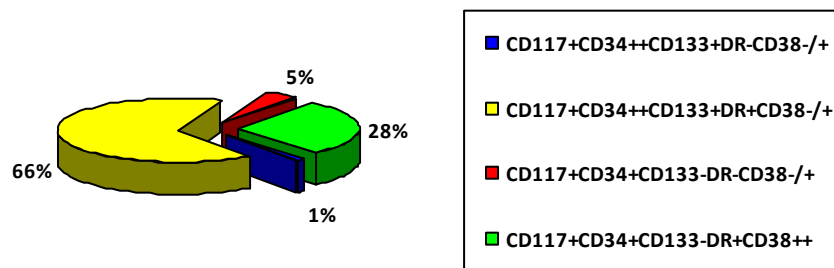


Gráfico 16. Distribución de los progenitores en función de la expresión de las moléculas CD133, CD38 y DR.

Una vez analizada la influencia sobre la supervivencia de las células CD34 totales y de los linfocitos, estudiamos, siguiendo la misma metodología, la influencia de las distintas subpoblaciones de progenitores CD34+ obtenidas en los productos de descongelación sobre la SLE y la SG.

Para estudiar las distintas subpoblaciones de CD34+ se analizaron primero los progenitores CD34+ en función de la expresión de los antígenos DR y CD38, posteriormente analizamos los progenitores CD34+CD133+ vs. CD34+CD133- y a continuación las distintas subpoblaciones en función de la expresión de CD133, CD38, CD117 y DR. Para dividir a los pacientes en dos grupos homogéneos, se tomó como punto de corte la mediana, mostrada en las tablas 39, 40 y 41, y se compararon ambos grupos en términos de supervivencia

Análisis de los progenitores CD34+ según la expresión de CD38 y DR.

Los progenitores que expresan CD38 y DR parecen definir a los progenitores más diferenciados o comprometidos. Este subtipo celular correspondería a la célula progenitora mielóide comprometida, que ya habría perdido la capacidad de diferenciarse en precursores linfopoyéticos como se explicará en la discusión [218,219,220].

Cuando tomamos como punto de corte la mediana de células obtenidas tras la descongelación de cada población y comparamos las curvas de supervivencia, observamos siempre una diferencia de supervivencia a favor de mayor cantidad de células obtenidas. Esta diferencia es significativa respecto a la SLE (tabla 42).

Tabla 42. Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos más diferenciados y su relación con la supervivencia. χ^2 para "log-rank-test" y P en los puntos de corte elegidos (mediana de la población) para las curvas Kaplan-Meier de SLP Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

		Punto de corte (mediana)	χ^2 (log-rank-test)	P
CD34+DR+	SLE	$\geq 1,4$ vs $< 1,4 \times 10^6$ /Kg	4,127	0,042
	SG	$\geq 1,4$ vs $< 1,4 \times 10^6$ /Kg	0,046	0,830
CD34+DR-	SLE	$\geq 0,05$ vs $< 0,05 \times 10^6$ /Kg	0,097	0,756
	SG	$\geq 0,05$ vs $< 0,05 \times 10^6$ /Kg	1,713	0,191
CD34+CD38+	SLE	$\geq 1,13$ vs $< 1,13 \times 10^6$ /Kg	4,543	0,033
	SG	$\geq 1,13$ vs $< 1,13 \times 10^6$ /Kg	3,568	0,059
CD34+CD38+DR+	SLE	$\geq 1,23$ vs $< 1,23 \times 10^6$ /Kg	1,804	0,179
	SG	$\geq 1,23$ vs $< 1,23 \times 10^6$ /Kg	1,720	0,190

Los progenitores que expresan ambos marcadores CD34+CD38+DR+ y los que son DR- no parecen ofrecer ventaja sobre la supervivencia, aunque existen diferencias a favor de la curva de mayor contenido celular. Si que obtenemos diferencias estadísticamente significativas con mayor SLE cuando infundimos mayor cantidad de $1,4 \times 10^6$ /Kg de células CD34+DR+ y de $1,13 \times 10^6$ /Kg de CD34+CD38+. No hay diferencias sin embargo para las curvas de SG (tabla 42).

A continuación mostramos las curvas de supervivencia según la estimación Kaplan-Meier y tomando como punto de corte la cifra mediana las distintas subpoblaciones de células infundidas (gráficos 17-20).

CÉLULAS CD34+DR+ (punto de corte según mediana obtenida):

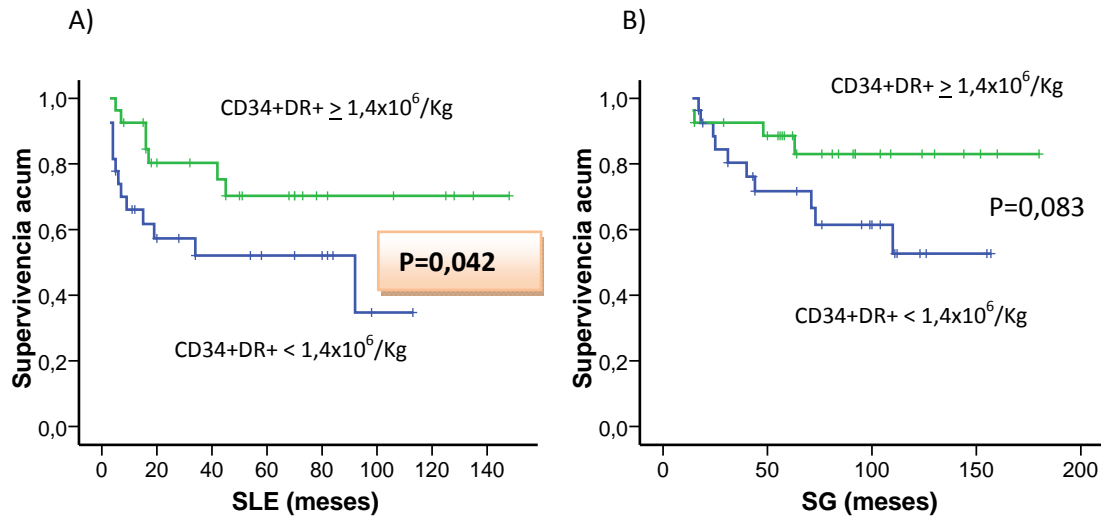


Gráfico 17. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+DR+ obtenidas. La media de SLE para el grupo de $\geq 1,4 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 55 vs 35 meses para el grupo de $< 1,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,042$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+DR+ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 1,4 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 81 vs 71 meses para el grupo de $< 1,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,083$).

CÉLULAS CD34+CD38+ (punto de corte según mediana obtenida):

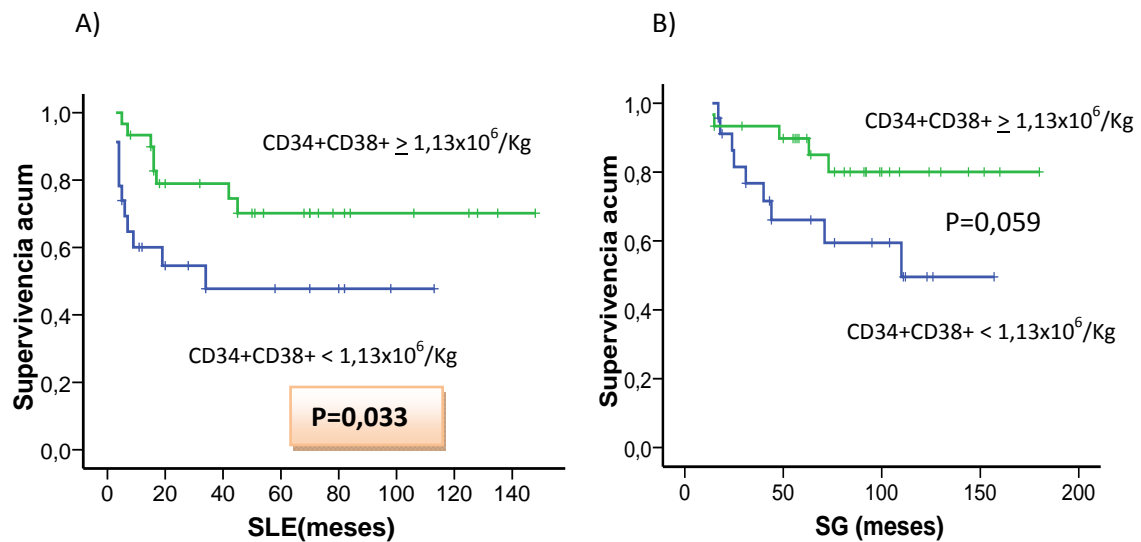
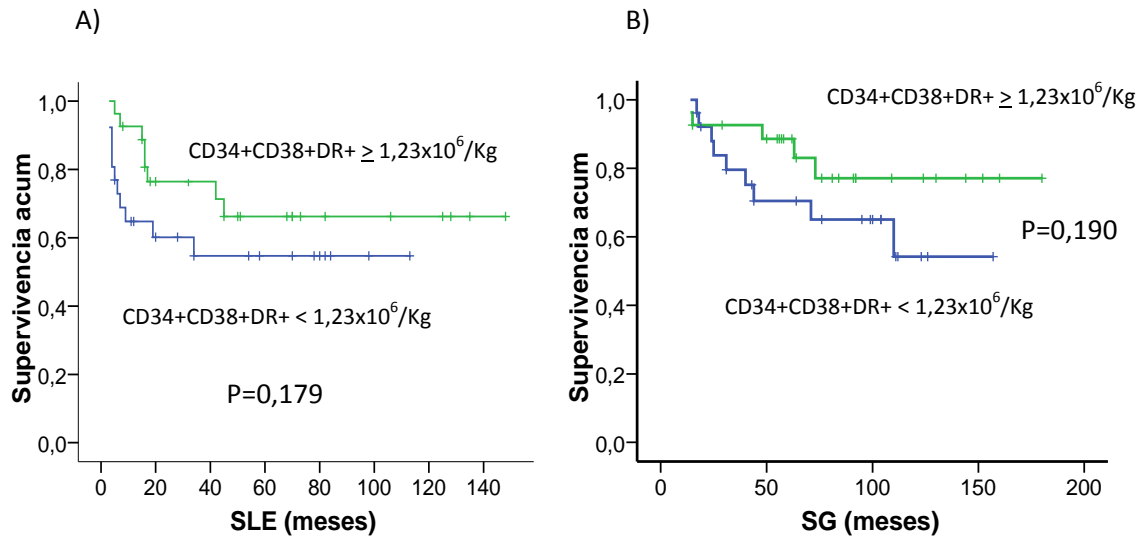
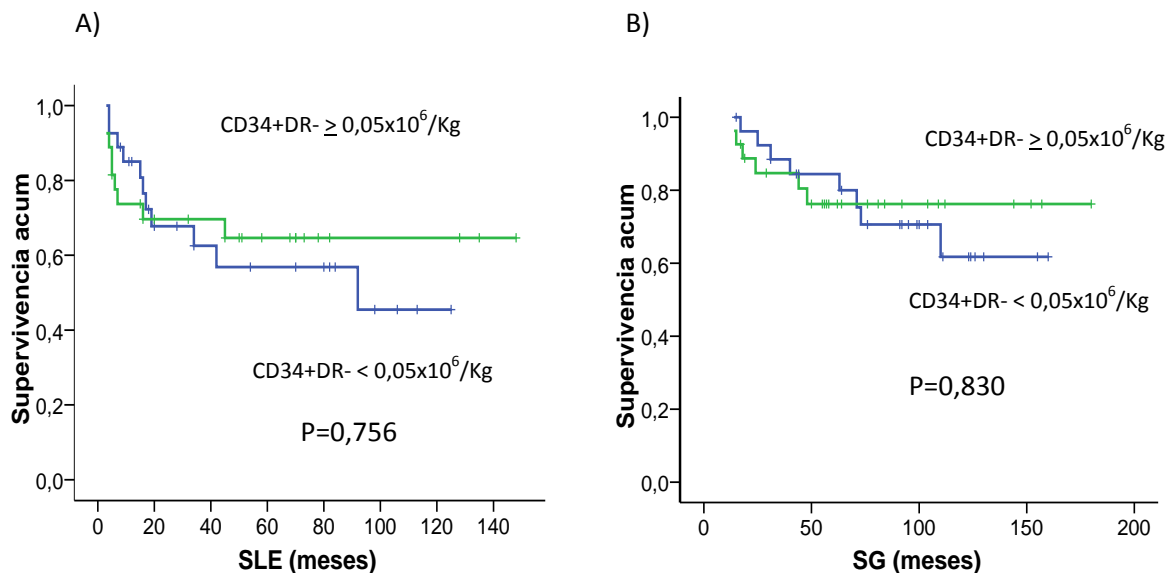


Gráfico 18. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+CD38+ obtenidas. La media de SLE para el grupo de $\geq 1,13 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 54 vs 31 meses para el grupo de $< 1,13 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,033$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+CD38+ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 1,13 \times 10^6/\text{Kg}$ fue de 82 vs 65 meses para el grupo de $< 1,13 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,059$).

CÉLULAS CD34+CD38+DR+ (punto de corte según mediana obtenida):



CÉLULAS CD34+DR- (punto de corte según mediana obtenida):



Sin embargo, investigando otros puntos de corte, diferentes a la mediana, observamos que todos los subtipos celulares tienen influencia de forma significativa sobre la supervivencia, incluyendo la SG. Las cifras de células CD34+CD38+DR+ obtenidas, con los nuevos puntos de corte, sí que se relacionan claramente con la supervivencia y además con un “log-rank-test” mayor; así mismo llegan a existir diferencias estadísticamente significativas tanto respecto a la SLE como para la SG para las células CD34+CD38+ y CD34+DR+ obtenidas (tabla 43, gráficos 21-23). No ocurre lo mismo para las células CD34+DR-, que siguen sin mostrar impacto sobre la supervivencia analizando otros puntos de corte.

Tabla 43. Células CD34+ globales obtenidas (post-descongelación) y su relación con la supervivencia. χ^2 para “log-rank-test” y P en el punto de corte elegido (≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg) para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

		Punto de corte	χ^2 (log-rank-test)	P
CD34+DR+	SLE	≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg	4,031	0,045
	SG	≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg	7,016	0,008
CD34+CD38+	SLE	≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg	5,821	0,016
	SG	≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg	4,475	0,034
CD34+CD38+DR+	SLE	≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg	6,266	0,012
	SG	≥ 1 vs $<1 \times 10^6$ /Kg	5,627	0,018

CÉLULAS CD34+DR+: $\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg.

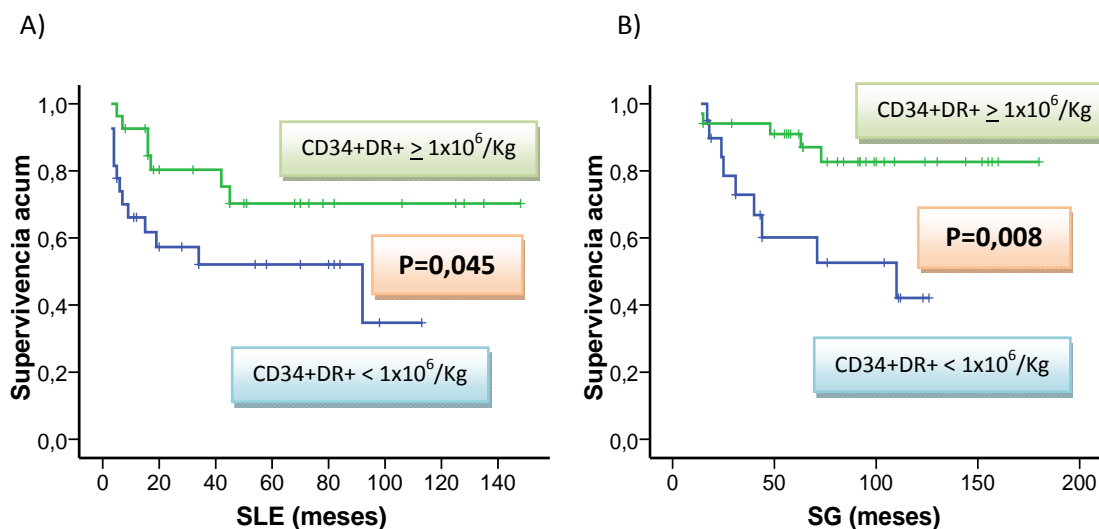


Gráfico 21. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+DR+ obtenidas ($\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg). La media de SLE para el grupo de $\geq 1 \times 10^6$ /Kg fue de 52 vs 29 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6$ /Kg ($p=0,045$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+DR+ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 1 \times 10^6$ /Kg fue de 87 vs 52 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6$ /Kg ($p=0,045$).

CÉLULAS CD34+CD38+: $\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg.

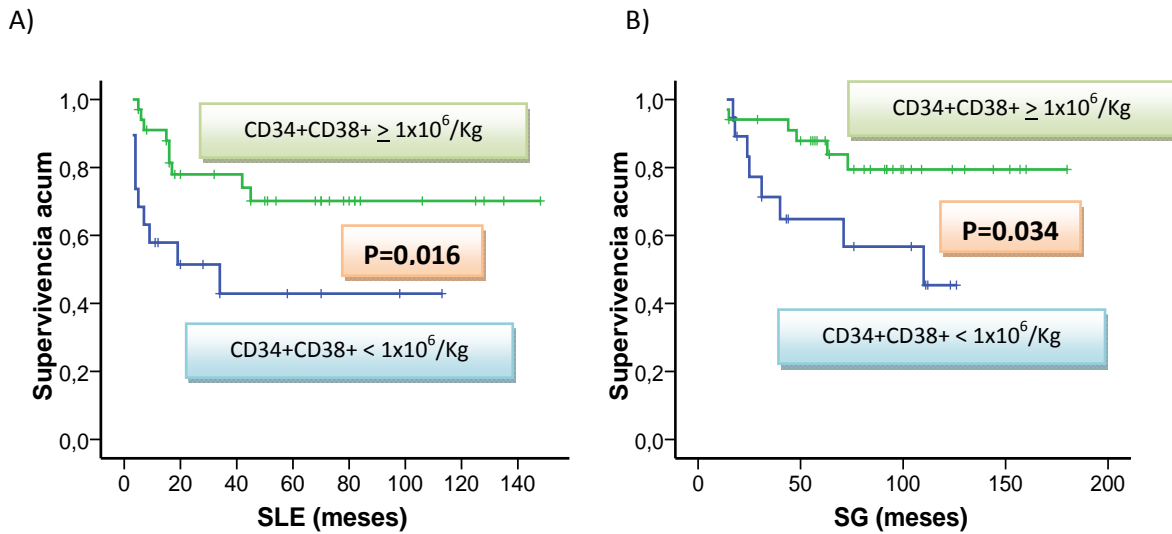


Gráfico 22. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+CD38+ obtenidas ($\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg). La media de SLE para el grupo de $\geq 1 \times 10^6$ /Kg fue de 53 vs 27 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6$ /Kg ($p=0,016$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+CD38+ obtenidas ($\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg). La media de SG para el grupo de $\geq 1 \times 10^6$ /Kg fue de 83 vs 54 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6$ /Kg ($p=0,034$).

CÉLULAS CD34+CD38+DR+: $\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg.

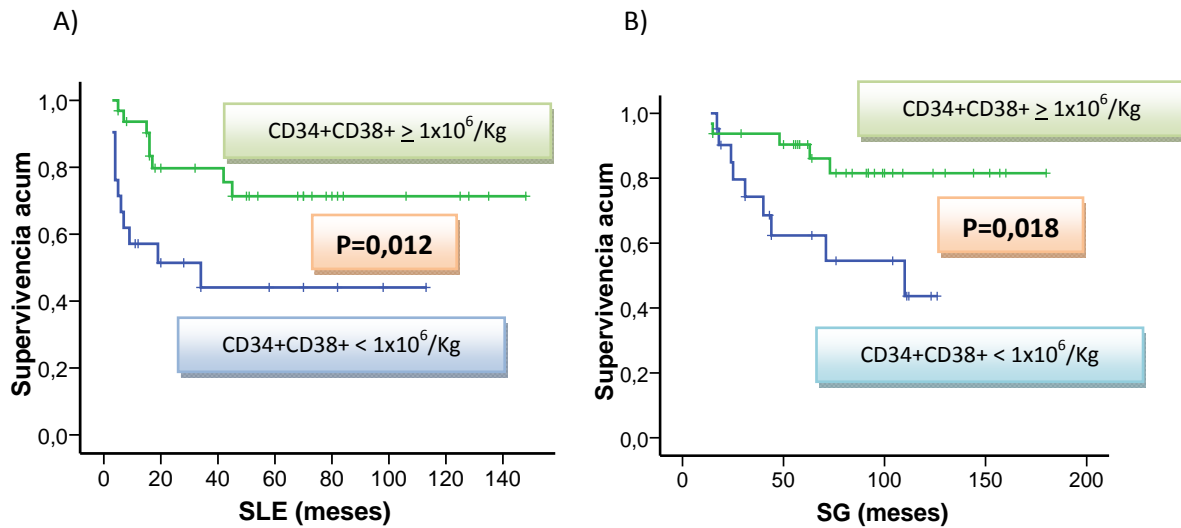


Gráfico 23. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+CD38+DR+ obtenidas ($\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg). La media de SLE para el grupo de $\geq 1 \times 10^6$ /Kg fue de 54 vs 28 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6$ /Kg ($p=0,012$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+CD38+DR+ obtenidas ($\geq 1 \times 10^6$ vs $< 1 \times 10^6$ /Kg). La media de SG para el grupo de $\geq 1 \times 10^6$ /Kg fue de 85 vs 58 meses para el grupo de $< 1 \times 10^6$ /Kg ($p=0,018$).

Análisis de los progenitores CD34+ según la expresión de CD133.

Los progenitores CD34+CD133+ y CD34+CD133- son funcionalmente distintos y es importante su análisis de forma separada [214, 215, 217].

Las curvas de supervivencia, tanto SG como la SLE muestran una ventaja en los pacientes que reciben mayor cantidad, tanto de CD34+CD133+ como de CD34+CD133-, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (tabla 44).

Tabla 44. Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos CD34+CD133+ y CD34+CD133- y su relación con la supervivencia. χ^2 para "log-rank-test" y P en los puntos de corte elegidos (mediana de la población) para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

		Punto de corte (mediana)	χ^2 (log-rank-test)	P
CD34 TOTALES	SLE	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	3,871	0,049
	SG	$\geq 1,45$ vs $< 1,45 \times 10^6$ /Kg	4,127	0,042
CD34+CD133+	SLE	$\geq 1,23$ vs $< 1,23 \times 10^6$ /Kg	1,628	0,202
	SG	$\geq 1,23$ vs $< 1,23 \times 10^6$ /Kg	2,095	0,148
CD34+CD133-	SLE	$\geq 0,48$ vs $< 0,48 \times 10^6$ /Kg	3,167	0,075
	SG	$\geq 0,48$ vs $< 0,48 \times 10^6$ /Kg	0,882	0,348

Para optimizar el punto de corte, se analizaron otros puntos de corte distintos a la mediana (tabla 45). Para un posterior análisis multivariante, el criterio de elección se realizó de entre los que mostraban diferencias estadísticamente significativas, aquellos con mayor χ^2 para "log-rank-test" y más cercanos a la mediana.

Tabla 45. Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos CD34+CD133+ y CD34+CD133- y su relación con la supervivencia. χ^2 para "log-rank-test" y P en los puntos de corte elegidos al azar (superiores a la mediana de la población) para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

Células CD34+CD133+		Punto de corte	χ^2 (log-rank-test)	P
	SLE	$\geq 0,6$ vs $< 0,6 \times 10^6$ /Kg	6,107	0,013
	SG	$\geq 0,6$ vs $< 0,6 \times 10^6$ /Kg	4,391	0,036
	SLE	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	3,54	0,06
	SG	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	4,256	0,039
	SLE	$\geq 1,23$ vs $< 1,23 \times 10^6$/Kg	1,628	0,202
	SG	$\geq 1,23$ vs $< 1,23 \times 10^6$/Kg	2,095	0,148
	SLE	$\geq 1,5$ vs $< 1,5 \times 10^6$ /Kg	2,950	0,086
	SG	$\geq 1,5$ vs $< 1,5 \times 10^6$ /Kg	3,398	0,065
	SLE	$\geq 1,7$ vs $< 1,7 \times 10^6$ /Kg	2,338	0,126
	SG	$\geq 1,7$ vs $< 1,7 \times 10^6$ /Kg	1,738	0,187

Células CD34+CD133-	Punto de corte	χ^2 (log-rank-test)	P
SLE	$\geq 0,25$ vs $< 0,25 \times 10^6$ /Kg	1,936	0,164
SG	$\geq 0,25$ vs $< 0,25 \times 10^6$ /Kg	3,741	0,053
SLE	$\geq 0,3$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg	1,531	0,216
SG	$\geq 0,3$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg	0,551	0,458
SLE	$\geq 0,48$ vs $< 0,48 \times 10^6$ /Kg	3,167	0,075
SG	$\geq 0,48$ vs $< 0,48 \times 10^6$ /Kg	0,882	0,348
SLE	$\geq 0,75$ vs $< 0,75 \times 10^6$ /Kg	2,324	0,127
SG	$\geq 0,75$ vs $< 0,75 \times 10^6$ /Kg	3,261	0,071
SLE	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	2,918	0,088
SG	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	1,750	0,186

Para el análisis de las células CD34+CD133- se pudo comprobar que aunque existen diferencias, no llegan a ser estadísticamente significativas, tanto en la SLE como con la SG. En este caso, las curvas en ambas poblaciones se comportan de igual forma, no pudiendo decir que una es superior a la otra en términos de supervivencia, sin embargo las células CD34+CD133+ sí que se relacionan claramente con la supervivencia con los nuevos puntos de corte investigados, inferiores a la mediana de células infundidas (tabla 45, gráfico 24).

CÉLULAS CD34+CD133+: $\geq 0,6 \times 10^6$ vs $< 0,6 \times 10^6$ /Kg.

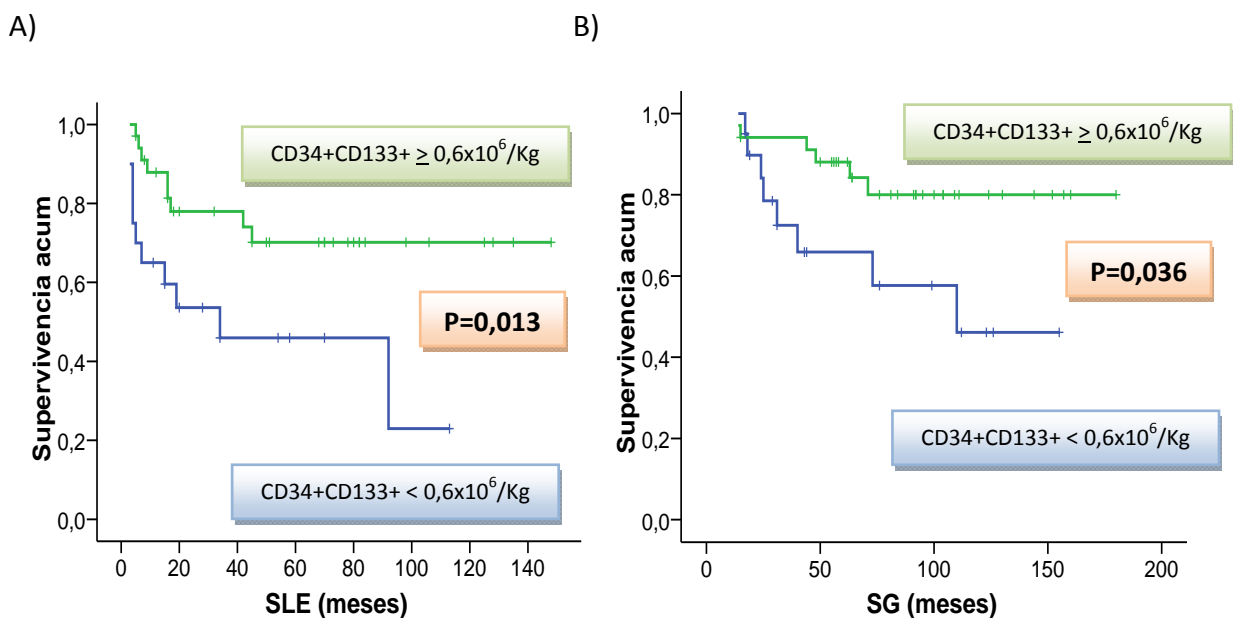


Gráfico 24. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+CD133+ obtenidas. La media de SLE para el grupo de $\geq 0,6 \times 10^6$ /Kg fue de 52,3 vs 28,2 meses el grupo de $< 0,6 \times 10^6$ /Kg ($p=0,013$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+CD133+ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 0,6 \times 10^6$ /Kg fue de 86 vs 58,6 meses el grupo de $< 0,6 \times 10^6$ /Kg ($p=0,036$).

Análisis de los progenitores CD34+ según la expresión de CD133, CD38, CD117 y DR.

Posteriormente se estudió con mayor detalle la relación con la supervivencia de estas subpoblaciones de células progenitoras **CD34+CD133+ y CD34+CD133-**, en función de la expresión de los marcadores **CD38 y HLA-DR**. Igualmente se establecieron los puntos de corte en función de la mediana de la cantidad de células recibidas. Los resultados se muestran en la tabla 46:

Tabla 46. Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos en función de CD133, CD38 y DR y su relación con la supervivencia. χ^2 para "log-rank-test" y P en los puntos de corte elegidos (mediana de la población) para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

		Punto de corte (mediana)	χ^2 (log-rank-test)	P
CD34+CD133+DR-CD38-/+	SLE	$\geq 0,01$ vs $< 0,01 \times 10^6 / \text{Kg}$	0,264	0,606
	SG	$\geq 0,01$ vs $< 0,01 \times 10^6 / \text{Kg}$	2,743	0,098
CD34+CD133+DR+CD38-/+	SLE	$\geq 0,93$ vs $< 0,93 \times 10^6 / \text{Kg}$	5,003	0,025
	SG	$\geq 0,93$ vs $< 0,93 \times 10^6 / \text{Kg}$	4,434	0,035
CD34+CD133-DR+CD38++	SLE	$\geq 0,42$ vs $< 0,42 \times 10^6 / \text{Kg}$	3,167	0,075
	SG	$\geq 0,42$ vs $< 0,42 \times 10^6 / \text{Kg}$	0,882	0,348
CD34+CD133-DR- CD38-/+	SLE	$\geq 0,06$ vs $< 0,06 \times 10^6 / \text{Kg}$	0,073	0,788
	SG	$\geq 0,06$ vs $< 0,06 \times 10^6 / \text{Kg}$	0,130	0,719

Se observa un fuerte impacto sobre la SG y la SLE en función de las cifras de células CD34+CD133+DR+CD38bajo. Tal y como se describe anteriormente en esta memoria, se trata, de las células CD34+ más inmaduras (CD34+CD133+) y a su vez la población más numerosa. Respecto al resto de subpoblaciones, no se obtienen diferencias significativas en la suoervivencia, pero es posible que aumentando la cantidad de células CD34+ obtenidas, se produzcan diferencias significativas en algún momento; para investigar este efecto estudiamos otros puntos de corte en cada subpoblación. Los resultados se muestran en la tabla 47. El primer punto de corte corresponde a la mediana y a continuación mostramos otros puntos de corte que corresponden progresivamente a una mayor cantidad de células, con su χ^2 (log-rank-test y nivel de significación).

