

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



**PROGRAMA DE DOCTORADO BIOQUÍMICA CLÍNICO-MÉDICA
E INMUNOLOGÍA**

**Estudio de la reconstitución inmunológica en pacientes
con neoplasias hematológicas sometidos a trasplante
de sangre de cordón umbilical**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Lourdes Cordón Gallego

Dirigida por:

**Prof. Miguel A. Sanz Alonso
Dr. Guillermo F. Sanz Santillana
Dra. Amparo Sempere Talens**

MIGUEL ÁNGEL SANZ ALONSO, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

GUILLERMO SANZ SANTILLANA, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Jefe de Sección de Hematología Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

AMPARO SEMPERE TALENS, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Médico Adjunto Especialista en Hematología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

INFORMAN

Que la tesis doctoral titulada: “**Estudio de la reconstitución inmunológica en pacientes con neoplasias hematológicas sometidos a trasplante de sangre de cordón umbilical**” ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Lourdes Cordón Gallego**, Licenciada en Ciencias Biológicas y Bioquímica, y reúne, a nuestro juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctor por la Universidad de Valencia

En Valencia a 15 de octubre de 2015

Prof. Miguel A. Sanz Alonso Dr. Guillermo Sanz Santillana Dra. Amparo Sempere Talens

*A mi madre, por legarme mucho
más de lo que jamás ni ella ni yo
pensamos*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento al Profesor Miguel Ángel Sanz, al Dr. Guillermo Sanz y a la Dra. Amparo Sempere por dirigir mi tesis. Miguel, es un privilegio formar parte del gran equipo de investigación que diriges; Guillermo, gracias por introducirme en el mundo de la inmunología del trasplante; Amparo, gracias por tus enseñanzas en citometría y hematología, por tu apoyo y por confiar tanto en mí todos estos años.

Esta tesis no habría sido posible sin la inestimable y desinteresada ayuda de Jaime Sanz e Ignacio Lorenzo. Jaime, te considero un gran profesional y una extraordinaria persona; gracias por orientarme en el desarrollo de este proyecto y regalarme tu tiempo tantísimas tardes. Ignacio, gracias por tu valiosa colaboración para la realización del análisis estadístico, por tu disponibilidad y tu paciencia.

Mi reconocimiento a la labor del excelente equipo técnico del Laboratorio de Citometría de Flujo del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Pilar, Amparo, Inma y Concha: además de ser las compañeras que muchos quisieran, os considero mis amigas.

Gracias a M^a Luz Pérez, Isidro Jarque, Rafa Andreu, Fede Gomis y Malé Senent por sus consejos y su comprensión; a Rebeca Rodríguez, María López, Mariam Ibáñez, María Noel Tamaño y Fede Moscardó por escucharme, aconsejarme y ser grandes pilares de apoyo; a Marta Parra, Marta Llop, Blanca Boluda, Samuel Romero e Irene Luna por sus ánimos; a Teresa Vilanova, Elena Herrero, Juan Carlos Marín, Patricia Ruiz, Alma Queralt y Celia Domingo por haber sido mis manos en algún momento; y al resto de integrantes de la Unidad de Diagnóstico Hematológico y del Servicio de Hematología del Hospital.

Alice, Cecilia, Jaume, David, Isabel, Tatiana: vuestra amistad incondicional es uno de los tesoros más grandes que tengo, y para la elaboración de esta tesis ha sido muy necesaria. Gracias a mi padre, por haberme inculcado constancia; a mi hermano Luis, por ayudarme a ver la vida con más claridad; y a Edie, por su infinita paciencia conmigo, por darme paz y por aportarme equilibrio al estilo *Le Châtelier*.

Por último, gracias a todos los pacientes incluidos en este estudio por su contribución para que, aunque más despacio de lo que quisiéramos, la ciencia y la medicina avancen.

TABLA DE CONTENIDOS

<u>SECCIÓN</u>	<u>PÁGINA</u>
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El sistema inmunológico	13
1.1.1. Respuesta inmunitaria natural y específica	14
1.1.2. Inmunidad humoral y celular.....	15
1.1.3. Anatomía de la respuesta inmunitaria	15
1.2. El trasplante de sangre de cordón umbilical como alternativa real de trasplante de progenitores hematopoyéticos	17
1.2.1. Desarrollo del trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado	17
1.2.2. Desarrollo del TSCU.....	18
1.2.3. Ventajas y limitaciones del TSCU.....	18
1.2.4. Inmunidad en TSCU	20
1.2.5. Factores que afectan a la reconstitución inmunológica postrasplante	21
1.2.6. Complicaciones postrasplante relacionadas con la inmunodepresión	21
1.3. Papel de la citometría de flujo en el estudio de la reconstitución inmunológica ..	26
1.3.1. Poblaciones linfocitarias de sangre periférica	28
1.3.2. Evaluación de la reconstitución inmunológica postrasplante	28
1.4. Dinámica de la reconstitución inmunológica postrasplante	32
1.4.1. Neutrófilos, monocitos y células dendríticas.....	34
1.4.2. Células Natural Killer	35
1.4.3. Células T.....	35
1.4.4. Células T reguladoras.....	39
1.4.5. Círculos de escisión del receptor de células T	39
1.4.6. Células B	40
2. HIPÓTESIS	43
3. OBJETIVOS	47
4. PACIENTES Y MÉTODOS	51

4.1. Pacientes	53
4.2. Selección de la unidad de SCU	53
4.3. Tipificación HLA de los pacientes y los donantes	54
4.4. Hemograma, bioquímica y serología	54
4.5. Estudios de citometría de flujo multiparamétrica	54
4.5.1. Estudio automatizado de poblaciones linfocitarias.....	57
4.5.2. Estudio manual de poblaciones linfocitarias.....	61
4.6. Recuento de células progenitoras hematopoyéticas por citometría de flujo	66
4.7. Indicación del tipo y las características del TSCU	67
4.8. Regímenes de acondicionamiento	67
4.9. Manejo clínico de la EICH	69
4.10. Cuidados de soporte	69
4.11. Definiciones	69
4.11.1. Injerto mieloide.....	69
4.11.2. Injerto plaquetar.....	70
4.11.3. Fallo de injerto.....	70
4.11.4. Enfermedad injerto-contra-huésped aguda y crónica.....	70
4.12. Clasificación del estado de la enfermedad al TSCU	70
4.13. Recolección, almacenamiento y gestión de los datos	70
4.14. Análisis estadístico	71
5. RESULTADOS	73
5.1. Serie global	75
5.1.1. Características de los pacientes.....	75
5.1.2. Características de las unidades de SCU y del procedimiento del trasplante.....	77
5.2. Estudio descriptivo de las poblaciones	79
5.2.1. Estudio automático de las poblaciones linfocitarias.....	79
5.2.2. Estudio manual de poblaciones linfocitarias.....	86
5.3. Análisis de factores pronóstico de la reconstitución inmunológica	99
5.3.1. Variables asociadas a las características de los pacientes o de la enfermedad de base	99

5.3.2. Variables asociadas a las características y la celularidad de las unidades de SCU	101
5.3.3. Variables asociadas al procedimiento de TSCU	104
5.4. Impacto de la reconstitución inmunológica sobre la mortalidad relacionada con el trasplante y la supervivencia global.....	106
5.4.1. Mortalidad relacionada con el trasplante	106
5.4.2. Supervivencia global.....	111
6. DISCUSIÓN.....	117
7. CONCLUSIONES.....	133
8. BIBLIOGRAFÍA.....	137

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- 7-AAD:** 7-aminoactinomicina D
- AcMos:** anticuerpos monoclonales
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- Alo-TPH:** trasplante alógeno de progenitores hematopoyéticos
- APC:** alofocianina
- APCCy7:** alofocianina con cianina 7 en tándem
- APCH7:** alofocianina con cianina H7 en tándem
- ATG:** antitumoglobulina
- CD:** grupo o *cluster* de diferenciación
- CFM:** citometría de flujo multiparamétrica
- CFU-GM:** unidades formadoras de colonias granulomonocíticas
- CI:** incidencia acumulada
- CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad
- CMV:** citomegalovirus
- CNT:** celularidad nucleada total
- CPA:** célula presentadora de antígenos
- CPH:** células progenitoras hematopoyéticas
- CSA:** ciclosporina A
- CSF:** factor estimulante de colonias
- DNE:** donante no emparentado
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EH:** enfermedad de Hodgkin
- EICH:** enfermedad injerto contra huésped
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- FLC:** fluorocromo
- FSC:** *forward scatter component*
- G-CSF:** factor estimulante de colonias granulocíticas
- HLA:** antígeno leucocitario humano
- IFN:** interferón
- Ig:** inmunoglobulina
- IL:** interleuquina
- ISHAGE:** *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*
- KIR:** *killer cell immunoglobulin-like receptor*
- LLA:** leucemia aguda linfoblástica

- LMA:** leucemia aguda mieloblástica
- LMC:** leucemia mieloide crónica
- LNH:** linfoma no Hodgkin
- MALT:** tejido linfoide asociado a mucosas
- MFM:** micofenolato mofetil
- MRT:** mortalidad relacionada con el trasplante
- NK:** *natural killer*
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PE:** ficoeritrina
- PerCP:** proteína peridín clorofila
- PerCPCy5.5:** proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem
- PECy7:** ficoeritrina con cianina 7 en tándem
- RAN:** recuento absoluto de neutrófilos
- RCT:** receptor de células T
- REDMO:** Registro Español de Donantes de Médula Ósea
- SCU:** sangre de cordón umbilical
- SG:** supervivencia global
- SLPPT:** síndrome linfoproliferativo postrasplante
- SMD:** síndrome mielodisplásico
- SMPC:** síndrome mieloproliferativo crónico
- SSC:** *side scatter component*
- TA:** temperatura ambiente
- TNF:** factor de necrosis tumoral
- TRECs:** círculos de escisión del receptor de células T
- Tregs:** células T reguladoras
- TSCU:** trasplante de sangre de cordón umbilical
- VEB:** virus de Epstein-Barr
- VHS:** virus del herpes simple
- VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sistema inmunológico

El conjunto de tejidos, células y moléculas responsables de la inmunidad que protegen al organismo frente a una amplia variedad de sustancias extrañas, patógenos y enfermedades distinguiéndolos de las células propias se denomina sistema inmunológico. En términos funcionales, la respuesta inmunitaria consiste inicialmente en el reconocimiento de los patógenos o las células extrañas que son discriminadas de las propias, y en el reclutamiento de células y moléculas efectoras para eliminar o neutralizar los agentes exógenos de forma específica. La exposición repetida al mismo tipo de patógeno o célula extraña induce una respuesta de memoria que se caracteriza por una reactividad incrementada para eliminar estas sustancias y prevenir la enfermedad.

La médula ósea y el timo constituyen los órganos linfoides primarios. En la médula ósea se produce la diferenciación y la maduración de las células del sistema inmunológico en un proceso denominado hematopoyesis. Las células troncales pluripotentes localizadas en la médula ósea dan lugar a los leucocitos, que incluyen los elementos finales de la línea de diferenciación linfoide y mieloide. A través de la linfopoyesis se producen las células *natural killer* (NK), los linfocitos T y los linfocitos B. Las células NK son responsables de la inmunidad innata y su función es destruir las células tumorales o las infectadas por virus mediante un mecanismo de citotoxicidad natural o dependiente de anticuerpos. Las células NK liberan sus gránulos provocando la lisis celular induciendo la apoptosis de las células a través de la activación de la cascada de proteasas caspasas y de la liberación de citoquinas secundaria a su estimulación por diferentes vías. Los linfocitos T y B son los responsables de la inmunidad adaptativa. Su principal función en el organismo es distinguir lo propio de lo extraño para articular los mecanismos de defensa del cuerpo y protegerlo frente a las infecciones. Los linfocitos B maduran en la médula ósea, mientras que los linfocitos T lo hacen en el timo que se encuentra estructurado en una serie de lóbulos formados por células epiteliales que definen las zonas cortical y medular proporcionando un microambiente adecuado para su diferenciación. Los linfocitos maduros recirculan continuamente desde el torrente sanguíneo hacia los órganos linfoides periféricos o secundarios, para retornar a la sangre periférica a través de los vasos linfáticos. La capacidad de los linfocitos de reconocer antígenos mediante receptores específicos se adquiere en el timo (Roitt, 2008). La mayoría de las respuestas inmunitarias adaptativas son iniciadas cuando una célula T recirculante reconoce un antígeno extraño localizado específicamente en la superficie de una célula dendrítica.

La mielopoyesis produce la diferenciación de todos los elementos celulares que integran las series eritroblástica, granulopoyética, monocítica y megacariocítica (Woessner *et al*, 2006) que participan tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Los neutrófilos, eosinófilos y basófilos se encuentran en la circulación sanguínea actuando como células efectoras en los lugares donde se desarrolla la respuesta a la infección o inflamación. Los macrófagos y mastocitos completan su diferenciación en los tejidos, ejerciendo su función como células efectoras en la primera línea de defensa del organismo e iniciando la respuesta inflamatoria. Los macrófagos son responsables de la fagocitosis bacteriana y de la captación de los neutrófilos de la sangre periférica, que también desempeñan una función fagocítica. Los mastocitos son los mediadores de la defensa frente a parásitos e inician la respuesta inflamatoria alérgica, reclutando a los eosinófilos y a los basófilos. Por último, las células dendríticas entran en los tejidos como fagocitos inmaduros para especializarse en la ingestión de antígenos y posteriormente migrar a los tejidos linfoides para actuar como células presentadoras de antígenos (CPA) (Janeway, 2005).

El bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) constituyen los órganos linfoides secundarios o periféricos que captan los antígenos de la sangre, de los tejidos infectados, y de las superficies epiteliales del organismo, respectivamente. En ellos los linfocitos T y B, procedentes de los órganos linfoides primarios, coordinan la respuesta inmunitaria adaptativa. Los linfocitos T tras reconocer a los antígenos, proliferan y se diferencian en células efectoras antígeno-específicas, mientras que las células linfoides B proliferan y se diferencian a células secretoras de anticuerpos (Janeway, 2005).

Para el funcionamiento y la comunicación intercelular del sistema inmunológico es necesaria la participación de las células endoteliales que posibilitan el tráfico leucocitario entre la sangre periférica y los tejidos, y la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas que condicionan la activación linfocitaria.

1.1.1. Respuesta inmunitaria natural y específica

El sistema inmunológico tiene como función mantener la integridad estructural y funcional del organismo, neutralizando y eliminando microorganismos, virus, células o moléculas extrañas. Se han descrito dos tipos generales de respuesta, que se diferencian fundamentalmente por los elementos celulares implicados y por el mecanismo de acción: la inmunidad innata, natural o inespecífica y la inmunidad

adquirida o específica. Las respuestas innata y adquirida constituyen un sistema defensivo integrado por numerosas células y moléculas que funcionan de forma cooperativa (Abbas *et al*, 2012).

La inmunidad natural está integrada por las barreras anatómicas, fisiológicas, celulares (endocíticas y fagocíticas) e inflamatorias que actúan de manera estereotipada frente a diferentes agentes infecciosos. Los linfocitos participan en la inmunidad adquirida que se desarrolla como respuesta a diferentes infecciones. Una serie de mecanismos se ponen en marcha tras la exposición a organismos infecciosos condicionando la estimulación secundaria de estas células. Este tipo de respuesta se caracteriza por una elevada especificidad de reacción frente a distintas moléculas y diferentes tipos de infecciones y por la adquisición de memoria ante una repetida exposición frente a un mismo agente infeccioso, que supone un aumento de la intensidad y capacidad defensivas (Roitt, 2008).

1.1.2. Inmunidad humoral y celular

La respuesta inmunitaria específica se clasifica como inmunidad humoral o celular en función de su mecanismo efector y de los componentes implicados en la misma (Roitt, 2008). Los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral. Su función principal es la producción y liberación de anticuerpos al suero, participando en el reconocimiento antigénico de patógenos infecciosos y de toxinas extracelulares, lo que facilita su eliminación. Los patógenos intracelulares pueden sobrevivir y proliferar en el interior de las células fagocitarias escapando a la acción de los anticuerpos. Es necesaria la intervención de los linfocitos T, efectores de la inmunidad celular, para que se produzca la destrucción de los patógenos intracelulares y la lisis de las células infectadas. Los linfocitos T colaboradores ($CD4^+$) modulan los procesos de interacción con las CPA y la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B, mientras que los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) son los encargados del reconocimiento de las células infectadas por virus y de su lisis posterior.

1.1.3. Anatomía de la respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria en un individuo sano supone un esfuerzo conjunto y coordinado de las células del sistema inmunológico, siendo necesaria la comunicación intercelular que se consigue gracias a la secreción de múltiples citoquinas que incluyen interleuquinas (IL), interferón (IFN), factores estimulantes de colonias (CSF) y factores de necrosis tumoral (TNF).

Las células que no son reconocidas como propias y los patógenos que penetran en el organismo inician la respuesta inmunitaria. Las primeras células involucradas en la inmunidad inespecífica son los macrófagos que reconocen y captan los antígenos extraños para transportarlos a través del sistema linfático hasta los órganos linfoides. Posteriormente, tras su digestión, estas sustancias son desintegradas en partículas más pequeñas que presentan a los linfocitos produciendo citoquinas que favorecen la regulación de la actividad linfocitaria. También participan en la respuesta innata las células NK, que no expresan receptores específicos de antígenos y cuya función es eliminar las células tumorales o infectadas mediante mecanismos de lisis y apoptosis. Estas células desempeñan un papel regulador a través de la liberación de citoquinas coordinando las respuestas innata y adaptativa (Abbas *et al*, 2012), (Janeway, 2005).

Los linfocitos T y B están directamente involucrados en la reacción inmunitaria específica. Los linfocitos B reconocen a los antígenos extraños, lo que condiciona su diferenciación a células plasmáticas, encargadas de la síntesis y secreción de inmunoglobulinas con la formación posterior de los complejos antígeno-anticuerpo. Algunos antígenos son neutralizados por efecto de esta unión. Las células fagocíticas del sistema inmunitario inespecífico (macrófagos y células dendríticas) ingieren estos complejos y tras este proceso adquieren su función como CPA. Las células dendríticas son las más eficientes en la presentación de antígenos y tienen la capacidad de interactuar con los linfocitos T iniciando una respuesta inmunitaria. Los linfocitos T son los encargados de eliminar los patógenos intracelulares, pudiendo destruir directamente las células infectadas por acción de los linfocitos T citotóxicos. Una subpoblación de linfocitos T antígeno-específicos es responsable de la memoria inmunitaria que permite al sistema inmunológico reconocer la estructura antigénica de las moléculas extrañas presentadas por los macrófagos produciendo la secreción de linfoquinas que alertan a otras células del sistema inmunitario. Ante una nueva exposición al mismo patógeno la reacción es más rápida y se producen una mayor cantidad de anticuerpos que en el primer contacto. El papel de los linfocitos T antígeno-específicos es fundamental en el control de las infecciones víricas y junto con los linfocitos B participan en la producción de anticuerpos específicos contra bacterias, colaborando con los granulocitos en el control de las infecciones fúngicas (Parkman & Weinberg, 2009), (Roitt, 2008). Otras poblaciones celulares también participan en la respuesta inmunológica. Ante una infección, se produce el aumento del número de neutrófilos que fagocitan y destruyen el material extraño. Finalmente los granulocitos basófilos y eosinófilos desempeñan un papel importante en las reacciones alérgicas

mediante la liberación de gránulos intracelulares secundaria a la interacción con sustancias extrañas (Abbas *et al*, 2012).

1.2. El trasplante de sangre de cordón umbilical como alternativa real de trasplante de progenitores hematopoyéticos

1.2.1. Desarrollo del trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado

Durante las últimas décadas se han producido unos progresos notables en el campo del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) que han permitido extender significativamente las indicaciones de este procedimiento a un número cada vez mayor de pacientes. Uno de los avances más importantes ha sido el uso creciente de donantes y fuentes de progenitores hematopoyéticos alternativos a la médula ósea o la sangre periférica de un hermano con antígeno leucocitario humano (HLA) idéntico. Muy particularmente se ha desarrollado el uso de progenitores hematopoyéticos de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical (SCU) de donante no emparentado (DNE), o incluso progenitores hematopoyéticos de un donante familiar haploidéntico. Aunque el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) de un hermano HLA-idéntico, tanto de médula ósea como de sangre periférica, es considerado la mejor opción cuando hay una indicación de trasplante, un donante de estas características óptimas está sólo disponible en una proporción relativamente baja de los pacientes en los que está indicado un TPH (alrededor del 30%). Esta importante limitación para realizar un TPH en las condiciones ideales es la que ha estimulado la investigación de fuentes alternativas que permitan la realización de un TPH cuando no se dispone de un hermano HLA-idéntico como donante. Por ello, en los últimos años se ha producido un extraordinario desarrollo de la donación de médula ósea y sangre periférica de donantes altruistas entre la población general y de donaciones de SCU que, mediante una búsqueda en bases de datos internacionales de millones de donantes, permiten actualmente encontrar progenitores hematopoyéticos apropiados para realizar un TPH en la gran mayoría de los pacientes en que este procedimiento está indicado (Sanz, 2012).

1.2.2. Desarrollo del TSCU

Desde que Gluckman *et al.* realizaran el primer trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU) en el año 1988 para tratar a un niño con anemia de Fanconi (Gluckman *et al.*, 1989), esta modalidad de TPH ha sufrido una enorme expansión en su actividad e indicaciones. A pesar de las reticencias iniciales en el uso del SCU de DNE como alternativa al más “convencional” trasplante de médula ósea o de sangre periférica también de DNE, en los últimos años, en particular en la última década, se ha ido incrementando notablemente el número de TSCU realizados en todo el mundo, especialmente en Estados Unidos, Canadá, Japón y los países más desarrollados de Europa. A ello han contribuido diversos estudios que a finales de los 90 y principios de los 2000 tuvieron inicialmente como principal objetivo demostrar la factibilidad del procedimiento en adultos (Bone Marrow Donors Worldwide), (Heemskerk *et al.*, 2005). Posteriormente, el TSCU como alternativa al trasplante de médula ósea o de sangre periférica, recibió un definitivo espaldarazo al demostrarse la similitud de los resultados con las distintas fuentes de progenitores, incluyendo el cordón umbilical (Bone Marrow Donors Worldwide), (Heemskerk *et al.*, 2005), (Ljungman *et al.*, 2010), (Gluckman *et al.*, 1989). En dichos estudios se demostraba que el cordón umbilical es una razonable alternativa en adultos con enfermedades hematológicas malignas que no disponían de un donante apropiado de médula ósea o de sangre periférica, especialmente cuando se requería una cierta urgencia en la realización del trasplante.

1.2.3. Ventajas y limitaciones del TSCU

Tras el TPH existe un periodo prolongado de severa inmunodeficiencia, que incluye defectos en la timopoyesis y contribuye a que se eleve la incidencia de infecciones oportunistas causadas por hongos o virus, que continúa durante años tras el TPH. Junto a las infecciones, la recidiva de la enfermedad, la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y el rechazo del injerto continúan siendo las mayores complicaciones que limitan la eficacia del trasplante alogénico.

La reconstitución inmunológica es el proceso de recuperación progresiva del sistema inmunológico que ocurre tras el TPH. El estudio y el mejor conocimiento de sus mecanismos y de la dinámica de su recuperación son clave porque permitirán disminuir la morbi-mortalidad relacionada con el trasplante mediante la aplicación de inmunoterapia en el área del TPH y controlar selectivamente las complicaciones infecciosas e inmunológicas.

El TSCU presenta ciertas ventajas comparado con el alo-TPH en el que se utilizan otras fuentes de progenitores hematopoyéticos:

- La rápida disponibilidad de las unidades de SCU reduce el tiempo que transcurre hasta el trasplante.
- La SCU contiene suficientes células progenitoras para reconstituir el compartimento linfo-hematopoyético del receptor.
- La ausencia de riesgo para los donantes.
- El bajo riesgo de transmisión de infecciones producidas por citomegalovirus (CMV) o virus de Epstein-Barr (VEB).
- La relativa inmadurez de los linfocitos disminuye la reactividad inmunológica y el riesgo de rechazo.
- Las ventajas proliferativas de los progenitores de SCU que presentan una alta tasa de células en ciclo celular, una producción autocrina de factores de crecimiento y telómeros más largos.
- El menor número de linfocitos T vírgenes que contiene el TSCU comparado con otras fuentes disminuyen la incidencia y la gravedad de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) .
- El mayor grado de discrepancia que permite en cuanto a la compatibilidad HLA entre donante y receptor.

Como contrapartida, el TSCU tiene limitaciones con respecto a otros tipos de alo-TPH:

- El bajo número de células progenitoras. Las células de SCU tienen alta capacidad proliferativa, pero dada la limitada dosis celular disponible para trasplante en la SCU, se han desarrollado estrategias para su expansión *ex vivo* que podrían incrementar el número de células progenitoras y acelerar el proceso de recuperación hematopoyética.
- El bajo número de linfocitos aumenta el fallo de injerto. Debido a la complejidad del sistema inmunológico y a la insuficiencia del timo en el transcurso de la reconstitución inmunológica, la regeneración de las poblaciones de linfocitos T y B requiere más tiempo hasta que alcanzan su funcionalidad normal. Colaboran también en este retraso, la administración postrasplante de fármacos inmunosupresores como profilaxis o tratamiento de la EICH y el daño inmunológico

desencadenado por la propia EICH, que tiene al sistema linfóide y a otros órganos como diana.

- El retraso en la recuperación hematopoyética. El TSCU supone un retraso en la reconstitución inmunológica, pero los receptores alcanzan de forma progresiva a largo plazo (>2 años) incluso mejores valores que tras un injerto de médula ósea o sangre periférica.
- La posibilidad, aunque remota, de transmisión de trastornos genéticos procedentes de las células del donante.

1.2.4. Inmunidad en TSCU

La evaluación del sistema inmunológico es clave en el contexto del trasplante alogénico debido a que las infecciones postrasplante, las recaídas y las enfermedades malignas están directamente relacionadas con las alteraciones en el sistema inmunológico y comportan una profunda inmunodepresión en estos pacientes que se prolonga más de un año postrasplante. Las infecciones que se producen durante los primeros meses se deben a la deficiencia en los granulocitos y las células mononucleares. Pero en el periodo pos-injerto las infecciones están más relacionadas con la deficiencia de ciertas subpoblaciones como los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos B (Toubert, 2008).

Se han llevado a cabo varios estudios en TPH convencional que apoyan que una completa reconstitución inmunológica postrasplante se correlaciona con una mayor tasa de remisión completa (ausencia de células malignas en el aspirado de médula ósea junto con una recuperación del recuento celular en sangre periférica), menor mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y mejor pronóstico. Sin embargo, una reconstitución inmunológica incompleta o un retraso en la misma se relaciona con un riesgo aumentado de recaída o complicaciones infecciosas (Szabolcs & Cairo, 2010), (Klyuchnikov *et al*, 2010). La reconstitución inmunológica pos-TSCU se ha estudiado extensamente en niños (Charrier *et al*, 2013), (Rénard *et al*, 2011), (Bartelink *et al*, 2013), (Moretta *et al*, 2001), (Clave *et al*, 2013), (Oshrine *et al*, 2013). Las conclusiones de estos estudios no pueden extrapolarse a los pacientes adultos debido al menor número de células CD34⁺ infundidas por kilogramo de peso y a la pérdida de la función tímica y esplénica con la edad. Además estos estudios son heterogéneos en cuanto a las características de los pacientes y el trasplante.

Tras el trasplante, los linfocitos T y B requieren más tiempo para alcanzar su funcionalidad normal. Esto es debido a la complejidad del sistema inmunitario en

cuanto a la regeneración linfocitaria y la insuficiencia del timo, que tiene un papel central en la reconstitución inmunológica, la administración postrasplante de fármacos inmunosupresores como profilaxis o tratamiento de la EICH, y el propio efecto inmunosupresor de la EICH que tiene como diana al sistema linfóide entre otros órganos.

Los receptores de TSCU presentan linfopenia CD4 y CD8 más prolongada, con un efecto sobre los linfocitos T CD8⁺ más acusado que con otras fuentes de trasplante. Las posibles causas de esto pueden ser el menor contenido de linfocitos totales en la SCU, la menor cantidad de células troncales totales, o el predominio de linfocitos vírgenes cuya expansión periférica homeostática sería insuficiente para conseguir una recuperación inmunológica rápida en el periodo temprano pos-TSCU.

1.2.5. Factores que afectan a la reconstitución inmunológica postrasplante

Existen diferentes factores que afectan a la recuperación inmunológica postrasplante. Los factores relacionados con el receptor son la edad, el sexo, el régimen de acondicionamiento y la enfermedad de base. Las diferencias genéticas entre el receptor y el donante, incluyendo el HLA, los antígenos menores de histocompatibilidad y los genes asociados con las respuestas inmunológicas frente a diversos microorganismos, también influyen en la reconstitución inmunológica. La fuente del trasplante tiene un impacto en la reconstitución inmunológica y en el caso del TSCU esta recuperación es más lenta aunque progresivamente y a largo plazo (>2 años) alcanza mejores valores que la recuperación tras un trasplante de médula ósea. Otros eventos postrasplante como la EICH aguda o crónica, la recidiva de la enfermedad y las complicaciones infecciosas causadas por virus, bacterias u hongos, pueden afectar negativamente a la reconstitución inmunológica, tanto directamente como a través de efectos secundarios relacionados con la utilización de fármacos para el tratamiento de estas infecciones (Toubert, 2008).

1.2.6. Complicaciones postrasplante relacionadas con la inmunodepresión

Las infecciones bacterianas, víricas o fúngicas oportunistas, la EICH aguda o crónica, la reacción de huésped contra injerto y la recidiva de la enfermedad continúan siendo las complicaciones más importantes que limitan la eficacia del alo-TPH debido a la prolongada inmunodeficiencia de los pacientes en este contexto (Welniak *et al*, 2007).

1.2.6.1 Infecciones

Una importante causa de morbilidad y mortalidad pos-TSCU tanto en adultos como en pacientes pediátricos son las infecciones bacterianas, fúngicas o víricas, cuya incidencia es mayor que en los TPH de sangre periférica o médula ósea. Algunas series sugieren que más de 50% de las muertes en los primeros 100 días pos-TSCU son debidas a infecciones consecuencia del retraso en la reconstitución inmunológica. En cuanto al tipo de infecciones pos-TPH se distinguen tres periodos cronológicos que se diferencian en el tipo de patógeno que predomina en cada fase (Figura 1.1).

En la fase temprana o neutropénica (días 0 a +30), que abarca desde el tratamiento de acondicionamiento hasta el injerto, todos los factores de riesgo para las infecciones están presentes. Aunque la neutropenia y la ruptura de las barreras anatómicas (daños de las mucosas y vasculares) son los factores más relevantes de riesgo en esta fase, la inmunodeficiencia celular y humoral así como la asplenia funcional en los pacientes que reciben irradiación corporal total también están presentes. Los principales patógenos que se observan en esta fase son las bacterias Gram-positivas y negativas, *Candida spp.* y el virus del herpes simple (VHS) y el tipo más frecuente de infecciones son bacteriemia o sepsis, neumonía, orofaringitis, sinusitis, proctitis y celulitis. Los tipos de complicaciones infecciosas en este periodo son los mismos tanto después del TPH autólogo como del alo-TPH. Sin embargo, después del TPH autólogo, el riesgo de infecciones bacterianas y su tasa de mortalidad son más bajos debido a que las mucositis suelen ser menos intensas y la neutropenia más corta. En el marco del TPH autólogo, el riesgo de infección casi desaparece por completo tras la recuperación de los neutrófilos (Rovira *et al*, 2012).

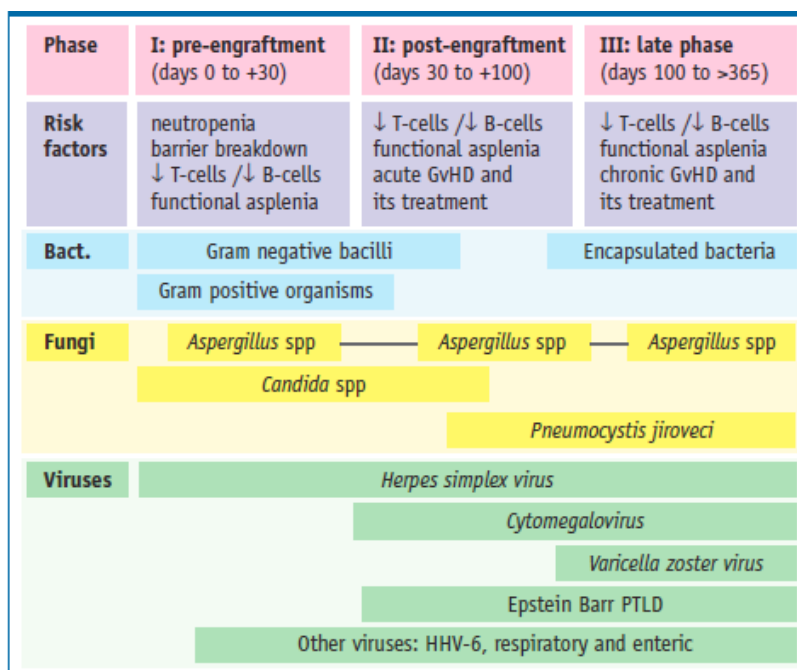


Figura 1.1. Cronología de las infecciones predominantes tras el TPH. Tomado con permiso de E. Carreras.

La fase intermedia (días +30 a +100) se inicia con el injerto de médula. En este momento, la neutropenia y la mucositis han desaparecido pero la inmunodeficiencia y la asplenia funcional, que pueden empeorar y mantenerse por la EICH y su tratamiento, persisten. Esto favorece el desarrollo de infecciones virales y fúngicas. En esta fase el CMV, los adenovirus, el poliomavirus BK, los virus respiratorios, *Pneumocystis jiroveci*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* y otros hongos son los responsables de las infecciones. Durante décadas, la enfermedad causada por CMV fue la principal complicación infecciosa en esta fase. Sin embargo, con la introducción de las técnicas de vigilancia que permitieron un diagnóstico anticipado y un tratamiento preventivo, la mortalidad debida al CMV ha disminuido notablemente. En la actualidad, la aspergilosis invasiva se observa en el 5-15% de receptores de alo-TPH, el 60% de los cuales mueren a causa de esta infección a pesar de la eficacia de los nuevos fármacos antifúngicos (Rovira *et al*, 2012).

Por último, en la fase tardía pos-TPH (>100 días) se producen infecciones que se asocian con la presencia y severidad de la EICH crónica, que impide la recuperación normal la inmunidad celular y humoral. Además, la asplenia funcional persiste en los pacientes con EICH y en los que recibieron irradiación corporal total. Por esta razón, en esta fase, las infecciones son generalmente secundarias a bacterias encapsuladas (*Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*),

Aspergillus spp. y otros hongos, *Pneumocystis jiroveci* y el virus de la varicela zóster. En esta fase tardía, existe una clara relación entre el grado de recuperación de la inmunidad celular y las complicaciones infecciosas. Por lo tanto, el número de células CD4⁺ se correlaciona con ciertas infecciones o reactivaciones (Figura 1.2). Ejemplos claros de ello son la reactivación de *Toxoplasma gondii* en pacientes seropositivos y la neumonía por *Pneumocystis jiroveci* observada cuando se interrumpe la profilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol antes de que se produzca la recuperación de las células CD4⁺ (Rovira *et al*, 2012).

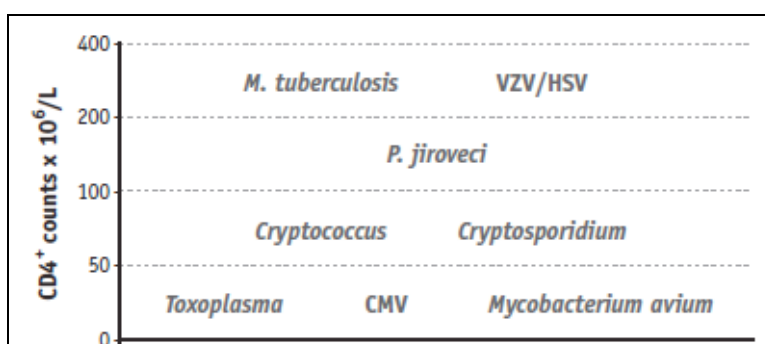


Figura 1.2. Riesgo de infección o reactivación en función del recuento de células CD4⁺. Tomado con permiso de E. Carreras.

Esta cronología de las infecciones se ha descrito en pacientes que han recibido un TPH mieloablativo, pero se pueden observar algunas diferencias en los receptores de TPH autólogo o TPH con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida. Así, en el marco del TPH autólogo las infecciones bacterianas son menos frecuentes y graves y el resto de las infecciones mencionadas son excepcionales. Sin embargo, los pacientes que recibieron fármacos inmunosupresores (esteroides, análogos de purina o anticuerpos monoclonales como rituximab o alemtuzumab) o con hipogammaglobulinemia severa antes del TPH autólogo tienen riesgo de desarrollar infecciones similares a las observadas en el marco alogénico. En la última década, el TPH con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida ha sido cada vez más utilizado en todo el mundo y las infecciones relacionadas con la neutropenia y la mucositis son menos frecuentes con esta modalidad de TPH que después del TPH convencional. Sin embargo, las infecciones víricas y fúngicas que se producen en los periodos intermedio y tardío son comparables debido a que la incidencia y la severidad de la EICH son similares a las observadas en el TPH mieloablativo. Además, el TPH con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida se emplea generalmente

en los pacientes de mayor edad que tienen un peor estado general y comorbilidades; por todas estas razones, la mortalidad relacionada con la infección no ha disminuido en este marco (Rovira *et al*, 2012).

1.2.6.2 Enfermedad injerto contra huésped aguda y crónica

La EICH es una de las complicaciones del TPH que se desarrolla cuando las células inmunocompetentes del injerto reconocen los antígenos de histocompatibilidad produciendo un ataque inmunológico contra las células del receptor (Welniak *et al*, 2007). La EICH aguda aparece en los primeros 100 días pos-TPH, mientras que la EICH crónica aparece más adelante. Ambas son entidades diferentes, con distinta etiología y fisiopatología.

La EICH aguda se asocia con linfopenia de células B y con una respuesta agresiva por parte de los linfocitos T colaboradores que tiene como diana principalmente la piel y el intestino (Brown & Boussiotis, 2008). Las células T maduras que acompañan a las células del injerto son activadas por los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II expresados por el receptor. Además pueden verse también afectados el hígado, los pulmones, el timo y los tejidos linfoides secundarios.

La fisiopatología de la EICH crónica está menos establecida pero se asemeja a un trastorno autoinmune con el desarrollo de células T autorreactivas (Brown & Boussiotis, 2008) que se ha caracterizado en modelos experimentales por la formación de autoanticuerpos (Welniak *et al*, 2007). Puede afectar a la piel, las membranas serosas y las glándulas exocrinas, resultando en una enfermedad debilitante y potencialmente mortal meses después del trasplante.

El riesgo de EICH grave en los TSCU es menor a pesar del número de disparidades en los antígenos menores de histocompatibilidad con el receptor. Estos antígenos menores de histocompatibilidad se han identificado como diana de la actividad injerto contra tumor (Welniak *et al*, 2007).

1.2.6.3 Rechazo del injerto (reacción huésped contra injerto)

La reacción huésped contra injerto consiste en que las células inmunocompetentes que persisten en el receptor tras la quimioterapia desarrollan un ataque inmunológico contra el injerto que conduce al rechazo.

Estudios preclínicos muestran que el rechazo del injerto puede estar mediado por las células NK del receptor, las células NKT, las células T $\gamma\delta$ y/o las células T CD4⁺ o CD8⁺ que reconocen antígenos de histocompatibilidad en las células del donante. Las células NK presentan receptores inhibidores y activadores dirigidos contra el CMH y otros determinantes celulares que son críticos para la identificación celular y la subsecuente acción de las células NK para mediar el ataque contra las células. La familia de receptores *killer cell immunoglobuline-like* (KIR) reconoce determinantes específicos del CMH de clase I (Welniak *et al*, 2007).

1.3. Papel de la citometría de flujo en el estudio de la reconstitución inmunológica

La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es una técnica cuantitativa rápida y objetiva de análisis celular que se ha consolidado como una herramienta imprescindible en el estudio de las células hematopoyéticas. Permite la identificación, la caracterización y la cuantificación de las células con una elevada sensibilidad en la detección de poblaciones celulares poco frecuentes. Esta técnica posibilita el inmunofenotipaje específico de los linfocitos mediante la evaluación de la expresión de diferentes antígenos y en la actualidad constituye el método de elección para el análisis de poblaciones linfocitarias.