Tabla 47. Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos en función de CD133, CD38 y DR y su relación con la supervivencia en función de diferentes puntos de corte. χ^2 para "log-rank-test" y P en los puntos de corte elegidos para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

		Puntos de corte	χ^2 (log-rank-test)	P
A) CD34+CD133-DR-CD38-/+	SLE	$\geq 0,04$ vs $< 0,04 \times 10^6$ /Kg	0,348	0,555
	SG	$\geq 0,04$ vs $< 0,04 \times 10^6$ /Kg	0,188	0,664
	SLE	$\geq 0,06$ vs $< 0,06 \times 10^6$/Kg	0,073	0,788
	SG	$\geq 0,06$ vs $< 0,06 \times 10^6$/Kg	0,130	0,719
	SLE	$\geq 0,1$ vs $< 0,1 \times 10^6$ /Kg	0,112	0,738
	SG	$\geq 0,1$ vs $< 0,1 \times 10^6$ /Kg	1,330	0,249
	SLE	$\geq 0,15$ vs $< 0,15 \times 10^6$ /Kg	2,864	0,91
	SG	$\geq 0,15$ vs $< 0,15 \times 10^6$ /Kg	2,164	0,141
B) CD34+CD133+DR-CD38-/+	SLE	$\geq 0,005$ vs $< 0,005 \times 10^6$ /Kg	0,520	0,471
	SG	$\geq 0,005$ vs $< 0,005 \times 10^6$ /Kg	2,654	0,103
	SLE	$\geq 0,01$ vs $< 0,01 \times 10^6$/Kg	0,264	0,606
	SG	$\geq 0,01$ vs $< 0,01 \times 10^6$/Kg	2,743	0,098
	SLE	$\geq 0,02$ vs $< 0,02 \times 10^6$ /Kg	0,516	0,473
	SG	$\geq 0,02$ vs $< 0,02 \times 10^6$ /Kg	0,464	0,496
	SLE	$\geq 0,025$ vs $< 0,025 \times 10^6$ /Kg	1,566	0,211
	SG	$\geq 0,025$ vs $< 0,025 \times 10^6$ /Kg	1,644	0,200
	SLE	$\geq 0,03$ vs $< 0,03 \times 10^6$ /Kg	0,853	0,356
	SG	$\geq 0,03$ vs $< 0,03 \times 10^6$ /Kg	0,471	0,493
C) CD34+CD133+DR+CD38-/+	SLE	$\geq 0,5$ vs $< 0,5 \times 10^6$ /Kg	9,392	0,002
	SG	$\geq 0,5$ vs $< 0,5 \times 10^6$ /Kg	6,997	0,008
	SLE	$\geq 0,76$ vs $< 0,76 \times 10^6$/Kg	2,536	0,111
	SG	$\geq 0,76$ vs $< 0,76 \times 10^6$/Kg	4,123	0,042
	SLE	$\geq 0,95$ vs $< 0,95 \times 10^6$ /Kg	5,003	0,025
	SG	$\geq 0,95$ vs $< 0,95 \times 10^6$ /Kg	4,434	0,035
	SLE	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	3,540	0,06
	SG	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	4,256	0,039
	SLE	$\geq 1,5$ vs $< 1,5 \times 10^6$ /Kg	2,950	0,086
	SG	$\geq 1,5$ vs $< 1,5 \times 10^6$ /Kg	3,398	0,065
D) CD34+CD133-DR+CD38++	SLE	$\geq 0,3$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg	13,076	0,000
	SG	$\geq 0,3$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg	6,225	0,013
	SLE	$\geq 0,42$ vs $< 0,42 \times 10^6$/Kg	3,167	0,075
	SG	$\geq 0,42$ vs $< 0,42 \times 10^6$/Kg	0,882	0,348
	SLE	$\geq 0,75$ vs $< 0,75 \times 10^6$ /Kg	2,321	0,128
	SG	$\geq 0,75$ vs $< 0,75 \times 10^6$ /Kg	3,045	0,081
	SLE	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	2,918	0,088
	SG	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	1,750	0,186

Ningún punto de corte llega a mostrar diferencias estadísticamente significativas en las subpoblaciones minoritarias (CD34+CD133+DR-CD38bajo y CD34+CD133-DR+CD38bajo), sin embargo las subpoblaciones CD34+CD133+DR+CD38bajo y CD34+CD133-DR+CD38++, ambas mayoritarias en el inóculo, muestran diferencias significativas, con mejor supervivencia cuando se infunden en cantidades iguales o superiores a $0,5 \times 10^6$ /Kg y $0,3 \times 10^6$ /Kg respectivamente.

En resumen, obtenemos diferencias significativas en las curvas de SG y en la SLE para las cifras post-congelación de células **CD34** totales y de las subpoblaciones **CD34+CD133+**,

CD34+CD133+DR+CD38bajo y CD34+CD133-DR+CD38++ en los términos resumidos en la tabla 48 y que se tendrán en cuenta más adelante para el análisis multivariante.

Tabla 48. Subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos en las que se obtienen diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia. χ^2 para "log-rank-test" y P en los puntos de corte elegidos para las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG. Nivel de significación: $p < 0,05$.

		Punto de corte	χ^2 (log-rank-test)	P
CD34 TOTALES	SLE	≥ 1 vs $< 1 \times 10^6$ /Kg	3,871	0,049
	SG	$\geq 1,45$ vs $< 1,45 \times 10^6$ /Kg	4,127	0,042
CD34+CD133+	SLE	$\geq 0,6$ vs $< 0,6 \times 10^6$ /Kg	6,107	0,013
	SG	$\geq 0,6$ vs $< 0,6 \times 10^6$ /Kg	4,391	0,036
CD34+CD133-DR+CD38++	SLE	$\geq 0,3$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg	13,076	0,000
	SG	$\geq 0,3$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg	6,225	0,013
CD34+CD133+DR+CD38-/+	SLE	$\geq 0,95$ vs $< 0,95 \times 10^6$ /Kg	5,003	0,025
	SG	$\geq 0,95$ vs $< 0,95 \times 10^6$ /Kg	4,434	0,035
	SLE	$\geq 0,5$ vs $< 0,5 \times 10^6$ /Kg	9,392	0,002
	SG	$\geq 0,5$ vs $< 0,5 \times 10^6$ /Kg	6,997	0,008

A continuación se muestran las curvas de Kaplan-Meier obtenidas respecto a la SLE y SG de la subpoblaciones CD34+CD133-DR+CD38++ y CD34+CD133+DR+CD38-/+ (gráficos 25, 26 y 27).

CÉLULAS CD34++CD133+DR+CD38-/+ : $\geq 0,95 \times 10^6$ vs $< 0,95 \times 10^6$ /Kg.

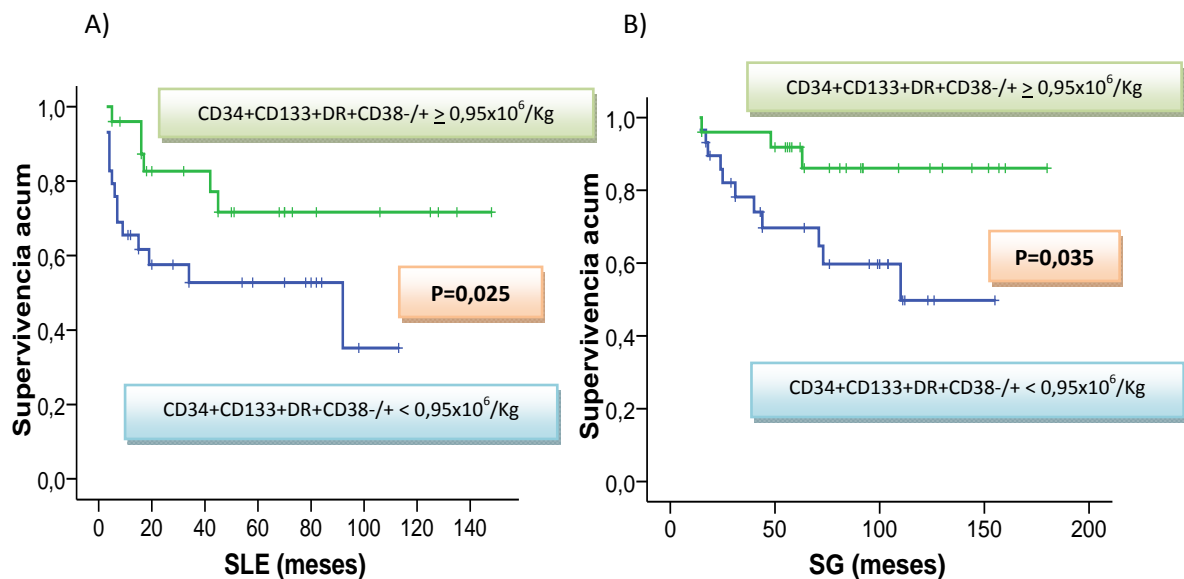


Gráfico 25. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34++CD133+DR+CD38-/+ obtenidas. La media de SLE para el grupo de $\geq 0,95 \times 10^6$ /Kg fue de 55,4 vs 34,9 meses el grupo de $< 0,95 \times 10^6$ /Kg ($p=0,025$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38-/+ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 0,95 \times 10^6$ /Kg fue de 88,6 vs 64,6 meses el grupo de $< 0,95 \times 10^6$ /Kg ($p=0,035$).

CÉLULAS CD34++CD133+DR+CD38-/+ : $\geq 0,5 \times 10^6$ vs $< 0,5 \times 10^6$ /Kg.

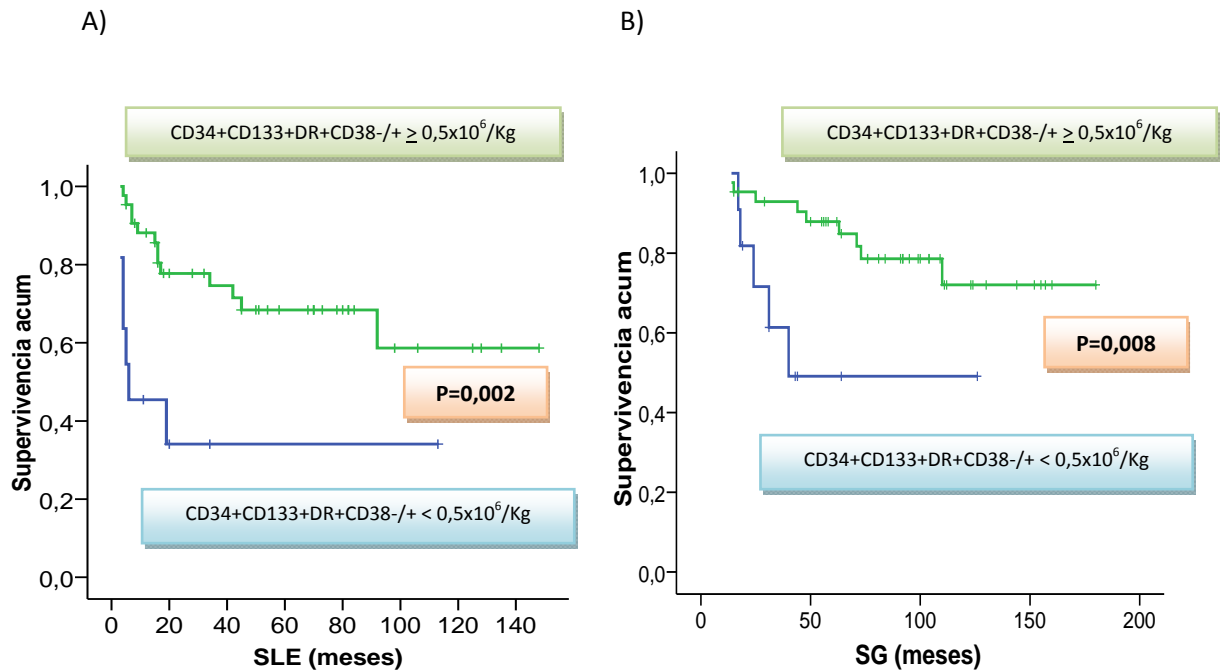


Gráfico 26. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34++CD133+DR+CD38-/+ obtenidas. La media de SLE para el grupo de $\geq 0,5 \times 10^6$ /Kg fue de 51,6 vs meses 18,5 el grupo de $< 0,5 \times 10^6$ /Kg ($p=0,002$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34++CD133+DR+CD38-/+ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 0,5 \times 10^6$ /Kg fue de 85,6 vs 39,7 meses el grupo de $< 0,5 \times 10^6$ /Kg ($p=0,008$).

CÉLULAS CD34+CD133-DR+CD38+++ : $\geq 0,3 \times 10^6$ vs $< 0,3 \times 10^6$ /Kg.

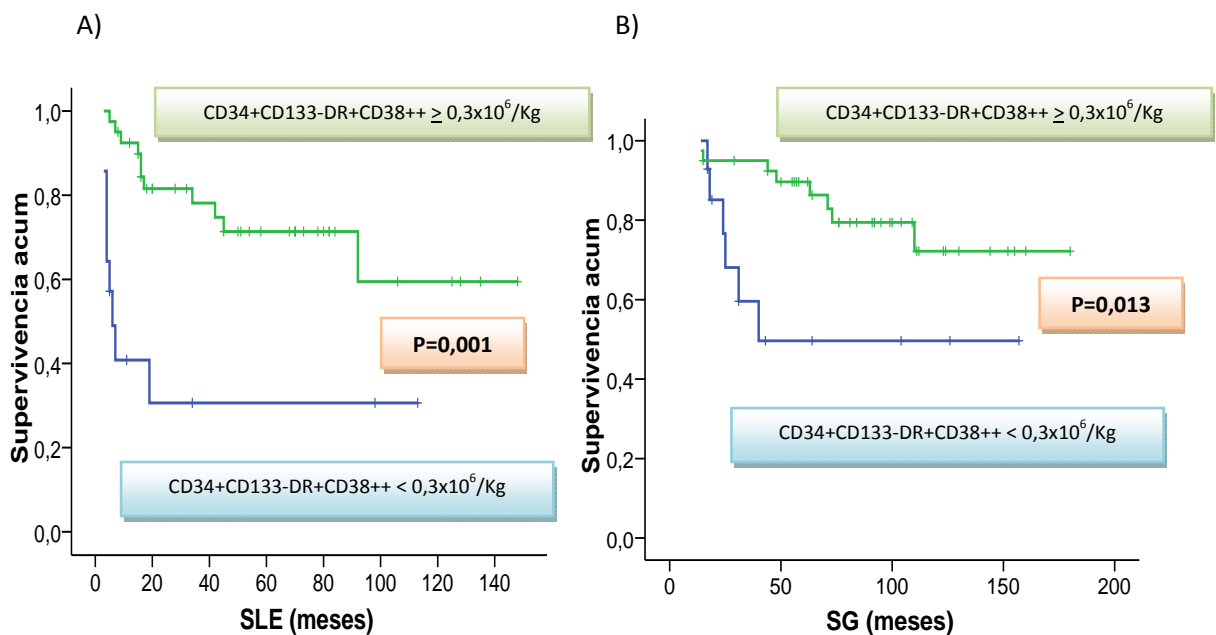


Gráfico 27. A) Curva de SLE en función de la cantidad de células CD34+CD133-DR+CD38+++ obtenidas. La media de SLE para el grupo de $\geq 0,3 \times 10^6$ /Kg fue de 53,1 vs 21 meses el grupo de $< 0,3 \times 10^6$ /Kg ($p<0,001$). B) Curva de SG en función de la cantidad de células CD34+CD133-DR+CD38+++ obtenidas. La media de SG para el grupo de $\geq 0,3 \times 10^6$ /Kg fue de 85,5 vs 49 meses el grupo de $< 0,3 \times 10^6$ /Kg ($p=0,013$).

1.2.2 SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS.

Para cada uno de los subtipos de linfocitos analizados se expondrán los resultados de estadísticos descriptivos obtenidos: medias, desviaciones estándar, medianas y rango obtenidos en cada población de linfocitos analizada y a continuación los resultados del análisis de supervivencia según estimación Kaplan-Meier.

En las tablas siguientes (tablas 49 a 54) se muestran los resultados de los estadísticos descriptivos obtenidos de las distintas subpoblaciones de linfocitos analizadas.

Tabla 49. Cantidad total obtenida de linfocitos T, B, NK y $\gamma\delta$.

POBLACIÓN	MEDIA	DS	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO
Linfocitos totales $\times 10^6$ /Kg	182,24	169,63	137,01	847,91	0,01
1. Linfocitos B (CD19+) $\times 10^6$ /Kg	8,14	18,45	1,09	111,61	0,00
2. Linfocitos T (CD3+) $\times 10^6$ /Kg	142,51	131,06	110,02	585,74	0,00
3. Linfocitos NK $\times 10^6$ /Kg	31,57	42,75	19,85	263,48	0,00

Tabla 50. Subtipos de linfocitos T y expresión global de distintos marcadores.

POBLACIÓN	MEDIA	DS	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO
Linfocitos T (CD3+) $\times 10^6$ /Kg	142,51	131,06	110,02	585,74	0,00
1. Linfocitos T CD4+ $\times 10^6$ /Kg	64,79	65,15	45,81	288,39	0,00
2. Linfocitos T CD8+ $\times 10^6$ /Kg	66,36	69,97	48,93	370	0,00
3. Linfocitos T TCR $\gamma\delta$ + $\times 10^6$ /Kg	9,86	13,89	3,32	57,01	0,00
Expresión de distintos marcadores en linfocitos T					
Linfocitos T CD16+ $\times 10^6$ /Kg	42,50	68,47	20,33	368,77	0,00
Linfocitos T CD56+ $\times 10^6$ /Kg	58,84	71,83	36,19	387,39	0,00
Linfocitos T CD56++ $\times 10^6$ /Kg	3,72	4,72	2,55	29,01	0,00
Linfocitos T NKG2D+ $\times 10^6$ /Kg	87,84	102,15	61,48	645,41	0,00
Linfocitos T CD158a+ $\times 10^6$ /Kg	6,82	13,14	3,13	69,89	0,00
Linfocitos T CD158b+ $\times 10^6$ /Kg	12,54	18,20	5,58	106,14	0,00

Tabla 51. Subtipos de linfocitos T CD4+.

POBLACIÓN	MEDIA	DS	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO
Linfocitos T CD4+ $\times 10^6$ /Kg	64,79	65,15	45,81	288,39	0,00
Linfocitos CD3+CD4+CD16+ $\times 10^6$ /Kg	0,78	1,93	0,25	14,05	0,00
Linfocitos CD3+CD4+CD56+ $\times 10^6$ /Kg	8,28	13,41	3,38	74,27	0,00
Linfocitos CD3+CD4+CD56++ $\times 10^6$ /Kg	0,39	0,64	0,13	3,54	0,00
Linfocitos CD3+CD4+NKG2D+ $\times 10^6$ /Kg	0,07	0,36	0,00	2,65	0,00
Linfocitos CD3+CD4+CD158a+ $\times 10^6$ /Kg	0,47	1,01	0,19	6,28	0,00
Linfocitos CD3+CD4+CD158b+ $\times 10^6$ /Kg	0,56	1,38	0,15	7,45	0,00
Linfocitos CD3+CD4+CD158a+CD158b+ $\times 10^6$ /Kg	0,03	0,04	0,01	0,23	0,00

Tabla 52. Subtipos de linfocitos T CD8+.

POBLACIÓN	MEDIA	DS	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO
Linfocitos T CD8+ x10 ⁶ /Kg	66,36	69,97	48,93	370	0,00
Linfocitos T CD8+totales x10 ⁶ /Kg	66,36	69,97	48,93	370	0,00
Linfocitos CD3+CD8+TCRγδ- x10 ⁶ /Kg	63,91	67,64	48,55	356,13	0,00
Linfocitos CD3+CD8+ CD16+ x10 ⁶ /Kg	5,62	12,27	1,88	66,78	0,00
linfocitos CD3+CD8+ NKG2D+ x10 ⁶ /Kg	51,83	58,27	36,08	333,73	0,00
linfocitos CD3+CD8+ CD56+ x10 ⁶ /Kg	13,31	19,97	6,90	112,25	0,00
Linfocitos CD3+CD8+ CD56++ x10 ⁶ /Kg	0,63	1,26	0,27	8,34	0,00
Linfocitos CD3+CD8+ CD158a+ x10 ⁶ /Kg	1,34	3,10	0,49	19,07	0,00
linfocitos CD3+CD8+ CD158b+ x10 ⁶ /Kg	2,78	4,53	1,47	24,58	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158a+CD158b+ x10 ⁶ /Kg	0,25	0,52	0,08	3,56	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158a+CD16+ x10 ⁶ /Kg	0,60	2,08	0,14	14,85	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158a+CD56+ x10 ⁶ /Kg	1,17	3,02	0,25	19,07	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158a+CD56++ x10 ⁶ /Kg	0,37	0,89	0,14	6,28	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158a+NKG2D+ x10 ⁶ /Kg	1,03	2,23	0,38	13,59	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158b+ x10 ⁶ /Kg	2,78	4,53	1,47	24,58	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158b+CD16+ x10 ⁶ /Kg	0,59	1,69	0,19	11,65	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158b+CD56+ x10 ⁶ /Kg	1,37	3,30	0,43	22,68	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158b+CD56++ x10 ⁶ /Kg	0,03	0,05	0,01	0,23	0,00
Linfocitos CD3+CD8+CD158b+NKG2D+ x10 ⁶ /Kg	2,25	4,11	0,98	23,51	0,00

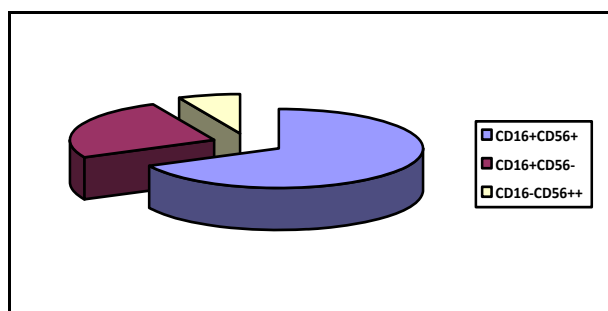
Tabla 53. Subtipos de linfocitos T TCR γδ+.

POBLACIÓN	MEDIA	DS	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO
Linfocitos T TCRγδ+ x10 ⁶ /Kg	9,86	13,89	3,32	57,01	0,00
Linfocitos TCR γδ+CD8+ x10 ⁶ /Kg	2,46	4,76	0,84	26,16	0,00
Linfocitos TCRγδ+CD16+ x10 ⁶ /Kg	3,72	9,15	0,53	42,45	0,00
linfocitos TCRγδ+CD56+ x10 ⁶ /Kg	3,70	5,21	1,77	21,81	0,00
linfocitos TCRγδ+CD56++ x10 ⁶ /Kg	0,50	1,12	0,14	7,31	0,00
Linfocitos TCRγδ+NKG2D+ x10 ⁶ /Kg	8,91	13,10	2,87	54,68	0,00
Linfocitos TCRγδ+CD158a+ x10 ⁶ /Kg	0,84	2,02	0,25	13,93	0,00
Linfocitos TCRγδ+CD158b+ x10 ⁶ /Kg	1,19	2,73	0,35	15,26	0,00
Linfocitos TCRγδ+CD158a+CD158b+ x10 ⁶ /Kg	0,78	1,93	0,25	14,05	0,00

Tabla 54. Subtipos de células NK y expresión de distintos marcadores.

POBLACIÓN	MEDIA	DS	MEDIANA	MÁXIMO	MÍNIMO
Células NK	31,57	42,75	19,85	263,48	0,00
1. Células NK CD16+CD56+ x10⁶/Kg	21,42	35,83	11,22	238,91	0,00
2. Células NK CD16+CD56- x10⁶/Kg	7,96	10,17	4,09	57	0,00
3. Células NK CD16-CD56++ x10⁶/Kg	2,20	2,20	1,49	9,82	0,00
Expresión de distintos marcadores en las células NK					
Células NK CD8+ x10 ⁶ /Kg	3,79	5,86	1,99	35,17	0,00
Células NK CD16+ x10 ⁶ /Kg	29,01	41,52	15,66	260,45	0,00
Células NK CD56+ x10 ⁶ /Kg	21,42	35,83	11,22	238,91	0,00
Células NK CD56++ x10 ⁶ /Kg	1,09	1,27	0,58	5,34	0,00
Células NK NKG2D+ x10 ⁶ /Kg	20,90	36,16	10,98	247,40	0,00
Células NK CD158a+ x10 ⁶ /Kg	7,74	13,65	3,22	73,56	0,00
Células NK CD158b+ x10 ⁶ /Kg	7,11	12,74	2,23	72,92	0,00
Células NK CD158a+CD158b+ x10 ⁶ /Kg	0,75	1,09	0,26	5,76	0,00

En el siguiente gráfico (grafico 28) se expresa la distribución de CD16, CD56 en las células NK y se define un ratio de células NK 16+56+/16+56- infundidas que resultó ser 2,7.



Media NK CD16+56+/16+56- = 2,7

Gráfico 28. Distribución de las células NK.

Para estudiar la influencia sobre la supervivencia de las distintas subpoblaciones de linfocitos, se dividieron a los pacientes en dos grupos homogéneos, se tomó como punto de corte la mediana y se compararon ambos grupos en términos de supervivencia (SLE y SG).

Principales subpoblaciones linfocitarias.

A continuación (tabla 55) se exponen los resultados obtenidos de las curvas de supervivencia de las principales subpoblaciones linfocitarias y de los linfocitos con expresión de los antígenos CD16+, CD56+, CD56++, NKG2D, CD158a y CD158b y tomando como punto de corte la mediana de la cantidad de células obtenidas. Como se puede comprobar no se obtienen diferencias significativas ni para la SLE ni para la SG.

Tabla 55. Principales subpoblaciones linfocitarias y expresión global de los marcadores CD16+, CD56+, CD56++, NKG2D, CD158a y CD158b en los linfocitos obtenidos. Relación con la supervivencia según estimación de Kaplan-Meier. Los puntos de corte elegidos corresponden a las cifras medianas.

		Punto de corte (mediana)	P	
			SLE	SG
LINFOCITOS B (CD19+)	SLE	$\geq 1,10$ vs $< 1,10 \times 10^6$ /Kg	0,735	0,399
LINFOCITOS T (CD3+)	SLE	$\geq 110,02$ vs $< 110,02 \times 10^6$ /Kg	0,690	0,526
LINFOCITOS NK	SLE	$\geq 19,85$ vs $< 19,85 \times 10^6$ /Kg	0,746	0,554
LINFOCITOS TCR $\gamma\delta$ +	SLE	$\geq 3,32$ vs $< 3,32 \times 10^6$ /Kg	0,604	0,866
LINFOCITOS CD3+CD4+	SLE	$\geq 45,81$ vs $< 45,81 \times 10^6$ /Kg	0,972	0,777
LINFOCITOS CD3+CD8+ TOTALES	SLE	$\geq 48,93$ vs $< 48,93 \times 10^6$ /Kg	0,826	0,574
EXPRESIÓN GLOBAL CD158a+	SLE	$\geq 3,13$ vs $< 3,13 \times 10^6$ /Kg	0,297	0,454
EXPRESIÓN GLOBAL CD158b+	SLE	$\geq 5,58$ vs $< 5,58 \times 10^6$ /Kg	0,459	0,603
EXPRESIÓN GLOBAL NKG2G+	SLE	$\geq 61,48$ vs $< 61,48 \times 10^6$ /Kg	0,839	0,618
EXPRESIÓN GLOBAL CD16+	SLE	$\geq 20,33$ vs $< 20,33 \times 10^6$ /Kg	0,918	0,635
EXPRESIÓN CD56+	SLE	$\geq 36,19$ vs $< 36,19 \times 10^6$ /Kg	0,827	0,577
EXPRESIÓN CD56++	SLE	$\geq 2,55$ vs $< 2,55 \times 10^6$ /Kg	0,592	0,580

Analizando otros puntos de corte distintos a la cifra mediana tampoco se obtienen diferencias en la supervivencia (tabla 56):

Tabla 56. χ^2 para "log-rank-test" y P para estimación *Kaplan-Meier* de SLE Y SG en diferentes puntos de corte.

SUBPOBLACIONES	Punto de corte	SLE		SG	
		χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
LINFOCITOS CD3+CD4+ totals	≥ 30 vs $< 30 \times 10^6$ /Kg	0,001	0,973	0,274	0,601
	≥ 50 vs $< 50 \times 10^6$ /Kg	0,034	0,854	0,012	0,913
	≥ 60 vs $< 60 \times 10^6$ /Kg	0,000	0,987	1,603	0,206
	≥ 70 vs $< 70 \times 10^6$ /Kg	0,372	0,796	0,579	0,447
LINFOCITOS TCR $\gamma\delta$ +	≥ 2 vs $< 2 \times 10^6$ /Kg	0,995	0,318	0,518	0,472
	≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	0,004	0,947	0,824	0,364
	≥ 5 vs $< 5 \times 10^6$ /Kg	0,023	0,879	0,544	0,461
	≥ 6 vs $< 6 \times 10^6$ /Kg	0,057	0,811	0,485	0,486
LINFOCITOS NK	≥ 10 vs $< 10 \times 10^6$ /Kg	1,133	0,287	0,308	0,579
	≥ 20 vs $< 20 \times 10^6$ /Kg	0,011	0,918	0,175	0,676
	≥ 30 vs $< 30 \times 10^6$ /Kg	0,009	0,923	0,209	0,648
	≥ 40 vs $< 40 \times 10^6$ /Kg	0,240	0,624	0,465	0,495
LINFOCITOS CD3+CD8+ totales	≥ 30 vs $< 30 \times 10^6$ /Kg	0,393	0,531	0,059	0,809
	≥ 50 vs $< 50 \times 10^6$ /Kg	0,193	0,661	0,151	0,796
	≥ 60 vs $< 60 \times 10^6$ /Kg	0,054	0,816	0,200	0,655
	≥ 70 vs $< 70 \times 10^6$ /Kg	0,410	0,552	0,700	0,403
EXPRESIÓN KIR (CD158a)	≥ 2 vs $< 2 \times 10^6$ /Kg	0,155	0,213	0,152	0,218
	≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	0,001	0,982	0,077	0,781
	≥ 5 vs $< 5 \times 10^6$ /Kg	0,003	0,955	0,192	0,661
	≥ 6 vs $< 6 \times 10^6$ /Kg	0,271	0,603	1,245	0,264
EXPRESIÓN KIR (CD158b)	≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	0,061	0,804	0,373	0,542
	≥ 6 vs $< 6 \times 10^6$ /Kg	0,011	0,917	0,120	0,728
	≥ 7 vs $< 7 \times 10^6$ /Kg	0,053	0,818	0,356	0,551
	≥ 8 vs $< 8 \times 10^6$ /Kg	0,354	0,552	0,024	0,876
EXPRESIÓN NKG2D	≥ 30 vs $< 30 \times 10^6$ /Kg	0,009	0,923	0,106	0,745
	≥ 40 vs $< 40 \times 10^6$ /Kg	0,147	0,702	0,620	0,431
	≥ 60 vs $< 60 \times 10^6$ /Kg	0,041	0,839	0,249	0,618
	≥ 70 vs $< 70 \times 10^6$ /Kg	0,016	0,898	0,767	0,381

Subpoblaciones de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ y células NK.