La CFM se basa en hacer pasar una suspensión de células marcadas con anticuerpos monoclonales (AcMos) conjugados con fluorocromos alineados de una en una por delante de varios haces de luz de láser. El citómetro de flujo nos proporciona información sobre los parámetros de dispersión de la luz, tamaño (*forward scatter component*, FSC) y complejidad (*side scatter component*, SSC) celular relativos, y sobre los antígenos expresados en las células detectados por la emisión o no de fluorescencia del fluorocromo unido al AcMo. Para la medida de la intensidad de fluorescencia el haz de láser incide sobre los fluorocromos conjugados a los AcMos que están unidos a los antígenos celulares. Estos compuestos fluorescentes absorben energía luminosa con una longitud de onda propia del fluorocromo.

Los citómetros de flujo disponen de programas informáticos de adquisición y análisis de las muestras. Las características de la adquisición deben ser definidas en función del objetivo del estudio: tipo de célula y análisis a realizar. La adquisición puede ser total y englobar a todas las células presentes en la muestra o puede estar referida a una población celular concreta y realizarse a través de una ventana de selección definiendo en un gráfico la región donde se encuentran los eventos que

deseamos analizar. En lo que respecta al número de células a analizar, cuanto menos frecuente es la población que queremos detectar, mayor debe ser el número eventos a adquirir, lo que aumenta la sensibilidad de la técnica. El análisis de los archivos de citometría se realiza representando los datos en diagramas de puntos biparamétricos o histogramas combinando todos los parámetros almacenados durante la adquisición. Los resultados de las poblaciones celulares se expresan generalmente en porcentaje respecto a la población a la que se refieren o en valores absolutos (células/ μ L).

En la últimas décadas se ha producido un creciente desarrollo de la CFM. Su aplicación al estudio de las poblaciones linfocitarias en enfermedades infecciosas, fundamentalmente en la evaluación de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), supuso un punto de partida para extenderse a otras áreas de la medicina hasta convertirse actualmente en una técnica asistencial para el diagnóstico y la monitorización de muchas enfermedades.

Inicialmente los estudios empleaban uno o dos AcMos. Progresivamente, gracias al desarrollo de nuevos fluorocromos, se ha conseguido aumentar el número de anticuerpos incluidos en cada combinación. Esto permite detectar un mayor número de antígenos simultáneamente, rentabilizando la muestra y obteniendo más información en el análisis. Hoy en día, las técnicas de CFM incluyen paneles con combinaciones de ocho o más AcMos.

El creciente grado de complejidad de la citometría ha requerido la optimización de los procedimientos de calibración de los equipos y la implementación de nuevas herramientas de adquisición y análisis, desembocando en la necesidad de estandarización de estas técnicas. En los últimos cinco años, el Grupo EuroFlow ha publicado una serie de procedimientos normalizados de trabajo para la estandarización de la CFM en el área del diagnóstico oncohematológico que incluyen la validación de los diferentes paneles de estudio, los protocolos de marcaje, adquisición y análisis de las muestras (van Dongen *et al*, 2012b), (van Dongen *et al*, 2012a), (Kalina *et al*, 2012), (Kalina *et al*, 2015). La implantación en los laboratorios asistenciales de dichos procedimientos posibilitará una correcta comparación intra e interlaboratorio de los resultados que hará más robusta la evaluación de los estudios, especialmente los multicéntricos. En lo que respecta al campo de la inmunología y a las aplicaciones de la citometría en la investigación, se está realizando un gran esfuerzo para extender la estandarización en estas áreas de trabajo (Maecker *et al*, 2012).

1.3.1. Poblaciones linfocitarias de sangre periférica

Una de las principales aplicaciones clínicas de la CFM es el estudio de las poblaciones linfocitarias en enfermedades infecciosas o en el seguimiento de procesos reactivos, que se centra en la identificación de los linfocitos T y sus principales subtipos (colaboradores y citotóxicos), linfocitos B y células NK. El análisis de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica se automatizó principalmente para reducir los riesgos del operador en la manipulación de los especímenes biológicos, simplificando además este tipo de estudios. Actualmente, el análisis de las poblaciones linfocitarias se ha extendido a la monitorización de pacientes con trasplante de órgano sólido y hematopoyético. En la actualidad, todas las casas comerciales disponen de programas automáticos de análisis de las poblaciones linfocitarias diseñados fundamentalmente para el seguimiento de pacientes con infecciones víricas, aunque más recientemente estas plataformas han sido utilizadas también para la evaluación inmunológica de pacientes trasplantados.

La información proporcionada por estos estudios, aunque básica, es imprescindible y forma parte de la evaluación clínica de los pacientes con TPH. Las alteraciones inmunológicas que se producen en los pacientes trasplantados hacen necesario ampliar el análisis a otros subtipos linfocitarios que permitan completar y mejorar el conocimiento sobre la recuperación inmunológica y el manejo clínico de los enfermos sometidos a este tipo de tratamientos. Puesto que hoy en día no existen análisis automatizados que incluyan marcadores adicionales dirigidos a la identificación de subpoblaciones implicadas en la recuperación inmunológica pos-TPH, los estudios de investigación emplean técnicas manuales diseñando paneles con combinaciones de AcMos que, además de identificar células NK, T y B, permitan obtener información sobre otros subtipos celulares que mejoren el conocimiento del estado inmunológico de estos pacientes y sean de utilidad en su seguimiento.

1.3.2. Evaluación de la reconstitución inmunológica postrasplante

Para identificar los antígenos que expresan las diferentes células del sistema inmunológico se emplean AcMos. Para su denominación se incorporó el término de grupo de diferenciación (CD, del inglés *cluster of differentiation*) que incluye el conjunto de AcMos que presentan patrones idénticos de reactividad celular y reconocen el mismo antígeno. Los AcMos se identifican con las siglas CD seguidas del número que se correlaciona con el linaje específico o el tipo de molécula reconocida. Según las características del estudio y la información celular que queramos obtener se emplean

diferentes combinaciones de AcMos. Así, el análisis básico de poblaciones linfocitarias incluye CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/CD56 y CD45. Los estudios de reconstitución inmunológica además de identificar las poblaciones de linfocitos T, B y células NK incluyen el estudio de subpoblaciones menos frecuentes dependiendo de su estadio de diferenciación, función o activación.

Las principales características de los AcMos más frecuentemente utilizados en este tipo de estudios se describen a continuación. El antígeno leucocitario común o CD45 es el mayor componente de la membrana linfocitaria, expresándose en estas células con intensidad superior que en los monocitos y en los neutrófilos. Para la identificación de las células T se emplea CD3. Este antígeno inicialmente se localiza en el citoplasma de las células precursoras T para luego expresarse en la membrana celular. CD3 se asocia con el receptor de células T (RCT) formando un complejo de membrana y se requiere para estabilizar la interacción de las células T con las CPA además de ser responsable de gran parte de la comunicación intracelular mediada por RCT. La mayoría de los timocitos corticales coexpresan los antígenos CD4 y CD8. Si se diferencian hacia linfocitos T colaboradores expresan únicamente CD4, antígeno que se une a una región de las moléculas del CMH de clase II. Los linfocitos T CD4⁺ estimulan la síntesis de anticuerpos por parte de los linfocitos B. En el caso de que se diferencien a linfocitos T citotóxicos o supresores expresan únicamente CD8, antígeno que actúa como correceptor para el reconocimiento de antígenos restringidos al CMH de clase I. Existe además una población minoritaria en sangre periférica (linfocitos pre-T) que no expresa CD4 ni CD8 que corresponde a los linfocitos T $\gamma\delta$ (Bhandoola *et al*, 2007). Otros antígenos que se utilizan para caracterizar a las células T son el CD5, que se encuentra en la mayoría de timocitos y linfocitos T maduros, el CD38 que se expresa en los timocitos medulares y en los linfocitos T activados, y el CD27 que podemos encontrarlo en timocitos medulares y linfocitos T periféricos, preferentemente expresado en la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes (CD45RA⁺CD45RO⁻). La molécula HLADR, que identifica antígenos leucocitarios humanos, se puede encontrar en los linfocitos T activados. Para la caracterización de los linfocitos T vírgenes y los memoria o activados se emplean los antígenos CD45RA y CD45RO respectivamente. CD45RA se expresa en los timocitos medulares, CD45RO en los timocitos corticales y ambos pueden detectarse tanto en los linfocitos T CD4⁺ como en los T CD8⁺. Un antígeno útil para identificar linfocitos T vírgenes o reguladores con capacidad de migración hacia los órganos linfoides secundarios y células dendríticas con potencial para dirigirse hacia los vasos linfáticos es CD197 o CCR7. Esta molécula junto con sus ligandos supone un punto de conexión entre la inmunidad innata y adaptativa a través

de sus efectos en las interacciones entre linfocitos T y células dendríticas. Las células T vírgenes entran en los nódulos linfáticos a través de vénulas endoteliales, que expresan CCL21. Las células dendríticas y los macrófagos migran en los nódulos linfáticos a través de vasos aferentes linfáticos. La interacción entre las células T y las células dendríticas en la zona T es CCR7 dependiente. Además, durante la vigilancia inmunológica, los linfocitos B recirculan entre los compartimentos ricos en células B (folículos y zonas B) en los órganos linfoides secundarios buscando antígenos. Tras la unión antigénica, las células B se localizan próximas a las zonas B y T para interactuar con las células T colaboradoras. Esta migración de células B está dirigida por CCR7 y sus ligandos. CCR7 se ha identificado como el principal receptor de migración y como importante regulador para la iniciación de la respuesta inmunológica antígeno-específica.

Los precursores linfoides y los linfocitos B normales se identifican por la expresión de CD19. El antígeno CD10 se expresa inicialmente en los precursores linfoides B inmaduros que lo pierden durante la maduración a medida que las células adquieren la expresión de inmunoglobulinas. Posteriormente CD10 se expresa en células B activadas o en proliferación en los centros germinales (Perez-Andres *et al*, 2010). Cuando los linfocitos B normales maduran y pasan a circulación periférica expresan el antígeno CD20. El antígeno CD5, además de ser un marcador pan-T, es un marcador que identifica a una población conocida como B1. Estas células B1 secretan inmunoglobulinas fundamentalmente de tipo IgM de forma espontánea sin necesidad de exposición a antígenos, presentan características de células activadas y están implicadas en la eliminación de células envejecidas y apoptóticas, en mecanismos de vigilancia inmunitaria o inmunomodulación y en la defensa frente a diversas infecciones. Otros antígenos que aparecen en las células B son la molécula de adhesión CD11b que se detecta en las células B de memoria activadas y juega un papel esencial en su capacidad migratoria (Kawai *et al*, 2005); la molécula CD23, receptor de baja afinidad de la IgE asociada con el antígeno del CMH de clase II, se observa en los linfocitos B incrementándose su expresión cuando se produce activación antigénica. El antígeno CD27 está presente en una pequeña población de linfocitos B memoria de sangre periférica, que expresan de forma espontánea IgM (Perez-Andres *et al*, 2011), (Kjeldsen *et al*, 2011). En las células B, CD38 se expresa de forma intensa en los primeros estadios de la ontogenia y se va perdiendo durante su maduración, para volver a detectarse cuando la célula B se activa en la diferenciación terminal a células plasmáticas (Kjeldsen *et al*, 2011), (Perez-Andres *et al*, 2010). Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (Ig) Kappa y Lambda se

expresan en los linfocitos B maduros de sangre periférica y en una subpoblación de células B inmaduras de médula ósea. Ig Kappa se expresa en más del 50% de los linfocitos B, mientras que Ig Lambda se expresa en un tercio de los linfocitos B. Además de detectarse en los linfocitos T activados, HLA-DR se encuentra en los linfocitos B, así como en otras CPA como las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos y en las células tímicas epiteliales.

Las células NK se identifican por CD16 y CD56, que en función de la intensidad con que se expresan permiten establecer los diferentes estadios madurativos de estas células. CD16 también aparece en una pequeña población de linfocitos T, así como en neutrófilos y monocitos. El antígeno CD56 también se encuentra en subpoblaciones de linfocitos T denominadas T *killer*. En las células NK, la expresión de CD11b disminuye cuando se produce su activación, mientras que la de HLADR aumenta en función tanto de la activación como de la diferenciación celular. La positividad de CD27 (baja o alta) también subclasifica a las células NK maduras en dos poblaciones con distinta capacidad migratoria y de respuesta (Hayakawa & Smyth, 2006).

En la **Tabla 1.1** se detallan los ligandos y las moléculas asociadas a diferentes antígenos y su detección en las poblaciones de linfocitos analizadas en los estudios de reconstitución inmunológica.

Tabla 1.1. Ligandos y moléculas asociadas a diferentes antígenos en las poblaciones de células T, B y NK

Antígeno	Ligandos y moléculas asociadas	Células T	Células B	Células NK
CD3	RCT	+	-	-
CD4	CMH clase II, gp120, IL-16, Lck	+	-	-
CD5	CD72, BCR, RCT, gp35-37, ZAP-70, CD21	+	+	-
CD8	CMH clase I, Lck	+	-	+
CD11b	iC3b, fibrinógeno, ICAM-1, 2, factor X	+	+	+
CD16	IgG Fc	+	-	+
CD19	CD21, CD81, CD225, Leu-13, Lyn, Fyn, Vav, PI3-quinasa	-	+	-
CD20	Lyn, LCK, Fyn, proteína superficie celular: 28-30, 180-200, 50-60 kDa	-	+	-
CD23	IgE, CD21, CD11b, CD11c	-	+	-
CD27	CD70, TRAF5, TRAF2	+	+	+
CD38	CD31, ácido hialurónico, complejo CD3/RCT, CD16, HLA clase I	+	+	+
CD45	p56lck, p59fyn, Src quinasas	+	+	+
CD45RA	p56lck, p59fyn, Src quinasas	+	+	-
CD45RO	p56lck, p59fyn, Src quinasas	+	-	-
CD56	NCAM-1, heparin sulfato	+	-	+
CD197	CCL19/ECL, CCL21	+	+	-

1.4. Dinámica de la reconstitución inmunológica postrasplante

Como consecuencia del tratamiento de acondicionamiento mieloablatoivo pre-TPH, la hematopoyesis normal y las células del sistema inmunológico del receptor son eliminadas y hay una pérdida de la memoria inmunitaria frente a organismos

infecciosos, ambientales y vacunaciones. Los pacientes experimentan un periodo prolongado de disfunción inmunológica con afectación tanto de la inmunidad humoral como celular que aumenta considerablemente el riesgo de infecciones en el periodo pos-TPH. Al quedar debilitada la respuesta inmunitaria, el tratamiento de las infecciones es difícil e ineficaz y la respuesta a las vacunas queda limitada.

La reconstitución inmunológica en el periodo postrasplante es clave para la recuperación efectiva de los pacientes, para evitar complicaciones infecciosas graves y la recidiva de la enfermedad de base. La reconstitución inmunológica depende fundamentalmente de que se produzca una transferencia efectiva de las células inmunitarias del donante, de la recuperación temprana de la ontogenia linfoide normal, de la incidencia de EICH aguda y crónica y de los tratamientos pos-TPH administrados.

Independientemente de la fuente de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), la inmunidad innata, particularmente la dependiente de los fagocitos y las células NK, es la primera en recuperarse dentro de las primeras semanas pos-TPH. Por el contrario, la recuperación de la inmunidad adaptativa, incluyendo a los linfocitos B y T, puede prolongarse desde varios meses hasta años postrasplante.

En adultos sometidos a TSCU la reconstitución inmunológica se caracteriza por una profunda linfopenia e inmunodeficiencia durante los primeros 6-12 meses postrasplante. En el desarrollo de la inmunidad pos-TPH se regenera la inmunidad linfoide normal derivada de las células progenitoras injertadas y de los elementos linfoides maduros, tanto linfocitos T como B, presentes en el injerto. El análisis inmunofenotípico mediante CFM permite identificar la presencia de linfocitos T y B y caracterizar su estadio de diferenciación (Parkman & Weinberg, 2009). A partir del primer año comienza la recuperación de la función B y T. El número absoluto de linfocitos totales en el periodo temprano pos-TSCU es muy bajo, excepto para las células NK circulantes cuyo número no difiere del de controles sanos. El recuento del número de células B comienza a elevarse a partir de los 6 meses pos-TSCU y continúa en aumento hasta normalizarse tras 1 año de seguimiento. En cuanto a la recuperación de la población T pos-TSCU, se observa un retraso en la recuperación tímica más pronunciada en adultos (18 meses) que en niños (12 meses). También se observa una disminución de la producción tímica con la edad y de las células T transferidas con el injerto (Escalón & Komanduri, 2010). En los TPH mieloablativos la reconstitución inmunológica depende de la capacidad del injerto hematopoyético para generar *de novo* las líneas linfoide y mieloide y de la funcionalidad de las células maduras contenidas en el injerto. Las primeras células en recuperarse son las

implicadas en la inmunidad innata (monocitos, granulocitos, macrófagos y células NK). Mientras que las células de la inmunidad específica (linfocitos T y B) tardan hasta años en recuperarse (Toubert, 2008).

1.4.1. Neutrófilos, monocitos y células dendríticas

Los monocitos son las primeras células en recuperarse, seguidas de polimorfonucleares, macrófagos tisulares y células NK (Mosaad, 2014). El prendimiento clínico de los granulocitos neutrófilos, que se consigue cuando éstos alcanzan un número $>0,5$ células $10^9/L$, se produce entre los días 10 y 25 postrasplante. Una vez ocurrido esto, el resto de poblaciones de leucocitos comienzan a recuperarse rápidamente, restaurando en gran medida la inmunidad innata (Storek *et al*, 2008). El recuento de neutrófilos se normaliza a las 4 semanas tras el TSCU, a diferencia de lo que ocurre en el TPH con sangre periférica movilizada con G-CSF (2 semanas) o con médula ósea (3 semanas), pero son hipofuncionales, especialmente en los pacientes con EICH aguda o crónica, por efecto de los corticoides utilizados para su tratamiento. El número de monocitos se normaliza alrededor de los 30 días pos-TPH pero su funcionalidad se mantiene disminuida durante aproximadamente 1 año (Storek *et al*, 2008).

Existen diferentes tipos de células dendríticas según su localización. Están implicadas en el procesamiento y la presentación de antígenos a las células T, siendo las únicas capaces de activar a los linfocitos T vírgenes. Aunque pueden detectarse células dendríticas epiteliales y de las áreas extrafoliculares de los nódulos linfáticos y del bazo a los 3 meses pos-TPH, su normalización se produce alrededor de los 6 meses. Las células dendríticas circulantes se identifican a las 2-3 semanas, pero su número continúa siendo bajo hasta los 3 meses pos-TPH. La recuperación de las células dendríticas tímicas, que participan en la eliminación de células T autorreactivas, no se conoce bien en humanos; y las foliculares, implicadas en la maduración de las células B, son escasas al año pos-TPH (Fearnley *et al*, 1999). Esto podría explicar la lenta recuperación de los linfocitos B. Algunos estudios indican que la presencia de células dendríticas circulantes junto con células T activadas $CD8^+HLADR^+$ en torno al día 50 pos-TSCU se asociaría con una menor incidencia de infecciones oportunistas (Szabolcs, 2010).

1.4.2. Células Natural Killer

El fenotipo de las células NK que se detectan en los pacientes trasplantados es diferente al de los individuos sanos (Chklovskaja *et al*, 2004). En general, las células NK y su función de citotoxicidad *in vitro* son las primeras en recuperarse durante las primeras semanas pos-TPH, normalizándose sus niveles alrededor de 1-2 meses (Auletta & Lazarus, 2005). Esta rápida normalización es debida a la expansión de la población inmadura CD56^{+brillante}CD16^{-/+débil}, que aumenta entre el primer y el tercer mes pos-TSCU. Estas células producen más IFN- γ y son menos citotóxicas que en la población normal y su expansión es más pronunciada en los receptores CMV positivos (Hokland *et al*, 1988). La maduración del linaje NK da lugar a una población de células NK intermedias caracterizadas por la coexpresión de CD56 y CD16, y finalmente a una población de células NK maduras que son CD56^{+débil}-CD16⁺⁺. La expresión de estos marcadores puede ser utilizada para caracterizar diferentes subpoblaciones de células NK en los pacientes antes y después del TSCU (Jacobs *et al*, 1992), (Shilling *et al*, 2003). La medida de la secreción de citoquinas como el IFN- γ o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por las células NK también es informativa por su implicación como mediadoras en la EICH (Storek *et al*, 2008).

Durante los primeros meses pos-TPH, las células NK eliminan las células que no presentan de forma eficaz ligandos para sus receptores KIR (Ruggeri *et al*, 1999) y tienen un efecto antileucémico, en particular en la leucemia mieloblástica aguda (LMA) (Ruggeri *et al*, 2002), (Ruggeri *et al*, 2007). Otra acción beneficiosa de las células NK alorreactivas podría ser la eliminación de las células presentadoras de antígenos del huésped que favorecen la actividad de las células T alorreactivas para causar EICH (Ruggeri *et al*, 2002). Los valores absolutos de las células NK permanecen aumentados hasta 1 año pos-TSCU y después se normalizan coincidiendo con el incremento en las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Komanduri *et al*, 2007).

1.4.3. Células T

La recuperación del compartimento de células T es fundamental para una reconstitución inmunológica funcional. En los receptores de TSCU, la diversidad de las células T se relaciona con varios factores: la supervivencia de las células T infundidas con el injerto, las células T residuales presentes en el receptor, la regeneración del timo (dependiente de la edad), el tratamiento inmunosupresor y las complicaciones postrasplante (Toubert, 2008), (Komanduri *et al*, 2007). En el marco del alo-TPH, el bajo número de células T del donante infundidas permite que sobrevivan las pocas

células T del receptor (no eliminadas por el régimen de acondicionamiento) debido a la ausencia de alorreactividad. Por otra parte, el número de células T del donante es tan bajo que durante las 2 primeras semanas, el compartimento T queda vacío. Esto induce una expansión tanto de las células T del donante como de las del receptor que reconstituye inicialmente el compartimento antes de que se desarrollen en el timo las primeras células T vírgenes derivadas del donante (Dumont-Girard *et al*, 1998). Esta última población de células T vírgenes producidas *de novo* deriva de las células troncales trasplantadas que se diferencian en el timo del receptor (Welniak *et al*, 2007) y sólo expresan marcadores de memoria. En el TPH, junto a la reducción de la capacidad del timo para producir nuevas células T con la edad y el efecto negativo de la EICH sobre la función tímica, se asocia el daño que ocasiona la terapia de acondicionamiento combinada con timoglobulina a las células epiteliales del timo, que disminuye su capacidad de producción de IL-17 necesaria para la supervivencia y el desarrollo de los timocitos (Mackall *et al*, 1995), (Mackall *et al*, 1997).

En el periodo pos-TPH, el número de linfocitos aumenta rápidamente en los primeros meses y las poblaciones linfocitarias, a excepción de los linfocitos T colaboradores, alcanzan valores normales en muchos pacientes. A pesar de ello, la frecuencia de infecciones durante el primer año es muy elevada. Los linfocitos T que se expanden en este periodo provienen de las células T progenitoras del donante trasfundidas junto con el injerto. La transferencia de la inmunidad del donante es escasa y la activación antigénica dista mucho de la que se produce en condiciones normales. Los clones de células T que se expanden son limitados de forma que sólo presentan unas pocas especificidades antigénicas. Además la mayor parte de estas células T han perdido sus receptores de migración y no pueden interaccionar con CPA ni estimular a las células B en los órganos linfoides secundarios (Storek *et al*, 2008).

La evaluación de la expresión de CD45RA y CCR7 permite definir diferentes subpoblaciones de células T: las células T vírgenes (CD45RA⁺CCR7⁺); las células de memoria central tempranas (CD45RA⁻CCR7⁺); las células de memoria efectoras (CD45RA⁻CCR7⁻); y las células de memoria efectoras tardías (CD45RA⁺CCR7⁻) (Sallusto *et al*, 1999). A largo plazo, las respuestas inmunológicas completas requieren la reconstitución de las células T vírgenes para responder frente a antígenos foráneos o tumorales. La reconstitución inmunológica de este compartimento requiere que el timo sea funcional para recuperar la ontogenia completa de las células T. El timo, durante este periodo, puede ser diana de ataques inmunológicos alorreactivos que pueden tener consecuencias en la selección tímica, en la generación de células T autorreactivas y en la perpetuación de la EICH (Toubert, 2008). El fallo en la

timopoyesis caracteriza la reconstitución inmunológica pos-TSCU comparada con otras fuentes de CPH y se asocia con una escasez de células CCR7⁺ vírgenes y de memoria central. La timopoyesis dañada y el bajo número de células T vírgenes previamente al TSCU se suman a la prolongada linfopenia T pos-TSCU, que se ve compensada por la expansión de células NK y B.

Con respecto a las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺, tras el TSCU el compartimento CD4⁺ se caracteriza por una relativa escasez de células vírgenes, con una alta proporción de células T memoria central y efectoras. El compartimento CD8⁺ contiene unas pocas células vírgenes y menos células T memoria central que el CD4⁺. Las células CD8⁺ expresan marcadores de memoria efectoras y de diferenciación a células T de memoria tardías (Komanduri *et al*, 2007). La preservación de las células CD4⁺CCR7⁺ vírgenes en el periodo inmediato pos-TSCU se relaciona con una mejor supervivencia debido a su capacidad de iniciar respuestas inmunológicas primarias tempranas frente a patógenos (Komanduri *et al*, 2007). Se observa una linfopenia más prolongada de CD4⁺ y CD8⁺, con una mayor inversión del cociente TCD4/TCD8 comparado con otras fuentes de CPH. Esto podría deberse al menor número de células madre y al predominio de linfocitos vírgenes cuya expansión homeostática periférica podría ser insuficiente para alcanzar una rápida recuperación inmunológica en el periodo temprano postrasplante. La recuperación de las células T CD4⁺ pos-TPH está especialmente limitada cuanto mayor es la edad del receptor. Este déficit de la recuperación se asocia con un mayor riesgo de infecciones oportunistas, de forma que en los pacientes CMV positivos o con EICH se observa una inversión todavía más pronunciada en el ratio CD4/CD8 (Escalón & Komanduri, 2010). Aunque la inmunidad T frente a ciertos tipos de virus se pierde tras el trasplante, las células T específicas contra CMV o VEB pueden detectarse a los 3 meses pos-TPH en mayor proporción que en individuos normales. Esto es debido a que la presencia del antígeno en el momento del trasplante hace que se produzca una sobreexpansión de estas células T en condiciones de linfopenia (Mackall *et al*, 1996). El número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ permanece muy bajo al menos 6 meses pos-TSCU, para posteriormente ir en aumento. Aproximadamente 1 año pos-TSCU, el cociente CD4/CD8 se normaliza y los valores absolutos de los linfocitos T CD8⁺ se acercan a los valores normales (Brown *et al*, 2010), (Komanduri *et al*, 2007). Durante el primer año postrasplante el compartimento de células T contiene células activadas HLADR⁺, mayor número de células CD8⁺ y menos células T vírgenes que en individuos normales (Leino *et al*, 1991), (Gratama *et al*, 1984), (Ault *et al*, 1985). La repoblación del compartimento T

por expansión homeostática no restaura la inmunidad T y el alto riesgo de infecciones se mantiene durante los 2 primeros años pos-TPH.

En individuos sanos, se observa mayor cantidad de células CCR7⁺ tanto en la población de células T CD4⁺ como en la de células CD8⁺. Una mayor proporción de células T CD4⁺CCR7⁺ a los 30 días pos-TSCU se asoció con una significativamente mayor supervivencia, mientras que esta relación no se observó en la población T CD8⁺CCR7⁺ (Komanduri *et al*, 2007). Esto explica que la recuperación de las células T vírgenes (CD45RA⁺CCR7⁺) sea clave para la reconstitución inmunológica a largo plazo, pero sin olvidar que las células T de memoria también son necesarias para una respuesta efectiva frente a patógenos.

Las células T vírgenes de SCU infundidas pueden iniciar una respuesta inmunológica primaria que conduce a la generación de células T de memoria específicas contra CMV en el periodo temprano pos-TSCU (Komanduri *et al*, 2007). Las células T de memoria (CD3⁺CD45RO⁺) son las primeras en expandirse tras el TPH pudiendo ser su origen del donante o de las células T del receptor que hayan sobrevivido al régimen de acondicionamiento. Estas células T responden rápidamente a patógenos que estaban presentes en el receptor antes del trasplante, su respuesta se produce más fácilmente y responden y entran en los tejidos más rápido que las células T vírgenes. Normalmente se dirigen a mantener bajo control las reactivaciones periódicas de herpesvirus, CMV o VEB, constituyendo la mayoría de las expansiones oligoclonales de células T encontradas en adultos sanos, especialmente en la población T CD8⁺. Son menos dependientes que las células T vírgenes en el reconocimiento de complejos de péptidos del CMH propios, en su supervivencia y expansión periférica (Toubert, 2008). La recuperación de linfocitos T funcionales específicos contra CMV es crítica para la protección frente a la infección activa por este virus. La medida de los niveles de IFN- γ en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en torno a 1 mes pos-TPH permite estratificar a los pacientes en función del riesgo de desarrollar una infección activa por CMV (Solano *et al*, 2008), así como evaluar la respuesta a la infección (Storek *et al*, 2008).

La inmunoterapia en determinados contextos puede ser utilizada para compensar la carencia de células T inmunocompetentes específicas de antígeno. En el caso del VEB, su reactivación puede dar lugar a un síndrome linfoproliferativo pos-TPH (SLPPT) (Toubert, 2008). El VEB se encuentra en el 90% de la población mundial, persistiendo de forma latente en el cuerpo tras la primo-infección. Se ha observado que el VEB está presente en el 60-80% de los casos de SLPPT. En el periodo pos-TPH en el que los pacientes se encuentran inmunocomprometidos la

respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T citotóxicos no se restablece hasta los 6 meses después y puede estar dañada en función de la terapia inmunosupresora empleada o el desarrollo de EICH. En ausencia de control por parte de los linfocitos T, el VEB inhibe la apoptosis y predispone a las células B a proliferar de forma incontrolada, favoreciendo la expresión de oncogenes, así como otras alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a una transformación maligna de los linfocitos B, ocasionando un SLPPT (Sanz & Andreu, 2014).

Durante los 6 primeros meses pos-TPH pueden encontrarse muchas anomalías en el repertorio de las células T que son difíciles de relacionar con el estado clínico del paciente. A partir de 1 año y hasta 2-3 años pos-TPH se pueden correlacionar estas alteraciones con la presencia de EICH, complicaciones infecciosas graves y recidiva de la enfermedad. La reconstitución T se retrasa en el caso de los trasplantes con depleción T o en los injertos con células CD34⁺ purificados y mejora cuando hay una hematopoyesis completa de las células del donante (Toubert, 2008).

1.4.4. Células T reguladoras

Las células T reguladoras (Tregs) expresan CD4, CD25 y FoxP3 y se encuentran en muy baja frecuencia en sangre periférica de adultos. Poseen efectos inmunomoduladores que reducen la alorreactividad disminuyendo el grado de EICH en los pacientes trasplantados, manteniendo la homeostasis del sistema inmunológico y favoreciendo la tolerancia hacia autoantígenos (Tolar *et al*, 2009). En SCU, las células T son mayoritariamente vírgenes y existe una subpoblación de Tregs relativamente más frecuente que en sangre periférica. Esto podría explicar la menor incidencia de EICH aguda en los TSCU comparado con TPH de médula ósea HLA compatibles. Los marcadores CD27 y CD127 (cadena α del receptor de la interleuquina-7) identifican subgrupos con función supresora dentro de la población CD4⁺CD25⁺⁺Foxp3⁺. Su capacidad inmunosupresora podría aprovecharse para mejorar la tolerancia en el TSCU (Welniak *et al*, 2007).

1.4.5. Círculos de escisión del receptor de células T

La reconstitución y el mantenimiento de la diversidad en los linfocitos T periféricos depende de la generación de timocitos funcionales a lo largo de la vida adulta. La diferenciación de las células T se caracteriza por una serie de reordenamientos de los genes del receptor de las células T, que da como resultado la unión de segmentos de los genes V, D y J. Durante el reordenamiento, los fragmentos

de ácido desoxirribonucleico (ADN) de estos segmentos génicos son eliminados como productos de escisión circulares. La cuantificación de los círculos de escisión del receptor de células T (TRECs) es una medida de la producción tímica de linfocitos vírgenes y del restablecimiento de la función de las células T (Hazenberg *et al*, 2001), (Geenen *et al*, 2003). En el contexto del TPH, la frecuencia de TRECs es menor a mayor edad de los pacientes y en trasplantes con depleción de células T. Los valores medios de TRECs en receptores de TSCU son significativamente más bajos que los observados en TPH autólogo o alogénico (Komanduri *et al*, 2007). Principalmente los niveles se mantienen bajos durante los 3-6 meses pos-TPH a causa de la EICH, la recaída leucémica y las infecciones oportunistas (Weinberg *et al*, 2001). Por el contrario, los niveles altos de TRECs y un amplio repertorio de células T se asocia con una eficiente reconstitución inmunológica a largo plazo (Talvensaari *et al*, 2002), aunque en el marco del alo-TPH se produce cierto retraso en la reconstitución inmunológica (Komanduri *et al*, 2007), (Chen *et al*, 2005). Una mejor función tímica del receptor antes del injerto se correlaciona con un resultado más favorable en términos de supervivencia, EICH o infecciones bacterianas o víricas, pudiendo convertirse en un buen factor pronóstico predictivo de la reconstitución inmunológica pos-TPH (Toubert, 2008).

1.4.6. Células B

A pesar de que el repertorio de células B derivado de las células B infundidas se restaura relativamente rápido postrasplante, las respuestas mediadas por anticuerpos se ven dificultadas por la ausencia de células T. La recuperación de la celularidad B postrasplante resume la ontogenia B normal. Las células B maduras circulantes que expresan CD19 y CD20 son indetectables o se encuentran en muy bajo número durante los 2-3 primeros meses pos-TPH y aumentan progresivamente hasta alcanzar cifras normales a 1-2 años postrasplante (Storek *et al*, 1993). El recuento de células B se estabiliza a los 6-9 meses, coincidiendo con la aparición de las células B derivadas del donante. La expresión de CD23 (receptor de baja afinidad para la fracción Fc de la IgE) y de CD38 (receptor de adhesión y migración, implicado en la homeostasis del calcio intracelular) es intensa en las células B de SCU, mientras que en adultos representan subpoblaciones minoritarias. Durante el primer año pos-TPH la mayoría de las células B circulantes presentan un inmunofenotipo indiferenciado expresando CD23⁺ y/o CD38⁺ (Guillaume *et al*, 1998). Las células B1 (CD19⁺CD5⁺), B memoria (CD19⁺CD27⁺) pueden detectarse a partir del primer año postrasplante, aunque la proporción estas últimas es escasa, siendo la mayoría

vírgenes (Storek *et al*, 2008). Este incremento es menor en alo-TPH comparado con TPH autólogo y en pacientes con EICH (Small *et al*, 1990), (Kook *et al*, 1997) probablemente debido a que la EICH y su tratamiento interfieren en la linfopoyesis B (Storek *et al*, 2001), (Storek *et al*, 1996).

Los niveles de inmunoglobulinas no son buenos marcadores de la recuperación de la inmunidad humoral pos-TPH, ya que muchos de ellos son autoanticuerpos o anticuerpos mono u oligoclonales inespecíficos. La generación de anticuerpos específicos contra determinadas proteínas antigénicas presentes tras el TPH ocurre durante el primer año y depende de que encuentren su antígeno. Si no se detectan antígenos la producción de anticuerpos específicos disminuye (Storek *et al*, 2008). La regeneración B está asociada a la aparición de expansiones de células B monoclonales, lo que apoya que la vacunación pos-TPH deba iniciarse cuando el número de linfocitos T CD4⁺ y B sea suficiente para obtener eficacia, normalmente a partir de los 6 meses pos-TPH (Toubert, 2008).

En resumen, diferentes estudios sugieren que el TSCU es una estrategia segura y efectiva en pacientes que carecen de donantes familiares o de DNE apropiados. Los estudios disponibles sobre la reconstitución inmunológica en pacientes trasplantados con unidades de SCU sin manipular o con unidades expandidas *ex vivo* es limitada y existe poca información sobre análisis comparativos en esta modalidad de trasplante. La CFM es una potente herramienta en el estudio cuantitativo de poblaciones linfocitarias del sistema inmunológico y la caracterización de subtipos linfocitarios minoritarios que podrían tener un papel relevante en la dinámica de la reconstitución inmunológica. El retraso en la reconstitución de la inmunidad celular predispone a los receptores de este tipo de trasplantes a sufrir infecciones oportunistas, posibles recaídas de su enfermedad hematológica, segundas neoplasias o SLPPT. Algunos trabajos proponen estrategias orientadas a acelerar la reconstitución inmunológica postrasplante mediante la infusión de linfocitos T reguladores (Nguyen *et al*, 2008), (Di Ianni *et al*, 2011), (Martelli *et al*, 2014) o linfocitos T reactivos frente a patógenos específicos como *Aspergillus*, CMV o VEB, (Perruccio *et al*, 2005), (Comoli *et al*, 2008), (Comoli *et al*, 2007), (Leen *et al*, 2009), (Feuchtinger *et al*, 2010). Otros autores plantean la manipulación de los linfocitos T infundidos para modular la alorreactividad (Ciceri *et al*, 2009), (Vago *et al*, 2012). El conocimiento de la dinámica y los mecanismos de la recuperación del sistema inmunológico y de las diferentes poblaciones linfocitarias que contribuyen a la misma permitiría una comprensión más profunda de la inmunobiología del TSCU y posibilitaría el diseño de estrategias terapéuticas orientadas a controlar la EICH, atenuar los efectos de la

inmunosupresión, acelerar la reconstitución inmunológica, modular la alorreactividad, controlar las infecciones víricas y la aparición de posibles SLPPT.

El conocimiento de la dinámica de la reconstitución inmunológica podría contribuir a mejorar la estrategia de prevención y tratamiento de las complicaciones derivadas y, por tanto, a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de pacientes que reciben un TSCU.

2. HIPÓTESIS

El análisis de la dinámica de la reconstitución inmunológica en los pacientes sometidos a trasplante de SCU con acondicionamiento mieloablativo podría ser crucial para trazar las estrategias profilácticas y terapéuticas más convenientes durante el periodo postrasplante. En consecuencia, se podría disminuir la morbilidad y mortalidad debida a las complicaciones derivadas de la lenta recuperación inmunológica que caracteriza a esta modalidad de trasplante.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal es estudiar la dinámica de la recuperación inmunológica en el TSCU mieloablativo y su potencial relación con las complicaciones más comúnmente asociadas a la profunda deficiencia del sistema inmunitario en el huésped, tales como las infecciones graves, la EICH aguda y crónica, así como las recaídas de la enfermedad. Para alcanzar este objetivo principal, se concibieron varios objetivos específicos que describimos a continuación:

1. Estudiar las subpoblaciones linfocitarias que se considera que tienen un papel relevante en la reconstitución inmunológica en diferentes periodos postrasplante (dinámica de la recuperación).
2. Analizar la asociación de los hallazgos en el comportamiento de la recuperación inmunológica con las características de los pacientes, de la enfermedad y de otros aspectos relacionados con el procedimiento (acondicionamientos, celularidad de las unidades, etc.).
3. Estudiar el impacto de la reconstitución inmunológica sobre la mortalidad relacionada con el trasplante y la supervivencia global.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

La serie analizada incluye 221 pacientes reclutados entre mayo de 1997 y noviembre de 2014 en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia diagnosticados de neoplasias hematológicas y sometidos a TSCU de DNE con acondicionamiento mieloablativo.

Los criterios de elegibilidad fueron:

- Edad comprendida entre 15 y 55 años.
- Diagnóstico inicial de neoplasia hematológica.
- Necesidad de un trasplante urgente en ausencia de un DNE HLA-idéntico.
- Indicación de un TSCU de DNE como mejor estrategia terapéutica por ausencia de un donante familiar adecuado (HLA-idéntico o con una única disparidad) tras una búsqueda en registros internacionales en un periodo de tres meses.
- Disponibilidad de una unidad de SCU cumpliendo los requisitos mínimos establecidos, tanto de compatibilidad HLA entre donante y receptor, como de la dosis celular de la unidad.
- Pacientes con una supervivencia de al menos 3 meses pos-TSCU y que disponían de al menos un estudio de seguimiento de poblaciones linfocitarias.
- Firma del consentimiento informado por escrito redactado en cumplimiento de las normas éticas requeridas por la declaración de Helsinki.