En la tabla siguiente (tabla 57) se exponen los resultados obtenidos de las curvas de supervivencia de las principales subpoblaciones de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ y células NK y su relación con la supervivencia según estimación de *Kaplan-Meier*. Los puntos de corte elegidos corresponden a las cifras medianas. Como en el caso de los linfocitos totales infundidos, del análisis efectuado se concluye que no se obtienen ventajas sobre la supervivencia (SG ni SLE) en función de la cantidad de las distintas subpoblaciones de linfocitos maduros infundidos ni con la expresión de moléculas KIR2D ni NKG2D.

Tabla 57. Subpoblaciones de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ y células NK. χ^2 para "log-rank-test" y P para estimación Kaplan-Meier de SLE Y SG en diferentes puntos de corte. No obtenemos ningún resultado significativo.

	Punto de corte (mediana)	P	
		SLE	SG
LINFOCITOS CD3+CD4+			
CD3+CD4+CD16+	$\geq 0,25$ vs $< 0,25 \times 10^6$ /Kg	0,669	0,183
CD3+CD4+NKG2D+	$> 0,00$ vs $= 0,00 \times 10^6$ /Kg	0,894	0,138
CD3+CD4+CD56+	$\geq 3,38$ vs $< 3,38 \times 10^6$ /Kg	0,527	0,332
CD3+CD4+CD56++	$\geq 0,13$ vs $< 0,13 \times 10^6$ /Kg	0,762	0,342
CD3+CD4+CD158a+	$\geq 0,19$ vs $< 0,19 \times 10^6$ /Kg	0,082	0,071
CD3+CD4+CD158b+	$\geq 0,15$ vs $< 0,15 \times 10^6$ /Kg	0,476	0,571
CD3+CD4+CD158a+CD158b+	$\geq 0,01$ vs $< 0,01 \times 10^6$ /Kg	0,623	0,425
LINFOCITOS CD3+CD8+			
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -	$\geq 48,55$ vs $< 48,55 \times 10^6$ /Kg	0,661	0,697
CD3+CD8+CD16+ $\gamma\delta$ -	$\geq 1,88$ vs $< 1,88 \times 10^6$ /Kg	0,752	0,994
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -NKG2D+	$\geq 36,08$ vs $< 36,08 \times 10^6$ /Kg	0,755	0,647
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD56+	$\geq 6,90$ vs $< 6,90 \times 10^6$ /Kg	0,578	0,992
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD56++	$\geq 0,27$ vs $\geq 0,27 \times 10^6$ /Kg	0,602	0,337
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158a+	$\geq 0,49$ vs $< 0,49 \times 10^6$ /Kg	0,877	0,571
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158b+	$\geq 1,47$ vs $< 1,47 \times 10^6$ /Kg	0,068	0,353
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -	$\geq 0,08$ vs $< 0,08 \times 10^6$ /Kg	0,089	0,700
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158a+CD16+	$\geq 0,14$ vs $< 0,14 \times 10^6$ /Kg	0,811	0,696
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158a+NKG2D+	$\geq 0,38$ vs $< 0,38 \times 10^6$ /Kg	0,498	0,240
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158a+CD56+	$\geq 0,25$ vs $< 0,25 \times 10^6$ /Kg	0,944	0,678
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158a+CD56++	$\geq 0,14$ vs $< 0,14 \times 10^6$ /Kg	0,814	0,127
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158b+CD16+	$\geq 0,19$ vs $< 0,19 \times 10^6$ /Kg	0,109	0,612
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158b+NKG2D+	$\geq 0,98$ vs $< 0,98 \times 10^6$ /Kg	0,093	0,423
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158b+CD56+	$\geq 0,43$ vs $< 0,43 \times 10^6$ /Kg	0,409	0,410
CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -CD158b+CD56++	$\geq 0,01$ vs $< 0,01 \times 10^6$ /Kg	0,609	0,748
LINFOCITOS TCR$\gamma\delta$+			
TCR $\gamma\delta$ +CD16+	$\geq 0,53$ vs $< 0,53 \times 10^6$ /Kg	0,132	0,431
TCR $\gamma\delta$ +NKG2D+	$\geq 2,87$ vs $< 2,87 \times 10^6$ /Kg	0,895	0,518
TCR $\gamma\delta$ +CD56+	$\geq 1,77$ vs $< 1,77 \times 10^6$ /Kg	0,604	0,866
TCR $\gamma\delta$ +CD56++	$\geq 0,14$ vs $< 0,14 \times 10^6$ /Kg	0,965	0,892
TCR $\gamma\delta$ +CD158a+	$\geq 0,25$ vs $< 0,25 \times 10^6$ /Kg	0,334	0,202
TCR $\gamma\delta$ +CD158b+	$\geq 0,35$ vs $< 0,35 \times 10^6$ /Kg	0,549	0,809
TCR $\gamma\delta$ +CD158a+CD158b+	$\geq 0,25$ vs $< 0,25 \times 10^6$ /Kg	0,814	0,669
TCR $\gamma\delta$ +CD3+CD8+	$\geq 0,84$ vs $< 0,84 \times 10^6$ /Kg	0,818	0,539
Células NK obtenidas. Expresión de CD16+, CD8, NKG2D, CD56+, CD56++, CD158a, CD158b y CD158aCD158b.			
NK CD16+	$\geq 15,66$ vs $< 15,66 \times 10^6$ /Kg	0,746	0,554
NK CD8+	$\geq 1,99$ vs $< 1,99 \times 10^6$ /Kg	0,693	0,669
NK NKG2D+	$\geq 10,98$ vs $< 10,98 \times 10^6$ /Kg	0,864	0,634
NK CD56+	$\geq 11,22$ vs $< 12,22 \times 10^6$ /Kg	0,853	0,900
NK CD56++	$\geq 0,58$ vs $< 0,58 \times 10^6$ /Kg	0,844	0,431
NK CD158a+	$\geq 3,22$ vs $< 3,22 \times 10^6$ /Kg	0,822	0,910
NK CD158b+	$\geq 2,23$ vs $< 2,23 \times 10^6$ /Kg	0,852	0,533
NK CD158a+CD158b+	$\geq 0,26$ vs $< 0,26 \times 10^6$ /Kg	0,431	0,554
Subpoblaciones de células NK			
NK CD16+CD56+	$\geq 11,22$ vs $< 11,22 \times 10^6$ /Kg	0,646	0,929
NK CD16+CD56-	$\geq 4,09$ vs $< 4,09 \times 10^6$ /Kg	0,661	0,700
NK CD16-CD56++	$\geq 1,49$ vs $< 1,49 \times 10^6$ /Kg	0,650	0,660
Ratio 16+56-/16+56+	$\geq 0,36$ vs $< 0,36 \times 10^6$ /Kg	0,514	0,669

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

2.1. INVESTIGAR LA INFLUENCIA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL RITUXIMAB SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL INJERTO Y LA SUPERVIVENCIA.

Se analizó el efecto del tratamiento previo al trasplante con rituximab.

De entre los pacientes con LNH se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en términos de supervivencia (SG y SLE) al comparar los pacientes que recibieron tratamiento con rituximab previo al trasplante con aquellos que no lo recibieron. Los datos se resumen a continuación (tabla 58):

Tabla 58. Mediana de los meses de SG y SLE de los pacientes con LNH que recibieron rituximab (22) en comparación con los que no lo recibieron (21). Estimación *Kaplan-Meier* de SLE y SG para ambos grupos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a favor del grupo que recibió tratamiento con rituximab.

	SG (MESES)				SLE (meses)			
	Media	DS	Mediana	Rango	Media	DS	Mediana	Rango
SI RITUXIMAB	67,2	29,76	67,5	15-112	39	27,21	33	4-84
NO RITUXIMAB	77	51,71	63	14-180	45,6	46,27	19	3-148
	p		χ^2 (log-rank-test)		p		χ^2 (log-rank-test)	
Kaplan-Meier	0,02		5,391		0,008		7,097	

Las medias muestran un resultado contradictorio, lo que explica que no se obtuvieran diferencias en el análisis univariante (comparación de medias de supervivencia, ver tabla 78, sección 3.1); sin embargo la mediana de supervivencia es superior en el grupo que recibió rituximab. Las curvas acumuladas de supervivencia (SLE y SG) según estimación *Kaplan-Meier* para ambos grupos de pacientes muestran diferencias estadísticamente significativas para los pacientes que recibieron rituximab pretrasplante (gráfico 29).

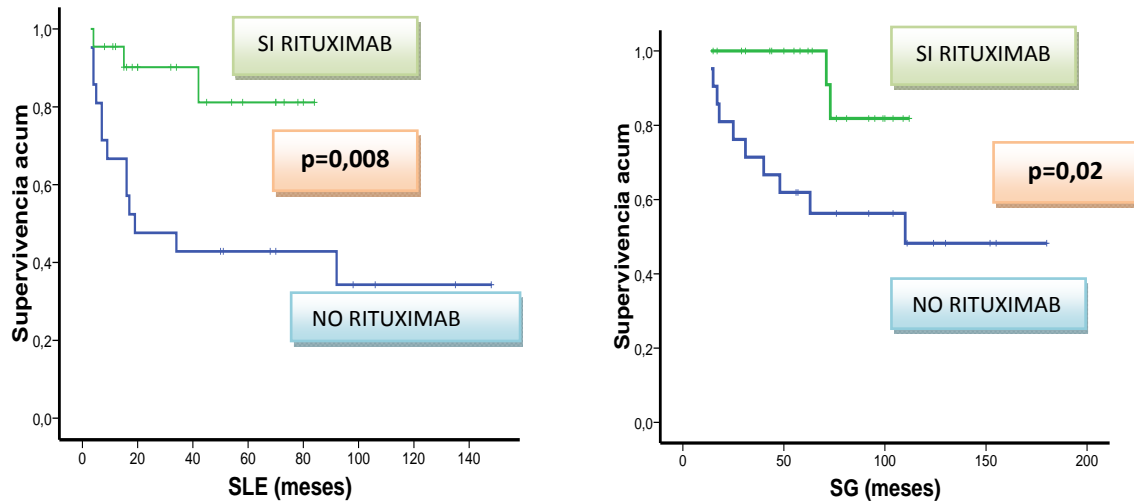


Gráfico 29. Curva de SLE y SG en función del tratamiento con rituximab. La mediana de SLE para el grupo que recibió rituximab fue de 33 vs 19 meses para el que no lo recibió ($p=0,008$). La mediana de SG para el grupo que recibió rituximab fue de 67,5 vs 63 meses para el que no lo recibió ($p=0,02$).

A continuación se muestra gráficamente según diagrama de cajas la mediana de los meses de supervivencia entre los pacientes que reciben rituximab pretrasplante y los que no (gráfico 30).

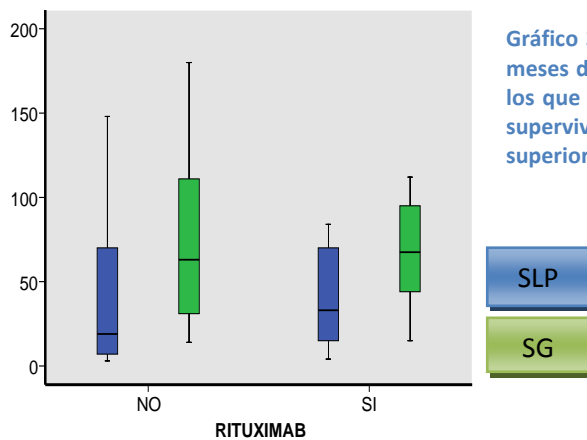


Gráfico 30. Diagrama de cajas que representa conjuntamente los meses de SLE y SG entre los pacientes que recibieron rituximab y los que no. La línea interior de la caja representa la mediana de supervivencia (Q2), el límite inferior de la caja el Q1 (25%) y el superior el Q3 (75%).

Se realizó una comparación de medias (prueba T para muestras independientes) entre los distintos tipos celulares de los que recibieron rituximab y los que no para ver si afectaba a la recolección de progenitores CD34+ y de linfocitos maduros y a sus subpoblaciones.

En las tablas 59 y 60 se muestran los resultados que ofrecieron diferencias significativas. Así se pudo comprobar que el tratamiento con rituximab no afecta a la cantidad de células CD34+ recolectadas ni a las diferentes subpoblaciones de progenitores analizadas. En cambio sí afecta a la cantidad de CMN y linfocitos totales recolectados debido a una disminución de la cantidad de linfocitos B (CD19+ recogida). No afecta al resto de subpoblaciones de linfocitos (T ni NK).

Tabla 59. Diferencias en el contenido celular de las muestras celulares obtenidas en relación a las CMN, CD34 y subtipos de CD34 obtenidos entre los pacientes que recibieron rituximab y los que no.

SUBTIPO CELULAR	SI RITUXIMAB		NO RITUXIMAB		P
	Media	Desviación	Media	Desviación	
CMN pre-cong (x 10 ⁸ /Kg)	4,84	4,33	7,35	4,59	0,04
CMN post-descon (x 10 ⁸ /Kg)	4,95	3,9	6,57	4,6	0,17
CÉLULAS CD34+ (x10⁶/kg)					
CD34+ pre-cong (x10 ⁶ /Kg)	3,44	1,8	3,41	1,76	0,94
CD34+ post-desc (x10 ⁶ /Kg)	1,83	1,6	1,53	0,97	0,39
CD34+CD133+	1,23	1,3	1,02	0,68	0,42
CD34+CD133	0,59	0,43	0,51	0,37	0,47
CD34+CD133+DR-CD38bajo	0,017	0,021	0,016	0,019	0,89
CD34+CD133+DR+CD38bajo	1,22	1,29	1	0,67	0,42
CD34+CD133-DR-CD38bajo	0,082	0,1	0,071	0,047	0,58
CD34+CD133-DR+CD38++	0,51	0,35	0,44	0,35	0,48
CD34+DR+	1,74	1,55	1,46	0,94	0,39
CD34+CD38+	1,62	1,35	1,41	0,95	0,51
CD34+CD38+DR+	1,58	1,32	1,36	0,92	0,47

Tabla 60. Diferencias en el contenido celular de las muestras celulares obtenidas en relación a los linfocitos y subpoblaciones de linfocitos obtenidos entre los pacientes que recibieron rituximab y los que no.

SUBTIPO CELULAR	SI RITUXIMAB		NO RITUXIMAB		P
	Media	Desviación	Media	Desviación	
Linfocitos totales (precong)	241,87	227,43	345,02	237,1	0,11
Linfocitos totales (postdes)	158,45	142,45	197,84	186,04	0,01
CD19+	1,94	5,85	11,4	19,32	0,03
Linfocitos T CD3+	122	98,8	137,79	132,31	0,65
CD4+	58,33	58,32	68,65	77,15	0,67
CD8+	60,4	17,59	63,71	67,33	0,76
CD16+	25,01	24,08	42,02	59,56	0,2
NKG2D+	67,02	68,68	90,36	113,77	0,4
CD158a+	6,11	12,3	8,83	14,56	0,47
CD158b+	9,62	13,41	13,19	19,56	0,45
CD56+	43,85	47,55	56,33	61,04	0,42
CD56++	2,88	3,2	4,17	4,15	0,22
TCRγδ+	5,87	7,97	10,77	14,9	0,16
CD3+CD4+	57,92	57,15	62,38	65,85	0,79
CD3+CD8+	56,88	62,44	63,79	71,48	0,71
CD3+CD4+CD16+	0,25	0,33	0,75	0,79	0,10
CD3+CD4+NKG2D+	0,1	0,44	0,011	0,03	0,23
CD3+CD4+CD56+	6,93	11,4	9,24	14,98	0,54
CD3+CD4+CD56++	0,21	0,35	0,42	0,5	0,098
CD3+CD4+CD158a+	0,21	0,29	1,11	2,35	0,081
CD3+CD4+CD158b+	0,5	0,85	0,48	0,97	0,95

LINFOCITOS TCR $\gamma\delta$ +					
CD3+CD4+CD158a+CD158b+	0,04	0,13	0,01	0,03	0,32
TCR $\gamma\delta$ +CD16+	0,84	1,18	4,87	10,53	0,08
TCR $\gamma\delta$ +NKG2D+	5,42	6,95	9,58	14,24	0,21
TCR $\gamma\delta$ +CD56+	2,01	2,3	4,24	5,78	0,09
TCR $\gamma\delta$ +CD56++	0,24	0,43	0,42	0,7	0,27
TCR $\gamma\delta$ +CD158a+	0,39	0,67	1,02	1,73	0,11
TCR $\gamma\delta$ +CD158b+	0,32	0,43	1,72	3,36	0,06
TCR $\gamma\delta$ +CD158a+CD158b+	0,09	0,21	0,39	1,48	0,34
LINFOCITOS NK					
Linfocitos NK	20,5	20,6	29,16	43,59	0,39
NK CD8+	3	3,59	3,84	6,57	0,58
NK CD16+	20,24	20,66	28,92	43,38	0,38
NKG2D+	14,06	17,47	23,09	41,61	0,35
NK CD56+	15,1	19,05	21,95	39,87	0,45
NK CD56++	1,01	1,15	1,63	2,1	0,21
NK CD158a+	4,08	10,28	3,48	5,57	0,78
NK CD158b+	5,5	10,48	7,46	13,31	0,56
NK CD158a+ CD158b+	0,74	0,89	1,14	2,41	0,46
NK 16+56+	16,06	19,24	24,99	38,53	0,37
NK 16+56-	5,89	5,83	9,34	12,13	0,22
NK 16-56++	1,67	1,72	2,55	2,44	0,14
LINFOCITOS TCR $\alpha\beta$ + ($\gamma\delta$ -)					
Linfocitos TCR $\alpha\beta$ + ($\gamma\delta$ -)	152,97	136,73	187,05	175,58	0,44
CD3+CD8+	55,79	61,53	61,2	69,16	0,76
CD3+CD8+CD16+	3,19	3,39	61,2	69,16	0,23
CD3+CD8+NKG2D+	43,65	48,27	6,23	11,61	0,61
CD3+CD8+CD56+	14,8	25,44	51,81	62,56	0,36
CD3+CD8+CD56++	0,52	0,81	10,17	11,43	0,88
CD3+CD8+CD158a+	1,01	1,45	0,55	0,7	0,36
CD3+CD8+CD158a+CD56+	1,56	2,28	1,79	3,83	0,59
CD3+CD8+CD158b+	2,58	5,01	2,61	3,88	0,98
CD3+CD8+CD158a+CD158b+	0,34	0,65	0,24	0,34	0,51
CD3+CD8+CD158a+CD16+	0,43	0,92	0,3	0,92	0,77
CD3+CD8+CD158a+NKG2D+	0,91	1,36	1,39	3,03	0,5
CD3+CD8+CD158a+CD56+	0,85	1,3	1,57	3,6	0,37
CD3+CD8+CD158a+CD56++	0,26	0,46	0,36	0,5	0,41
CD3+CD8+CD158b+CD16+	0,29	0,35	0,73	1,87	0,29
CD3+CD8+CD158b+NKG2D+	2,23	4,94	2,09	3,36	0,9
CD3+CD8+CD158b+CD56+	1,7	4,65	1	1,67	0,42
CD3+CD8+CD158b+CD56++	0,02	0,05	0,01	0,03	0,27

2.2 ESTUDIAR EL PAPEL DE LOS LINFOCITOS EN DISTINTOS MOMENTOS DE LA ENFERMEDAD SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

En la introducción se describe la importancia del recuento absoluto de linfocitos (RAL) al diagnóstico y tras el TAPH (RL precoz) sobre la supervivencia de los pacientes. Este último hecho se relaciona con la existencia de un efecto injerto contra linfoma del trasplante autólogo.

En los siguientes apartados se analiza la influencia del RAL sobre la supervivencia:

- Al diagnóstico de la enfermedad.
- Previo a la recolección de progenitores hematopoyéticos.
- En el día 15 post-TAPH (RL precoz).
- En diferentes momentos durante el primer año post-TAPH.

2.2.1. INFLUENCIA DEL RAL AL DIAGNÓSTICO SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

Los datos del RAL al diagnóstico son los siguientes (tabla 61):

Tabla 61. Datos globales del RAL al diagnóstico.

RAL AL DIAGNÓSTICO	
Mediana	1,5x10⁹/L
Máximo	5,2 x10 ⁹ /L
Mínimo	0,216 x10 ⁹ /L
Media	1,785 x10⁹/L
DS	1,122 x10 ⁹ /L

Se excluyeron los pacientes con linfocitosis por expresión leucémica al diagnóstico (2 pacientes). Para el análisis de supervivencia, la elección del punto de corte en la cifra de linfocitos fue la que presentaba mayor diferencias en el χ^2 en los diferentes puntos de corte analizados para el “log-rank test” en el análisis de Kaplan-Meier.

Los resultados obtenidos para distintos puntos de corte fueron (tabla 62):

Tabla 62. χ^2 para “log-rank-test” y P en diferentes puntos de corte de RAL al diagnóstico en las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG.

RAL AL DIAGNÓSTICO	SLE		SG	
	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
<0,5 vs $\geq 0,5 \times 10^9/L$	23,213	<0,001	1,656	0,198
<0,75 vs $\geq 0,75 \times 10^9/L$	27,158	<0,001	5,164	0,023
<1 vs $\geq 1 \times 10^9/L$	8,913	0,003	2,766	0,096
<1,5 vs $\geq 1,5 \times 10^9/L$	0,637	0,425	0,656	0,418
<1,8 vs $\geq 1,8 \times 10^9/L$	0,634	0,426	0,467	0,494

El punto de corte de mayor significación estadística lo ofrece el punto de mayor χ^2 : $\geq 0,75$ vs $<0,75 \times 10^9/L$, aunque $\geq 0,5$ vs $<0,5 \times 10^9/L$ y ≥ 1 vs $<1 \times 10^9/L$ también muestran diferencias significativas con respecto a la SLE. Debido a esto, el primero será el valor que se incluirá en el análisis multivariante.

A continuación se muestran las curvas que muestran diferencias significativas en la supervivencia (gráfico 31):

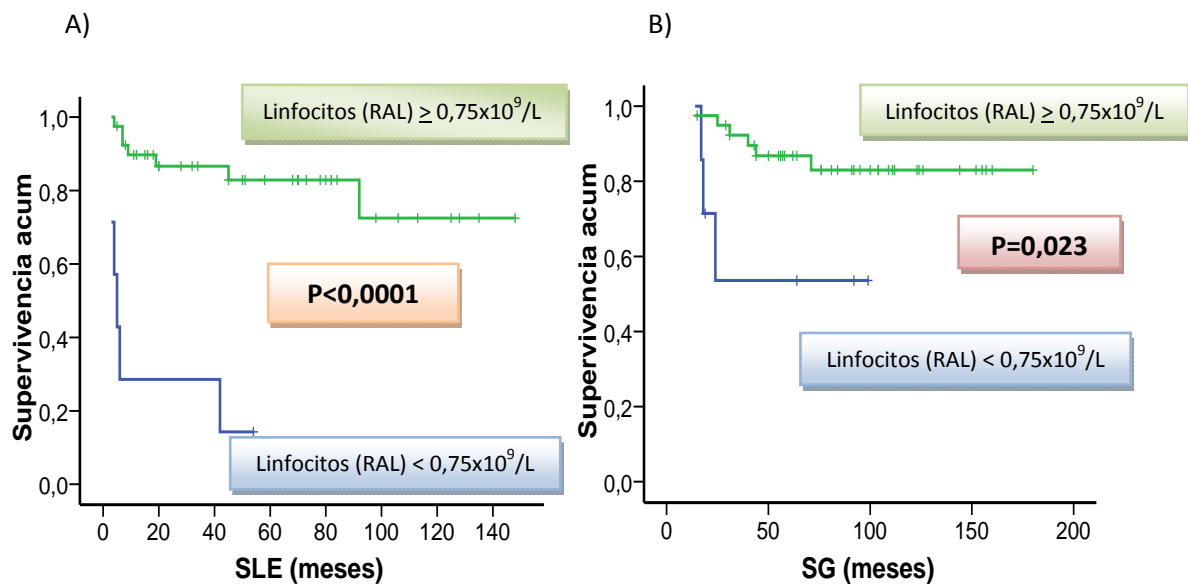


Gráfico 31. A) Curva de SLE en función del RAL al diagnóstico $\geq 0,75 \times 10^9/L$ vs $< 0,75 \times 10^9/L$. La media de SLE para el grupo de $\geq 0,75 \times 10^9/L$ fue de 47,5 vs 18,6 meses para el grupo de $< 0,75 \times 10^9/L$ ($p < 0,0001$). B) Curva de SG en función de los linfocitos al diagnóstico $\geq 0,75 \times 10^9/L$ vs $< 0,75 \times 10^9/L$ ($p < 0,05$). La media de SG para el grupo de $\geq 0,75 \times 10^9/L$ fue de 78,3 vs 52,3 meses para el grupo de $< 0,75 \times 10^9/L$ ($p < 0,05$).

Los pacientes que tienen un RAL al diagnóstico $\geq 0,750 \times 10^9/L$ tienen una SLE y una SG significativamente mayor que los tienen un RAL inferior a este valor. Estos resultados también se reproducirán en el análisis univariante (sección 3.1, tabla 78). Este hecho confirma la importancia pronóstica del sistema inmune del huésped al diagnóstico de la enfermedad en nuestros pacientes.

2.2.2. INFLUENCIA DEL RAL PREVIO A LA RECOLECCIÓN SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

En distintos trabajos [175, 176] se demuestra una correlación entre el RAL existente previo a la recolección y la cantidad de linfocitos totales recolectados. En nuestros pacientes este hallazgo sigue siendo cierto como se muestra el estudio de correlación efectuado (tabla 64). Los datos del RAL en el momento de realizar la aféresis fueron los siguientes (tabla 63):

Tabla 63. Datos globales del RAL en el momento de realizar la aféresis.

RAL PREVIO RECOLECCIÓN	
Mediana	1x10⁹/L
Máximo	11,2 x10 ⁹ /L
Mínimo	0,07 x10 ⁹ /L
Media	1,36 x10⁹/L
DS	1,72 x10 ⁹ /L

Tabla 64. Correlación entre el RAL de linfocitos pre-aféresis y la cantidad de linfocitos y células CD34+ totales recolectados. La correlación es significativa con los datos obtenidos pre-congelación.

LINFOCITOS PRE-AFÉRESIS/ LINFOCITOS RECOLECTADOS	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
Pre-congelación	0,354	0,009	0,368	0,006
Post-descongelación	0,223	0,105	0,195	0,158

Existe una clara correlación lineal (gráfico 32) entre el recuento absoluto de linfocitos pre-aféresis y la cantidad de linfocitos recolectada (cálculo efectuado antes de la congelación); con las células obtenidas post-descongelación, aunque existe correlación, no adquiere significación estadística.

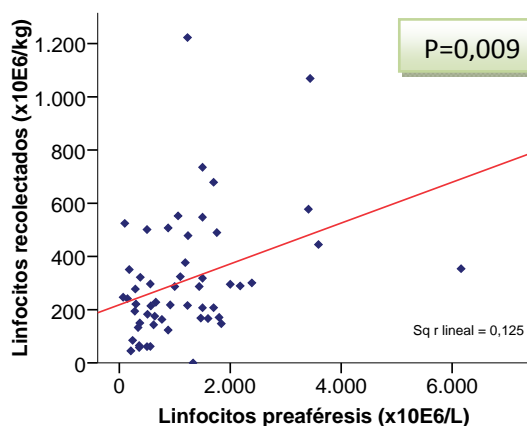


Gráfico 32. Gráfico de correlación entre el RAL existente en el momento de iniciar la recolección de progenitores con la cantidad de linfocitos recolectados. Se obtiene una correlación positiva estadísticamente significativa. (Rho de Spearman 0,354; p=0,009).

Estos resultados concuerdan con los publicados [175, 176]. Sin embargo, como ya hemos comentado, en nuestro caso la supervivencia no se veía influenciada por la cifra de linfocitos infundidos y como es de esperar, tampoco por la cantidad de linfocitos en el momento de realizar la aféresis (tabla 65):

Tabla 65. χ^2 para “log-rank-test” y P en diferentes puntos de corte de RAL al inicio de la recolección de progenitores en las curvas Kaplan-Meier de SLE Y SG.

RAL AL INICIO DE LA AFÉRESIS	SLE		SG	
	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
<0,5 vs $\geq 0,5 \times 10^9/L$	0,106	0,745	0,02	0,889
<1 vs $\geq 1 \times 10^9/L$	0,277	0,599	0,871	0,351
<1,5 vs $\geq 1,5 \times 10^9/L$	0,054	0,817	0,106	0,744

2.2.3. INFLUENCIA DE LA RL PRECOZ SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

Se definió la RL precoz, en concordancia con la mayoría de los trabajos publicados, como el recuento absoluto de linfocitos existente en el día 15 post-trasplante (RL-precoz). Los datos globales obtenidos fueron los siguientes (tabla 66):

Tabla 66. Datos globales de RL precoz.

RAL en el día 15	
Mediana	0,6x10⁹/L
Máximo	1,9 x10 ⁹ /L
Mínimo	0,1 x10 ⁹ /L
Media	0,772 x10⁹/L
DS	0,409 x10⁹/L

Para comprobar si existían diferencias en cuanto a la supervivencia en función de la RL-precoz, se realizó un análisis *Kaplan-Meier*, utilizando diferentes puntos de corte. Los pacientes que poseen un recuento de linfocitos $\geq 0,9 \times 10^9/L$ tienen una SLE significativamente mayor. Igualmente ocurre estableciendo el punto de corte en $\geq 1 \times 10^9/L$. Los resultados obtenidos para los distintos puntos de corte se expresan en la tabla 67:

Tabla 67. χ^2 para “log-rank-test” y P en diferentes puntos de corte de RL precoz para las curvas de Kaplan-Meier de SLE y SG.

ALC-15	SLE		SG	
	χ^2 (log-rank-test)	P	χ^2 (log-rank-test)	P
<0,5 vs $\geq 0,5 \times 10^9/L$	0,602	0,438	0,798	0,372
<0,6 vs $\geq 0,6 \times 10^9/L$	0,082	0,774	0,581	0,446
$\leq 0,6$ vs $>0,6 \times 10^9/L$	1,320	0,251	0,169	0,681
<0,7 vs $\geq 0,7 \times 10^9/L$	2,115	0,146	0,005	0,945
<0,75 vs $\geq 0,75 \times 10^9/L$	1,920	0,166	0,015	0,903
<0,8 vs $\geq 0,8 \times 10^9/L$	1,920	0,166	0,015	0,903
$\leq 0,8$ vs $>0,8 \times 10^9/L$	2,917	0,088	1,117	0,291
<0,9 vs $\geq 0,9 \times 10^9/L$	4,478	0,034	2,614	0,106
<1,0 vs $\geq 1,0 \times 10^9/L$	4,285	0,038	1,585	0,208
<1,2 vs $\geq 1,2 \times 10^9/L$	1,804	0,172	0,552	0,458

Para el análisis multivariante se incluirá el punto de mayor diferencia en el χ^2 en los diferentes puntos de corte analizados para el “long-rank” test en el análisis de *Kaplan-Meier*, en este caso el de $RAL \geq 0,9 \times 10^9/L$.

En cuanto a la SG existen diferencias entre ambos grupos de pacientes, sin embargo, no se alcanzaron diferencias significativas en ninguno de los puntos de corte analizados. A continuación (gráfico 33) se representan las gráficas de supervivencia acumulada según la estimación de *Kaplan-Meier*.

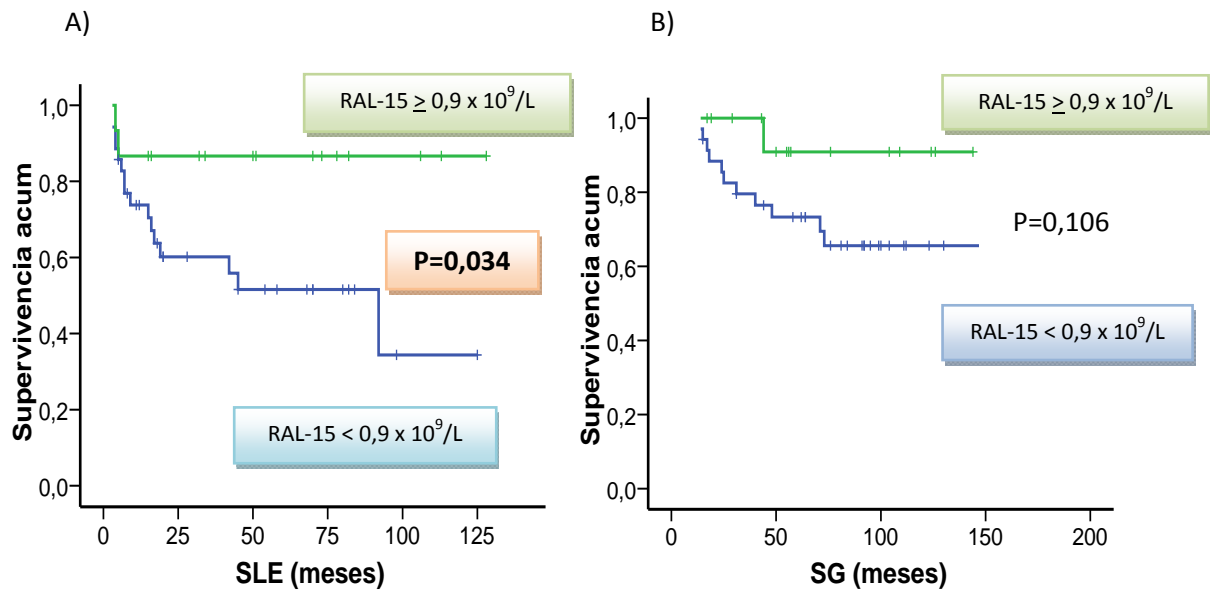


Gráfico 33. A) Curva de SLE en función de la RL-precoz ($\geq 0,9 \times 10^9/L$ vs $< 0,9 \times 10^9/L$), ($p < 0,05$). La media de SLE para el grupo de $\geq 0,9 \times 10^9/L$ fue de 57,1 vs 34,8 meses para el grupo de $< 0,9 \times 10^9/L$ ($p < 0,05$). B) Curva de SG en función de la RL-precoz ($\geq 0,9 \times 10^9/L$ vs $< 0,9 \times 10^9/L$), ($p = 0,106$). Aunque el grupo de $\geq 0,9 \times 10^9/L$ tiene una curva superior de SG, las diferencias no son estadísticamente significativas ($p = 0,106$).

Se comprueba que los pacientes que tienen una RL precoz en el día 15 ($\geq 0,9 \times 10^9/L$), poseen mejor SLE; sin embargo para la SG, aunque existen diferencias en ambas curvas a favor de los que tienen mejor RL precoz ($\geq 0,9 \times 10^9/L$), ésta no llega a ser estadísticamente significativa.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis univariante (sección 3.1, tabla 78), en el que se demuestran deferencias respecto a la SLE (aunque no llegan a ser estadísticamente significativas) pero no en cuanto a la SG.

FACTORES RELACIONADOS CON LA RL PRECOZ.

En apartados previos hemos descrito que la población celular que resulta determinante sobre la supervivencia son las células CD34+ y no los linfocitos que contiene el inóculo. Por

tanto, la RL precoz, si resulta un factor determinante como se describe en la literatura en el efecto injerto contra linfoma y en la supervivencia, debe correlacionarse con la cantidad de células CD34+ infundidas, y no con la de linfocitos. Con el objetivo de contrastar esta hipótesis se desarrolló un estudio de correlación entre las cifras de linfocitos infundidas (totales y de las distintas subpoblaciones de éstos) con el recuento de linfocitos que los pacientes tenían en el día 15 (RL precoz).

No se demostró correlación significativa entre ambas variables, independientemente del recuento celular fuera el que se obtuviera pre-congelación o post-descongelación (tabla 68):

Tabla 68. Correlación entre la cantidad de linfocitos infundidos y la RL precoz.

LINFOCITOS INFUNDIDOS	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
Pre-congelación	0,067	0,642	0,120	0,405
Post-descongelación	-0,034	0,814	-0,049	0,736

El mismo análisis de correlación se efectuó entre las distintas subpoblaciones linfocitarias infundidas y la RL precoz no obteniendo ninguna correlación estadísticamente significativa (no se muestran estos datos).

De la misma manera, siguiendo el mismo esquema que en el caso anterior, se realizó un análisis de correlación entre la cantidad de células CD34+ y la de sus subpoblaciones con la RL precoz (tabla 69). Estos estudios demuestran que la RL precoz se correlaciona con la cantidad de células CD34 infundidas y no con la cantidad de linfocitos infundidos, y en particular con las subpoblaciones minoritarias **CD34+DR-**: CD34+CD133+DR-CD38bajo y CD34+CD133-DR-CD38bajo.

Tabla 69. Índices de correlación entre los distintos subtipos de células CD34+ infundidas y la RL precoz. Las células CD34+DR- tienen una correlación significativa bilateral (Pearson y Spearman) con la RL precoz.

Correlación con RL precoz	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
CD34 Pre-congelación	0,168	0,244	0,189	0,189
CD34 Post-descongelación	0,04	0,781	0,101	0,485
CD34+/CD133+	0,01	0,626	0,100	0,495
CD34+/CD133-	0,084	0,564	-0,82	0,575
CD34+CD133-DR+ CD38++	0,005	0,972	-0,153	0,294
CD34+CD133+DR+ CD38bajo	0,0063	0,665	0,090	0,537
CD34+CD133+DR-CD38bajo	0,415	0,003	0,350	0,014
CD34+CD133-DR- CD38bajo	0,399	0,004	0,281	0,05
CD34+DR- TOTALES	0,428	0,002	0,298	0,036
CD34+CD38+	0,058	0,694	0,068	0,644
CD34+DR+	0,056	0,7	0,087	0,549
CD34+CD38+DR+	0,051	0,727	0,058	0,694

De estos resultados se puede concluir que existe una correlación entre la cantidad de células **CD34+CD133+DR-CD38bajo** y **CD34+CD133-DR-CD38bajo** infundidas, ambas minoritarias en el injerto, y las globales **CD34+DR-** con la RL precoz (que a su vez influye en la SLE). Las gráficas de correlación (gráfico 34) y la ecuación de regresión de la RL precoz en función de las células CD34+DR- infundidas (gráfico 35) se exponen a continuación:

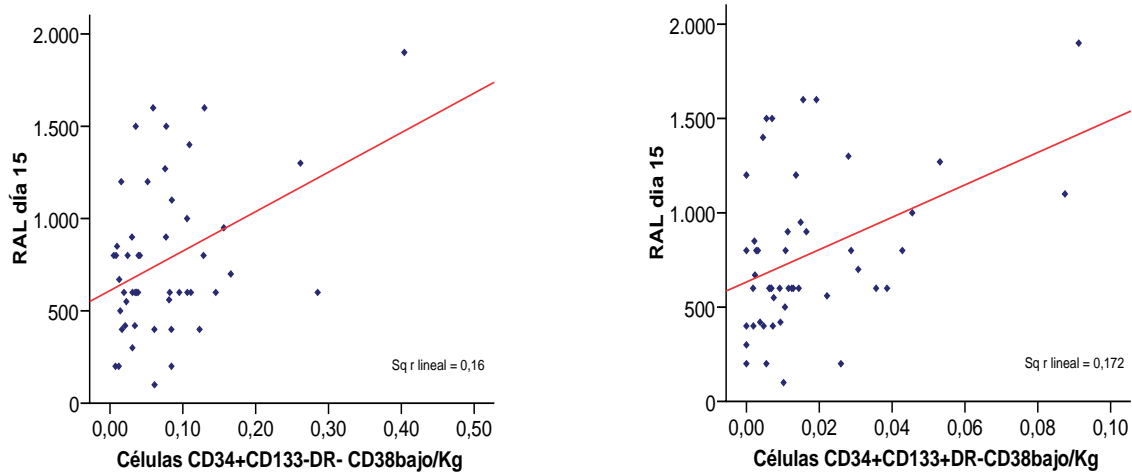


Gráfico 34. Gráfico de correlación entre la cantidad de células **CD34+CD133-DR-CD38bajo** y **CD34+CD133+DR-CD38bajo** infundidas ($\times 10^6/\text{Kg}$) y la RL precoz.

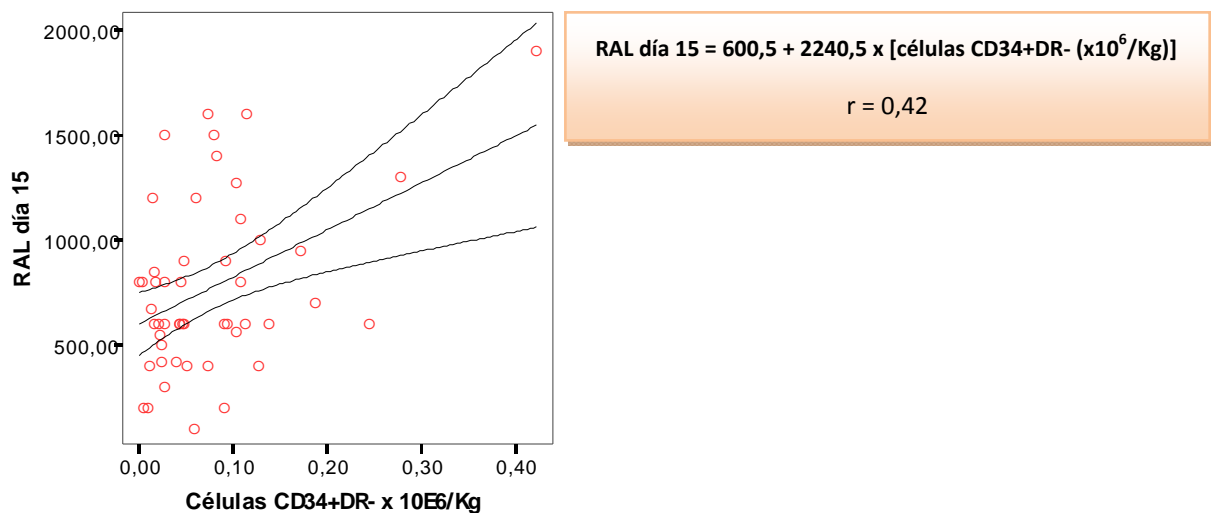


Gráfico 35. Gráfico y ecuación de regresión lineal simple de la las células **CD34+DR-** y la recuperación linfocitaria precoz.

Sin embargo, las células **CD34+CD133+DR+CD38bajo** y las **CD34+CD133-DR+CD38++**, las subpoblaciones mayoritarias en el injerto, no muestran correlación con la RL precoz.

2.2.4. INFLUENCIA DE LA RL TARDÍA.

Se analizó el comportamiento de los linfocitos desde el día 30 hasta el año post-trasplante en relación a la supervivencia.

Los datos se expresan en la siguiente tabla (tabla 70):

Tabla 70. Media, mediana, rango y desviación estándar (DS) del RAL ($\times 10^9/L$) en los días 30, 90, 180 y 365 post-trasplante. Grupos comparando la SG y la SLE (estimación *Kaplan-Meier*): día 30 $<1,3$ vs $\geq 1,3 \times 10^9/L$; día 90 $<1,4$ vs $\geq 1,4 \times 10^9/L$; día 180 $<1,35$ vs $\geq 1,35 \times 10^9/L$; día 365 $<1,8$ vs $\geq 1,8 \times 10^9/L$. NS: diferencias estadísticamente no significativas.

	Día 30	Día 90	Día 180	Día 365
Mediana	1,3	1,4	1,35	1,8
Máximo	3,1	1,5	4	2,9
Mínimo	0,2	0	0,1	0,4
Media	1,42	1,65	1,47	1,64
DS	0,67	1,1	0,9	0,63
SLE	NS	NS	NS	NS
SG	NS	NS	NS	NS

En los días 30, 90, 180 y 365 del trasplante, se establecieron dos grupos en función de la mediana de RAL existente en esos días, y se compararon las curvas de SG y SLE en ambos grupos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (tabla 71):

Tabla 71. Resultados (p) de la comparación de las curvas de SLE y SG según estimación *Kaplan-Meier* en diferentes momentos del primer año post-trasplante en función de la mediana del RAL.

			p		p
RAL DÍA 30	$\geq 1,3$ vs $<1,3 \times 10^9/L$	SLE	0,709	SG	0,974
RAL DÍA 90	$\geq 1,4$ vs $<1,4 \times 10^9/L$	SLE	0,979	SG	0,961
RAL DÍA 180	$\geq 1,35$ vs $<1,35 \times 10^9/L$	SLE	0,697	SG	0,524
RAL DÍA 365	$\geq 1,8$ vs $<1,8 \times 10^9/L$	SLE	0,106	SG	0,423

También se estudiaron otros puntos de corte por inferiores y superiores a la mediana no obteniendo diferencias significativas en las curvas de SLE y SG en ninguno de ellos (datos no mostrados). Por tanto, nuestros datos muestran que tanto la RL al diagnóstico como la RL precoz, ejercen un claro efecto sobre la supervivencia de nuestros pacientes, pero no la RL tardía.

2.3. ESTUDIAR LAS POSIBLES CORRELACIONES DE LOS CULTIVOS CLONOGÉNICOS CON LAS CÉLULAS CD34 Y SUS SUBPOBLACIONES.

Se realizaron cultivos clonogénicos de progenitores hematopoyéticos, tras la descongelación de éstos, para el estudio de progenitores CFU-GM, BFU-E y CFU-Mix como control de calidad de los procesos de aféresis y conservación de los inóculo. Los datos de mediana, media desviación estándar y rango obtenidos fueron los siguientes (tabla 72):

Tabla 72. Media, desviación estándar, mediana y rango de las colonias CFU-Mix, CFU-GM y BFU-E.

	CFU-Mix x 10 ⁵ /Kg	CFU-GM x 10 ⁶ /Kg	BFU-E x 10 ⁵ /Kg
MEDIA	6,5	8,33	5,54
DS	5,97	7,88	7,76
MEDIANA	5,02	6,34	3,31
RANGO	0-31,05	0-34,82	0-40,28

Se efectuó un análisis de correlación de *Spearman* y de *Pearson* entre los resultados obtenidos en los distintos cultivos clonogénicos llevados a cabo y las cifras de las distintas subpoblaciones de CD34+. Los resultados se muestran en las siguientes tablas (tablas 73, 74 y 75).

Tabla 73. Índices de correlación (*Pearson* y *Rho de Spearman*) y nivel de significación (p) entre los progenitores CFU-Mix obtenidos y las distintas subpoblaciones de CD34 estudiadas.

Correlación de CFU-Mix con:	Índice de correlación (<i>Pearson</i>)	P	Rho de <i>Spearman</i>	P
CD34+ pre-congelación	0,153	0,260	-0,028	0,840
CD34+Post-descongelación	-0,111	0,418	-0,102	0,458
CD34+/CD133+	-0,128	0,351	-0,154	0,262
CD34+/CD133-	-0,039	0,776	0,023	0,867
CD34+CD133+DR-CD38bajo	0,042	0,762	0,145	0,292
CD34+CD133+DR+CD38bajo	-0,130	0,345	-0,156	0,256
CD34+ CD133-DR-CD38bajo	0,110	0,425	0,107	0,439
CD34+CD133-DR+CD38++	-0,068	0,621	0,024	0,862
CD34+DR+	-0,122	0,376	-0,114	0,409
CD34+CD38+	-0,126	0,365	-0,103	0,462
CD34+CD38+DR+	-0,129	0,352	-0,102	0,462

Tabla 74. Índices de correlación (*Pearson* y *Rho de Spearman*) y nivel de significación (*p*) entre los progenitores CFU-GM obtenidos y las distintas subpoblaciones de CD34 estudiadas.

Correlación de CFU-GM con:	Índice de correlación (<i>Pearson</i>)	P	Rho de <i>Spearman</i>	P
CD34+ pre-congelación	0,024	0,864	-0,060	0,602
CD34+Post-descongelación	0,275	0,042	-0,013	0,923
CD34+/CD133+	0,288	0,033	-0,024	0,864
CD34+/CD133-	0,166	0,227	0,013	0,925
CD34+CD133+DR-CD38bajo	0,181	0,185	0,278	0,04
CD34+CD133+DR+CD38bajo	0,286	0,034	-0,031	0,823
CD34+ CD133-DR-CD38bajo	0,185	0,008	0,271	0,045
CD34+CD133-DR+CD38++	0,112	0,417	-0,013	0,925
CD34+DR+	0,259	0,056	-0,031	0,822
CD34+CD38+	0,242	0,077	-0,012	0,931
CD34+CD38+DR+	0,233	0,090	-0,014	0,919

Tabla 75. Índices de correlación (*Pearson* y *Rho de Spearman*) y nivel de significación (*p*) entre los progenitores BFU-E obtenidos y las distintas subpoblaciones de CD34 estudiadas.

Correlación de BFU-E con:	Índice de correlación (<i>Pearson</i>)	P	Rho de <i>Spearman</i>	P
CD34+ pre-congelación	-0,119	0,387	-0,036	0,797
CD34+Post-descongelación	-0,015	0,915	0,008	0,953
CD34+/CD133+	-0,023	0,869	-0,047	0,733
CD34+/CD133-	0,009	0,949	0,079	0,567
CD34+CD133+DR-CD38bajo	0,097	0,483	0,217	0,111
CD34+CD133+DR+CD38bajo	-0,025	0,857	-0,055	0,691
CD34+ CD133-DR-CD38bajo	0,267	0,049	0,222	0,103
CD34+CD133-DR+CD38++	-0,047	0,732	0,056	0,683
CD34+DR+	-0,037	0,791	-0,017	0,900
CD34+CD38+	-0,310	0,082	-0,002	0,989
CD34+CD38+DR+	-0,043	0,758	-0,007	0,961

Existe una correlación lineal entre las cifras de progenitores CD34 (cálculo post-descongelación) y los de las colonias CFU-GM obtenidas después de la descongelación; éstas también se correlacionan con las subpoblaciones CD34+/CD133+, CD34+CD133+DR-CD38bajo, CD34+CD133+DR+CD38bajo y CD34+ CD133-DR-CD38bajo; las células CD34+DR+ muestran una correlación que no llega a ser significativa (*p*: 0,056). Las que no muestran ningún tipo de correlación son las CD34+CD133-DR+CD38++, CD34+CD38+ y CD34+CD38+DR+ que corresponden a los subtipos de progenitores más diferenciados.

Para explorar la relación entre las dos variables CD34 post-descongelación y CFU-GM se estimó la recta de regresión mediante un análisis de regresión lineal simple, cuyos resultados se muestran a continuación (gráfico 36) y que evidencian la asociación lineal entre las dos variables; la asociación encontrada es, no obstante, débil debido a que son pocos los pacientes estudiados. No obstante, las CD34 explican el 30% de la variabilidad en las CFU-GM, ($r^2=0,3$).

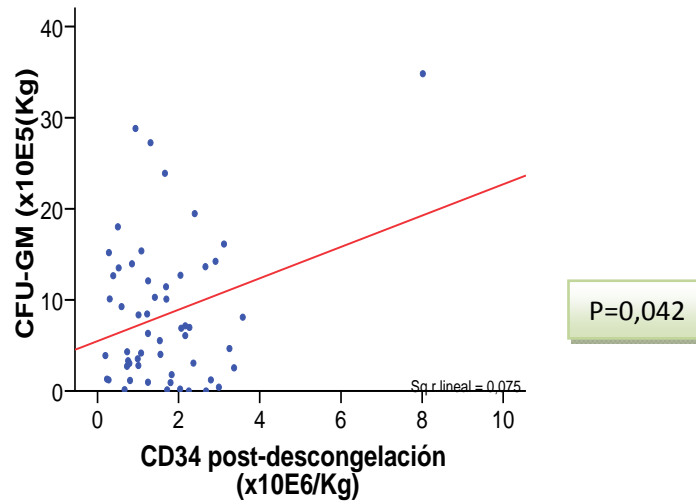


Gráfico 36. Correlación entre las células CD34+ obtenidas post-descongelación y las CFU-GM. Se obtiene una correlación positiva estadísticamente significativa. (Índice de correlación de Pearson 0,275; $p=0,042$).

La ecuación de regresión predictiva obtenida muestra una relación directa:

$$CD34 (x10^6/Kg) = 1,29 + [0,044 \times CFU-GM(x10^5/kg)]$$

Al analizar las distintas colonias entre sí se obtiene una fuerte correlación entre todas ellas (tabla 76; gráficos 37, 38 y 39).

Tabla 76. Índices de correlación (Pearson y Rho de Spearman) y nivel de significación (p) entre los progenitores obtenidos (CFU-Mix, CFU-GM y BFU-E). Todos muestran una alta correlación entre sí.

Correlación de Pearson		CFU-GM	BFU-E
Correlación de Pearson	CFU-Mix	0,612	0,485
Significación (p)		<0,001	<0,001
Correlación de Pearson	CFU-GM		0,731
Significación (p)			<0,001
Correlación de Spearman		CFU-GM	BFU-E
Rho de Spearman	CFU-Mix	0,767	0,655
Significación (p)		<0,001	<0,001
Rho de Spearman	CFU-GM		0,774
Significación (p)			<0,001

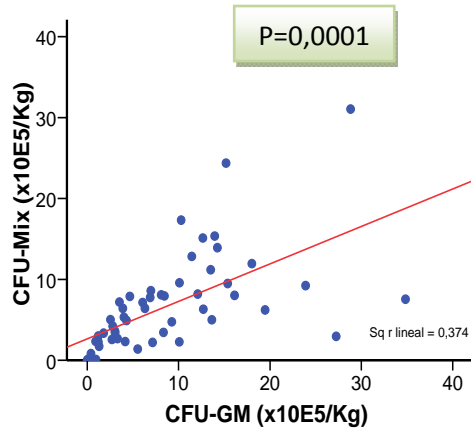


Gráfico 37. Gráfico que compara las CFU-GM obtenidas con las CFU-Mix. Se obtiene una fuerte correlación positiva estadísticamente significativa. (Índice de correlación de *Pearson* 0,612; $p=0,0001$. Rho de Spearman 0,767; $p=0,0001$).

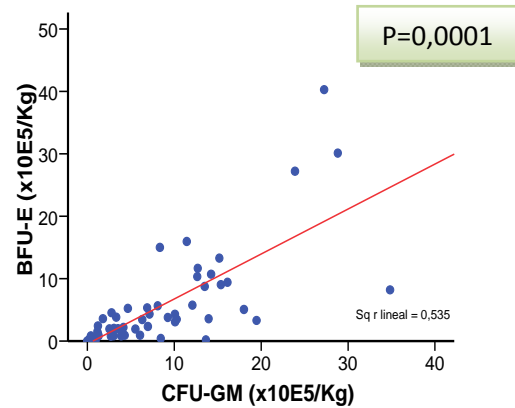


Gráfico 38. Gráfico que compara las CFU-GM obtenidas con las BFU-E. Se obtiene una fuerte correlación positiva estadísticamente significativa. (Índice de correlación de *Pearson* 0,731; $p=0,0001$. Rho de Spearman 0,774; $p=0,0001$).

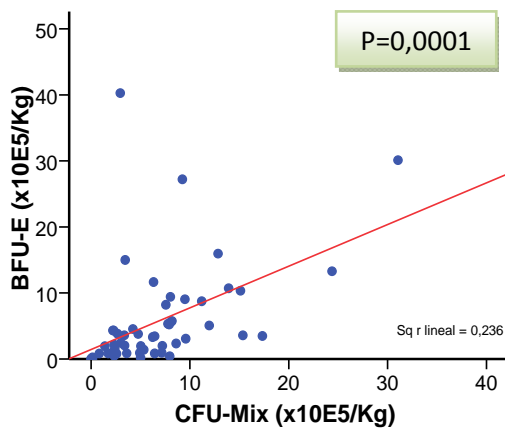


Gráfico 39. Gráfico que compara las CFU-Mix obtenidas con las BFU-E. Se obtiene una fuerte correlación positiva estadísticamente significativa. (Índice de correlación de *Pearson* 0,485; $p=0,0001$. Rho de Spearman 0,655; $p=0,0001$).

3. ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS.

3.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE.

Hasta ahora se ha estudiado el impacto sobre la supervivencia de las distintas subpoblaciones obtenidas tras la descongelación de los criotubos control, y que reflejan la composición celular de producto infundido a los pacientes.

Nuestros resultados muestran que las cifras de células CD34+ y de sus subpoblaciones CD34+DR+, CD34+CD38+, CD34+CD38+DR+, CD34+CD133+, CD34+CD133+DR+CD38++ y CD34+CD133-DR+CD38-/+ tienen impacto sobre la supervivencia. Sin embargo, ninguno de los subtipos de linfocitos estudiados parecen tener impacto sobre la supervivencia según la estimación *Kaplan-Meier*. No obstante, es importante determinar la importancia de éstas células en el contexto de otros factores pronósticos clásicos descritos en los pacientes con linfoma, y determinar si se comportan como factores pronósticos independientes. Para ello se efectuó un análisis univariante que incluyó factores pronósticos clásicos y posteriormente se determinó en un análisis multivariante el impacto de las células CD34 y sus subtipos.

En el análisis univariante se incluyeron factores o variables pronosticas clásicas conocidas, en el momento del diagnóstico y en el momento del trasplante, y se estudió si se asociaban con una mayor SG y/o SLE.

El método estadístico empleado fue la prueba *T-Student* para muestras independientes. Para ello se realizó previamente el test de *Kolmogorov-Smirnov* para comprobar si tanto la SG como la SLE seguían una distribución normal; dado que los valores de SLE no seguían una distribución normal, se realizó la transformación logarítmica de la SLE (tabla 77).

Tabla 77. Distribución normal de la SLE tras la transformación logarítmica (*Z de Kolmogorov-Smirnov*).

	SG	SLE	Log SLE
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,688	1,476	0,915
p	0,732	0,026	0,373

A continuación se realizó la prueba *T-Student* para muestras independientes comparando la SG y la SLE en dos distribuciones independientes según se expone en la siguiente tabla (tabla 78). Los objetivos de este análisis son determinar que variables son

significativamente predictivas de mejor SLE o SG. Los resultados se muestran en la tabla 78:

Tabla 78. Análisis univariante de diversas variables al diagnóstico y en el momento del trasplante. RAL: recuento absoluto de linfocitos. RAN: recuento absoluto de neutrófilos.

VARIABLES ANALIZADAS	SG (P)	SLE (P)
Edad al diagnóstico ≥ 60 vs < 60 años	0,042	0,239
Edad al trasplante ≥ 60 vs < 60 años	0,533	0,702
Edad al trasplante ≥ 50 vs < 50 años	0,129	0,443
Sexo varón vs mujer	0,776	0,019
RAL al diagnóstico $\geq 0,5 \times 10^9$ vs $< 0,5 \times 10^9$ /L	0,082	0,000
RAL al diagnóstico $\geq 0,75 \times 10^9$ vs $< 0,75 \times 10^9$ /L	0,060	0,001
RAL día-15 $\geq 0,5 \times 10^9$ vs $< 0,5 \times 10^9$ /L	0,856	0,845
RAL día-15 $\geq 0,75 \times 10^9$ vs $< 0,75 \times 10^9$ /L	0,078	0,974
RAL día-15 $\geq 0,9$ vs $< 0,9 \times 10^9$ /L	0,076	0,795
RAL día-15 $\geq 1 \times 10^9$ vs $< 1 \times 10^9$ /L	0,411	0,129
RAL día-15 $\geq 1,5 \times 10^9$ vs $< 1,5 \times 10^9$ /L	0,674	0,517
RAL día-30 $\geq 1 \times 10^9$ vs $< 1 \times 10^9$ /L	0,871	0,977
RAL día-30 $\geq 1,5 \times 10^9$ vs $< 1,5 \times 10^9$ /L	0,296	0,819
Linfocitos infundidos $\geq 300 \times 10^6$ vs $< 300 \times 10^6$ /Kg (cálculo antes de congelación)	0,209	0,939
Linfocitos infundidos $\geq 500 \times 10^6$ vs $< 500 \times 10^6$ /Kg (cálculo antes de congelación)	0,107	0,219
Linfocitos infundidos $\geq 241 \times 10^6$ vs $< 241 \times 10^6$ /Kg (cálculo antes de congelación)	0,439	0,728
Linfocitos infundidos $\geq 195 \times 10^6$ vs $< 195 \times 10^6$ /Kg (cálculo después descongelación)	0,941	0,883
Linfocitos infundidos $\geq 500 \times 10^6$ vs $< 500 \times 10^6$ /Kg (cálculo después descongelación)	0,538	0,153
Linfocitos infundidos $\geq 137 \times 10^6$ vs $< 137 \times 10^6$ /Kg (cálculo después descongelación)	0,805	0,911
Estadio precoz (I, II) vs estadio avanzado (III,IV)	0,595	0,587
Performance Status (ECOG) ≥ 2 vs < 2	0,062	0,293
Hemoglobina ≥ 120 vs < 120 gr/L	0,534	0,830
IPI bajo o intermedio-bajo vs intermedio-alto o alto	0,991	0,581
LDH ≥ 450 vs < 450 U/L	0,851	0,779
Líneas de inducción pretrasplante ≥ 3 vs ≤ 2	0,995	0,483
Radioterapia pretrasplante SI vs NO	0,848	0,430
Rituximab pretrasplante SI vs NO	0,220	0,627
Sitios nodales > 4 vs ≤ 4	0,09	0,230
Sitios extranodales ≥ 2 vs < 2	0,992	0,630
Estatus pretrasplante RC vs no RC	0,020	0,037
Estatus post-trasplante RC vs no RC	0,014	0,004
Afectación esplénica SI vs NO	0,755	0,828
β_2 -microglobulina ≥ 2800 vs < 2800 μ gr/ml	0,690	0,624
Masa Bulky SI vs NO	0,635	0,314
Día trasplante con RAN $\geq 0,5$ /L, \leq día 11 vs $>$ día 11	0,833	0,527
Día trasplante con RAN ≥ 1 /L, \leq día 12 vs $>$ día 12	0,204	0,096
Día trasplante con plaquetas $\geq 20 \times 10^9$ /L, \leq día 12 vs $>$ día 12	0,785	0,817
Día trasplante con plaquetas $\geq 50 \times 10^9$ /L, \leq día 17 vs $>$ día 17	0,815	0,133
CD34 infundidas ≥ 4 vs $< 4 \times 10^6$ /Kg	0,682	0,402
CFU-GM infundidas $\geq 8,33$ vs $< 8,33 \times 10^8$ /Kg	0,191	0,096
BFU-E infundidas $\geq 5,54$ vs $< 5,54 \times 10^5$ /Kg	0,895	0,873
CFU-Mix infundidas ≥ 6 vs $< 6 \times 10^5$ /Kg	0,100	0,283

En resumen, se obtienen como variables predictivas de SG y de SLE las mostradas en la tabla 79:

Tabla 79. Variables al diagnóstico y en el momento del trasplante predictivas de aumento de la supervivencia en el análisis univariante.