Las indicaciones de trasplante fueron aprobadas por el Comité Ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

4.2. Selección de la unidad de SCU

Las búsquedas de unidades de SCU apropiadas para la realización del trasplante se efectuaron a través del Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO). Los requisitos que las unidades deben de cumplir para su uso en este tipo de trasplante se describen a continuación (Sanz, 2012):

- Compartir al menos 4 antígenos HLA con el receptor (antígenos HLA de clase I [A y B] determinados por serología o por tipificación de baja resolución y antígenos de clase II [DRB1] por alta resolución).
- En lo que respecta a la dosis celular, distinguimos los siguientes periodos:

- Hasta mayo de 2006 se requería que la dosis de celularidad nucleada total (CNT) fuera superior a $1,5 \times 10^7/\text{kg}$ y las células CD34^+ superiores a $0,5 \times 10^5/\text{kg}$. En caso de que las células CD34^+ fueran inferiores a $1 \times 10^5/\text{kg}$, la dosis mínima de CNT debía ser superior a $2 \times 10^7/\text{kg}$.
- Después de mayo de 2006, una enmienda al protocolo establecía un mínimo de CNT de $2 \times 10^7/\text{kg}$ y de células CD34^+ superior a $1 \times 10^5/\text{kg}$.
- Desde julio de 2007 hasta la actualidad, el criterio se ha modificado valorando más la calidad de la unidad que el peso del receptor, exigiéndose una CNT mínima de 150×10^7 y un total de células CD34^+ superior a 7×10^6 .

4.3. Tipificación HLA de los pacientes y los donantes

La tipificación HLA de los pacientes y de las unidades de SCU fue siempre confirmado en el laboratorio de histocompatibilidad del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de la Comunidad Valenciana (Sanz, 2012). La tipificación serológica de los antígenos HLA de clase I se realizó con una técnica estándar de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (Terasaki & McClelland, 1964). El genotipaje HLA-A, -B, -C, -DRB, -DQA1, y -DQB1 por baja o alta resolución fue hecho por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de secuencia (SSP-PCR) (Olerup & Zetterquist, 1992) y el genotipado de HLA-DPB1 por alta resolución por PCR e hibridación reversa con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO-PCR) (Buyse *et al*, 1993).

4.4. Hemograma, bioquímica y serología

El hemograma, la bioquímica y la serología fueron solicitados según criterio médico y los resultados se introdujeron en la base de datos de laboratorio del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (GestLab, Indra).

4.5. Estudios de citometría de flujo multiparamétrica

Las poblaciones linfocitarias se caracterizaron mediante CFM en muestras de sangre periférica de menos de 24 horas de los pacientes incluidos en el estudio

obtenidas por venopunción y recogidas en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los estudios se efectuaron en diferentes momentos evolutivos (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses pos-TSCU) mediante un procedimiento automatizado. En un subgrupo de 52 pacientes se realizó en los mismos momentos evolutivos un estudio manual de poblaciones linfocitarias, que incluyó la caracterización de otros subtipos linfocitarios (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Poblaciones y subtipos linfocitarios identificados mediante CFM.

Subtipo linfocitario	Inmunofenotipo
Linfocitos T totales	CD3 ⁺
Linfocitos T colaboradores	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻
Linfocitos T citotóxicos	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺
Células T vírgenes	CD3 ⁺ CD45RA ⁺
Células T memoria	CD3 ⁺ CD45RO ⁺
Células T activadas	CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLADR ⁺
Células T vírgenes y memoria centrales	CD3 ⁺ CCR7 ⁺
Células B totales	CD19 ⁺
Células B maduras	CD19 ⁺ CD20 ⁺
Células B con clonalidad Kappa	CD19 ⁺ Ig Kappa ⁺
Células B con clonalidad Lambda	CD19 ⁺ Ig Lambda ⁺
Células B1	CD19 ⁺ CD5 ⁺
Células B memoria	CD19 ⁺ CD27 ⁺
Células B activadas	CD19 ⁺ CD23 ⁺ o CD19 ⁺ CD38 ⁺
Células NK totales	CD16 ⁺ CD56 ⁺
Células NK inmaduras	CD56 ^{++brillante} CD16 ^{-/+débil}
Células NK maduras	CD56 ^{-/+débil} CD16 ⁺⁺
Células NK activadas	CD16 ⁺ CD11b ⁺ o CD16 ⁺ HLADR ⁺

4.5.1. Estudio automatizado de poblaciones linfocitarias

4.5.1.1 Procesamiento de las muestras

La preparación de las muestras y la dispensación de los AcMos se realizó mediante el preparador automático Sample Prep Assistant II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). En función del periodo del estudio se utilizó el reactivo BD Multitest (desde 1998 hasta 2012) y BD Multitest 6-color TBNK (hasta 2014) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Estos reactivos consisten en una mezcla de AcMos para la identificación de las diferentes poblaciones linfocitarias. El marcaje de la sangre periférica se realizó en una plataforma única empleando tubos TruCount que contienen un número conocido de microesferas liofilizadas que permite al equipo calcular el número absoluto de las células linfocitarias.

$$\frac{\left(\frac{\text{número de eventos de interés}}{\text{número de microesferas en el tubo}} \right)}{\left(\frac{\text{número de microesferas del lote}}{\mu\text{L muestra}} \right)}$$

La técnica automatizada consistió en marcar 50 μL de sangre periférica con 20 μL del reactivo que contiene una combinación de AcMos conjugados con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína peridinín clorofila (PerCP) y alofococianina (APC) en el caso de combinaciones de 4 AcMos; en las combinaciones de 6 AcMos se sustituyó PerCP por proteína peridinín clorofila con cianina 5.5 en tándem (PerCPCy5.5) y se añadieron ficoeritrina con cianina 7 en tándem (PECy7) y alofococianina con cianina 7 (APCCy7).

El reactivo BD Multitest incluía dos combinaciones de AcMos en dos tubos TruCount por separado. El primer tubo con una mezcla de CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP y CD4-APC; el segundo incluía CD3-FITC, CD16/CD56-PE, CD45-PerCP y CD19-APC (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Estudio de poblaciones linfocitarias con el reactivo BD Multitest.

Tubo	FLC	FITC	PE	PerCP	APC
1	AcMo	CD3	CD8	CD45	CD4
	clon	SK3	SK7	SK1	2D1
2	AcMo	CD3	CD16/CD56	CD45	CD19
	clon	SJ25C1	SK7/NCAM 16	B73.1	2D1

FLC: fluorocromo; AcMo: anticuerpo monoclonal; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP: proteína peridín clorofila; APC: alofocianina

El reactivo BD Multitest 6-color TBNK consistía en una sola combinación de 6 AcMos con CD3-FITC, CD16/CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD4-PECy7, CD19-APC y CD8-APCCy7 en un único tubo TruCount (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Estudio de poblaciones linfocitarias con el reactivo BD Multitest 6-color TBNK.

FLC	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
AcMo	CD3	CD16/CD56	CD45	CD4	CD19	CD8
clon	SK7	B73.1/NCAM16.2	2D1 (HLe-1)	SK3	SJ25C1	SK1

FLC: fluorocromo; AcMo: anticuerpo monoclonal; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCPCy5.5: proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem; ficoeritrina con cianina 7 en tándem; APC: alofocianina; APCCy7: alofocianina con cianina 7

La incubación con los AcMos se realizó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente (TA). A continuación, los hematíes se lisaron con 450 μ L de solución FACSLysing (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) durante 15 minutos en las mismas condiciones. Tras este paso la muestra se transfirió al citómetro de flujo para su adquisición y análisis.

4.5.1.2 Adquisición de las muestras

Las muestras fueron adquiridas inicialmente en un citómetro de flujo FACSCalibur (1997-2012) mediante el programa BD Multiset y en un FACSCanto-II (2012-2014) con el programa BD FACSCanto versión 2.4 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) en el periodo final del estudio. El número de leucocitos adquiridos en cada muestra lo establecen de forma automática los programas de adquisición con el fin de asegurar un número adecuado de células para el análisis de la población linfocítica.

4.5.1.3 Análisis de las muestras

El análisis de los datos de citometría de las poblaciones linfocitarias marcadas con combinaciones de 4 AcMos se realizó en el citómetro FACSCalibur mediante el programa BD Multiset (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) que realiza un análisis automatizado de las poblaciones linfocitarias, siendo necesario en algunos casos un reajuste manual de las regiones de selección. Para el análisis automático del primer tubo, el programa selecciona la región de los linfocitos en un diagrama de CD45 vs SSC y representa estas células en los gráficos de CD3 vs CD8, CD3 vs SSC y CD8 vs CD4 identificando a los linfocitos T, T colaboradores y T citotóxicos. En el segundo tubo, el programa selecciona nuevamente la región de los linfocitos en CD45 vs SSC y los representa en los diagramas de CD3 vs CD16/CD56, CD3 vs SSC y CD16/CD56 vs CD19 para identificar a los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK.

El análisis de los datos de citometría de las poblaciones linfocitarias marcadas con combinaciones de 6 AcMos se realizó de forma similar mediante el programa clínico FACSCanto versión 2.4 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), que realiza un análisis automatizado de las poblaciones linfocitarias, siendo necesario en algunos casos un reajuste manual de las regiones de selección. La suma de las principales poblaciones linfocitarias (T, B y NK) o linfosuma, tiene un valor establecido de 100 +/- 5.

El análisis automatizado realizado por el programa se muestra en la Figura 4.1. Las células y las microesferas se representan en un diagrama de puntos de CD45 vs SSC, en el que se seleccionan los leucocitos y se eliminan las partículas inespecíficas de la muestra. Para la identificación de los linfocitos se utiliza la expresión intensa de CD45. Las células B se individualizan en un diagrama de puntos de CD19 vs SSC, mientras que un diagrama de CD3 vs SSC permite la discriminación de los linfocitos T del resto de células linfocitarias. Por último, las células T CD4⁺ y CD8⁺ se identifican en

un diagrama con CD4 vs CD8 y los linfocitos B y las células NK en otro de CD19 vs CD16/CD56. La enumeración de las microesferas se realiza utilizando el diagrama de CD19 vs SSC.

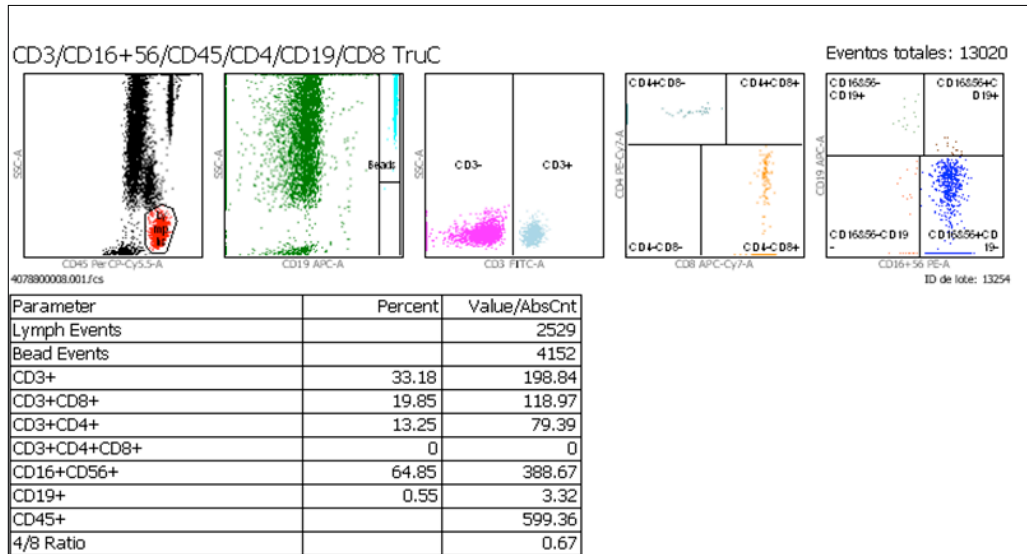


Figura 4.1. Análisis automático de poblaciones linfocitarias en sangre periférica utilizando el programa de análisis FACSCanto versión 2.4 en un citómetro de flujo FACSCanto-II.

Los resultados se obtuvieron tanto en porcentaje como en números absolutos (células/ μ L). Los rangos de normalidad para cada una de las poblaciones linfocitarias determinadas utilizando los kits comerciales de Becton Dickinson se establecieron utilizando los valores de referencia proporcionados por el fabricante (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Valores de referencia de las poblaciones linfocitarias usando el reactivo BD Multitest 6-color TBNK.

Población linfocitaria	Media (%)	Rango (95%)	Media (cels/ μ L)	Rango (95%) (cels/ μ L)
CD3 ⁺ totales	71,1	49,1 – 83,6	1.705	603-2.990
CD3 ⁺ CD4 ⁺	46,4	28,2 – 62,8	1.106	441-2.156
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24	10,2 – 40,1	583	125-1.312
CD19 ⁺	14,9	6,5 – 27,0	354	107-698
CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,7	4,2 – 25,2	266	95-640

4.5.2. Estudio manual de poblaciones linfocitarias

4.5.2.1 Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó utilizando paneles con combinaciones de 5 a 6 AcMos conjugados con fluorocromos para los siguientes antígenos de superficie: CD3, CD4, CD5, CD10, CD16, CD20, CD23, CD27, CD38, CD45, CD45RO, CD45RA, CD56, CCR7, HLADR, Ig Kappa, Ig Lambda (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). CD3, CD8, CD20 (Cytognos, Salamanca, ES). CD8, CD11b, CD19 (Immunotech, Marseille, FR) que se incluyeron en diferentes tubos (**Tabla 4.5**).

Brevemente, la técnica consistió en una primera incubación de 15 minutos de las células con los AcMos en oscuridad a TA y la lisis de los hematíes durante 10 minutos con la solución QuickLysis (Cytognos, Salamanca, ES) para a continuación realizar la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

Tabla 4.5. Panel de estudio de los subtipos linfocitarios mediante CFM según el momento de estudio (meses postrasplante).

Meses	FLC	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
3,6,12,18,24,36	AcMo	CD8	CD56	CD45	CD4	CD3	CD16
	Clon	UCH-T4	MY31	2D1	SK3	SK7	3G8
3,6,12,24,36	AcMo	Ig Kappa	Ig Lambda	CD20	CD19	CD10	CD45
	Clon	TB28-2	1-155-2	L27	J3-119	HI10A	2D1
12,18,24,36	AcMo	CD20	CD27	CD45	CD19	CD5	CD10
	Clon	2H7	L128	2D1	J3-119	L17F12	HI10A
12,18,24,36	AcMo	CD20	CD23	CD38	CD19	CD10	CD45
	Clon	2H7	EBVCS-5	HIT2	J3-119	HI10a	2D1
12,18,24,36	AcMo	CD8	CD4	CD3	CD45RO	CD45RA	CD45
	Clon	UCH-T4	SK3	SK7	UCHL1	HI100	2D1
12,18,24,36	AcMo	CD8	CCR7	-	CD4	CD3	CD45
	Clon	UCH-T4	150503	-	SK3	SK7	2D1
3,12,18,24,36	AcMo	CD11b	CD3	HLADR	CD8	CD45	CD16
	Clon	Bear-1	33-2A3	L243	SFC121Thy2D3	2D1	3G8

FLC: fluorocromo; AcMo: anticuerpo monoclonal, FITC: isotiocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, PerCPCy5.5: proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem, PECy7: ficoeritrina con cianina 7 en tándem, APC: alofocianina, APCH7: alofocianina con cianina H7 en tándem.

4.5.2.2 Adquisición de las células

Para asegurar un número suficiente de células para el posterior análisis de cada subpoblación, se adquirieron a través de una región en el diagrama de FSC vs SSC un mínimo de 50.000 y un máximo de 100.000 leucocitos en un citómetro de flujo FACSCanto-II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

4.5.2.3 Análisis de las poblaciones

El análisis de los datos de citometría de los diferentes subtipos linfocitarios se realizó de forma manual utilizando el programa Infinicyt 1.7 (Cytognos, Salamanca, ES). Los resultados fueron consensuados por dos citometristas.

Los resultados se obtuvieron en porcentaje sobre cada una de las poblaciones linfoides (T, B o NK). El cálculo absoluto (células/ μL) de cada uno de los subtipos linfocitarios se determinó utilizando la cifra absoluta de linfocitos (calculada de forma automática por el citómetro de flujo en el estudio de poblaciones linfocitarias) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje subtipo linfocitario} \times \left(\frac{\text{linfocitos}}{\mu\text{L}} \right) / 100$$

El análisis manual de los ficheros de CFM se realizó mediante el programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca, ES) utilizando diagramas de puntos biparamétricos. Se diseñó un perfil de análisis que incluía un diagrama de puntos de FSC vs SSC y cada una de las fluorescencias empleadas frente a SSC.

Una población celular se identificó como positiva cuando se expresaban los antígenos utilizados para su identificación y se adelantaba en el eje de ordenadas con respecto al resto de las poblaciones de células negativas en la muestra. El análisis se inició eliminando las partículas inespecíficas con bajo FSC vs SSC y ausencia de expresión de CD45. A continuación, las diferentes subpoblaciones celulares se identificaron en el área positiva en el diagrama biparamétrico donde se representó el AcMo que las caracteriza. De este modo, los linfocitos T, B y las células NK se seleccionaron mediante la expresión de CD3⁺, CD19⁺ y CD16⁺/CD56⁺/CD3⁻, respectivamente, con una expresión de CD45⁺⁺ (Figura 4.2). Los linfocitos T colaboradores (CD4⁺CD8⁻) y citotóxicos (CD4⁻CD8⁺) se individualizaron mediante la valoración de la expresión de CD4 y CD8. Los AcMos CD45RA y CD45RO permitieron caracterizar a los linfocitos T vírgenes y memoria, respectivamente. La expresión de CD3⁺CD8⁺HLADR⁺ identificó a los linfocitos T activados y CCR7 a los linfocitos T con capacidad migratoria.

Los linfocitos B maduros (Figura 4.3) son CD20 positivos y pueden presentar clonalidad para las cadenas ligeras kappa o lambda. La subpoblación de linfocitos B1 se individualizó mediante la expresión de CD19⁺CD5⁺. La detección de CD19 y CD27 identificó a una subpoblación de linfocitos B de memoria. Los linfocitos B activados se

identificaron como CD19⁺CD23⁺ y los linfocitos B activados con función de adhesión y migración como CD19⁺CD38⁺.

Los diferentes estadios madurativos de las células NK se caracterizaron mediante la expresión de CD56 y CD16 (Figura 4.4). Las células NK de sangre periférica inmaduras presentan una elevada expresión de CD56 y una débil expresión de CD16. El aumento de la expresión de CD16 junto con la pérdida de CD56 permitió identificar a las células NK maduras. Estas últimas células expresan CD11b⁺ cuando no han recibido activación antigénica y HLADR⁺ cuando se encuentran activadas.