Variables predictivas de SG	Variables predictivas de SLE
Edad al diagnóstico ≥ 60 vs < 60 años.	La edad no es significativa para SLE
El sexo no es significativo para SG	SEXO varón vs mujer
El RAL al diagnóstico no es significativo para SG	RAL al diagnóstico $\geq 0,5 \times 10^9$ vs $< 0,5 \times 10^9$/L
Estatus pretrasplante RC vs no RC	Estatus pretrasplante RC vs no RC
Estatus post-trasplante RC vs no RC	Estatus post-trasplante RC vs no RC

Las variables que se asocian significativamente con tanto una mayor SG como una mayor SLE son el estar en situación de RC en el pre y en el post-trasplante. Con una mayor SLE se asocia el sexo femenino, el tener un RAL al diagnóstico $\geq 0,5 \times 10^9$ /L y con una mayor SG el tener una edad al diagnóstico menor de 60 años. En la siguiente tabla se muestran las medias de los meses de supervivencia comparando ambos grupos:

Tabla 80. Variables al diagnóstico y en el momento del trasplante predictivas de aumento de la supervivencia en el análisis univariante. Medias de meses de supervivencia (hasta Agosto de 2008) en ambos grupos comparados.

Variables para SG	Media de meses de SG			
Edad al diagnóstico	< 60 años	78,8	≥ 60 años	56,1
Estatus pre-trasplante	RC	85,2	No RC	55,6
Estatus post-trasplante en RC	RC	81	No RC	37,3
Variables para SLE	Media de meses de SLE			
Sexo	Hombre	35,1	Mujer	60,5
Estatus pre-trasplante	RC	51,8	No RC	29
Estatus post-trasplante en RC	RC	49,3	No RC	10,5
RAL al diagnóstico	$\geq 0,5 \times 10^9$/L	51,5	$< 0,5 \times 10^9$/L	5
	$\geq 0,75 \times 10^9$/L	54	$\geq 0,75 \times 10^9$/L	18,6

Es importante destacar que también se obtienen diferencias en los meses de supervivencia global en función del RAL al diagnóstico (los pacientes con RAL de linfocitos al diagnóstico $\geq 0,5 \times 10^9$ /L tienen una SG de 80 vs 40,5 meses, al igual que los que tienen un RAL $\geq 0,75 \times 10^9$ /L (82 vs 52,3 meses), aunque las diferencias en este análisis no llegan a ser significativas para la SG.

A continuación se representan gráficamente en diagramas de cajas las variables que se han obtenido diferencias significativas. La línea interna de cada caja representa la mediana mientras que la línea imaginaria que divide a cada caja por la mitad representa la media de cada grupo (gráfico 40).

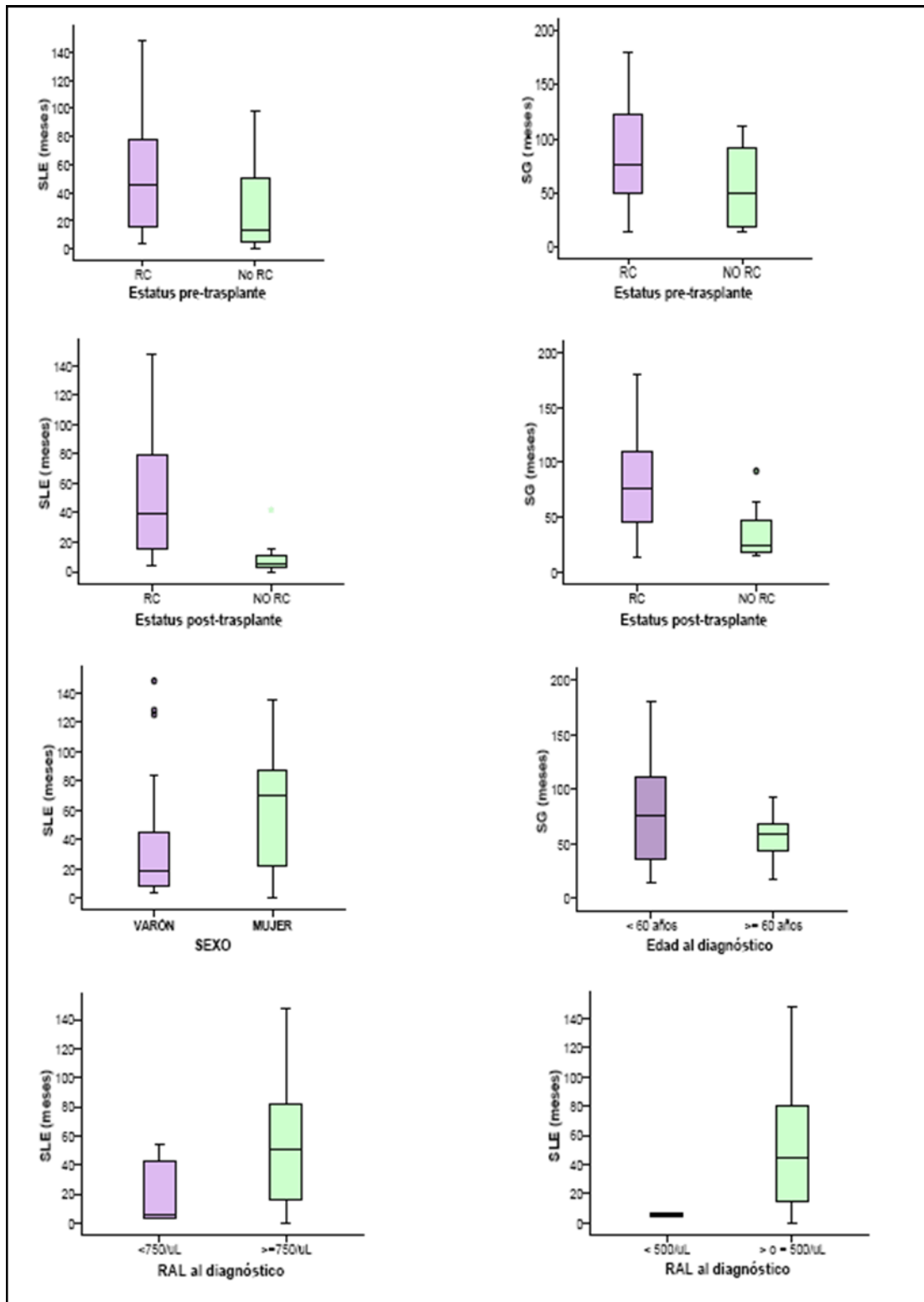


Gráfico 40. Gráficos de cajas que muestran las diferencias de supervivencia de las variables significativas. La línea interior de la caja representa la mediana de supervivencia (Q2), el límite inferior de la caja el Q1 (25%) y el superior el Q3 (75%).

3.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

El análisis multivariante se realizó según el modelo proporcional de Cox o análisis de regresión de Cox. La regresión de Cox consiste en obtener una función lineal de las variables independientes que permita estimar, en función del tiempo, la probabilidad de que ocurra dicho suceso, es decir, cuando la variable dependiente esté relacionada con la supervivencia de un grupo de sujetos o, en general, con el tiempo que transcurre hasta que se produce en ellos un suceso o evento.

La finalidad de este análisis es valorar simultáneamente el efecto independiente de una serie de variables explicativas o factores pronósticos sobre la supervivencia, determinaremos así que variables se comportan como factores pronósticos independientes y podremos cuantificar su riesgo.

Las variables que incluiremos en la regresión de Cox son las que han demostrado beneficio en la supervivencia de los pacientes en el análisis de *Kaplan-Meier* y en el análisis univariante.

En la tabla 81 se muestran las variables que han sido incluidas en el análisis multivariante:

Tabla 81. Variables incluidas en el análisis multivariante.

VARIABLES ANALIZADAS PARA S.L.E.	VARIABLES ANALIZADAS PARA S.G.
RAL al diagnóstico $\geq 0,75$ vs $< 0,750/L$	RAL al diagnóstico $\geq 0,75$ vs $< 0,750/L$
RAL-15 $\geq 0,9$ vs $< 0,9/L$	
	Edad al diagnóstico ≥ 60 vs < 60 años
Sexo	
Tratamiento previo con rituximab	Tratamiento previo con rituximab
Estatus pretrasplante RC vs no RC	Estatus pretrasplante RC vs no RC
Estatus post-trasplante RC vs no RC	Estatus post-trasplante RC vs no RC
CD34+ totales (post-desc.) $\geq 1,5$ vs $< 1,5 \times 10^6/Kg$	CD34+ totales (post-desc.) ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$
CD34+CD133+DR+CD38bajo $\geq 0,5$ vs $< 0,5 \times 10^6/Kg$	CD34+CD133+DR+CD38bajo $\geq 0,5$ vs $< 0,5 \times 10^6/Kg$
CD34+CD133+DR+CD38bajo $\geq 0,95$ vs $< 0,95 \times 10^6/Kg$	CD34+CD133+DR+CD38bajo $\geq 0,95$ vs $< 0,95 \times 10^6/Kg$
CD34+CD133-DR+CD38++ $\geq 0,3$ VS $< 0,3 \times 10^6/Kg$	CD34+CD133-DR+CD38++ $\geq 0,3$ VS $< 0,3 \times 10^6/Kg$
CD34+CD133+ $\geq 0,6$ VS $< 0,6 \times 10^6/Kg$	CD34+CD133+ $\geq 0,6$ VS $< 0,6 \times 10^6/Kg$
CD34+DR+ ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$	CD34+DR+ ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$
CD34+CD38+ ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$	CD34+CD38+ ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$
CD34+CD38+DR+ ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$	CD34+CD38+DR+ ≥ 1 vs $< 1 \times 10^6/Kg$

Los resultados obtenidos se exponen en la siguiente tabla (tabla 82):

Tabla 82. Análisis multivariante. Variables pronósticas independientes obtenidas.

Regresión de Cox.	S.L.E.			S.G.		
	Hazard ratio	I.C. 95% para Hazard ratio	P	Hazard ratio	I.C. 95% para Hazard ratio	P
CD34+CD133+DR+CD38bajo $\geq 0,95 \times 10^6$ /Kg	7,5 ($\beta=2,02$)	1,4-39,3	0,016	15,4 ($\beta=2,73$)	1,8-132,6	0,013
RITUXIMAB	9,7 ($\beta=2,27$)	1,2-80	0,034	8 ($\beta=2,08$)	0,9-67,4	0,056

Así pues obtenemos como variables pronósticas independientes el haber recibido una cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo $\geq 0,95 \times 10^6$ /Kg y el haber recibido rituximab pretrasplante.

Estos resultados indican que los pacientes que reciben un inóculo con una cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo mayor o igual de $0,95 \times 10^6$ /Kg el intervalo diagnóstico-recaída y diagnóstico-muerte es menor, es decir, la tasa de recaída/progresión y muerte es 7,5 y 15 veces mayor respectivamente.

En el caso del rituximab, los pacientes que no recibieron rituximab pretrasplante tienen una tasa de recaída/progresión 9,7 veces superior a los que lo recibieron. Para la SG sin embargo, el Hazard Ratio resulta no ser significativo ($p=0,056$), y por ello el intervalo de confianza incluye el 1 (0,9-67,4).

Mediante la regresión de Cox, a partir de la función Z, podemos estimar la probabilidad de que un suceso final no ocurra hasta pasado un período de tiempo.

Podemos construir las ecuaciones de regresión a partir de las variables obtenidas:

Para la SLE:

$$Z(X) = 2,02 \times (CD34+CD133+DR+CD38bajo) + 2,27 \times (RITUXIMAB)$$

$$G(X) = e^{2,02} \times (CD34+CD133+DR+CD38 bajo) + e^{2,27} \times (RITUXIMAB)$$

$$G(X) = 7,5 \times (CD34+CD133+DR+CD38 bajo) + 9,7 \times (RITUXIMAB)$$

Para la SG:

$$Z(X) = 2,73 \times (CD34+CD133+DR+CD38 bajo) + 2,08 \times (RITUXIMAB)$$

$$G(X) = e^{2,73} \times (CD34+CD133+DR+CD38 bajo) + e^{2,08} \times (RITUXIMAB)$$

$$G(X) = 15,4 \times (CD34+CD133+DR+CD38 bajo) + 8 \times (RITUXIMAB)$$

Si $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo} \geq 0,95 \times 10^6/Kg = 0$
 Si $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo} < 0,95 \times 10^6/Kg = 1$
 Si rituximab=1
 Si no rituximab=0

Es decir, un paciente que haya recibido $0,95 \times 10^6$ células $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$ por Kg o más, y que se ha tratado con Rituximab, tiene un riesgo 17 veces mayor de no recaer o progresar su linfoma:

$$G(1) = 7,5 + 9,7 = 17,2 \text{ veces superior de no recaer,}$$

En otras palabras, la probabilidad de recaer se reduce de forma importante tanto si el paciente recibe más de $0,95 \times 10^6/Kg$ células $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$, como si ha recibido previamente rituximab pretrasplante.

En cuanto a la RL precoz, que demostró tener influencia significativa sobre la SLE tanto en el análisis de *Kaplan-Meier* como en el univariante, pierde su significación en el análisis multivariante. La población celular determinante sobre la supervivencia son las células $CD34+$, especialmente las células $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$ y no los linfocitos y, por tanto, la RL precoz dependería de la cantidad de éstas infundida.

De hecho, los estudios de correlación demuestran que la RL precoz se correlaciona con la cantidad de células $CD34$ infundidas y no con la cantidad de linfocitos infundidos.

3.2.1 FACTORES ASOCIADOS CON MAYOR RECOLECCIÓN DE CÉLULAS $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$.

Una vez efectuado el análisis multivariante nuestros datos muestran que las células $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$ son el único factor pronóstico independiente para la SLE y para la SG dependientes del injerto.

A continuación, investigaremos que factores se correlacionan con una mejor colecta de estas células para, en el proceso de aféresis, optimizar la recolección de los progenitores adecuados y mejorar la calidad de los productos recolectados en cuanto al contenido de células $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$. En la siguiente tabla (tabla 83) mostramos los resultados del análisis de correlación. Existe una fuerte correlación entre las dos subpoblaciones de células $CD34$, tanto con las $CD34$ obtenidas precongelación como post-descongelación con la cantidad de células $CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}$ recolectadas. Esta

correlación es más fuerte con las CD34 obtenidas tras la descongelación. También existe correlación con las colonias obtenidas de CFU-GM.

Tabla 83. Correlación entre la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo recolectadas con la cantidad de células CD34+, CMN y CFU-GM.

Correlación con CD34+	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
Pre-congelación	0,298	0,027	0,420	0,001
Post-descongelación	0,968	<0,001	0,937	<0,001
Correlación con CMN	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
Pre-congelación	-0,158	0,250	-0,102	0,458
Post-descongelación	-0,061	0,659	0,045	0,744
Correlación con CFU-GM	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
Post-descongelación	0,286	0,034	-0,031	0,823

No existe correlación, sin embargo, con las CMN totales pero hay que tener en cuenta que si existe con las CD34 a nivel de precongelación (tabla 84):

Tabla 84. Correlación entre las CMN en el momento de la aféresis y la cantidad de células CD34+ totales recolectados. La correlación es significativa con los datos obtenidos pre-congelación.

CMN	Índice de correlación (Pearson)	P	Rho de Spearman	P
CD34+ Pre-congelación	-0,355	0,004	-0,423	0,001
CD34+ Post-descongelación	-0,022	0,875	0,042	0,763

Una vez obtenidos los parámetros que se correlacionan y que nos pueden ser útiles en la aféresis, realizamos un análisis de regresión lineal simple y calculamos la ecuación de regresión.

1. Células CD34+ obtenidas antes de la congelación.

Hemos comprobado que existe una correlación significativa entre las células CD34+ antes de la congelación con la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo recolectadas (tabla 80):

La ecuación de regresión obtenida es:

Células CD34+CD133+DR+CD38bajo=0,53 + 0,16xCD34 precongelación

con $r^2=0,09$ ($r=0,3$), con una p asociada al contraste de correlación de 0,027 y con un intervalo de predicción de la media al 95% (gráfico 41).

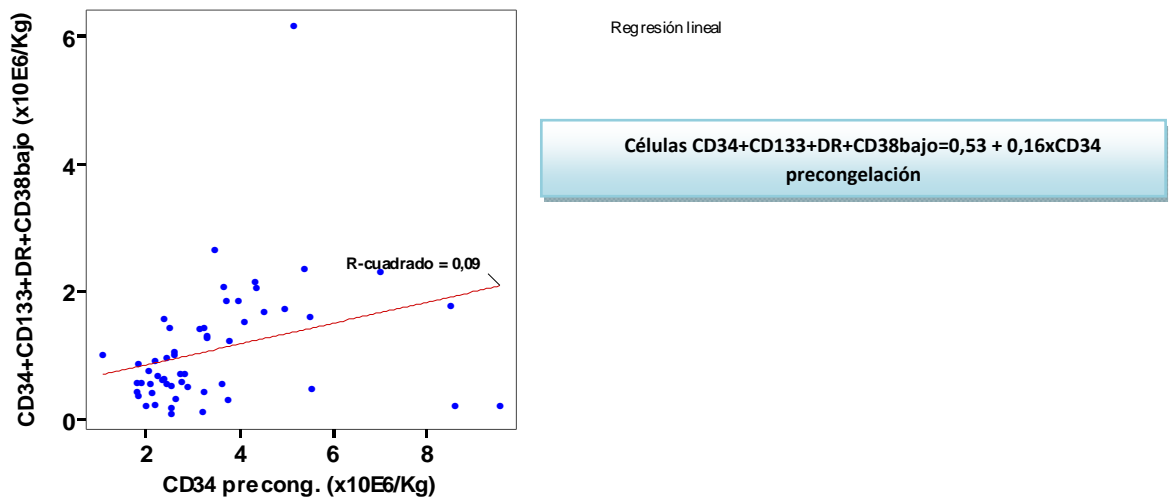


Gráfico 41. Recta de regresión lineal simple de la las células CD34+CD133+DR+CD38bajo y las células CD34 (precongelación).

Con estos datos podemos concluir:

1. Las dos variables están asociadas linealmente (aunque también existe correlación de tipo no lineal) y asociadas a una significación estadística en el contraste de correlación en nuestra población.
2. Sin embargo, la relación encontrada es moderada ($r=0,3$), es decir, las células CD34 precongelación sólo explican el 9% ($r^2=0,09$) de la variabilidad de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo analizadas antes de congelar la muestra.
3. La relación es directa, aumentando $0,16 \times 10^6$ /Kg las células CD34+CD133+DR+CD38bajo, por cada aumento de 1×10^6 /Kg las CD34.

2. Células CD34+ obtenidas después de descongelar.

Sin embargo, el grado de correlación es superior con la cantidad de células CD34+ obtenidas tras la descongelación del producto (tabla 83).

La ecuación de regresión obtenida es:

Células CD34+CD133+DR+CD38bajo=-0,14 + 0,308xCD34 post-descongelación

con $r^2=0,94$ ($r=0,97$), con una p asociada al contraste de correlación menor de 0,001 y con un intervalo de predicción de la media al 95% (gráfico 42).

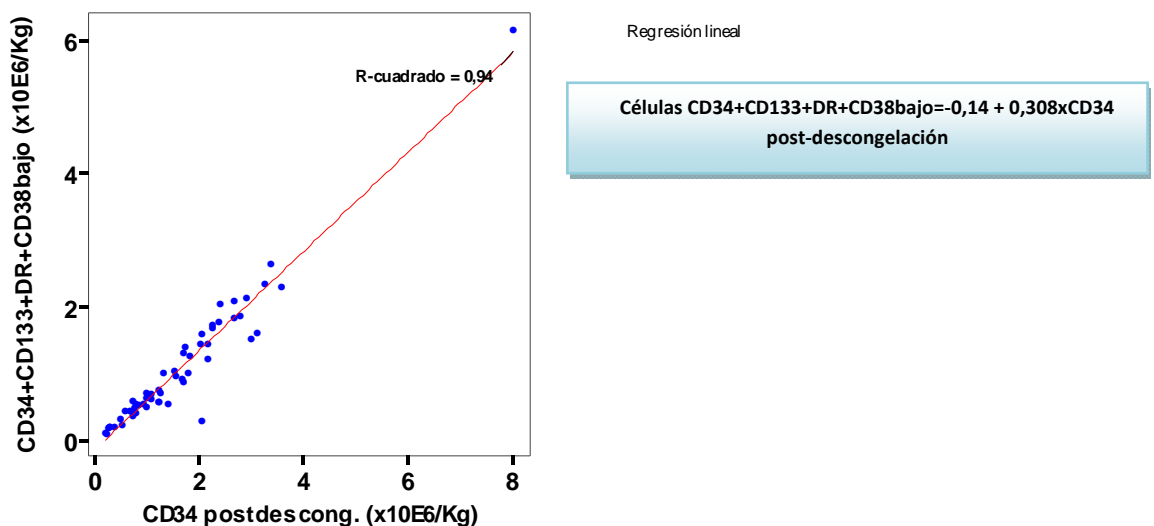


Gráfico 42. Recta de regresión lineal simple de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo y las células CD34 (post-descongelación).

Con estos datos podemos concluir:

1. Las dos variables están asociadas linealmente (aunque también existe correlación de tipo no lineal) y asociadas a una significación estadística en el contraste de correlación en nuestra población.
2. La relación encontrada es muy fuerte ($r=0,96$), es decir, las células CD34 post-congelación explican el 96% ($r^2=0,94$) de la variabilidad de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo analizadas tras descongelar la muestra.
3. La relación es directa, aumentando $0,308 \times 10^6$ /Kg las células CD34+CD133+DR+CD38bajo, por cada aumento de 1×10^6 /Kg las CD34.

Si el punto de corte de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo en el análisis de *Kaplan-Meier* lo establecimos en $0,95 \times 10^6/\text{Kg}$ (mayor χ^2 , *log-rank-test*), deberíamos obtener más de $2,62 \times 10^6/\text{Kg}$ e infundir más de $1,47 \times 10^6/\text{Kg}$ de células CD34 en nuestros pacientes para asegurar mayor supervivencia (SLE y SG).

A continuación se representa mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) la alta capacidad de discriminación que poseen las células CD34 (post-descongelación) y no tanto de las células CD34 precongelación sobre la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo obtenidas:

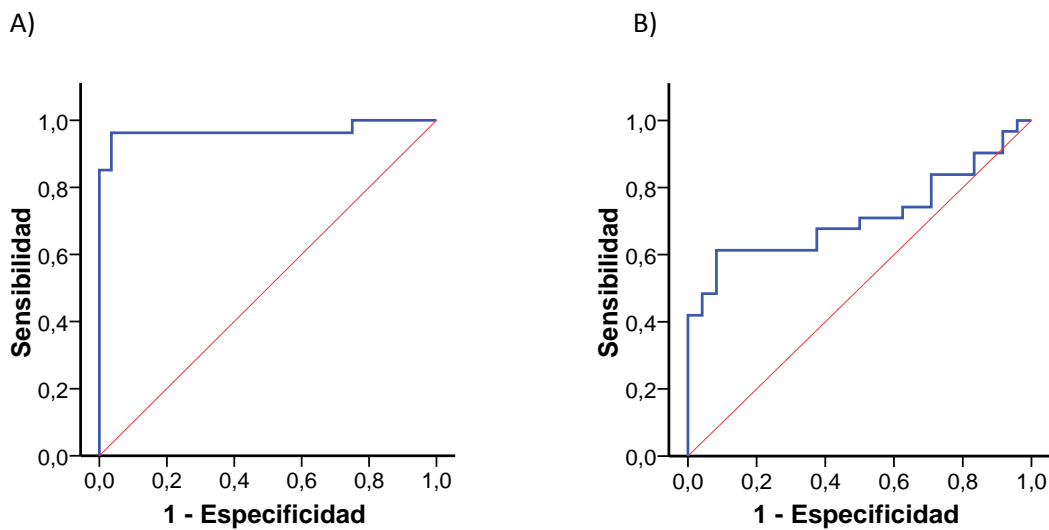


Gráfico 43. Curvas ROC de estimación de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo en función de A) CD34 post-descongelación $>1,5 \times 10^6/\text{Kg}$ (área bajo la curva 0,968) y B) en función de CD34 precongelación $\geq 2,6 \times 10^6/\text{Kg}$ (área bajo la curva 0,714).

3. CMN.

Las CMN, otro parámetro de control de la aféresis, no muestran correlación con las células CD34+CD133+DR+CD38bajo (tabla 83). Sin embargo, sí existe una excelente correlación entre las CMN pre-congelación y las CD34 recolectadas (tabla 84). Esta correlación, sin embargo, se pierde con la descongelación debido a la pérdida celular y sólo es posible tenerla en cuenta con las células CD34+ antes de la congelación. La correlación es lineal y negativa, es decir, cuanto mayor cantidad de CMN tengamos menor cantidad de CD34 obtendremos.

Si hemos demostrado una asociación entre las CD34+ y la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo, y hemos determinado un dintel celular de CD34+ precongelación para asegurar una adecuada colecta de células CD34+CD133+DR+CD38bajo,

es posible determinar, mediante un dintel de CMN pre congelación capaz de discriminar una adecuada colecta de CD34+.

La ecuación de regresión obtenida es (gráfico 41):

Células CD34+ pre congelación = 4,29 – 0,14 x CMN pre congelación

con $r^2=0,35$ ($r=0,125$), con una p asociada al contraste de correlación de 0,004 y con un intervalo de predicción de la media al 95%.

Con estos datos podemos concluir:

1. Las dos variables están asociadas linealmente (aunque también existe correlación de tipo no lineal) y asociadas a una significación estadística en el contraste de correlación en nuestra población.
2. Sin embargo, la relación encontrada es moderada ($r=0,355$), es decir, las CMN pre congelación sólo explican el 35,5 % ($r^2=0,126$) de la variabilidad de las células CD34+ obtenidas antes de congelar la muestra.
3. La relación es directa e inversa, por cada aumento de 1×10^6 /Kg de células CD34, las CMN disminuyen 14×10^6 /Kg.

Según este análisis, para obtener más de $2,62 \times 10^6$ /Kg de células CD34 en nuestros pacientes (ya hemos demostrado mayor SLE y SG), deberíamos obtener una cantidad de CMN inferior a $11,92 \times 10^8$ /Kg.

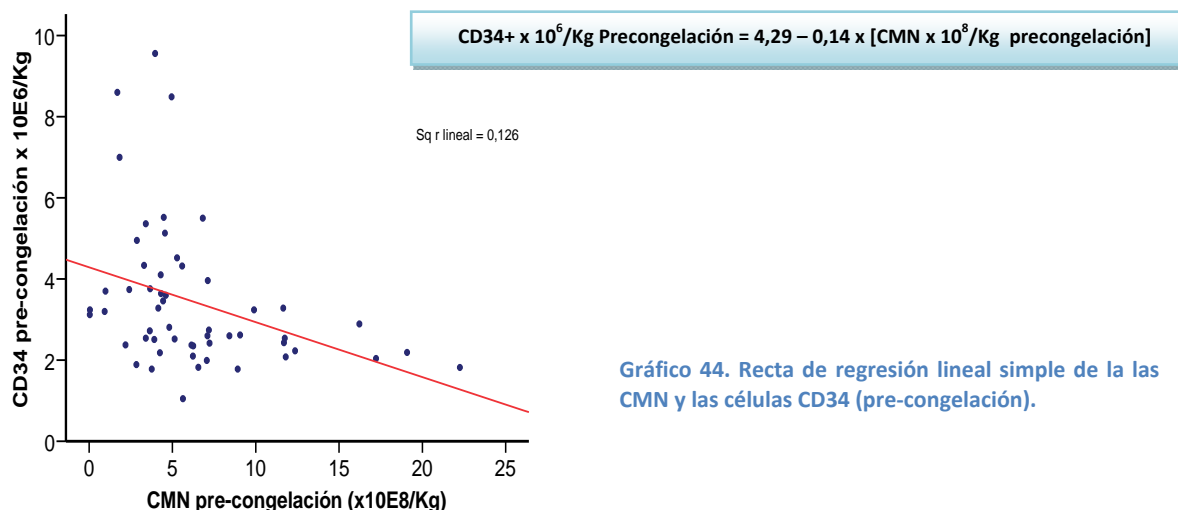


Gráfico 44. Recta de regresión lineal simple de la las CMN y las células CD34 (pre-congelación).

No encontramos una explicación para esta correlación negativa con las CMN obtenidas pre congelación; probablemente influya el hecho de haber un mayor contenido de mielocitos y células precursoras que se pierden durante la congelación y descongelación del producto.

4. CFU-GM obtenidas después de la descongelación.

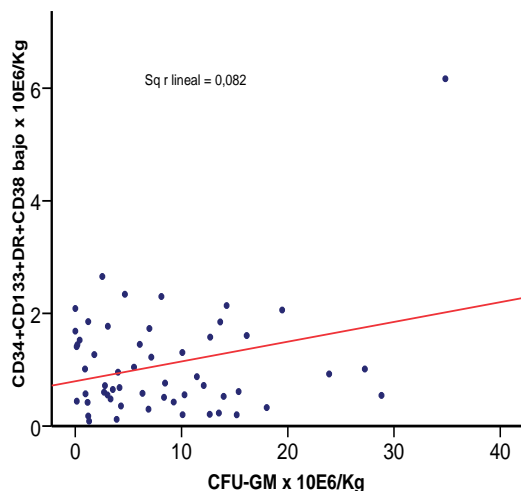
Ya hemos descrito la correlación existente entre las colonias de progenitores del tipo CFU-GM con las células CD34+ postdescongelación y las células CD34+CD133+DR+CD38bajo (tablas 74 y 83)

Se efectuó un análisis de regresión lineal simple entre la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo y las cantidad de CFU-GM obtenida (gráfico 45).

La ecuación de regresión obtenida es:

Células CD34+CD133+DR+CD38bajo = 0,8 + 0,04 x CFU-GM ($\times 10^6$ /Kg)

con $r^2=0,28$ ($r=0,082$), con una p asociada al contraste de correlación de 0,042 y con un intervalo de predicción de la media al 95%.



Células CD34+CD133+DR+CD38bajo=0,8 + 0,04x CFU-GM

Gráfico 45. Recta de regresión lineal simple de las CFU-GM y las células CD34+CD133+DR+CD38bajo.

Con estos datos podemos concluir:

1. Las dos variables están asociadas linealmente y asociadas a una significación estadística en el contraste de correlación en nuestra población.
2. Sin embargo, la relación encontrada es moderada ($r=0,28$), es decir, las CFU-GM sólo explican el 28% ($r^2=0,082$) de la variabilidad de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo obtenidas tras descongelar la muestra.
3. La relación es directa, aumentando $0,04 \times 10^6$ /Kg las células CD34+CD133+DR+CD38bajo, por cada aumento de 1×10^6 /Kg las CFU-GM.

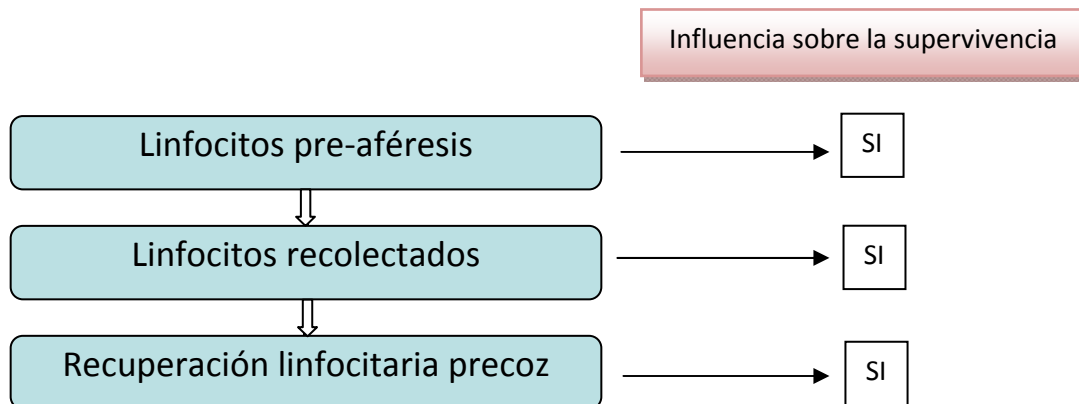
Según este análisis, para obtener más de $0,95 \times 10^6$ /Kg de células CD34+CD133+DR+CD38 bajo en nuestros pacientes, deberíamos obtener una cantidad de CFU-GM mayor de **$3,75 \times 10^6$ /Kg**.

DISCUSIÓN

El sistema inmunitario del huésped juega un papel importante en el pronóstico de los pacientes con linfomas. Con la introducción de la inmunoterapia en el tratamiento de los linfomas, el estudio del estatus inmune del huésped ha adquirido gran importancia.

Como se ha mencionado, múltiples trabajos han puesto de manifiesto este efecto en dos momentos de la enfermedad, en base a la influencia ejercida por el RAL en distintos momentos de la enfermedad: al diagnóstico [201-205] y tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos en la fase de recuperación hematológica, es decir, en relación a la recuperación linfocitaria precoz [147, 148, 151, 158, 159, 161-166], (tabla 10).

Clásicamente, el beneficio del trasplante autólogo se debe exclusivamente a las altas dosis de quimioterapia. Sin embargo, estos trabajos atribuyen un papel importante a un posible efecto *“injerto contra tumor”* del injerto autólogo. Los trabajos que describen la existencia de dicho efecto [147, 148, 151, 158, 159, 161-166] demuestran que los pacientes con una RL precoz tienen mayor supervivencia y se comporta como una variable pronóstica independiente. Sin embargo, cuando se estudia la influencia el papel de la cantidad de linfocitos maduros infundida, se observa que los pacientes con RL precoz son los que recibieron mayor cantidad de linfocitos, resultando ser ésta la verdadera variable pronóstica independiente [175, 176]. A su vez, ésta última podría depender directamente del RAL existente en el momento de realizar la aféresis [175, 177].



Existen datos sin embargo, que demuestran que la RL precoz no depende de la cantidad de linfocitos infundidos sino de la cantidad de células progenitoras CD34 presentes en el injerto [159, 151, 173].

Otros trabajos incluso no encuentran relación de la RL precoz con la supervivencia post-trasplante [156, 173, 174]

En este trabajo hemos pretendido estudiar la existencia de un posible efecto “*injerto contra tumor*” en nuestros pacientes, profundizando en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias y de células progenitoras de las células que componen el injerto y su relación con la supervivencia de los pacientes post-trasplante.

1. OBJETIVO PRINCIPAL.

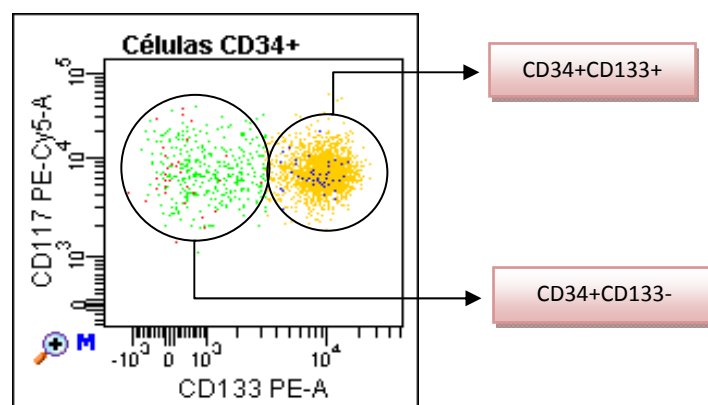
Investigar el papel de las subpoblaciones celulares del injerto autólogo en el resultado del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con linfoma.

El objetivo principal consiste en conocer cómo afectan las distintas subpoblaciones de celulares de progenitores y linfocitos en el resultado de trasplante a través del estudio de la supervivencia (SLE y SG) de nuestros pacientes.

Nuestros resultados muestran que las cifras de células CD34+ y de sus subpoblaciones CD34+CD133+, CD34+DR+, CD34+CD38+, CD34+CD38+DR+ y CD34+CD133+DR+CD38^{bajo} tienen impacto sobre la supervivencia. Los pacientes que reciben mayor cantidad de células CD34+ tienen una curva de supervivencia significativamente mejor. Sin embargo, este claro beneficio sobre la supervivencia no aparece en relación con la cantidad total de linfocitos infundida ni con ninguna de sus subpoblaciones de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T-TCR $\gamma\delta$, linfocitos NK, así como en función de la expresión de moléculas KIR (CD158a y CD158b) o de NKG2D. Nuestros datos derivados de las curvas de supervivencia no muestran una ventaja en la supervivencia a favor de aquellos pacientes que reciben mayor cantidad de ninguna de las anteriores subpoblaciones de linfocitos.

Sin embargo si se obtienen resultados significativos cuando analizamos las células progenitoras CD34+. Las células CD34+ se pueden subdividir en función de la expresión del antígeno CD133+ en:

1. Células CD117+CD34+CD133+
2. Células CD117+CD34+CD133-



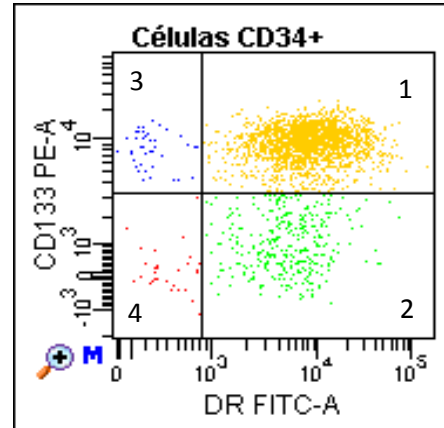
El análisis de nuestros resultados muestra que los pacientes movilizan 4 subtipos de progenitores hematopoyéticos. Se trata de 4 subpoblaciones CD34+ claramente diferenciadas y con un patrón repetitivo muy parecido en todos los pacientes (ver ilustración 16):

-Subpoblación mayoritaria de células **CD34+DR+**:

1. CD117+CD34++CD133+DR+CD38bajo
2. CD117+CD34+CD133-DR+CD38++

-Subpoblación minoritaria de células **CD34+DR-**:

3. CD117+CD34++CD133+DR-CD38bajo
4. CD117+CD34+CD133-DR-CD38bajo



Las células progenitoras que muestran impacto significativo positivo sobre la supervivencia son: las CD34 totales y las subpoblaciones CD34+CD133+, CD34+CD133+DR+CD38bajo, CD34+CD133-DR+CD38++. También muestran impacto significativo las células CD34+DR+, CD34+CD38+ y CD34+CD38+DR+.

Es importante hacer notar que las células CD34 totales, CD34+CD133+, CD34+DR+, CD34+CD38+ y CD34+CD38+DR+ incluyen a la subpoblación CD34+CD133+DR+CD38bajo.

Al realizar el análisis multivariante obtenemos que los pacientes que reciben una cantidad superior a $0,95 \times 10^6$ /Kg de células progenitoras del tipo CD34+CD133+DR+CD38bajo, tienen una mayor SLE y SG, excluyendo del resultado final al resto.

La cantidad de progenitores CD34+CD133+DR+CD38bajo constituye el único factor pronóstico independiente obtenido para la SG y para la SLE dependiente del injerto; junto a estas células, además, obtenemos que los pacientes que recibieron rituximab pre-trasplante presentan también un aumento significativo de la SLE y la SG; ambos constituyen los únicos factores pronósticos independientes detectados en nuestros pacientes.

Los progenitores hematopoyéticos CD34+CD133+DR+CD38bajo dependen únicamente de la cantidad de CD34 post-descongelación. De hecho si los eliminamos de análisis multivariante automáticamente obtendremos progresivamente otros subtipos de progenitores como factores pronósticos independientes, que de forma sucesiva son CD34+DR+, CD34+CD38+DR+, CD34+CD38+, CD34+CD38+, CD34+CD133+, y por último, las células CD34 globales (post-descongelación), lo que indica que todas dependen de la cantidad de CD34.

Además, las células CD34+CD133+DR+CD38bajo muestran una alta correlación con las CD34 globales (post-descongelación) y un alto grado de asociación demostrado en el análisis de regresión lineal. Así pues son las células CD34+ globales (post-descongelación) las que determinan la supervivencia y no los linfocitos maduros infundidos, ni ninguna subpoblación de éstos, incluidas las células NK.

Sin embargo, son las células CD34+DR- las que se correlacionan con la recuperación linfoide precoz. Tanto la subpoblación CD34++CD133+DR-CD38bajo como la CD117+CD34+CD133-DR-CD38bajo, así como las células CD34+DR- globalmente consideradas, muestran una correlación significativa con la recuperación linfoide precoz.

Una vez determinado que son células CD34 globales (post-descongelación) las responsables de la supervivencia de nuestros pacientes trasplantados, este trabajo indaga sobre los subtipos de estos progenitores implicados en tal efecto, obteniendo que son las células CD34+CD133+DR+CD38bajo cuando se infunden en cantidad igual o superior a $0,95 \times 10^6/\text{Kg}$ las responsables de este efecto y además de forma independiente. Sin embargo, existe una fuerte correlación lineal entre la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo y la cantidad de células CD34 recolectada, tanto con el cálculo pre-congelación como sobre todo post-descongelación.

En nuestros pacientes, según el modelo de regresión lineal, para conseguir infundir $0,95 \times 10^6/\text{Kg}$ o más, deberíamos obtener en el proceso de aféresis más de **$2,62 \times 10^6/\text{Kg}$** (pre-congelación) para infundir más de **$1,47 \times 10^6/\text{Kg}$** (post-descongelación) de células CD34+ y poder asegurar así una mayor supervivencia (SLE y SG).

Igualmente, los pacientes en los que recolectamos más de $2,62 \times 10^6/\text{Kg}$, son aquellos en los que la cifra de CFU-GM es mayor de **$3,75 \times 10^6/\text{Kg}$** .

1.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS CD34+CD133+DR+CD38_{bajo}.

La caracterización funcional de estas células es muy poco conocida, sin embargo sabemos que corresponden con diversos fenotipos de la célula madre común pluripotente o tronco. Todas son CD34+ y CD117+ y lo que varía es la expresión de CD133, HLA-DR y CD38.

Entre estas células CD34+ se han identificado varios subtipos de progenitores en diferentes estadios madurativos. Uno de ellos es la célula CD34+CD38- sin expresión de HLA-DR, que se identifica como la **célula madre común pluripotente o tronco** (CFU-LM), con capacidad para dar lugar al progenitor multipotente. La diferenciación de estas células va asociada a la pérdida o disminución de expresión de CD34 y al inicio de la expresión de otros antígenos característicos de estadios de diferenciación más avanzados [45, 46].

La **célula madre multipotente mieloide y linfoide** expresa junto a CD34 el HLA-DR, pero es CD38 negativa [47]. Los progenitores CD34+DR+CD38- caracterizan pues a una subpoblación de progenitores multipotentes linfoides y mieloides tempranos, no comprometidos, y parece que se localizan en el nicho de las células "*stem*", se mantienen durante un tiempo en un estado quiescente y pueden aumentar en la médula ósea con la edad y en diversas situaciones de estrés con respecto a los progenitores más tardíos CD34+CD38+ [45, 46, 218, 219, 220].

A su vez podemos distinguir un **progenitor multipotente mieloide temprano** CD34+CD33+CD15-, más abundante en productos de leucoaféresis en comparación con la médula ósea, y un **progenitor multipotente mieloide tardío** CD34+CD33+CD15+, al contrario, más abundante en médula ósea que en sangre periférica movilizada con G-CSF [45,46]. Posteriormente la **célula monopotente mieloide** adquiere una alta expresión de CD33, sin embargo la **célula monopotente linfoide** no expresa CD33 [46, 47].

En cuanto al CD117, se trata de un antígeno presente desde estadios muy tempranos junto con el CD34 [47]. Sin embargo, es interesante la expresión de CD133 en los progenitores hematopoyéticos, porque parece establecer funcionalmente dos tipos de progenitores como describiremos a continuación.

Diferentes hallazgos en modelos experimentales en mamíferos sugieren que el compartimento hematopoyético "*stem cell*" humano es heterogéneo, incluido el conjunto de fenotipos celulares que se exponen durante la función de repoblación tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos. De hecho, tanto las poblaciones CD34+ como CD34-

poseen capacidad repobladora. Sin embargo, son las células CD34+ y CD34+CD133+ las realmente importantes desde el punto de vista regenerativo.

Se ha comprobado que existe una elevada actividad aldehído deshidrogenasa citosólica (ALDH) en progenitores hematopoyéticos humanos. Las células ALDH+ poseen una marcada actividad en células “stem” hematopoyéticas humanas (CSH) primitivas de cordón umbilical, en precursores periféricos obtenidos tras movilización con factores estimulantes de colonias y también en los precursores de médula ósea en pacientes con LMA; dicho fenotipo sería: CD34+CD38- y CD34+CD133+. Cuando se realiza un trasplante en ratones NOD/SCID de células ALDH+, se produce un injerto multilineal en los órganos hematopoyéticos, mientras que las células ALDH- estuvieron desprovistas de capacidad repobladora. La expresión de CD34 y CD133 disminuye con la maduración y diferenciación [211]. Estos resultados se han corroborado en otros trabajos empleando ALDH [212], donde se obtiene que las células ALDH+CD34+ tienen una alta expresión de CD117 y CD133 y baja expresión de CD38 (este sería el perfil de progenitor hematopoyético primitivo) en comparación con las células ALDH-CD34+; además parece que las células ALDH+CD34- son las que tendrían capacidad de diferenciación eritroide [212].

Estos datos permiten utilizar la expresión de los marcadores CD34 y CD133 como marcadores de células “stem” primitivas con capacidad repobladora hematopoyética demostrada “*in vitro*” e “*in vivo*” [211, 212].

Cuando se analiza la expresión de CD133 y CD34 en progenitores hematopoyéticos de ratón, se halla que la adquisición de CD133 es previa a la de CD34; estas observaciones se han reproducido en progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical y de médula ósea humanos. Por tanto, los progenitores CD34-CD133+ preceden a los CD34+CD133+, sin embargo parece que los primeros todavía no poseen capacidad hematopoyética (no tienen capacidad clonal) y que esta capacidad está asociada a la adquisición de CD34. Está descrito pues que CD133 define una población muy primitiva de la célula madre pluripotente dentro del compartimento de las células “stem” hematopoyéticas, es un marcador ancestral a CD34 y se adquiere antes que éste tras estímulo por citoquinas. Estas células primitivas además son negativas para CD38, CD33 y CD71 [213].

Así pues, las células CD34+CD133+ constituirían un subgrupo de célula madre pluripotente muy precoz e indiferenciado con una alta capacidad hematopoyética, proliferativa, autoreplicativa y de injerto precoz en comparación con las células CD34+CD133- [46, 213].

Las células CD133+ dan origen a un elevado número de poblaciones de linfocitos B y T así como NK, que no es el caso de las células que expresan solamente el CD34 (CD34+CD133-); los progenitores CD34+CD133+ poseen además una capacidad clonogénica superior a las CD34+CD133- [214, 215].

La posibilidad de que en médula ósea podamos distinguir una subpoblación de células madre CD34+CD133+ podría ser importante en términos de reconstitución hematológica, ya que estas células son superiores en estos términos a las CD34+CD133-. Estas células podrían ser importantes para el injerto linfopoyético, considerándose que las células CD34+CD133+CD38- tienen una alta capacidad linfopoyética T [216]; además ensayos "in vitro" han establecido que la población CD34+CD133+ contiene la mayoría de las CFU-GM [217].

En concordancia con estos resultados, también se ha demostrado un injerto más rápido en pacientes que reciben productos de leucoaféresis, más ricos en progenitores multipotentes mieloides tempranos, en comparación con los que reciben médula ósea, con mayor abundancia de progenitores multipotentes mieloides tardíos. Además los progenitores multipotentes mieloides tienen más capacidad de desarrollar unidades formadoras de colonias (CFC) [45]

Junto a esto, parece que existe una correlación inversa entre el número total de células CD34+CD133+ y el número de días en injertar los neutrófilos ($>0,5 \times 10^9/L$) y las plaquetas ($>20 \times 10^9/L$). Esta correlación mejora la existente con el número de CD34 totales. Por tanto, una cantidad elevada de células CD34+CD133+ se asocia con una rápida recuperación de neutrófilos y plaquetas; sin embargo no se ha estudiado la relación con el injerto de linfocitos [45].

Estos hallazgos pueden ayudar a predecir la capacidad de reconstitución del injerto hematopoyético (la calidad del injerto) que por diversas circunstancias contienen un bajo número de células CD34.

Los progenitores multipotentes linfoides y mieloides tempranamente comprometidos presentan una expresión de CD38 baja. La pérdida de la capacidad linfopoyética y la adquisición de la capacidad mieloides van ligadas a la pérdida de CD133 y a la adquisición de CD38. La adquisición progresiva de CD38 va paralela a la pérdida de CD133 (progenitores multipotentes mieloides tardíos y monopotentes). En el caso de los progenitores multipotentes linfoides, la expresión de CD38 no llega a ser intensa [221, 222, 223]. Está descrito que las células CD34+CD38^{bajo} pueden tener diferenciación linfoide B [221], NK [222] y T [223], definiendo a los progenitores multipotentes linfoides, pero no una expresión intensa de CD38, como ocurre con la diferenciación mieloides.

En cuanto al significado de antígeno HLA-DR es poco conocido; se sabe que se encuentra en estadios muy tempranos de la célula madre multipotente mieloides y linfoide y desaparece en estadios tempranos de diferenciación [47, 218].

En resumen, en función de la expresión de distintos marcadores antigénicos descritos en la bibliografía [45, 46, 47, 184-186, 211-221] podemos distinguir los siguientes subtipos de progenitores hematopoyéticos (tabla 85):

Tabla 85. Clasificación de los progenitores hematopoyéticos en función de la expresión de distintos marcadores según datos descritos en la bibliografía [45, 46, 47, 184-186, 211-221].

	CD133	CD34	DR	CD38	CD33	CD15
Célula madre común pluripotente precoz	+	-	-	-	-	-
Célula madre común pluripotente	+	+	-	-	-	-
Progenitor mieloide y linfoide multipotente	+	+	+	-/+		-
Progenitor mieloide multipotente temprano	-	+	-	-/+	+	-
Progenitor mieloide multipotente tardío	-	+	-	+	+	+
Progenitor mieloide monopotente	-	+	-	++	++	++
Progenitor linfoide multipotente	+	+	+	-	-	-

-Progenitores indiferenciados (célula madre pluripotente): CD34+CD33-, CD34+CD133+, CD34+CD38-, CD34+DR-.

-Progenitores diferenciados (multipotentes mieloides y linfoides): CD34+CD33+, CD34+CD133-, CD34+CD38+, CD34+DR+, CD34+DR+CD38+.

En nuestro trabajo se analiza el papel que desempeñan los distintos subtipos de progenitores CD34 del autoinjerto sobre el resultado clínico del TAPH, demostrándose la existencia de un beneficio sobre la supervivencia en nuestros pacientes. Las células responsables de este efecto beneficioso son los progenitores hematopoyéticos CD34+CD133+DR+CD38bajo. Dichos progenitores constituyen un subgrupo de progenitores multipotentes muy indiferenciados y cuyo grado de diferenciación se sitúa a medio camino entre la célula madre pluripotente y la célula madre multipotente mieloide. Tanto las células CD34+CD133+DR+CD38bajo como las CD34+CD133+DR-CD38bajo son progenitores hematopoyéticos primitivos indiferenciados (CD34+CD133+) con capacidad clonogénica y capacidad linfopoyética y, es posible que, dentro de este estadio inmaduro, la adquisición del HLA-DR se asocie a una etapa ulterior de diferenciación. Las células CD34+CD133+ también muestran un beneficio significativo sobre la supervivencia, pero el efecto pronóstico es dependiente de las células CD34+CD133+DR+CD38bajo como se demuestra en el análisis multivariante.

Sin embargo, no obtenemos diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia en función de la cantidad de las células CD34+CD133+DR-CD38bajo infundidas, aunque en los pacientes que reciben más cantidad, la curva de supervivencia es mejor. De las dos subpoblaciones CD34+CD133+ estudiadas, las subpoblación CD34+CD133+DR+CD38bajo es la mayoritaria y, es la que en nuestro análisis, ha demostrado un importante impacto en la supervivencia de nuestros pacientes. En la subpoblación CD34+CD133+DR-CD38bajo, minoritaria, si bien los pacientes que reciben mayor cantidad tienen una supervivencia

mayor, ésta no llega a ser significativa. Es posible que la no significación esté motivada por la pequeña cantidad movilizada de estas células, sin embargo estas células, junto a la subpoblación CD34+CD133-DR-CD38bajo han demostrado su importancia en la recuperación linfóide precoz de nuestros pacientes. Estas dos subpoblaciones (CD34+DR-) tienen en común la no expresión del antígeno HLA-DR y podrían ser importantes en términos de reconstitución linfopoyética y contener a los progenitores pluripotentes indiferenciados.

Las otras dos subpoblaciones de progenitores estudiadas (CD34+CD133-) tienen en común una disminución de la expresión de CD34 y una pérdida de la expresión de CD133. Estos hallazgos sugieren que estamos ante unos progenitores más diferenciados, con poca capacidad hematopoyética siendo la mayoritaria, las células CD34+CD133-DR+CD38++ las que corresponderían a la célula madre multipotente mieloide que carece de capacidad linfopoyética y que en nuestros pacientes, los que reciben más cantidad de estas células, también tienen una significativa mejor supervivencia; sin embargo, el efecto pronóstico sigue siendo dependiente de la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo infundida.

Así pues definimos en nuestros pacientes la movilización de cuatro subtipos de progenitores:

1. CD117+CD34++CD133+DR-CD38bajo y CD117+CD34++CD133+DR+CD38bajo

Corresponden al progenitor multipotente linfomieloide con capacidad proliferativa clonal tempranamente comprometidos, por tanto incluyen a los progenitores con capacidad linfopoyética. Las primeras son progenitores más indiferenciados al ser HLA-DR- y, según nuestros resultados, corresponden con las que poseen mayor capacidad linfopoyética.

2. CD117+CD34+CD133-DR+CD38++

Corresponden al progenitor mono-bipotente. Probablemente con capacidad mieloide y con pérdida de la capacidad linfopoyética (la pérdida de la capacidad linfopoyética y la adquisición de la capacidad mielopoyética van ligadas a la pérdida de CD133 y a la adquisición de CD38).

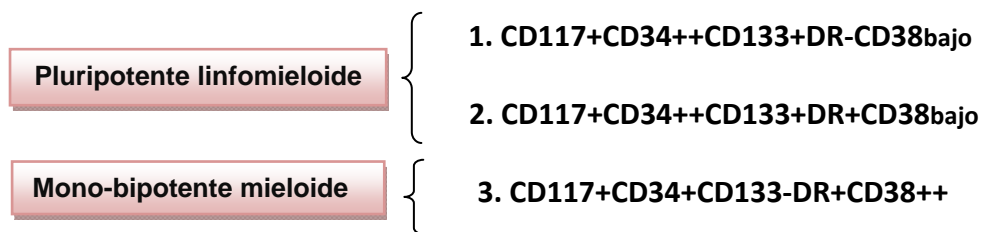
3. CD117+CD34+CD133-DR-CD38bajo

Desconocemos cual puede ser la funcionalidad de estas células. Se trata de una subpoblación muy poco representada dentro de los progenitores CD34+ de baja expresión y CD133- por lo que correspondería a células mono-bipotentes linfomieloideas, como en el caso anterior, pero a diferencia de éstas poseen una baja expresión de CD38 y pérdida de HLA-DR. Podríamos postular diversas hipótesis (podría tratarse de un subclón de células quiescentes o formar parte de la misma población CD117+CD34++CD133+DR-CD38bajo que

podrían adquirir CD133 de forma tardía...), sin embargo, estas células se asocian con una recuperación linfoide precoz, por lo que poseen una alta capacidad linfopoyética como en el caso de las CD117+CD34++CD133+DR-CD38bajo.

En nuestros pacientes, las células CD34+DR-, se asocian con una alta capacidad linfopoyética con lo que podrían contener a los precursores linfoides.

Con independencia de esta última, las etapas madurativas quedan claramente definidas de la siguiente forma:



1.2. ¿EXISTE UN EFECTO “*INJERTO CONTRA LINFOMA*” EN EL TRASPLANTE AUTÓLOGO?

Clásicamente definimos el efecto “*injerto contra tumor*” cuando las células inmunes maduras de un donante reconocen y atacan las células “extrañas” tumorales en el paciente. Este fenómeno ayuda a prevenir las recaídas y, en algunas ocasiones, puede llegar a ser curativo.

Este “*efecto inmunológico*” beneficioso se ha demostrado en el escenario del trasplante alogénico. En estos pacientes se producen una serie de mecanismos que involucran las poblaciones celulares efectoras de la respuesta inmune, fundamentalmente la actividad de los linfocitos T del donante, lo que se traduce en una disminución de las recaídas (aumento de la SLE) y en una disminución de la mortalidad (aumento de la SG) [144, 222-224].

En el contexto del trasplante autólogo, obviamente, no existe tal efecto mediado por los linfocitos maduros del donante, pero puede existir un efecto inmune beneficioso derivado de las células progenitoras existentes en el injerto, y que de la misma manera, produzcan una mayor supervivencia de estos pacientes.

Según nuestros resultados, los pacientes que reciben mayor cantidad de células y CD117+CD34++CD133+DR+CD38bajo tienen una supervivencia mayor, por tanto podemos afirmar que en nuestros pacientes parece existir un efecto “*injerto contra linfoma*” y que este efecto puede relacionarse con la cantidad recibida de este tipo de células. La cantidad infundida de estas células resulta ser un factor pronóstico independiente.

La cantidad de células CD34 totales igualmente influye sobre la supervivencia pero ésta sí que es dependiente de las anteriores.

Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas células ejercen el mecanismo “*injerto contra linfoma*” son desconocidos.

En diversos trabajos previamente comentados, se postula que el efecto “*injerto contra linfoma*” depende de la reconstitución inmune (linfocitaria) precoz en diversas neoplasias tanto hematológicas [147, 151, 158, 159, 161, 163-166], como no hematológicas [148, 161, 162] y se basa en la hipótesis de que estos linfocitos tempranamente regenerados ejercerían un efecto inmunológico sobre el linfoma, que sería responsable de la mejor supervivencia de estos pacientes y del efecto “*injerto contra linfoma*”. En estos trabajos la RL precoz se muestra como una variable de gran importancia pronóstica en el resultado del TAPH. El origen de estos linfocitos reconstituidos post-trasplante es desconocido, pero se postulan tres hipótesis [147]:

1. *Stem cell* progenitoras contendidas en el injerto y que se diferencian a linfocitos maduros.
2. Linfocitos maduros contenidos en el injerto, que han sido recolectados previamente y son reinfundidos.
3. Linfocitos del huésped que sobreviven al régimen de acondicionamiento.

En algunos casos [175, 176], la RL precoz depende exclusivamente de la cantidad total de linfocitos infundida, mostrando una fuerte correlación proporcional, directa y lineal, y no de las células CD34, por lo que sería válida la segunda hipótesis. Sin embargo no se investiga cuales pueden ser los factores asociados a la recuperación linfocitaria precoz, que pueden afectar a ésta o si ésta puede depender de otros factores. Sin embargo, hay algunos trabajos con resultados contradictorios en los que sí que depende de las células CD34 administrada [147, 150].

Según nuestros datos, la RL precoz (definida como RAL en el día $15 \geq 0,9 \times 10^6/L$) se asocia con una mejor SLE (estadísticamente significativa) y una SG mejor (en este caso las diferencias alcanzadas no llegan a ser estadísticamente significativas), pero no constituyen un factor pronóstico independiente. La RL precoz tampoco se correlaciona ni con la cantidad de linfocitos infundida, ni con la cantidad total de células CD34 infundida (ni de CD34++CD133+DR+CD38bajo), sino que, se correlaciona con la cantidad de células CD34+DR- totales infundidas (tanto CD34+CD133+DR-CD38bajo como CD34+CD133-DR-CD38bajo) como se comentó previamente. Ambas constituyen dos subpoblaciones minoritarias del inóculo de CD34 y, aunque las diferencias en las curvas de supervivencia no son significativas, los pacientes que reciben mayor cantidad de células CD34+DR- poseen mayor SLE y SG. Las células CD34+DR- también son la única subpoblación de CD34+ que se asocia con un injerto de neutrófilos más rápido (tabla 86):

Por tanto, podemos concluir:

1. Parece existir un efecto "*injerto contra linfoma*" demostrado por el hecho de que los pacientes que reciben mayor cantidad de células CD34++CD133+DR+CD38bajo poseen mayor supervivencia. Este hecho también se produce con las células CD34+DR- en relación con una RL precoz. Sin embargo, son las células CD34++CD133+DR+CD38bajo las que han demostrado ser factor pronóstico independiente. El beneficio sobre la supervivencia mostrado por estas células en cambio no deriva de una RL precoz y el mecanismo es desconocido.
2. En nuestra serie, no existe ninguna ventaja en la supervivencia derivada de una mayor cantidad de linfocitos maduros recibida ni de ninguna de sus subpoblaciones (B, T ni NK).
3. Nuestros datos indican que existe una ventaja en la supervivencia de los pacientes con RL precoz pero ésta no depende de la cantidad de células CD34+ totales, ni de su

subpoblación CD117+CD34++CD133+DR+CD38bajo, ni de la cantidad de linfocitos maduros presentes en el injerto. La RL precoz no ha demostrado ser factor pronóstico independiente en el análisis multivariante, al contrario que en la mayoría de los trabajos publicados; esta ventaja en la supervivencia podría estar relacionada con otros factores como por ejemplo un rápido injerto hematopoyético, tanto mieloide como linfoide, que sí depende de las células CD34+DR-. Los pacientes que reciben mayor cantidad de células CD34+DR- son los que injertan más rápidamente, tanto los granulocitos como los linfocitos, (no así las plaquetas, datos no mostrados), como ilustramos en las tablas 86 y 87 y en los gráficos 34 y 35:

Tabla 86. Diferencias de medias (prueba T para muestras independientes) de diversas subpoblaciones en función del injerto granulocítico (injerto ≥ 500 vs. < 500 después del día 12) y linfoide (injerto ≥ 900 en el día 15 vs. < 900).