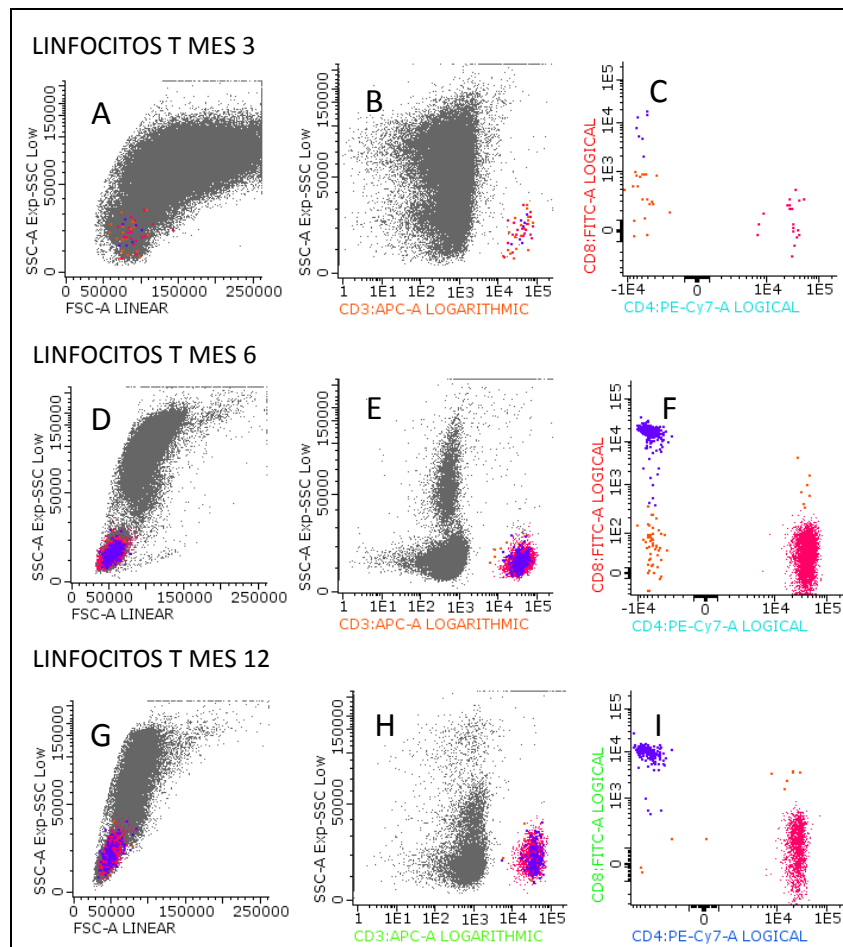


Figura 4.2. Estrategia de análisis manual de la reconstitución de los linfocitos T en un paciente a los 3, 6 y 12 meses pos-TSCU. A, D y G: diagramas de FSC vs SSC que muestran los linfocitos T totales (naranja), los subtipos CD4 (rosa) y CD8 (morado). B, E y H: diagramas de CD3 vs SSC que muestran los linfocitos T CD3⁺. C, F e I: diagramas de CD4 vs CD8 que muestran los linfocitos T colaboradores CD4⁺ (rosa) y citotóxicos CD8⁺ (morado).

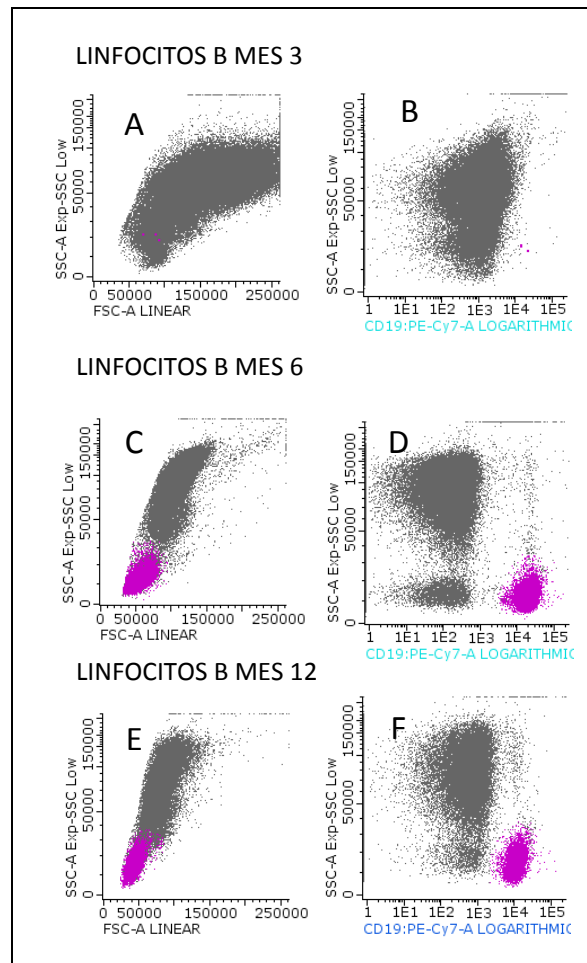


Figura 4.3. Estrategia de análisis manual de la reconstitución de los linfocitos B en un paciente a los 3, 6 y 12 meses pos-TSCU. A, C y E: diagramas de FSC vs SSC que muestran los linfocitos B totales (morado). B, D y F: diagramas de CD19 vs SSC que muestran los linfocitos B CD19⁺.

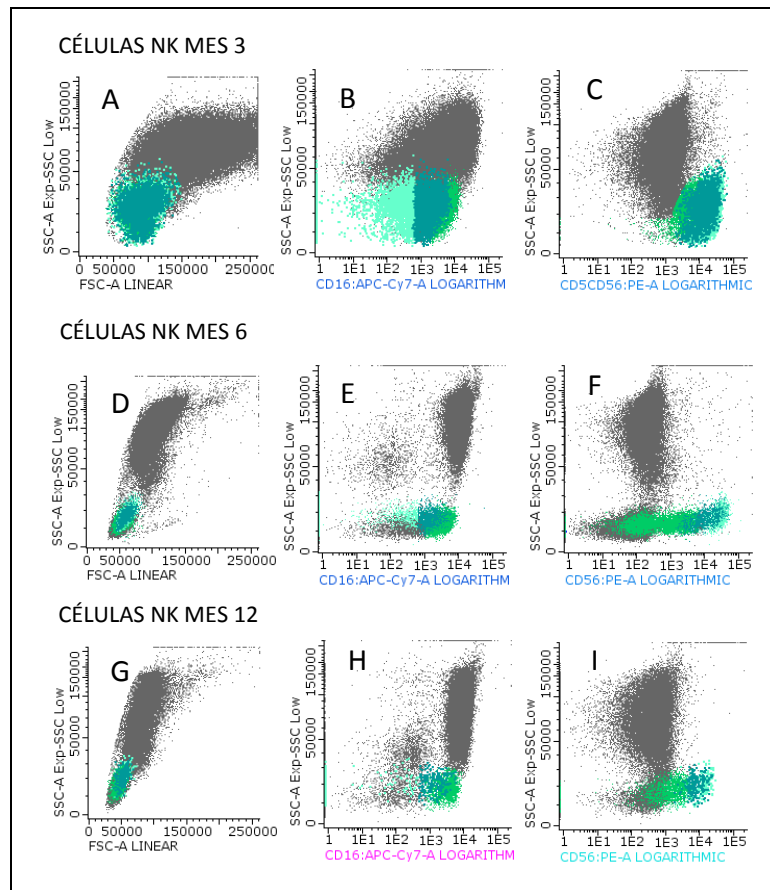


Figura 4.4. Estrategia de análisis manual de la reconstitución de las células NK en un paciente a los 3, 6 y 12 meses pos-TSCU. A, D y G: diagramas de FSC vs SSC que muestran las células NK (color). B, E, H, C, F e I: diagramas de CD16 vs SSC y CD56 vs SSC que muestran la distinta expresión de CD16⁺ y CD56⁺ en las células NK (maduras en verde claro, intermedias en verde oscuro e inmaduras en turquesa).

4.6. Recuento de células progenitoras hematopoyéticas por citometría de flujo

El recuento de CPH de las unidades de SCU se realizó en el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana utilizando un kit comercial con los AcMos CD45-FITC, CD34-PE y el marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD) en un citómetro FACSCanto-II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) siguiendo las recomendaciones de la *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) (Sutherland *et al*, 1996), (Sutherland *et al*, 2003), (Thiago & Sutherland, 2015).

4.7. Indicación del tipo y las características del TSCU

La indicación definitiva del tipo y las características del TPH, incluyendo la fuente de progenitores hematopoyéticos y el tratamiento de acondicionamiento se decidieron en una sesión específica semanal en la que participan los hematólogos del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. En esta sesión se describen de forma pormenorizada las circunstancias particulares de cada paciente que justifican la indicación de un TPH y se presenta la información acerca de los potenciales donantes y la urgencia requerida para la realización del procedimiento. Finalmente se toma una decisión teniendo en cuenta los criterios del equipo de facultativos (Sanz, 2012).

4.8. Regímenes de acondicionamiento

El régimen de acondicionamiento mieloablatoivo tiene como objetivo eliminar las células malignas, provocar una inmunosupresión que permita el injerto funcional y permanente de las células trasplantadas y producir una aceptable MRT (Carreras *et al*, 2010). Los tratamientos de acondicionamiento que se emplearon durante el periodo de estudio se muestran en la Figura 4.5 (Sanz, 2012). Junto con los fármacos quimioterápicos se administraron sustancias inmunosupresoras como antitimoglobulina (ATG), ciclosporina A (CSA), prednisona (corticoide) o micofenolato mofetil (MMF). La combinación de CSA con prednisona o MMF se utilizó para prevenir la EICH. A los pacientes que desarrollaron EICH se les administraron altas dosis de corticoides.

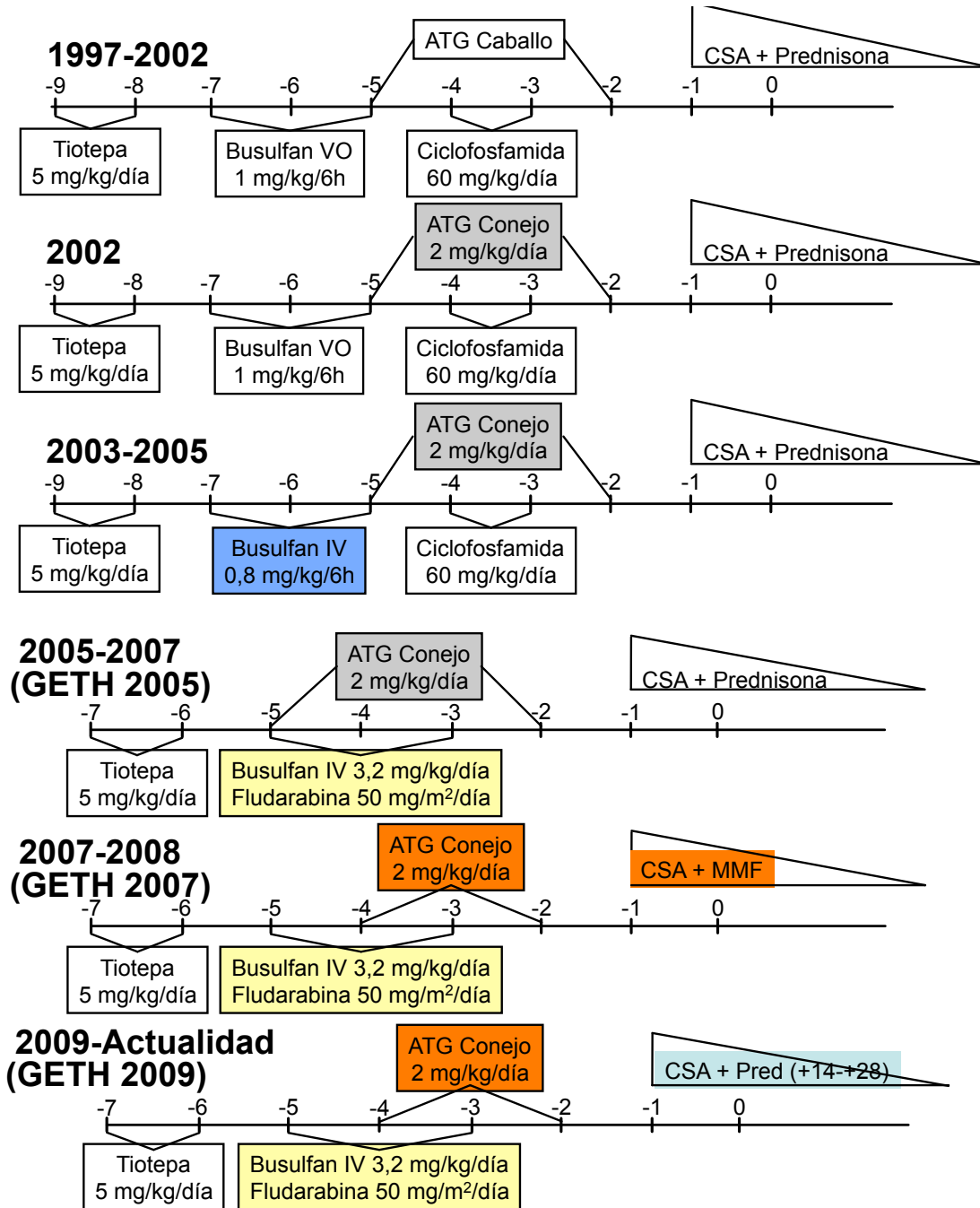


Figura 4.5. Esquema de los diferentes regímenes de acondicionamiento usados en el Hospital Universitario La Fe. Tomado con permiso de J. Sanz. ATG: antitimoglobulina; CSA: ciclosporina A; GETH: Grupo Español de Trasplante Hematopoyético; IV: intravenosa; MMF: micofenolato mofetilo; Pred: prednisona; VO: vía oral.

4.9. Manejo clínico de la EICH

La profilaxis de la EICH se realizó administrando CSA. Hasta el año 2007, la CSA se combinó con prednisona (Sanz *et al*, 2001). A partir del año 2007 se sustituyó la prednisona por MFM. Posteriormente en el año 2009 se sustituyó el MFM por una pauta corta de corticoides. Los pacientes que desarrollaron EICH aguda recibieron tratamiento de primera línea con metilprednisolona. Los pacientes que desarrollaron EICH crónica fueron tratados con prednisona (Moscardó *et al*, 2014). La descripción detallada de los tratamientos de profilaxis está fuera de los objetivos de este trabajo.

4.10. Cuidados de soporte

Los pacientes que fueron trasplantados se hospitalizaron en habitaciones individuales dotadas con aire a presión positiva y filtros HEPA (high-efficiency particulate air) en régimen de aislamiento invertido. Se administró G-CSF tras el TSCU hasta que se produjo la recuperación de las cifras de neutrófilos, al mismo tiempo que los pacientes recibieron profilaxis antibacteriana. Durante 6 meses pos-TSCU o durante el tratamiento con corticoides todos los pacientes siguieron una profilaxis antifúngica. En caso de fiebre de $>38^{\circ}\text{C}$ o infección se les suministró a los pacientes empíricamente antibióticos de amplio espectro. El seguimiento de los enfermos se realizó al menos semanalmente hasta el día +100, una vez al mes hasta el día +365 y anualmente a partir de este momento. Además se tomaron otras medidas preventivas y terapéuticas que actualmente se utilizan en los pacientes con TSCU como medidas de profilaxis y monitorización de las infecciones bacterianas, fúngicas y virales, tratamiento de las infecciones y otras medidas de soporte. Su descripción detallada está fuera de los objetivos de este trabajo.

4.11. Definiciones

4.11.1. Injerto mieloide

Se definió como un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) igual o superior a $0,5 \times 10^9/\text{L}$ en 3 días consecutivos. El tiempo para el injerto mieloide se midió teniendo en cuenta el tiempo requerido para alcanzar el primer día del injerto mieloide.

4.11.2. Injerto plaquetar

Se definió como un recuento absoluto de plaquetas igual o superior a $20 \times 10^9/L$ sin requerir soporte de transfusiones en 7 días consecutivos. El tiempo para el injerto plaquetar se midió teniendo en cuenta el tiempo requerido para alcanzar primer día del injerto plaquetar.

4.11.3. Fallo de injerto

Se definió como fallo primario de injerto a la ausencia de injerto mieloide en los pacientes que sobrevivieron al menos 28 días después del trasplante. El fallo secundario de injerto se definió como la pérdida de un injerto.

4.11.4. Enfermedad injerto-contra-huésped aguda y crónica

Para la definición y la gradación de la EICH aguda y crónica se tuvieron en cuenta los criterios estándar (Glucksberg *et al*, 1974), (Przepiorka *et al*, 1995), (Shulman *et al*, 1980).

4.12. Clasificación del estado de la enfermedad al TSCU

El estado de la enfermedad en el momento del TSCU se clasificó en tres estadios (Sanz *et al*, 2013):

- Estadio precoz: pacientes con leucemia aguda, linfoma o síndrome mielodisplásico (SMD) en primera remisión completa, leucemia mieloide crónica (LMC) en primera fase crónica y anemia refractaria no tratada.
- Estadio intermedio: pacientes con leucemia aguda, linfoma o SMD en segunda o superior remisión completa, LMC en segunda fase crónica o fase acelerada.
- Estadio avanzado: leucemia aguda y linfoma refractario o en recaída, LMC en crisis blástica y anemia refractaria con exceso de blastos no tratada.

4.13. Recolección, almacenamiento y gestión de los datos

Los datos de CFM se obtuvieron en archivos en formato *fcs y se almacenaron en los ordenadores de los citómetros. Se guardó una copia de seguridad de los

mismos en discos duros externos y en el servidor del Laboratorio de Citometría de Flujo del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Desde 1997 hasta 2011, los resultados de los estudios de poblaciones linfocitarias se recogieron tanto en una base de datos diseñada para tal propósito como en una base de datos de Microsoft Access (Microsoft Office®). A partir de 2011 se introdujeron en la base de datos de laboratorio del Hospital (Gestlab, Indra). Los resultados del análisis manual de los ficheros de citometría se recogieron en la base de datos de laboratorio del Hospital (Gestlab, Indra), así como en un formulario de Microsoft Access (Microsoft Office®) concebido para ello.

La información de los hemogramas se recogió en una base de datos del laboratorio de morfología del Hospital y posteriormente se almacenaron en soporte informático hasta 2011. Los resultados de bioquímica y serología se registraron en la base de datos de los laboratorios del Hospital (Intralab). A partir de 2011 todos los resultados de estas pruebas se incluyeron en la base de datos de laboratorio (Gestlab, Indra). Los resultados siempre se incorporaron en la historia clínica de los pacientes.

Los datos acerca de la modalidad de trasplante, los detalles sobre tratamientos, complicaciones infecciosas, EICH y la evolución se almacenaron en diferentes bases de datos de Microsoft Access (Microsoft Office®) del Servicio de Hematología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Estos datos se actualizaron periódicamente.

Los datos para la elaboración de esta tesis se seleccionaron mediante varias consultas SQL y se exportaron a hojas de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft Office®) que se utilizaron para el posterior análisis estadístico de los datos.

4.14. Análisis estadístico

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de la serie. Los resultados se expresaron como porcentajes en las variables categóricas y como medianas (extremos) para las variables continuas. El estudio de la comparación de la distribución de las variables en los distintos subgrupos de pacientes se realizó para variables continuas mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney o el test de la t de student, de acuerdo a la normalidad de la distribución. Para variables categóricas se utilizó el test de chi-cuadrado de Pearson, con la corrección de Yates cuando ésta fue necesaria. Todos los valores de p fueron calculados usando “tests de dos colas”.

El análisis estadístico se realizó usando R versión 3.2.1 (undefined author), empleando los paquetes markdown 0.7.7, car 2.1-0, tableone 0.7.1, prodlim 1.5.1,

survival 2.38-3 y cmprsk 2.2-7. Las gráficas de las poblaciones y los subtipos linfocitarios se realizaron utilizando el paquete ggplot2 1.0.1, representando las medias con el error estándar. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. En las variables estudiadas que mostraron significación estadística se analizaron las diferencias entre los meses 12 y 3 y la pendiente (de cada paciente) a los 3, 6 y 12 meses para las poblaciones linfocitarias.

Las variables consideradas para el análisis de factores pronóstico de reconstitución inmunológica fueron: edad, sexo, diagnóstico, fase de la enfermedad, alo-TPH previo, serología CMV del receptor, compatibilidad HLA donante-receptor, sexo donante-receptor, características relacionadas con la celularidad de las unidades de SCU en el momento de la infusión (CNT, CD34+, CFU-GM, linfocitos absolutos, linfocitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, linfocitos B CD19⁺ y células NK CD16⁺CD56⁺), régimen de acondicionamiento mieloablativo y profilaxis de la EICH. Cuando las variables continuas fueron categorizadas se utilizó la mediana y primer y tercer cuartil como puntos de corte.

La probabilidad de MRT se calculó mediante el método de incidencia acumulada (riesgo competitivo) (Gooley *et al*, 1999), (Fine & Gray, 1999). Se consideró evento competitivo la recaída. El análisis actuarial de supervivencia se hizo mediante el método Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) y para comparaciones las pruebas del log-rank (Mantel, 1966). La supervivencia global (SG) se calculó desde la fecha del TPH y la recaída o muerte en remisión completa fueron considerados eventos no censurados, cualquiera que ocurriese primero. El seguimiento de los pacientes para este estudio fue actualizado el 1 de octubre de 2015.