SUBPOBLACIÓN	Rapidez injerto granulocítico (RAN-12 ≥ 500 vs. $< 500/\mu\text{L}$)	Rapidez injerto linfoide (RAL-15 ≥ 900 vs $< 900/\mu\text{L}$)
	P	P
CD34+ (pre-congelación)	0,02	0,372
CD34+ (post-descongelación)	0,130	0,383
CD34+CD133+	0,093	0,425
CD34+CD133-	0,489	0,413
CD34+CD133+DR+CD38bajo	0,097	0,453
CD34+DR-	0,008	0,008
CFU-GM	0,405	0,489
CFU-Mix	0,831	0,736
BFU-E	0,994	0,450

Tabla 87. Media y DS de células CD34+DR- en función del injerto mieloide y linfoide.

	Media de células CD34+DR-	p
Injerto neutrófilos día 12 ($\geq 500 \mu\text{L}$ vs. $< 500/\mu\text{L}$)	$0,1 \times 10^6/\text{Kg}$	0,008
	$0,046 \times 10^6/\text{Kg}$	
Injerto linfocitos día 15 ($\geq 900 \mu\text{L}$ vs. $< 900/\mu\text{L}$)	$0,120 \times 10^6/\text{Kg}$	0,008
	$0,05 \times 10^6/\text{Kg}$	

El hecho de que la RL precoz se asocie a mejor supervivencia, se apoya en los linfocitos regenerados “*de novo*” por las células progenitoras CD34+, ya que dentro de los linfocitos del inóculo o en las células residuales del huésped, podría haber gran número de linfocitos reguladores que se generaron durante la respuesta frustrada contra el tumor. En la regeneración, aparecerían linfocitos vírgenes que podrían aprender a luchar contra el tumor, sin el freno que suponen las células reguladoras inducidas por el tumor.

Sin embargo, el impacto sobre la supervivencia dependiente de la cantidad de células CD34++CD133+DR+CD38bajo administrada es mayor y por tanto, el efecto “*injerto contra*”

linfoma” que se ha producido en nuestros pacientes, depende mayoritariamente de este tipo celular.

Desde el punto de vista práctico y dado que el potencial efecto “*injerto contra linfoma*” parece depender de la cantidad de células CD34++CD133+DR+CD38bajo administrada, sería importante determinar estas células o un umbral mínimo en la colecta para asegurar el éxito del trasplante. Sin embargo, las células CD34++CD133+DR+CD38bajo muestran una clara correlación con las células CD34+ totales (con el cálculo post-descongelación), asociación que queda reflejada mediante el análisis de regresión lineal. Esto quiere decir que las células CD34++CD133+DR+CD38bajo son una buena parte de las células CD34+ totales movilizadas y descongeladas (66% de las células CD34+ descongeladas), que existe una buena correlación entre ambas y que el efecto beneficioso sobre la supervivencia depende de las células CD34++CD133+DR+CD38bajo. Debido a esta excelente correlación (antes y sobre todo tras la descongelación) la cifra de células CD34+ recolectada e infundida puede servir de valor subrogado y no sería imprescindible determinar las células CD34++CD133+DR+CD38bajo, si bien constituyen una medida excelente de control de calidad de una aféresis tras la descongelación.

Por último, el mecanismo por el que las células CD34++CD133+DR+CD38bajo actúan beneficiosamente sobre el huésped está poco aclarado. El mecanismo no parece depender de una reconstitución inmune precoz, ni tampoco a través de un rápido injerto tanto linfoide como mieloide. Podríamos postular que se trataría de mecanismos inmunológicos poco esclarecidos, que no se reflejaría de forma tan simplista en la cifra absoluta de linfocitos maduros.

Queda por dilucidar si con mayor cantidad de estas células la recuperación linfocitaria precoz hubiera sido mayor y por tanto su impacto en la supervivencia también; de hecho en la mayoría de los trabajos publicados la RL en el día 15 está en torno a $0,5 \times 10^9/L$ mientras que en nuestros pacientes es de $0,772 \times 10^9/L$ de media de media, y su significación se alcanzaba con $0,9 \times 10^9/L$.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

2.1 INVESTIGAR LA INFLUENCIA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL RITUXIMAB SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL INJERTO Y LA SUPERVIVENCIA.

El rituximab se utiliza como purgado “*in vivo*” de células tumorales CD20+ en los pacientes con linfoma no Hodgkin en el tratamiento previo al trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. El empleo del rituximab ha supuesto un gran avance en el tratamiento de los pacientes con LNH, pero no existen estudios comparativos para determinar el impacto de rituximab sobre la composición del injerto y si ésta puede afectar a la SLE y la SG.

Está ampliamente estudiado que el empleo del rituximab previo al trasplante no afecta a la cinética de movilización y recolección de progenitores CD34 [227-230]. Tampoco se produce un aumento en la tasa de infecciones a pesar de producir una depresión de la inmunidad humoral (linfocitos B e IgG) que no se recupera hasta los 2 años post-trasplante [231].

Un único estudio ha comparado las características de la movilización y la cinética del injerto entre una serie de pacientes con LNH que reciben rituximab con otros que no reciben rituximab previamente a la movilización de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (PHSP). Los pacientes que reciben rituximab tienen un tiempo más largo de injerto de granulocitos ($p=0,0466$), poseen una tendencia a una recolección de progenitores más pobre y una tasa significativamente mayor de los episodios de bacteriemia. Este trabajo postuló que el rituximab utilizado en los 6 meses anteriores a la recogida puede tener un efecto perjudicial sobre la movilización de PHSP y el injerto. Sin embargo la supervivencia de estos pacientes es significativamente mejor por lo que este efecto negativo del rituximab sería compensado por una mejor supervivencia [232].

Nosotros comparamos un grupo de pacientes que recibe rituximab previo a la recolección de PHSP (22 pacientes) con otro que no lo recibieron (21 pacientes).

El análisis de nuestros resultados muestra que no existen diferencias en la composición del injerto en ninguna de las subpoblaciones de células progenitoras estudiada: CD34 (pre y post-descongelación), CD34+CD133+DR-CD38bajo, CD34+CD133+DR+CD38bajo,

CD34+CD133-DR-CD38bajo, CD34+CD133-DR+CD38++, CD34+CD133+, CD34+DR+, CD34+CD38+ y CD34+CD38+DR+.

En cuanto al total los linfocitos recolectados sí que existen diferencias: en los pacientes que reciben rituximab se recolecta globalmente menos cantidad de linfocitos totales, sobre todo a expensas de una menor recolección de linfocitos B (CD19+), no afectándose la recolección de otros subtipos de linfocitos T (TCR $\gamma\delta$, CD4, CD8) ni NK (tabla 88).

Tabla 88. Diferencias entre las principales subpoblaciones linfocitarias del injerto de los pacientes que reciben rituximab pre-trasplante y los que no.

LINFOCITOS	SI RITUXIMAB		NO RITUXIMAB		P
	Media	Desviación	Media	Desviación	
Linfocitos totales (precong)	241,87	227,43	345,02	237,1	0,11
Linfocitos totales (postdes)	158,45	142,45	197,84	186,04	0,01
CD19+	1,94	5,85	11,4	19,32	0,03
Linfocitos T CD3+	122	98,8	137,79	132,31	0,65
TCR $\gamma\delta$ +	5,87	7,97	10,77	14,9	0,16
CD3+CD4+	57,92	57,15	62,38	65,85	0,79
CD3+CD8+	56,88	62,44	63,79	71,48	0,71
Linfocitos NK	20,5	20,6	29,16	43,59	0,39

El tratamiento con rituximab tampoco afectó al injerto de granulocitos ($p=0,809$) ni de plaquetas ($p=0,287$) con una media respectivamente de 11 y 12 días en alcanzar $>0,5 \times 10^9$ granulocitos/L y $>20 \times 10^9$ plaquetas/L sin necesidades transfusionales adicionales.

No se encontraron diferencias en los días en los que se alcanzó nadir, en los días de fiebre ni tampoco se produjo una mayor documentación microbiológica en los pacientes que recibieron rituximab (8 aislamientos microbiológicos en 9 pacientes de cada grupo).

En consecuencia se puede concluir que el tratamiento con rituximab en nuestros pacientes no afectó a la composición del injerto, salvo un una depleción de linfocitos totales y de linfocitos B, como era previsible. Tampoco se aumentaron los días que tardan en injertar los pacientes, tanto de granulocitos como de plaquetas, ni se produjeron más infecciones en el grupo de pacientes que recibió rituximab.

El empleo de rituximab tampoco ha determinado mayores necesidades transfusionales.

2.2 ESTUDIAR EL PAPEL DE LOS LINFOCITOS EN DISTINTOS MOMENTOS DE LA ENFERMEDAD SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

2.2.1. INFLUENCIA DEL RAL AL DIAGNÓSTICO SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

El análisis de nuestros resultados demuestra, aún con un número bajo de pacientes, que aquellos que poseen un RAL al diagnóstico $\geq 0,5 \times 10^9/L$ tienen una SLE significativamente mayor ($p < 0,001$) y los que tienen $\geq 0,75 \times 10^9/L$ tienen una SLE y SG significativamente mejor ($p < 0,001$ y $0,023$ respectivamente).

En el análisis univariante, tanto el tener $\geq 0,75 \times 10^9/L$ como el tener $\geq 0,5 \times 10^9/L$, muestran diferencias respecto a la SLE y a la SG respectivamente, aunque las diferencias en este caso no llegan a ser estadísticamente significativas para la SG pero sí para la SLE.

En el análisis multivariante se eligió $0,75 \times 10^9/L$ como punto de corte al carecer de significación estadística $\geq 0,5 \times 10^9/L$ para la SG en el análisis de *Kaplan-Meier* y ser el punto de mayor χ^2 para el “*log-rank test*”. En dicho análisis el tener $\geq 0,75 \times 10^9/L$ linfocitos al diagnóstico no resultó ser un factor pronóstico independiente.

Nuestros resultados concuerdan con los datos publicados hasta el momento y descritos en la introducción: todos los trabajos realizados en este sentido han demostrado el papel fundamental como factor pronóstico del RAL al diagnóstico en pacientes con linfoma no Hodgkin [201-205], si bien en los modelos multivariantes no se incluyen factores como las células CD34+ o el empleo de rituximab.

En nuestro caso, si obviamos estos dos factores como en los trabajos reseñados [201-205], sí que obtenemos que el RAL al diagnóstico $\geq 0,75 \times 10^9/L$ es un factor pronóstico independiente, y además lo es de otros factores pronósticos obtenidos en el análisis univariante como edad al diagnóstico, estatus pretrasplante o respuesta al trasplante, lo que indica que el estado inmunitario del huésped al diagnóstico de la enfermedad juega un importante papel pronóstico y que el RAL al diagnóstico es importante marcador de éste.

Otros trabajos publicados se refieren solamente a pacientes con linfoma folicular y linfoma difuso de células grandes, mientras que el nuestro incluye además a pacientes con linfoma de Hodgkin.

2.2.2. INFLUENCIA DEL RAL PREVIO A LA RECOLECCIÓN SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

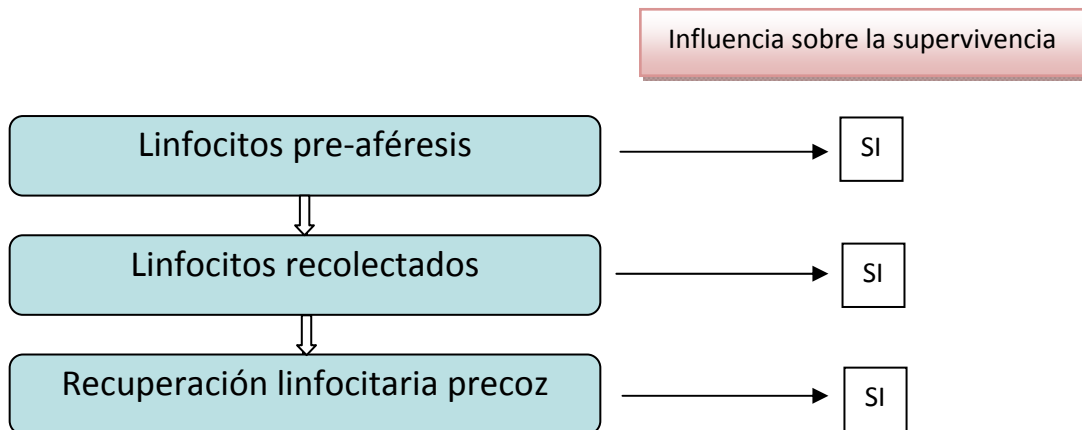
Como se comentó al inicio de la discusión, algunos trabajos confieren un papel relevante al recuento absoluto de linfocitos en el momento de la aféresis.

Katipamula R. et al [177] se plantean que factores pueden estar relacionados con el rendimiento en la recolección linfocitaria y por tanto pueden influir en el contenido de linfocitos del autoinjerto. Del análisis multivariante llevado a cabo para aclarar este aspecto, solamente el recuento de linfocitos pre-aféresis se asoció significativamente con los pacientes que obtenían $>500 \times 10^6$ linfocitos/Kg ($p=0,0001$), mostrando una fuerte correlación. Al evaluar diferentes puntos de corte de RAL pre-aféresis capaces de predecir una mayor cantidad de linfocitos recolectada, se identificó el valor de $0,5 \times 10^9$ linfocitos/L como el umbral predictor de RAL superior a $0,5 \times 10^9$ linfocitos/Kg.

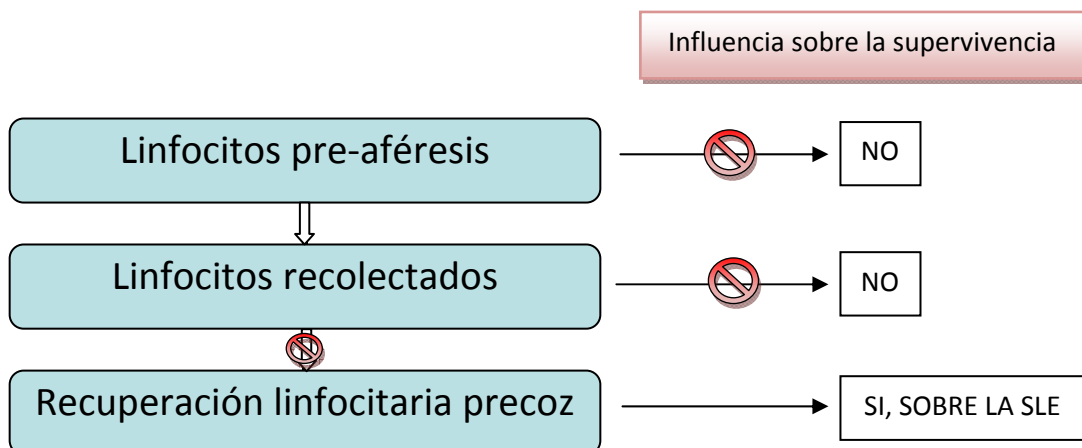
Aunque se han podido demostrar diferencias respecto a la SLE en función de la cantidad de linfocitos existentes en el momento de la aféresis [168], este parámetro no se ha incluido en ningún análisis multivariante para comprobar su relación con la supervivencia. Por tanto, niveles elevados de linfocitos en sangre periférica en el momento de la aféresis permite obtener una cantidad mayor de linfocitos en el injerto; si la cantidad de linfocitos del autoinjerto depende de la cantidad de linfocitos existentes en el momento de la aféresis, sería este un factor pronóstico independiente.

El análisis de nuestros resultados muestra una correlación entre el recuento absoluto de linfocitos en el momento de la aféresis y la cantidad de linfocitos recolectados (Rho de *Spearman* 0,3; $p=0,028$). Sin embargo, no existe ninguna ventaja en la supervivencia de los pacientes que tienen mayor cantidad de linfocitos en el momento de realizar la aféresis. Esto concuerda también con el hecho de que la cantidad de linfocitos recolectados (y posteriormente infundidos) no afecta a la supervivencia, circunstancia que es independiente de la pérdida celular derivada de la descongelación. Estos resultados concuerdan con los publicados [175, 177]. No obstante, como ya hemos comentado, en nuestro caso la supervivencia no se veía influenciada por la cifra de linfocitos infundidos y como es de esperar, tampoco por la cantidad de linfocitos en el momento de realizar la aféresis.

Así pues la hipótesis expuesta al principio de esta discusión:



y basándose en nuestros resultados en nuestros pacientes quedaría como sigue:



Es posible que muchos otros factores puedan influir sobre la cantidad de linfocitos recolectados, como el tipo de movilización realizada [175, 176], el tiempo transcurrido entre el último ciclo de quimioterapia y el momento de realizar la aféresis [178], pero el estudio de estos factores excede el propósito de esta tesis al no haber demostrado estos parámetros, en nuestra muestra de pacientes ningún beneficio sobre la supervivencia.

2.2.3. INFLUENCIA DE LA RL PRECOZ SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

En el apartado correspondiente al objetivo principal se discutió los factores celulares relacionados con la supervivencia y el impacto de la RL precoz sobre la supervivencia.

La RL precoz mejora la SLE de nuestros pacientes de forma significativa. Ésta se correlaciona con la cantidad de células CD34+DR- infundida, pero no constituye un factor pronóstico independiente.

2.2.4. INFLUENCIA DE LA RL TARDÍA.

Diversos trabajos han estudiado el papel de la recuperación linfocitaria más allá del día 15 como factor pronóstico. Los resultados publicados no demuestran ningún beneficio sobre la supervivencia más allá del día 30, aunque la recuperación linfocitaria tardía si se correlaciona con la dosis de linfocitos recibida.

Nuestros datos no demuestran ningún beneficio sobre la supervivencia en función del recuento absoluto de linfocitos en los días 30, 90, 180 y al año post-trasplante en los diferentes puntos de corte analizados.

2.3. ESTUDIAR LAS POSIBLES CORRELACIONES DE LOS CULTIVOS CLONOGÉNICOS CON LAS CÉLULAS CD34 Y SUS SUBPOBLACIONES.

Los progenitores hematopoyéticos fueron evaluados no sólo por citometría de flujo sino también a través de cultivos clonogénicos.

El control de la viabilidad "*in vitro*" de las muestras celulares obtenidas tras la recolección y manipuladas "*ex vivo*", se lleva a cabo mediante la técnica de cultivo *in vitro* de los progenitores mieloides, siendo los granulomonocíticos (CFU-GM) los más utilizados. Su valor como control de calidad está bien establecido y constituye una práctica habitual en los laboratorios de criopreservación. Este control nos informa acerca de posibles deterioros celulares que pueden ocasionar dichas técnicas.

Sin embargo el valor predictivo del cultivo de progenitores CFU-GM en relación con el implante de los progenitores hematopoyéticos está muy debatido [236, 237].

Existe una alta correlación entre el número de células CD34+/Kg obtenidas tanto antes como después de la criopreservación, con los días en que se produce el injerto plaquetar y de neutrófilos y ambas tienen capacidad de predecir el injerto hematopoyético en pacientes que reciben más de 2×10^6 CD34+/Kg. Los pacientes en los que se produce una pérdida de la viabilidad de las células CD34+ tras la criopreservación y reciben una cantidad inferior a 2×10^6 células CD34+/Kg tienen, en general, peor reconstitución hematopoyética [233, 234, 238]. Este es un hecho aceptado, aunque existen algunos datos contradictorios en la literatura.

También, clásicamente, se entiende que existe una fuerte correlación lineal entre la cantidad de células CD34+ por kilogramo de peso corporal y el número de CFU-GM por kilo de peso corporal obtenidas tanto antes como después de la criopreservación [235]. Esta correlación es significativa cuando se produce una disminución importante de la viabilidad (por debajo del 50%). En este caso, parece predecir una gran pérdida de capacidad de proliferación *in vitro*, mientras que si la viabilidad es superior al 50%, no existe una buena correlación con un mayor número de CFU-GM generado antes y después de la criopreservación [235].

Trabajos recientes muestran una alta correlación entre las colonias CFU-GM/Kg y las células CD34+/Kg y tanto la cantidad de células CD34+/Kg de peso corporal como el número de CFU-GM/Kg de peso corporal, obtenidas antes y después del proceso de criopreservación, muestran una elevada y significativa correlación con el injerto tanto de plaquetas como de neutrófilos. Sin embargo, comparando ambas, la correlación más fuerte

parece ser entre la cantidad de células CD34+/kg de peso corporal y los datos de recuperación hematológica, siendo además un factor independiente del número de colonias CFU-GM/Kg en el análisis multivariante [236, 238].

Otros trabajos, sin embargo, no demuestran una correlación entre las células CD34+/Kg ni las CFU-GM/Kg y el tiempo de injerto, por lo que han estudiado otros parámetros como la ratio CFU-GM/CD34+ como indicador de la calidad de las células progenitoras obtenidas y su relación con el injerto hematopoyético. En dicho trabajo, el número de células CD34+ por Kg se correlacionó altamente con las CFU-GM/Kg y con las CMN/Kg. Sin embargo ni el número de CD34+/Kg ni las CFU-GM/Kg mostraron correlación con el injerto de neutrófilos ni de plaquetas. Al estudiar el ratio CFU-GM/CD34+, la presencia de un ratio bajo predijo un rápido injerto plaquetar que hipotéticamente podría ser utilizado como predictor de la capacidad movilizador y de injerto del paciente [237].

En nuestro trabajo, nos preguntamos sobre la utilidad de los datos obtenidos del estudio de los cultivos clonogénicos, realizados tras del proceso de criopreservación como predictor del injerto hematopoyético y como control de calidad del proceso de criopreservación.

Nuestros datos parecen indicar, respecto a la influencia sobre el injerto de los granulocitos, que los pacientes que han recibido mayor cantidad de células CD34+/Kg (cálculo precongelación) han tenido un injerto granulocítico significativamente más rápido (tabla 86), pero son sobre todo, los pacientes que han recibido mayor cantidad de células CD34+DR-/Kg, los que tienen un injerto granulocítico y linfoide más precoz (tablas 86 y 87), mostrándose esta subpoblación celular como los progenitores con mayor capacidad regenerativa post-trasplante. Esta correlación no se ha mostrado con el injerto de plaquetas.

Sin embargo, los pacientes que tienen un injerto granulocítico y linfoide más precoz, no han recibido mayor cantidad de CFU-GM/Kg, CFU-Mix/Kg y BFU-E/Kg (post-criopreservación), (tablas 86 Y 87). Parece pues que los distintos tipos de colonias estudiados, no son útiles como factores predictivos del injerto. Aún así, las colonias de tipo CFU-GM obtenidas tras la criopreservación, muestran correlación con los progenitores con los progenitores CD34+ obtenidos también tras la criopreservación y, sobre todo, con las subpoblaciones CD34+CD133+, CD34+CD133+DR-CD38bajo, CD34+CD133+DR+CD38bajo y CD34+CD133-DR-CD38bajo (tabla 89).

Tabla 89. Correlación entre CFU-GM y distintos tipos de progenitores.

CFU-GM	Índice de correlación	P
CD34+Post-descongelación	0,275	0,042
CD34+/CD133+	0,288	0,033
CD34+CD133+DR-CD38bajo	0,278	0,04
CD34+CD133+DR+CD38bajo	0,286	0,034
CD34+CD133-DR-CD38bajo	0,185	0,008

Por tanto, según nuestros resultados, no podemos concluir que el análisis de las colonias CFU-GM obtenidas tras el proceso de criopreservación sea útil para predecir el injerto de neutrófilos, de plaquetas ni de linfocitos, pero, sin embargo, pueden constituir un adecuado control de calidad de la cantidad de células CD34+ post-descongelación y de las CD34+CD133+DR+CD38bajo obtenidas.

Como conclusión de estos resultados es importante resaltar la correlación de las colonias obtenidas de tipo CFU-GM con los progenitores CD34+ y los distintos subpoblaciones estudiadas con excepción de las células CD34+CD133- totales y las células CD34+CD133-DR-CD38++. Es de destacar que estos subtipos celulares corresponden a los progenitores mas diferenciados (mono-bipotentes), por tanto la correlación es buena con los progenitores CD34+CD133+ y con los CD34+ totales tras la descongelación.

CONCLUSIONES

1. En pacientes con linfoma sometidos a TAPH, la cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo ha demostrado ser el único factor pronóstico independiente que afecta al injerto.
2. Nuestros datos indican que la infusión de más de **0,95x10⁶/Kg** de células con fenotipo CD34+CD133+DR+CD38bajo y el haber recibido rituximab pretrasplante, son los únicos factores pronósticos independientes para la SLE (ambos) y la SG (cantidad de células CD34+CD133+DR+CD38bajo) tras el TAPH.
3. Nuestros resultados sugieren que para asegurar una adecuada recolección de células CD34+CD133+DR+CD38bajo es preciso obtener más de **2,62x10⁶/Kg** células CD34 en el proceso de aféresis (pre-congelación) e infundir más de **1,47x10⁶/Kg** (post-descongelación).
4. Los pacientes que reciben una mayor cantidad de células con el fenotipo CD117+CD34++CD133+DR+CD38bajo tienen una mayor supervivencia, que puede estar relacionada con un efecto "*injerto contra linfoma*". En contraste con otros estudios, no hemos observado este efecto en relación con la cifra de linfocitos ni con ninguna de sus subpoblaciones.
5. En nuestro estudio la RL precoz se asocia con una mejor SLE pero no constituye un factor pronóstico independiente. La RL precoz no se correlaciona con la cantidad de linfocitos o de células CD34+ infundida, ni con otras subpoblaciones más inmaduras como las que tienen inmunofenotipo CD34++CD133+DR+CD38bajo, pero sí depende de la cantidad de células CD34+DR- administrada.
6. El tratamiento con rituximab previo a la aféresis de progenitores hematopoyéticos determina una depleción de linfocitos totales y de linfocitos B, aunque ello no afecta al injerto de granulocitos ni de plaquetas, ni a la reconstitución linfocitaria postrasplante.

REFERENCIAS

1. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N. Mortalidad por Cáncer en España, 1997. Tendencias en los últimos 5 años. Boletín Epidemiológico Semanal 2000; 8 (18): 193-204.
2. International Association of Cancer Registres. [En línea] <http://www-dep.iarc.fr/>. Febrero de 2002.
3. National Cancer Institute. SEER. Cancer Statistics Review 1973-1997.
4. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press; 2008.
5. Warnke RA, Weiss LM, Chan JKC, Cleary ML, Dorfman RF, Tumors of the Lymph nodes and Spleen. En: Rosai J, Sobin LH (eds.). Washington: Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), 1994.
6. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Suárez B, Cárdbaba M, Cerdá T, Salas M. La situación del cáncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo 2005.
7. La situación del cáncer en España. Junio 2009. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.
8. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer incidence in Five Continents. Vol III. IARC Scientific Publication N^o 155. Lyon. IARC: 2002.
9. López Abente G, Pollan M, Aragonés N, Pérez B, Llácer A, Pérez J et al. Tendencias de la mortalidad en España, 1952-1996. Efecto de la edad, de cohorte de nacimiento y del periodo de muerte. Madrid. Instituto de Salud Carlos III, 2002.
10. Marcos-Gragera R, Pollán M, Chirlaque MD, Gumà J, Sanchez MJ, Garau I; Non-Hodgkin's Lymphoma Working Group. Attenuation of the epidemic increase in non-Hodgkin's lymphomas in Spain. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 3:iii90-96.
11. Registro español de linfomas. RELINF. FLL. 2005.
12. Berrino F, Verdecchia A, Lutz JM, Lombardo C, Micheli A, Capocaccia R, the EURO CARE Working Group (Galceran J). Comparative cancer survival information in Europe. *Eur J Cancer*. 2009;45:901-908.
13. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581-592. 2007
14. Vose JM, Chiu BC, Cheson BD, Dancey J, Wright J. Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology (Am.Soc. Hematology. Educ. program)* 2002;241.262.
15. Arranz R. Linfoma no Hodgkin. En: Moraleda JM (ed). *Pregrado de Hematología*. 3^a ed. Madrid:Luzan 5 S.A.; 2011;353-388.

16. Smedby KE, Baecklund E, Askling J. 45.Malignant lymphomas in autoimmunity and inflammation: a review of risks, risk factors, and lymphoma characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 15(11):2069-77.
17. Kirk O, Pedersen C, Cozzi-Lepri A, Antunes F, Miller V, Gatell JM, Katlama C, Lazzarin A, Skinhøj P, Barton SE; EuroSIDA Study Group. Blood. 2001 Dec 1;98(12):3406-12. Non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3406-12.
18. De San José S, Goedert JJ, Marshall V, Bellas C, Benavente Y, Bosch R, Domingo A, Fernandez de Sevilla A, Servitje O, Whitby D. Risk of malignant lymphoma associated with human herpesvirus-8: a case-control study in Spain. *Br J Cancer.* 2004 Jun 1;90(11):2145-8.
19. Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control* 1991; 2(1):37-52.
20. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000 Aug 17;343(7):481-92.
21. Negri E, Little D, Boiocchi M, La Vecchia C, Franceschi S. B-cell non-Hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection: a systematic review. *Int J Cancer.* 2004 Aug 10;111(1):1-8.
22. de San José S, Dickie A, Alvaro T, Romagosa V, Garcia Villanueva M, Domingo-Domenech E, Fernandez de Sevilla A, El-Omar E. Helicobacter pylori and malignant lymphoma in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Jun;13(6):944-8.
23. Goldin LR, Pfeiffer RM, Gridley G, Gail MH, Li X, Møller M, Olsen JH, Hemminki K, Linet MS. Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer.* 2004 May 1;100(9):1902-8.
24. Buckley JD, Meadows AT, Kadin ME, Le Beau MM, Siegel S, Robison LL. Pesticide exposures in children with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer.* 2000 Dec 1;89(11):2315-21.
25. Chiu BC, Cerhan JR, Folsom AR, Sellers TA, Kushi LH, Wallace RB, Zheng W, Potter JD. Diet and risk of non-Hodgkin lymphoma in older women. *JAMA.* 1996 May 1;275(17):1315-21.
26. Chiu BC, Cerhan JR, Gapstur SM, Sellers TA, Zheng W, Lutz CT, Wallace RB, Potter JD. Alcohol consumption and non-Hodgkin lymphoma in a cohort of older women. *Br J Cancer.* 1999 Jul;80(9):1476-82.
27. Freedman DS, Tolbert PE, Coates R, Brann EA, Kjeldsberg CR. Relation of cigarette smoking to non-Hodgkin's lymphoma among middle-aged men. *Am J Epidemiol.* 1998 Nov 1;148(9):833-41.
28. Zhang Y, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Zahm SH, Flynn S, Tallini G, Owens PH, Zheng T. Hair-coloring product use and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study in Connecticut. *Am J Epidemiol.* 2004 Jan 15;159(2):148-54.
29. Zhang Y, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Zahm SH, Owens PH, Morton LM, Zhang B, Zou K, Flynn S, Tallini G, Zheng T. Blood transfusion and risk of non-Hodgkin's lymphoma in Connecticut women. *Am J Epidemiol.* 2004 Aug 15;160(4):325-30.

30. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
31. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30(8):896-904.
32. Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B.P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 2001;7:1028-1034.
33. Chaudhary, P.M. and Roninson, I.B. 1991. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66:85-94.
34. Sales-Pardo, I., Avendaño, A., Martínez-Muñoz, V., García-Escarp, M., Whittle, P., Barquinero, J., Domingo, J.C., Marin, P., and Petriz, J. 2006. Flow cytometry of the side population: Tips and tricks. *Cell Oncol.* 2006;28:37-53.
35. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;159:123-34.
36. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
37. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
38. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz FM, Bonilla S, Cabanes C, Tabares L, Martínez S. Adult stem cell therapy. Dream or reality? *Transplant Immunology* 2006; 17: 74-77.
39. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-77.
40. Reguerio González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune.* 3ª Edición. 2002.
41. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132:631-44.
42. Majado MJ, García de Insausti C, Moraleda JM. Hematopoyesis. En: Moraleda JM (ed). *Pregrado de Hematología.* 3ª ed. Madrid:Luzan 5 S.A.; 2011;15-34.

43. Khanna-Gupta A, Berliner N. Granulocytopoiesis and monocytopoiesis. En Hoffman R (ed). Hematology. Basic principles and practice. Elsevier 2005;289-301.
44. Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, Smith KA, Torbett BE, Salomon DR, Crisa L. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. Blood 2004;104(7):2010-9.
45. Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Schjødt K, Heilmann C, Vindeløv L, Jacobsen N, Dickmeiss E. Pluripotent and myeloid-committed CD34+ subsets in hematopoietic stem cell allografts. Bone Marrow Trasplant 2003;32(12):1125-33.
46. Pastore D, Mestice A, Perrone T, Gaudio F, Delia M, Albano F, Russo Rossi A, Carluccio P, Leo M, Liso V, Specchia G. Subsets of CD34+ and early engraftment kinetics in allogeneic peripheral SCT for AML. Bone Marrow Trasplant 2008;41(11):977-81.
47. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008;111:3941-3967.
48. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. The immune system. Molecular biology of the cell. 3ª ed. New York: Garland Publishing Inc, 1994.
49. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3ª Ed. Philadelphia: Saunders, 1998.
50. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. Nat Rev Immunol. 2002;2:547–56.
51. Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel WD, Andrade LE, Silva NP. 2. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. Rev Bras Reumatol. 2010 Oct;50(5):552-580.
52. Moraleda JM, Tomas JF. Síndromes linfoproliferativos. En: Moraleda JM (ed). Pregrado de Hematología. 3ª ed. Madrid:Luzan 5 S.A.; 2011;305-330.
53. Beutler et al. Williams Hematology. Chapter 5. The Organization and Structure of Lymphoid Tissues The Organization and Structure of Lymphoid Tissues. 8ª Ed. 2010.
54. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. Science 1998; 281 (5373):96-99.
55. MacLennan IC. Germinal centers. Annu Rev Immunol 1994; 12:117-139.
56. Rudin CM, Thompson CB. B cell development and maturation. Semin Oncol 1998; 25(4):435-446.
57. Tiasgbe VK, Inghrami G, Thorbecke GJ. The physiology of germinal centers. Crit Rev Immunol 1996; 16(4):381-421.
58. Miranda RN, Cousar JB, Hammer RD, Collins RD, Vnencak-Jones CL. Somatic mutation analysis of IgH variable regions reveals that tumor cells of most parafollicular (monocytoid) B-cell

lymphoma, splenic marginal zone B-cell lymphoma, and some hairy cell leukemia are composed of memory lymphocytes. *Hum Pathol* 1999; 30(3):306-312.

59. Isaacson PG, Spencer J. Monocytoid B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 1990; 14:888-891.

60. Piris M, Rivas C, Morente M, Cruz M, Rubio C, Oliva H, Monocytoid B-cell lymphoma, a tumor related to the marginal zone. *Histopathology* 1998; 12:383-392.

61. McHeyzer-Williams MG, Immune response decisions at the single cell level. *Semin Immunol* 1997; 9(4):219-227.

62. Oprea M, Perelson AS. Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblast. *J Immunol* 1997; 158(11):5155-5162.

63. Karimi M, Cao TM, Baker JA, Verneris RM, Soares L, Negrin RS. Silencing human NKG2D, DAP10, and DAP12 reduces cytotoxicity of activated CD8+ T cells and NK cells. *J Immunol* 2005; 175:7819-7828.

64. Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genetics* 2005; 1: 129-139.

65. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2006; 117:1-10.

66. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633-640.

67. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* 2006;203(3):633-645.

68. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaëlsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood.* 2010;115:1166-1174."

69. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-44.

70. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675-8.

71. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 619-48.

72. Lopez-Botet M, Bellon T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 301-7.

73. Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol Today* 1998; 19: 153-7.

74. D'Andrea A, Chang C, Phillips JH, Lanier LL. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* 1996; 184: 789-94.
75. Raulet DH. Development and tolerance of natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 129-34.
76. Moretta A, Sivori S, Ponte M, Mingari MC, L Moretta . Stimulatory receptors in NK and T cells. 1998; 230: 15-23.
77. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulins superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995; 268: 405-8.
78. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995; 2: 439-49.
79. Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M, Long EO. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity* 1995; 3: 801-9.
80. D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* 1995; 155: 2306-10.
81. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 2005;201:1025-1029.
82. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006;203:633-645.
83. Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2008. Vol 21, Nº 1:57-65.
84. Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. 2003. The online books page. Acceso: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003.chapter.1.
85. Trowsdale, J., R. Barten, A. Haude, C. A. Stewart, S. Beck, and M. J. Wilson. 2001. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001;181:20 (58)
86. Single RM, Martin MP, Gao X, et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 2007;39:1114-1119.
87. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004;16:626-633.
88. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005;5:201-214.

89. Storkus WJ, Alexander J, Payne JA, Cresswell P, Dawson JR. The alpha 1/alpha 2 domains of class I HLA molecules confer resistance to natural killing. *J Immunol* 1989;143:3853-3857.
90. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T, et al. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 1996; 4: 77-85.
91. Olcese L, Lang P, Vely F, Cambiaggi A, Marguet D, Blery M, et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1996; 156: 4531-4.
92. Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997; 6: 655-61.
93. Vivier E, Daeron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 1997; 18: 286-91.
94. Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daeron M. Differential roles of N- and C-terminal immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs during inhibition of cell activation by killer cell inhibitory receptors. *J Immunol* 1999; 162: 3168-75.
95. Saxena RK. Ontogeny of inhibitory receptors for MHC molecules on NK cells. *Immunol Today* 1997;18:146. 13.
96. Borrego F. The first molecular basis of the "missing self" hypothesis. *J Immunol* 2006;177:5759-5760.
97. Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A, Slavcev A. Distribution of KIR genes in the Czech population. *Int J Immunogenet* 2008;35:57-61.
98. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 1995; 181: 1133-44.
99. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 1994; 180: 537-43.
100. Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, Di Donato C, et al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 1996; 184: 505-18.
101. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 1996; 156: 3098-101.
102. Rajagopalan S, Long EO. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med* 1997; 185: 1523-8.

103. Peruzzi M, Wagtmann N, EO Long. A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLAB* 2705. *J Exp Med* 1996; 184: 1585-90.
104. Malnati MS, Peruzzi M, Parker KC, Biddison WE, Ciccone E, Moretta A, et al. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 1995; 267: 1016-8.
105. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-251.
106. Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 2006;214:186-201.
107. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005;5:226-240.
108. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002;31:429-434.
109. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004;173:4273-4276.
110. Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003;52:2639-2642.
111. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002: 295:2097-2100.
112. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 2002;100:3825-3827.
113. McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol* 2007;68:309-323.
114. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333-339.
115. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Haploidentical transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev* 2006;214:202-218.
116. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: Challenging its predictive value. *Blood* 2007;110:433-440.
117. Smith HRC, Heusel JW, Mehta IK, et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8826-8831.

118. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996;157: 4741-45.
119. Carretero M, Cantoni C, Bellon T, Bottino C, Biassoni R, Rodriguez A, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27: 563-7.
120. Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* 1997;185: 795-800.
121. Chang C, Rodríguez A, Carretero M, López-Botet M, Phillips JH, Lanier LL. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2443-7.
122. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991; 173: 1017-20.
123. Yabe T, McSherry C, Bach FH, Fisch P, Schall RP, Sondel PM, et al. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* 1993; 37: 455-60.
124. Plougastel B, Jones T, Trowsdale J. Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics* 1996; 44: 286-91.
125. Carretero M, Palmieri G, Llano M, Tullio V, Santoni A, Geraghty DE, et al. Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1280-91.
126. Le Drean E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, Krystal G, et al. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 1998; 28: 264-76.
127. Cantoni C, Biassoni R, Pende D, Sivori S, Accame L, Parati L, et al. The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene. *Eur J Immunol* 1998; 28: 327-38.
128. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998; 8: 693-701.
129. Lopez-Botet M, Carretero M, Bellon T, Perez-Villar JJ, Llano M, Navarro F. The CD94/NKG2 C-type lectin receptor complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;230: 41-52.
130. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391: 795-9.
131. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived

- peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998; 187: 813-8.
132. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5199-204.
133. Lopez-Botet M, Llano M, Navarro F, Bellon T. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol* 2000; 12: 109-19.
134. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285: 730-2.
135. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285: 727-9.
136. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 359-93.
137. Colonna M, Nakajima H, Navarro F, Lopez-Botet M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 375-81.
138. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1809-18.
139. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4778-83.
140. Wagtmann N, Rojo S, Eichler E, Mohrenweiser H, Long EO. A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. *Curr Biol* 1997; 7: 615-8.
141. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 1997; 155: 53-65.
142. Vivier E, Daron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 1997; 18: 286-91.
143. F. Navarro y M. López-Botet. Receptores de células NK específicos para moléculas HLA de clase I. *Inmunología*, 2001; vol 20; Nº 1: 38-48
144. Moraleda JM, Iniesta F, Sanchez-Salinas A. Trasplante de progenitors hematopoyéticos. En: Moraleda JM (ed). *Pregrado de Hematología*. 3ª ed. Madrid:Luzan S.A.; 2011;481-516.
145. Powles R,ni S, Singhai S, Treleaven J, Kulkarni S, Horton C, Metha J. Identification of patients who may benefit from prophylactic immunotherapy after bone marrow transplantation for acute

- myeloid leukemia on the basis of lymphocyte recovery after transplantation. *Blood* 1998; 91: 3481-3486.
146. Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ et al. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1998;21: 33–41.
147. Porrata LF, Gertz MA, Inwards DJ, Litzow MR, Lacy MQ, Tefferi A, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood*; 2001; 98:579-85.
148. Porrata LF, Ingle JN, Litzow MR, Geyer S, Markovic SN. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:865-871.
149. Kim H, Sohn HJ, Kim S, Lee JS, Kim WK, Suh C. Early lymphocyte recovery predicts longer survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37:1037-42.
150. Gordan LN, Sugrue MW, Lynch JW, Williams KD, Khan SA, Moreb JS. Correlation of early lymphocyte recovery and progression-free survival after autologous stem-cell transplant in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:1009-13.
151. Porrata LF, Inwards DJ, Micallef IN, Ansell SM, Geyer SM, Markovic SN. Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *Br Journal Haematol* 2002; 117:629-33.
152. Rajkumar SV, Fonseca R, Lacy MQ, et al. Autologous stem cell transplantation for relapsed and primary refractory myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:1267-1272.
153. Rajkumar SV, Fonseca R, Lacy MQ, et al. Beta2-microglobulin and bone marrow plasma cell involvement predict complete responders among patients undergoing blood cell transplantation for myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:1261-1266.
154. Neben S, Hellman S, Montgomery M, Ferrara J, Mauch P, Hellman S. Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol*. 1993;21:156-162.
155. Domenech J, Roingeard F, Binet C. The mechanisms involved in the impairment of hematopoiesis after autologous bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma*. 1997;24:239-256.
156. Schrama JG, Rodenhuis S, De Gast GC. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31:141-142.
157. Hartmann F, Renner C, Jung W, Deisting C, Juwana M, Eichtopf B, Kloft M, Pfreundschuh M. Treatment of Refractory Hodgkin's Disease With an Anti-CD16/CD30 Bispecific Antibody . *Blood*, Mar 1997; 89: 2042 - 2047.

158. Porrata LF, Litzow MR, Tefferi A et al. Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1311–1318.
159. Gordan LN, Sugrue MW, Lynch JW, Williams KD, Khan SA, Moreb JS. Correlation of early lymphocyte recovery and progression-free survival after autologous stem-cell transplant in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:1009-13.
160. Barrett AJ, Ringden O, Zhang MJ et al. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood* 2000; 95: 3323–3327.
161. Kim H, Sohn HJ, Kim S, Lee JS, Kim WK, Suh C. Early lymphocyte recovery predicts longer survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37:1037-42.
162. Porrata LF, Gertz MA, Litzow MR, Lacy MQ, Dispenzieri A, Inwards DJ et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with primary systemic amyloidosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1210–1218.
163. Yoong Y, Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Litzow MR, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Gastineau DA, Tefferi A, Elliott M, Snow DS, Hogan WJ, Markovic SN. The effect of absolute lymphocyte count recovery kinetics on survival after autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2005 Sep;46(9)1287-94.
164. Joao C, Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Gastineau DA, Markovic SN. Early lymphocyte recovery after autologous stem cell transplantation predicts superior survival in mantle-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2006 May;37(9):865-71.
165. Kim H, Sohn HJ, Kim SE, Kang HJ, Park S, Kim S, Kim WK, Lee JS, Suh C. Lymphocyte recovery as a positive predictor of prolonged survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Jul;34(1):43-9.
166. Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Gastineau DA, Litzow MR, Winters JL, Markovic SN. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma: a prospective study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jul;14(7):807-16.
167. Oliveira MR, Hyashi M, Magalhaes-Silverma M et al. Early lymphocyte recovery predicts for progression-free survival (PFS) in Hodgkin lymphoma (HL) patients following autologous stem cell transplant (ASCT) using the same ablative regimen. *Blood* 2002; 100 (Suppl.) (Abstr. 2551).
168. Herr AI, Edwardes MD, Lachance S et al. Predictive factors of early lymphocyte recovery after autologous stem cell transplantation in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002; 100 suppl (Abstr. #5496).
169. Boulassel MR, Herr AL, deB Edwardes MD, Galal A, Lachance S, Laneuville P, Routy JP. Early lymphocyte recovery following autologous peripheral stem cell transplantation is associated with

better survival in younger patients with lymphoproliferative disorders. *Hematology*. 2006 Jun;11(3):165-70.

170. Nieto Y, Jones RB, Bearman SI et al. Prognostic analysis of the early lymphocyte recovery in patients (PTS) with advanced breast cancer receiving high-dose chemotherapy (HDC) with an autologous hematopoietic progenitor cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9:72 (Abstr. 30).

171. Ferrandina G, Pierelli L, Perillo A et al. Lymphocyte recovery in advanced ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell plus growth factor support: clinical implications. *Clin Cancer Res* 2003; 9:195–200.

172. Pierelli L, Perillo A, Ferrandina G et al. The role of growth factor administration and T-cell recovery after peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of solid tumors: results from a randomized comparison of G-CSF and GM-CSF. *Transfusion* 2001; 41: 1577–1585.

173. Seshadri T, Pintilie M, Keating A, Crump M, Kuruvilla J. The relationship between absolute lymphocyte count with PFS in patients with Hodgkin's lymphoma undergoing autologous hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42:29-34.

174. D Tiwari, F Gao, J Hidalgo, DR Adkins, R Vij, JF DiPersio and HJ Khoury. Prognostic significance of early lymphocyte recovery after post-autografting administration of GM-CSF in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Oct;40(7):671-5.

175. Porrata LF, Litzow MR, Inwards DJ, Gastineau DA, Moore SB, Pineda AA, et al. Infused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count correlates with day 15 absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33:291-8.

176. Porrata LF, Gertz MA, Geyer SM, Litzow MR, Gastineau DA, Moore SB, et al. The dose of infused lymphocytes in the autograft directly correlates with clinical outcome after autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia* 2004; 18:1085-92.

177. Katipamula R, Porrata LF, Gastineau DA, Markovic SN, Moore SB, Greiner C, et al. Apheresis instrument settings influence infused absolute lymphocyte count affecting survival following autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma: the need to optimize instrument setting and define a lymphocyte collection target. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37:811-7.

178. Holtan SG, Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Litzow MR, Gastineau DA, Markovic SN. Timing of autologous stem cell transplantation from last chemotherapy affects lymphocyte collection and survival in non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2006 Jun;133(6):628-33.

179. Rosillo MC, Ortuño F, Moraleda JM, Lozano ML, Heras I, Arriba F, Vicente V. Immune recovery after autologous bone marrow or rhG-CSF primed PBSC transplantation. *European J Hematol* 1996;56:301-307.

180. Weaver CH, Hazelton B, Birch R et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995; 86: 3961–3969.
181. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2547–2555.
182. Ketterer N, Salles G, Raba M, Espinouse D, Sonet A, Tremisi P, Dumontet C, Moullet I, Eljaafari-Corbin A, Neidhardt-Berard EM, Bouafia F, and Coiffier B. High CD34⁺ Cell Counts Decrease Hematologic Toxicity of Autologous Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation. *Blood*, Vol 91, No 9 (May 1), 1998: pp 3148-3155.
183. Rutella S, Rumi C, Laurenti L, Pierelli L, Sora' F, Sica S, Leone G. Immune reconstitution after transplantation of autologous peripheral CD34⁺ cells: analysis of predictive factors and comparison with unselected progenitor transplants. *British Journal of Haematology*, 2000; 108: 105-115.
184. Pecora AL. Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(suppl 2):S7–S12.
185. Archimbaud E, Philip I, Coiffier B et al. Selected autologous peripheral blood CD34⁺ Thy-1⁺ Lin⁻ hematopoietic stem cell (HSC) transplantation in multiple myeloma. *Blood* 1997;90 (Suppl.): 394a.
186. Pecora AL, Preti RA, Gleim GW et al. CD34⁺CD33⁻ cells influence days to engraftment and transfusions requirements in autologous blood stem cell recipients. *J Clin Oncol* 1998;16: 2093–2104.
187. Porrata LF, Litzow MR, Markovic SN. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Mayo Clinic Proc* 2001; 76: 407–412.
188. Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, Varney M, Jackson J, Vose JM, Bierman PJ. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 161–172.
189. Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, Printz D, Buchinger P, Fischmeister G, Hoecker P, Gadner H. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 1996 Feb;17(2):169-78.
190. Koehne G, Zeller W, Stocksclaeder M, Zander AR. Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 149–156.
191. Kook H, Goldman F, Padley D, Giller R, Rumelhart S, Holida M, Lee N, Peters C, Comito M, Huling D, Trigg M. 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.

192. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood* 1994; 84: 2221–2228.
193. San Miguel JF, Hernandez MD, Gonzalez M, Lopez Berges MC, Caballero MD, Vazquez L, Orfao A, Nieto MJ, Corral M and del Canizo MC. A randomized study comparing the effect of GM-CSF and G-CSF on immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation. *British Journal of Haematology*, 1996;94: 140-147.
194. Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA. Natural killer cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *J Immunol* 1985; 134: 3798–3801.
195. Hackett J, Bosma GC, Bosma MJ. Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 93: 3427–3431.
196. MacDonald HR, Blanc C, Lees RK and Sordat B. Abnormal distinction of T cell subsets in athymic mice. *Journal of Immunology*, 1986; 136: 4337-4339.
197. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, and Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood*, 1993; 82: 2585-2594.
198. Porrata LF, Gastineau DA, Padley D, Bundy K, Markovic SN. Re-infused autologous graft natural killer cells correlates with absolute lymphocyte count recovery after autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2003 Jun;44(6):997-1000.
199. Verbik DJ, Jackson JD, Pirruccello SJ, Patii KD, Kessinger A and Josbi SS. Functional and phenotypic characterization of human peripheral blood stem cell harvests: a comparative analysis of cells from consecutive collections. *Blood* 2005;85(7), 1964-1970.
200. Hiwase DK, Hiwase S, Bailey M, Bollard G, Schwarer AP. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jan;14(1):116-24.
201. Behl D, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, Inwards DJ, White WL, Ansell SM, Micallef IN, Jonhson PB, Porrata LF. Absolute lymphocyte count predicts therapeutic efficacy of rituximab therapy in follicular lymphomas. *Br Journal Haematol* 2007;137:409-415.
202. Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, Inwards DJ, White WL, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Call TG and Porrata LF. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br Journal Haematol* 2006; 134:596-601.
203. Kim DH, Baek JH, Chae YS, Kim YK, Kim HJ, Park YH, Song HS, Chung JS, Hyun MS, Sohn SK. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B- cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:2227-30.
204. Plonquet A, Haioun C, Jais JP, Debard AL, Salles G, Bene MC, Feugier P, Rabian C, Casasnovas O, Labelette M, Kuhlein E, Farcet JP, Emilie JF, Gisselbrecht C. peripheral blood natural killer cell count

is associated with clinical outcome in patients with aalPI 2-3 diffuse large B-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 2007;18:1209-1215.

205. Cox M, Nofroni I, La Verde G, Ferrari A, Amodeo R, Tatarelli C, Saltarelli F, Veggia B, Aloe-Spiriti MA, Ruco L, Monarca B. Absolute lymphocyte count is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Br Journal Haematol* 2008; 141:260-273.

206. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17:1244-1253.

207. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosemberg SA, Coltman CA and Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Costwolds meeting. *J Clin Oncol.* 1989; 7:1630-1636.

208. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M et. al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996; (5): 213-26.

209. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.

210. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc (B)* 1972; 34: 187-202.

211. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolte JA. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*, 2004, 15;104(6):1648-55.

212. Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, Morabito P, Abate G, Gorrese M, Raia M, Pascariello C, Scalia G, Gemei M, Mariotti E, Del Vecchio L. Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiol.* 2008;May 29;8:13.

213. Götze KS, Schiemann M, Marz S, Jacobs VR, Debus G, Peschel C, Oostendorp RA. CD133-enriched CD34(-) (CD33/CD38/CD71)(-) cord blood cells acquire CD34 prior to cell division and hematopoietic activity is exclusively associated with CD34 expression. *Exp Hematol.* 2007 Sep;35(9):1408-14.

214. Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 2003;101(3):869-76.

215. Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Führer M, Weinstock C, Handgretinger R, Kuci S, Martin D, Niethammer D, Greil J. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol.* 2004;124(1):72-9.

216. De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B, Kerre T, Taghon T, Plum J. T lymphoid differentiation potential measured in vitro is higher in CD34+CD38-/lo hematopoietic stem cells from umbilical cord blood than from bone marrow and is cell intrinsic. *Haematologica.* 2011;96(5):646-54.

217. Jaime-Pérez JC, Hernández-Alcántara AE, Méndez-Ramírez N, Vázquez-Garza E, Cantú-Rodríguez OG, Gómez-Almaguer D. Mobilization kinetics of CD133+ hematopoietic stem cells for hematopoietic grafting. *Transfusion* 2009;49(3):532-5.
218. Kamel AM, El-Sharkawy N, Mahmoud HK, Khalaf MR, Haddan AE, Fahmy O et al. Impact of CD34 subsets on engraftment kinetics in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:129–136.
219. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, Ando K. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*. 2008;26(12):3228-36.
220. Taraldsrud E, Grøgaard HK, Solheim S, Lunde K, Fløisand Y, Arnesen H, Seljeflot I, Egeland T. Age and stress related phenotypical changes in bone marrow CD34+ cells. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 2009;69(1):79-84.
221. Berardi, A.C., Meffre, E., Pflumio, F., Katz, A., Vainchenker, W., Schiff, C. & Coulombel, L. Individual CD34⁺CD38^{low} CD19⁻CD10⁻ progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. *Blood* 1997;89, 3554–3564.
222. Carayol, G., Robin, C., Bourhis, J.-H., Chouaib, S., Coulombel, L. & Caignard, A. Natural killer cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions. *European Journal of Immunology* 1998;28, 1991–2002.
223. Robin C, Bennaceur-Griscelli A, Louache F, Vainchenker W and Coulombel L. Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34⁺CD38^{low} and CD34⁺CD38⁺ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *British Journal of Haematology*, 1999, 104, 809–819.
224. Storb R, Champlin R, Riddell S, Murata M, Bryant S, Warren E. Nonmyeloablative transplant for malignant disease. *Hematology* 2001;1:375-91.
225. Van de Brink M IRM, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem cell transplantation. *Immunology* 2002;2:273-81.
226. Van Besien KW, Khouri IF, Giralt SA. Allogeneic bone marrow transplantation for refractory and recurrent low grade lymphoma: the case for aggressive management. *J Clin Oncol* 1995;13:1096-102.
227. T. Papajik, Z. Pikalova, L. Raida, I. Skoumalova, J. Vondrakova, E. Faber, V. Prochazka, Z. Kubova, L. Kucerova, T. Pavlik, L. Dusek, K. Indrak. Rituximab does not adversely affect the stem cell mobilization and engraftment after high-dose therapy and autologous transplantation in patients with diffuse large B-cell lymphoma in first complete or partial remission. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009 Sep; 153(3):211–214.
228. Kamezaki K, Kikushige Y, Numata A, Miyamoto T, Takase K, Henzan H, et al. Rituximab does not compromise the mobilization and engraftment of autologous peripheral blood stem cells in diffuse-large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39: 523–7.

229. Botto B, Vitolo U, Cortelazzo S, Chiappella A, Allione B, Angelucci E, et al. Pre-Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) Treatment with Rituximab Does Not Impair Stem Cell Harvest and Engraftment in Untreated Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (B-DLCL) at Poor Prognosis. *Blood* 2005; 106:2738a.
230. Hosing C, Saliba RM, Korbling M, Acholonu S, McMannis J, Anderlini P, et al. High-dose rituximab does not negatively affect peripheral blood stem cell mobilization kinetics in patients with intermediate-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1290–4.
231. Kasamon YL, Jones RJ, Brodsky RA, Fuchs EJ, Matsui W, Luznik L, Powell JD, Blackford AL, Goodrich A, Gocke CD, Abrams RA, Ambinder RF, Flinn IW. Immunologic recovery following autologous stem-cell transplantation with pre- and posttransplantation rituximab for low-grade or mantle cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2010 Jun;21(6):1203-10. Epub 2009 Oct 30.
232. Benekli M, Hahn T, Shafi F, Qureshi A, Alam AR, Czuczman MS, Bernstein ZP, Chanan-Khan AA, Becker JL, McCarthy PL. Effect of rituximab on peripheral blood stem cell mobilization and engraftment kinetics in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Jul;32(2):139-43.
233. DS Allan, M Keeney, K Howson-Jan, J Popma, K Weir, M Bhatia, DR Sutherland and IH Chin-Yee. Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2002) 29, 967–972.
234. Lee S, Kim S, Kim H, Baek EJ, Jin H, Kim J, Kim HO. Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 2008 Feb; 94(2):146-52.
235. Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K, Troff C, Hiddemann W, Köhler M, Wörmann B. Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion* 1997 Oct;37(10):1050-7.
236. Jansen EM, Hanks SG, Terry C, Akard LP, Thompson JM, Dugan MJ, Jansen J. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit-granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion.* 2007 May;47(5):817-23.
237. Fu SQ, Abboud CN, Brennan JK, Ifthikharuddin JJ, Nichols D, Liesveld JL. Impact of mobilized blood progenitor cell quality determined by the CFU-GM/CD34+ ratio on rapid engraftment after blood stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2002 May-Jun;28(3):315-21.
238. Abrahamsen JF, Wentzel-Larsen T, Bruserud O. Autologous transplantation: the viable transplanted CD34+ cell dose measured post-thaw does not predict engraftment kinetics better than the total CD34+ cell dose measured pre-freeze in patients that receive more than 2x10(6) CD34+ cells/kg. *Cytotherapy.* 2004;6(4):356-62.

DIFUSIÓN DE TRABAJOS CIENTIFICOS RELACIONADOS.

1. Influencia del recuento linfocitario previo a la recolección de progenitores hematopoyéticos de s.p. en pacientes con enfermedad de Hodgkin (EH) y linfoma no Hodgkin (LNH) sometidos a autotrasplante de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH).

E. Salido, M^ªJ. Majado, M^ªI. Macizo, M. Berenguer, A. García-Hernández, J. Monserrat, F. García-Candel, JM^ª. Moraleda y A. Morales. XXIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia y XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia, Murcia, 23, 24 y 25 de Octubre de 2008.

2. Study of the relationship of product infused with survival in in patients with Hodgkin's Disease and No Hodgkin's Lymphoma undergoing Autologus Stem Cell Transplantation. E.

Salido. 50th annual meeting. American Society of Hematology. December 6-9 2008. San Francisco. Abstract nº 4443.

3. Factores relacionados con la recuperación linfocitaria precoz en pacientes con enfermedad de Hodgkin (EH) y linfoma no Hodgkin (LNH) sometidos a autotrasplante de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH). E. Salido, MJ^ª. Majado, MI^ª. Macizo, A. García-

Hernández, M. Berenguer, J. Monserrat, F. García-Candel, JM^ª. Moraleda y A. Morales. XXIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia y XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia, Murcia, 23, 24 y 25 de Octubre de 2008.

4. Correlation of infused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count and survival after autologus stem cell trasplantation in patients with Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. E. Salido, M.J. Majado, A. Minguela, M^ª. I.Macizo, M.V. Sánchez-

Martínez, C. García-Insausti, A. Morales, J.M. Moraleda. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia. XIII Congreso Internacional de la Asociación Europea de Hematología. Copenague (Dinamarca), 12 al 15 de Junio de 2008.

5. Large-Volume-Apheresis Facilitates Autologus Transplantation of Hematopoietic Progenitors in Poor Mobilizer Patients. María Juliana Majado, Alfredo Minguela, Consuelo

González, Eduardo Salido, Miguel Blanquer, Consuelo Funes, Carmen Luisa Insausti, Ana María García Hernández, Jose María Moraleda y Alfonso Morales. *Journal of Clinical Apheresis* 24:12-17 (2009).

6. Study of the effect of temperature in pre-freezing overnight storage in 268 autologous leukapheresis products.

M.López, M.Majado, M. Blanquer, A. Sánchez-salinas, E. Salido, C. Funes, C. González-García, P.Menchon, V. Sánchez-Ibáñez, V. Cabañas-Perianes, C. García-Insausti, JM. Moraleda. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia. XVI Congreso Internacional de la Asociación Europea de Hematología. London (UK), June 9-12, 2011.