5.RESULTADOS

5.1. Serie global

5.1.1. Características de los pacientes

Las características de la serie analizada de 221 pacientes adultos que recibieron un TSCU de DNE en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe desde mayo de 1997 a noviembre de 2014 se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Características de los pacientes sometidos a TSCU mieloablativo*

Número de pacientes (N)	221
Edad, años	
Mediana	35
Extremos	15-55
Grupos de edad, n (%)	
15 – 20	27 (12)
21 – 30	63 (29)
31 – 40	63 (29)
41 – 50	51 (23)
> 50	17 (8)
Sexo, n (%)	
Hombre	132 (60)
Mujer	89 (40)
Peso, kg	
Mediana	71
Extremos	37-144
Fase de la enfermedad al TSCU, n (%)	
Precoz	124 (56)
Intermedio	52 (24)
Avanzado	45 (20)
Diagnóstico	
Leucemia mieloblástica aguda (LMA)	85 (38)
Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	85 (38)
Leucemia mieloide crónica (LMC)	18 (8)
Síndrome mielodisplásico (SMD)	12 (5)
Síndrome linfoproliferativo crónico (SLPC) o linfoma	18 (8)
Síndrome mieloproliferativo crónico (SMPC)	1 (<1)
Otros	2 (<1)
Trasplante autólogo previo, n (%)	18 (8)
Estado serológico del receptor a CMV, n (%)	
Positivo	171 (77)
Negativo	50 (23)

* Los porcentajes pueden no sumar 100 debido al redondeo. TSCU: trasplante de sangre de cordón umbilical; CMV: citomegalovirus.

La mediana de edad de los pacientes trasplantados fue 35 años (extremos, 15-55), de los que 132 (60%) fueron hombres. La distribución por enfermedades y el estadio en el momento del trasplante se muestran en la Figura 5.1 y la Figura 5.2, respectivamente. En 18 pacientes el TSCU se realizó tras recaída de la enfermedad después de un TPH autólogo. La mediana de seguimiento de los pacientes vivos en el momento del presente análisis fue 66 meses (extremos, 7-180).

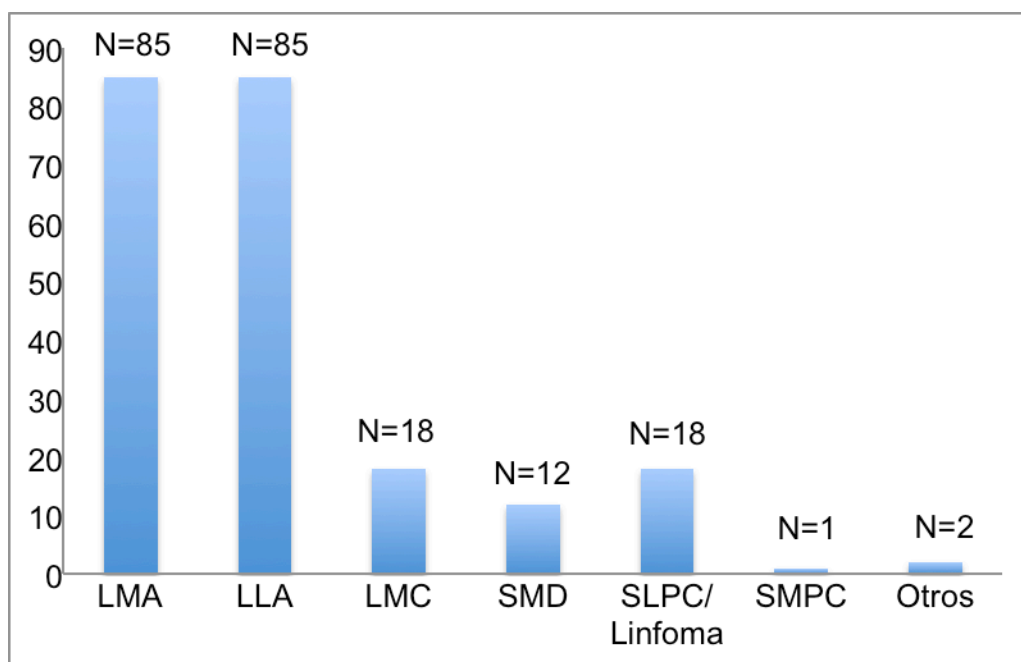


Figura 5.1. Distribución por enfermedades de los pacientes sometidos a TSCU. LMA: leucemia mieloblástica aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndrome mielodisplásico; SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico; SMPC: síndrome mieloproliferativo crónico.

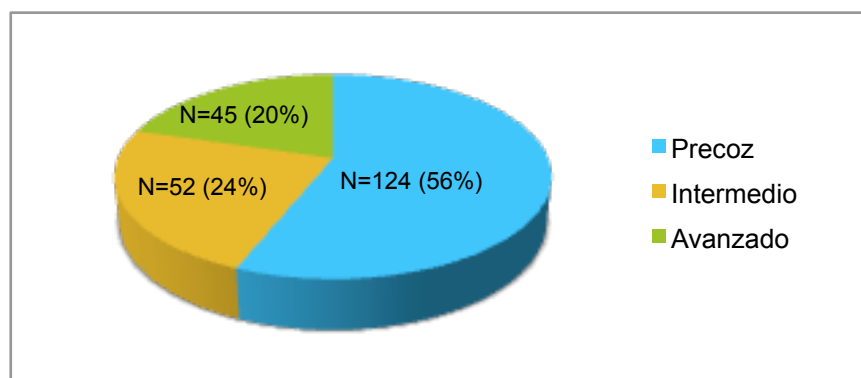


Figura 5.2. Distribución del estadio de la enfermedad en el momento del TSCU.

5.1.2. Características de las unidades de SCU y del procedimiento del trasplante

La procedencia de las unidades de SCU se muestra en la Tabla 5.2. Las unidades de SCU utilizadas se obtuvieron preferentemente de los bancos de Barcelona (33%) y New York (12%). En la Tabla 5.3 se recogen los datos relativos al grado de compatibilidad HLA e incompatibilidad ABO y emparejamientos por sexo entre donante y receptor.

Tabla 5.2. Procedencia de las unidades de SCU*

País	N (%)
España	101 (46)
Barcelona	74 (33)
Valencia	11 (5)
Madrid	7 (3)
Otros	9 (4)
Estados Unidos	56 (25)
New York	26 (12)
Saint Louis	12 (5)
Detroit	1 (<1)
Denver	1 (<1)
Otros	16 (7)
Francia	20 (9)
Australia	15 (7)
Alemania	10 (5)
Dusseldorf	10 (5)
Italia	9 (4)
Milán	6 (3)
Otros	3 (1)
Bélgica	8 (4)
Reino Unido	1 (<1)
Suiza	1 (<1)

Los porcentajes pueden no sumar 100 debido al redondeo.

Tabla 5.3. Grados de compatibilidad y emparejamientos por sexo entre donante y receptor

Grado de compatibilidad HLA, N (%)	
6 de 6	10 (5)
5 de 6	51 (23)
4 de 6	158 (72)
3 de 6	2 (1)
Grado de incompatibilidad ABO, N (%)	
Mayor	58 (26)
Menor	58 (26)
Ninguna	105 (48)
Emparejamiento por sexo donante – receptor, N (%)	
Hombre – Hombre	69 (31)
Hombre – Mujer	38 (17)
Mujer – Hombre	63 (28)
Mujer – Mujer	51 (23)

Las características de las unidades de SCU, los regímenes de acondicionamiento empleados y el tratamiento de profilaxis utilizado para la EICH se detallan en la **Tabla 5.4**. El tiempo de almacenamiento y las dosis celulares de las unidades de SCU empleadas para los trasplantes se resumen en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.4. Características de las unidades de SCU, regímenes de acondicionamiento y de profilaxis de la EICH.

Año del trasplante, n (%)	
1997 – 2000	12 (5)
2001 – 2005	45 (20)
2006 – 2010	97 (44)
2011 – 2014	67 (30)
Régimen de acondicionamiento, n (%)	
Tiotepa + Busulfan + Ciclofosfamida	50 (23)
Tiotepa + Busulfan + Fludarabina	171 (77)
Profilaxis de la EICH n (%)	
Ciclosporina A + Prednisona (Largo)	101 (46)
Ciclosporina A + Prednisona (Corto)	58 (26)
Ciclosporina A + Mofetil micofenolato	62 (28)

EICH: enfermedad injerto contra huésped

Tabla 5.5. Tiempo de almacenamiento y dosis celulares de las unidades de SCU

Tiempo de almacenamiento de la unidad de SCU, meses	
Mediana	29
Extremos	2-212
Viabilidad celular	
Mediana	70,5
Extremos	35-99
Número de células nucleadas antes de la congelación, $\times 10^7/\text{kg}^*$	
Mediana	3,0
Extremos	1,4-7
Número de células nucleadas infundidas, $\times 10^7/\text{kg}^*$	
Mediana	2,4
Extremos	1-5,6
Número de células CD34⁺ antes de la congelación, $\times 10^5/\text{kg}^*$	
Mediana	1,7
Extremos	0,1-6,8
Número de células CD34⁺ infundidas, $\times 10^5/\text{kg}^*$	
Mediana	1,3
Extremos	0,1-21,6
Número de CFU-GM antes de la congelación, $\times 10 /\text{kg}^*$ (n =137)	
Mediana	2,2
Extremos	0,1-73
Número de CFU-GM infundidas, $\times 10^4/\text{kg}^*$ (n =156)	
Mediana	2,6
Extremos	0,1-135

*Células/kg de peso del receptor. CNT: celularidad nucleada total, CFU-GM: unidades formadoras de colonias granulomonocíticas

5.2. Estudio descriptivo de las poblaciones

5.2.1. Estudio automático de las poblaciones linfocitarias

Las poblaciones linfocitarias que se analizaron mediante el método automático incluyeron los linfocitos totales, los linfocitos T (CD3⁺), los T colaboradores (CD3⁺CD4⁺), los T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), los linfocitos B (CD19⁺) y las células NK (CD16⁺CD56⁺). El número de pacientes recogidos en cada periodo de estudio (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) para cada población, los resultados de media, mediana, valores mínimo y máximo, así como el primer (Q1) y tercer (Q3) cuartil se expresaron en valores absolutos (células/ μL) (Tabla 5.6, Tabla 5.7, Tabla 5.8, Tabla 5.9, Tabla 5.10, Tabla 5.11). En los gráficos de cada población que acompañan a las tablas correspondientes se representan las medias en valores absolutos con el error estándar

para cada momento de estudio (Figura 5.3, Figura 5.4, Figura 5.5, Figura 5.6, Figura 5.7, Figura 5.8).

Tabla 5.6. Valores absolutos de los linfocitos totales de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos totales (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	144	641	481	22	6.397	263	732
M6	119	1.111	857	11	4.300	507	1.413
M12	96	1.932	1.682	38	8.886	1.099	2.465
M18	36	2.399	2.163	38	8.736	1.302	3.052
M24	48	2.526	2.393	131	6.926	1.573	3.134
M36	44	2.356	2.077	757	4.782	1.698	2.749

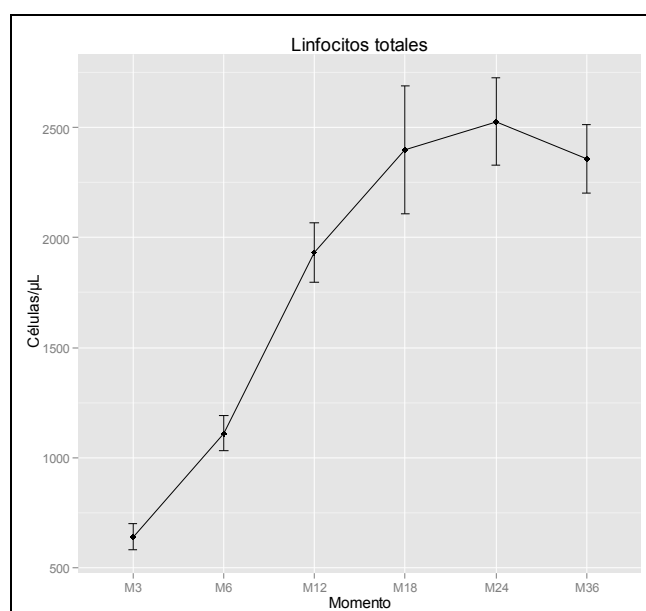


Figura 5.3. Medias y error estándar de los linfocitos totales en cada momento de estudio

El recuento absoluto de linfocitos totales se incrementó de forma muy pronunciada desde el tercer mes hasta los 18 meses pos-TSCU, estabilizándose a

partir de ese momento en valores normales alrededor de la media (2.370 células/ μ L). El valor de referencia mínimo (1.500 células/ μ L) se superó en torno a los 9 meses.

Tabla 5.7. Valores absolutos de los linfocitos T (CD3⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	143	124	41	0	5.118	0	129
M6	118	302	164	0	2.076	78	402
M12	95	717	588	7	3.416	342	986
M18	36	999	928	9	2.702	481	1.351
M24	47	1.165	928	24	5.847	686	1.344
M36	44	1.310	1.020	93	3.417	317	743

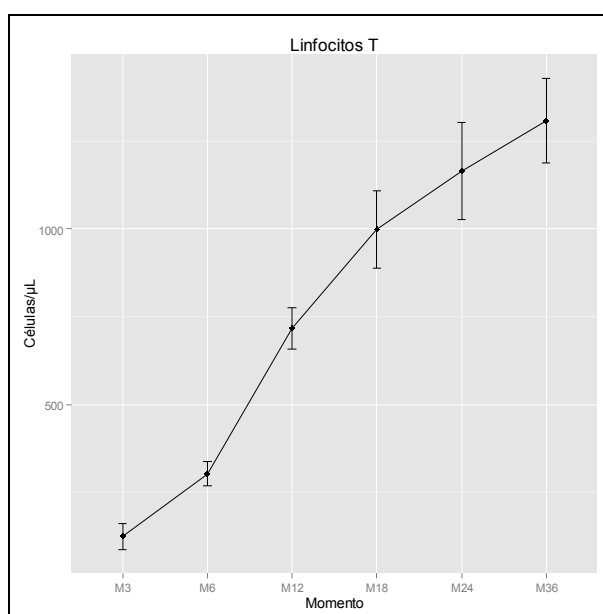


Figura 5.4. Medias y error estándar de los linfocitos T (CD3⁺) en cada momento de estudio

El número absoluto de linfocitos T se recuperó lentamente, superándose el recuento mínimo (603 células/ μ L) de esta población alrededor de los 12 meses pos-

TSCU. A partir de este momento la tendencia fue a seguir incrementándose, pero a pesar de ello, el recuento a los 36 meses no alcanzó el valor medio de referencia (1.705 células/ μ L).

Tabla 5.8. Valores absolutos de los linfocitos T colaboradores ($CD3^+CD4^+$) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T colaboradores (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	143	49	26	0	369	5	69
M6	118	150	109	0	636	43	216
M12	95	319	278	0	1.057	154	432
M18	36	422	415	7	1.054	203	606
M24	47	510	469	6	1.546	322	573
M36	44	622	553	106	1.592	455	673

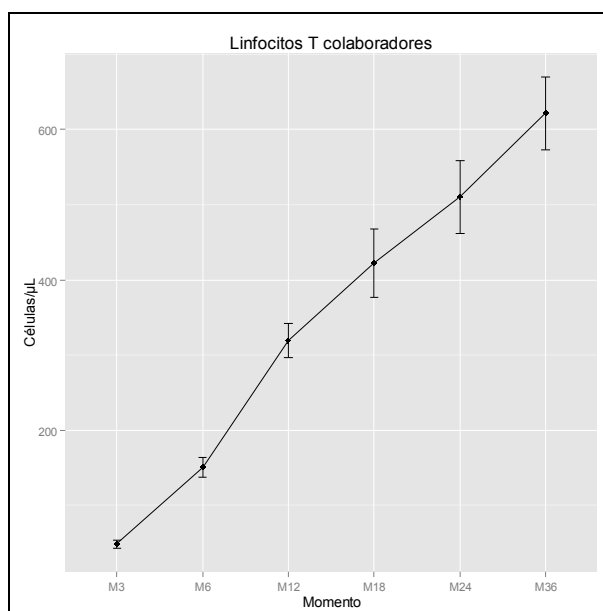


Figura 5.5. Medias y error estándar de los linfocitos T colaboradores ($CD3^+CD4^+$) en cada momento de estudio

El recuento absoluto de linfocitos T colaboradores ($CD4^+$) alcanzó el valor mínimo de referencia (441 células/ μL) a los 18 meses pos-TSCU y continuó en aumento. Igual que ocurrió con el número de linfocitos T, tampoco se objetivó un recuento cercano al valor medio de referencia (1.106 células/ μL) a los 36 meses.

Tabla 5.9. Valores absolutos de los linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T citotóxicos (células/ μL)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	143	73	7	0	4.913	2	24
M6	118	145	36	0	1.436	11	117
M12	95	376	253	0	2.186	125	484
M18	36	539	427	2	2.243	198	744
M24	47	621	418	16	4.911	245	739
M36	44	645	475	93	3.418	317	743

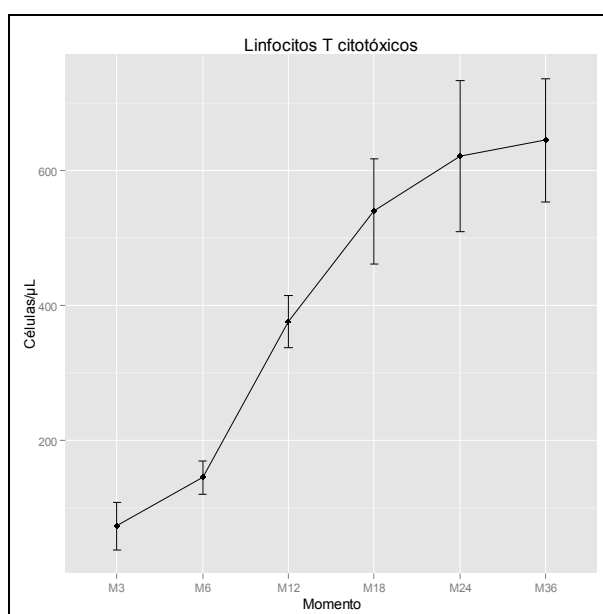


Figura 5.6. Medias y error estándar de los linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) en cada momento de estudio

El recuento de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) alcanzó el valor medio mínimo (125 células/ μ L) a los 6 meses pos-TSCU, y después su número aumentó hasta llegar a un valor en torno al valor medio de referencia (583 células/ μ L) a los 18 meses pos-TSCU. A partir de ese momento, su recuento aumentó más paulatinamente, con una tendencia a mantenerse ligeramente por encima del valor medio de referencia.

Tabla 5.10. Valores absolutos de los linfocitos B (CD19⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	143	226	34	0	2.083	3	300
M6	118	413	253	0	3.397	45	585
M12	95	637	431	0	2.646	257	847
M18	36	871	628	0	4.721	326	1.191
M24	47	894	653	3	4.363	328	1.226
M36	44	655	509	0	2.152	283	867

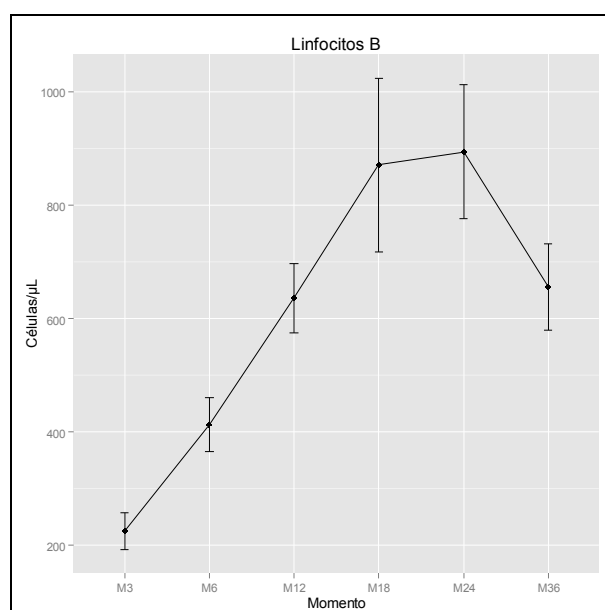


Figura 5.7. Medias y error estándar de los linfocitos B (CD19⁺) en cada momento de estudio

El número de linfocitos B aumentó exponencialmente hasta los 18 meses. Alrededor de los 6 meses el recuento superó el valor medio de referencia (354 células/ μL) y en torno a los 12 meses pos-TSCU los valores superaron el valor máximo de referencia (698 células/ μL). Entre los meses 18 y 24 se observó un *plateau*, para a continuación producirse un descenso en su número con una tendencia a normalizarse.

Tabla 5.11. Valores absolutos de las células NK ($\text{CD16}^+\text{CD56}^+$) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Células NK (células/ μL)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	143	284	241	0	1.521	147	355
M6	118	375	279	11	2.295	168	477
M12	95	549	380	20	5.509	251	675
M18	36	490	356	29	4.280	272	496
M24	47	448	368	47	1.430	245	625
M36	44	362	322	40	1.283	240	445

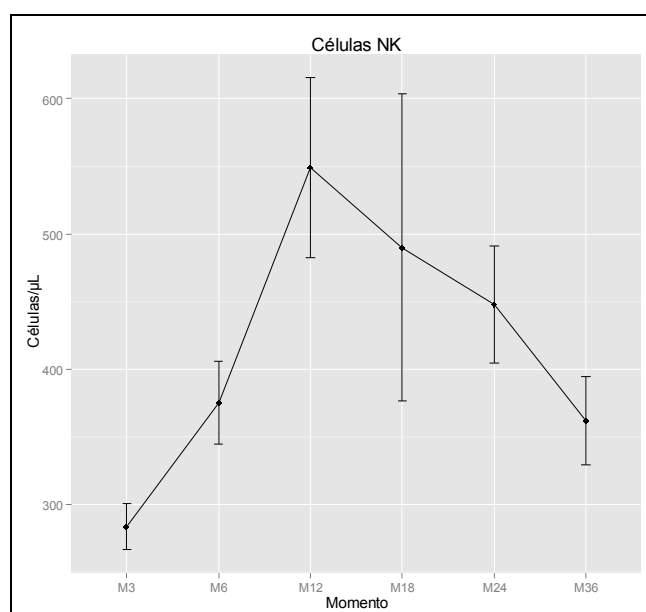


Figura 5.8. Medias y error estándar de las células NK ($\text{CD16}^+\text{CD56}^+$) en cada momento de estudio

El recuento de células NK comenzó su recuperación a partir de los 3 meses pos-TSCU, superando los valores normales medios (266 células/ μ L) a partir de ese momento, y aumentando su recuento absoluto hasta los 12 meses pos-TSCU. Después su número descendió hasta alcanzar de nuevo valores cercanos a la media, aunque por encima de ella, a los 36 meses.

5.2.2. Estudio manual de poblaciones linfocitarias

En un subgrupo de 52 pacientes de la serie global se realizaron de forma paralela estudios manuales de poblaciones linfocitarias para identificar subtipos celulares minoritarios cuya aparición durante la recuperación inmunológica podría relacionarse con determinados parámetros clínicos o biológicos. El número de pacientes recogidos en cada periodo de estudio (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) para cada subpoblación, los resultados de media, mediana, valores mínimo y máximo, así como primer (Q1) y tercer (Q3) cuartil se expresaron en valores absolutos (células/ μ L).

Entre las subpoblaciones de linfocitos T se incluyeron los linfocitos T vírgenes (CD3+CD45RA⁺), memoria (CD3+CD45RO⁺), linfocitos T activados (CD3+CD8+HLADR⁺) y las células T vírgenes memoria central (CD3+CCR7⁺) (Tabla 5.12, Tabla 5.13, Tabla 5.14, Tabla 5.15).

Tabla 5.12. Valores absolutos de los linfocitos T vírgenes (CD3⁺CD45RA⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T vírgenes (CD3 ⁺ CD45RA ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	0	-	-	-	-	-	-
M6	0	-	-	-	-	-	-
M12	19	309	131	0	1.033	35	575
M18	12	458	371	23	1.487	122	673
M24	13	461	264	43	1.939	222	585
M36	8	401	319	169	809	246	556

Tabla 5.13. Valores absolutos de los linfocitos T memoria ($CD3^+CD45RO^+$) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T memoria ($CD3^+CD45RO^+$) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	0	-	-	-	-	-	-
M6	0	-	-	-	-	-	-
M12	19	425	269	87	1.165	167	598
M18	12	609	517	92	1.342	317	766
M24	13	643	445	63	2.197	283	951
M36	8	698	703	498	1.028	608	730

Tabla 5.14. Valores absolutos de los linfocitos T activados ($CD3^+CD8^+HLADR^+$) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T activados ($CD3^+CD8^+HLADR^+$) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	24	17	2	0	188	1	9
M6	2	18	18	9	27	13	23
M12	19	163	115	6	675	32	229
M18	12	349	77	40	2.406	61	203
M24	13	134	139	17	264	71	217
M36	8	180	175	9	415	28	303

Tabla 5.15. Valores absolutos de los linfocitos T memoria central (CD3⁺CCR7⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos T memoria centrales (CD3 ⁺ CCR7 ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	0	-	-	-	-	-	-
M6	0	-	-	-	-	-	-
M12	18	158	61	3	545	43	298
M18	12	181	126	0	677	27	238
M24	13	394	362	2	995	211	477
M36	8	365	392	56	779	141	497

En la Figura 5.9 se incluye la representación gráfica de las medias en valores absolutos con el error estándar de los subtipos linfocitarios T para cada momento de estudio.

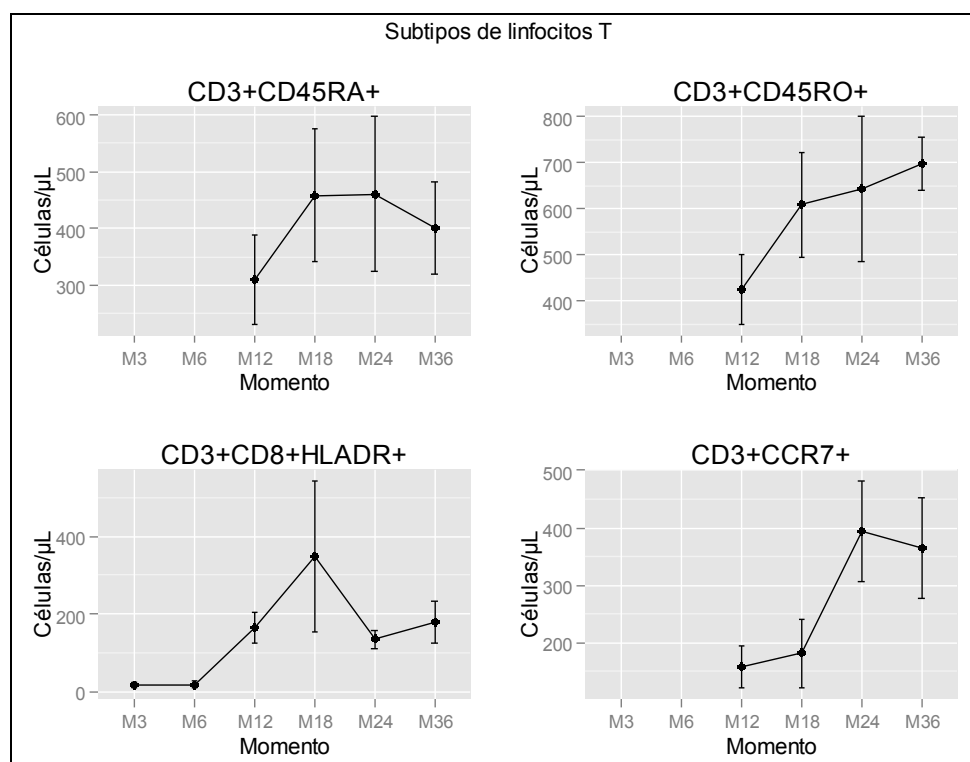


Figura 5.9. Medias y error estándar de los subtipos linfocitarios T en cada momento de estudio que incluye el recuento absoluto en células/ μL de linfocitos T vírgenes ($\text{CD3}^+\text{CD45RA}^+$), memoria ($\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$), activados ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{HLADR}^+$) y memoria centrales ($\text{CD3}^+\text{CCR7}^+$)

El recuento de linfocitos T vírgenes ($\text{CD3}^+\text{CD45RA}^+$) aumentó entre los 12-18 meses. A continuación se estabilizó su número y descendió a partir de los 24 meses. El valor absoluto de linfocitos T memoria ($\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$) aumentó entre los 12 y 18 meses para después continuar en aumento de forma más paulatina hasta el mes 36. Las cifras de linfocitos T activados ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{HLADR}^+$) se mantuvieron en valores en torno al 0 hasta los 6 meses. A partir de entonces iniciaron su aumento, observándose un pico a los 18 meses. Después descendieron con una tendencia a mantenerse estables a partir de los 24 meses. El recuento de linfocitos T con capacidad migratoria ($\text{CD3}^+\text{CCR7}^+$) se incrementó de forma muy pronunciada a partir de los 18 meses para estabilizarse alrededor de los 24 meses.

Las subpoblaciones de linfocitos B incluyeron el análisis de los linfocitos B maduros ($\text{CD19}^+\text{CD20}^+$), los linfocitos con expresión en superficie de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas ($\text{CD19}^+\text{Ig Kappa}^+$ y $\text{CD19}^+\text{Ig Lambda}^+$), los linfocitos B1 ($\text{CD19}^+\text{CD5}^+$), los linfocitos B memoria ($\text{CD19}^+\text{CD27}^+$) y los linfocitos B activados

(CD19⁺CD23⁺ y CD19⁺CD38⁺) (Tabla 5.16, Tabla 5.17, Tabla 5.18, Tabla 5.19, Tabla 5.20, Tabla 5.21, Tabla 5.22).

Tabla 5.16. Valores absolutos de los linfocitos B maduros (CD19⁺CD20⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B maduros (CD19 ⁺ CD20 ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	22	341	107	0	1.517	8	388
M6	21	433	375	0	1.768	23	583
M12	18	708	425	0	2.264	176	1.085
M18	7	1.003	784	124	2.009	441	1.612
M24	13	821	652	84	2.764	170	1.100
M36	8	788	734	232	1.597	406	1.038

Tabla 5.17. Valores absolutos de los linfocitos B maduros con clonalidad Ig Kappa (CD19⁺ Ig Kappa⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B Ig Kappa (CD19 ⁺ Ig Kappa ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	18	259	101	3	823	26	327
M6	19	272	244	0	1.096	22	405
M12	17	449	271	0	1.481	183	643
M18	1	403	403	403	403	403	403
M24	13	477	422	47	1.548	98	622
M36	8	452	407	136	878	238	616

Tabla 5.18. Valores absolutos de los linfocitos B maduros con clonalidad Ig Lambda (CD19⁺ Ig Lambda⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B Ig Lambda (CD19 ⁺ Ig Lambda ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	18	158	54	1	698	12	245
M6	19	176	131	0	672	9	265
M12	17	292	162	0	928	86	482
M18	1	208	208	208	208	208	208
M24	13	344	251	37	1.216	73	478
M36	8	337	326	98	718	170	422

Tabla 5.19. Valores absolutos de los linfocitos B1 (CD19⁺CD5⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B1 (CD19 ⁺ CD5 ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	1	479	479	479	479	479	479
M6	2	487	487	189	785	338	636
M12	19	216	114	0	812	13	329
M18	10	249	182	14	798	50	309
M24	13	235	221	11	702	41	341
M36	8	225	196	31	562	57	322

Tabla 5.20. Valores absolutos de los linfocitos B memoria (CD19⁺CD27⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B memoria (CD19 ⁺ CD27 ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	1	184	184	184	184	184	184
M6	2	138	138	126	150	132	144
M12	19	58	33	0	224	8	65
M18	10	166	115	6	593	56	231
M24	13	159	68	6	594	67	117
M36	8	134	118	26	259	87	197

Tabla 5.21. Valores absolutos de los linfocitos B activados (CD19⁺CD23⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B activados (CD19 ⁺ CD23 ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	0	-	-	-	-	-	-
M6	0	-	-	-	-	-	-
M12	19	339	163	0	1.347	55	549
M18	10	441	245	46	1.641	147	548
M24	13	578	430	9	1.907	150	811
M36	8	483	308	138	1.166	221	591

Tabla 5.22. Valores absolutos de los linfocitos B activados (CD19⁺CD38⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Linfocitos B activados (CD19 ⁺ CD38 ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	0	-	-	-	-	-	-
M6	0	-	-	-	-	-	-
M12	19	672	435	0	2.200	191	868
M18	10	885	820	124	1.878	385	1.175
M24	13	739	600	81	2.681	164	1.007
M36	8	609	536	232	1.289	364	796

En la Figura 5.10 se incluye la representación gráfica de las medias en valores absolutos con el error estándar de los subtipos linfocitarios B para cada momento de estudio.

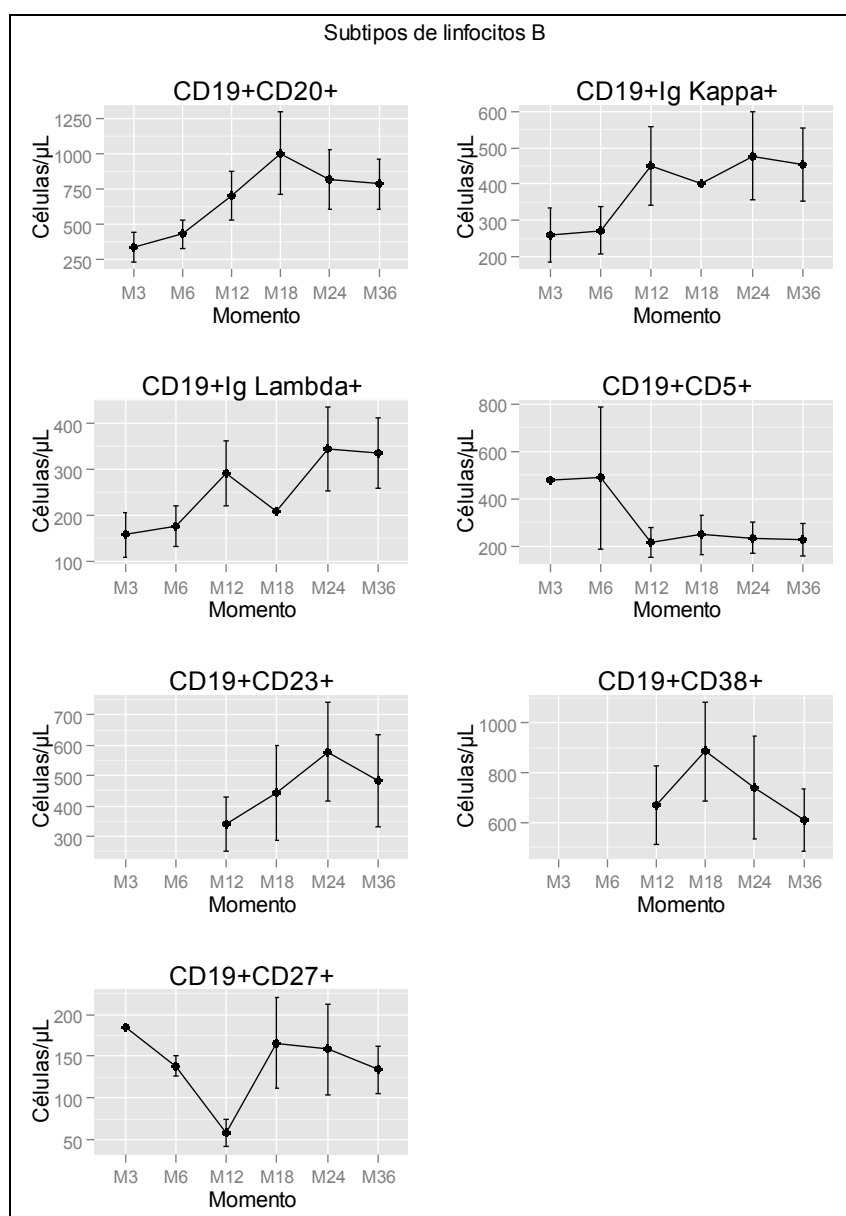


Figura 5.10. Medias y error estándar de los subtipos linfocitarios B en cada momento de estudio que incluye el recuento absoluto en células/ μL de linfocitos B maduros ($\text{CD19}^+\text{CD20}^+$), clonales para Ig Kappa ($\text{CD19}^+\text{Ig Kappa}^+$), clonales para Ig Lambda ($\text{CD19}^+\text{Ig Lambda}^+$), B1 ($\text{CD19}^+\text{CD5}^+$), activados ($\text{CD19}^+\text{CD23}^+$ y $\text{CD19}^+\text{CD38}^+$) y memoria ($\text{CD19}^+\text{CD27}^+$)

El recuento de linfocitos B maduros CD20^+ presentó un pico máximo alrededor de los 18 meses coincidiendo con el *plateau* que se observó en la población total de linfocitos B con valores por encima del máximo. Las cifras absolutas de las cadenas ligeras Kappa y Lambda de las inmunoglobulinas aumentaron de forma paralela alrededor de los 12 meses, estabilizándose su expresión a partir de este momento con un predominio, esperable, de Kappa sobre Lambda. Los valores obtenidos para los

linfocitos B1 (CD19⁺CD5⁺) a los 3 y 6 meses no fueron significativos debido al bajo número de pacientes estudiados en estos momentos (N=1 y N=2, respectivamente). A partir de los 12 meses sus valores absolutos se estabilizaron. El recuento de linfocitos B activados CD19⁺CD23⁺ aumentó hasta alcanzar un pico máximo a los 24 meses, mientras que los CD19⁺CD38⁺ presentaron un recuento máximo a los 18 meses. Del mismo modo que ocurrió con los linfocitos B1 a los 3 y 6 meses, los linfocitos memoria (CD19⁺CD27⁺) no fueron valorables en estos momentos debido a la limitación en el número de casos estudiados (N=1 y N=2, respectivamente). A partir de los 12 meses y hasta los 18 meses se produjo un incremento en su número, para posteriormente estabilizarse con un ligero descenso hasta los 36 meses.

Por último, las células NK se subclasificaron en células NK inmaduras (CD56^{++brillante}CD16^{-/+débil}), maduras (CD56^{-/+débil}CD16⁺⁺) y células NK activadas (CD16⁺CD11b⁺ y CD16⁺HLADR⁺) (Tabla 5.23, Tabla 5.24, Tabla 5.25, Tabla 5.26).

Tabla 5.23. Valores absolutos de las células NK inmaduras CD56^{++brillante}CD16^{-/+débil} de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Células NK inmaduras (CD56 ^{++brillante} CD16 ^{-/+débil}) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	24	75	55	4	241	26	116
M6	23	53	31	0	229	22	78
M12	19	34	22	3	137	15	48
M18	11	32	31	0	70	20	46
M24	13	20	19	0	42	8	32
M36	8	21	19	0	44	17	25

Tabla 5.24. Valores absolutos de las células NK maduras $CD56^{-/+débil}CD16^{++}$ de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Células NK maduras ($CD56^{-/+débil}CD16^{++}$) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	24	160	125	30	677	79	189
M6	23	143	114	2	420	51	206
M12	19	535	263	19	5.243	170	377
M18	11	719	180	28	5.416	106	349
M24	13	357	246	63	783	190	456
M36	8	333	264	117	659	237	443

Tabla 5.25. Valores absolutos de las células NK activadas ($CD16^{+}CD11b^{+}$) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Células NK activadas ($CD16^{+}CD11b^{+}$) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	24	324	245	81	706	169	499
M6	2	428	428	191	665	310	547
M12	19	501	221	70	4.738	165	382
M18	11	409	267	52	2.140	176	355
M24	13	319	318	41	817	231	391
M36	8	324	294	185	467	259	418

Tabla 5.26. Valores absolutos de las células NK activadas (CD16⁺HLADR⁺) de la serie global en los diferentes momentos de estudio pos-TSCU

Células NK activadas (CD16 ⁺ HLADR ⁺) (células/ μ L)							
Mes	Pacientes (N)	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
M3	24	50	36	12	228	27	56
M6	2	51	51	22	81	37	66
M12	19	133	35	6	1.543	26	89
M18	11	108	29	13	856	20	53
M24	13	48	39	7	193	27	49
M36	8	25	18	10	48	16	30

En la Figura 5.11 se incluye la representación gráfica de las medias en valores absolutos con el error estándar de los subtipos de células NK para cada momento de estudio.

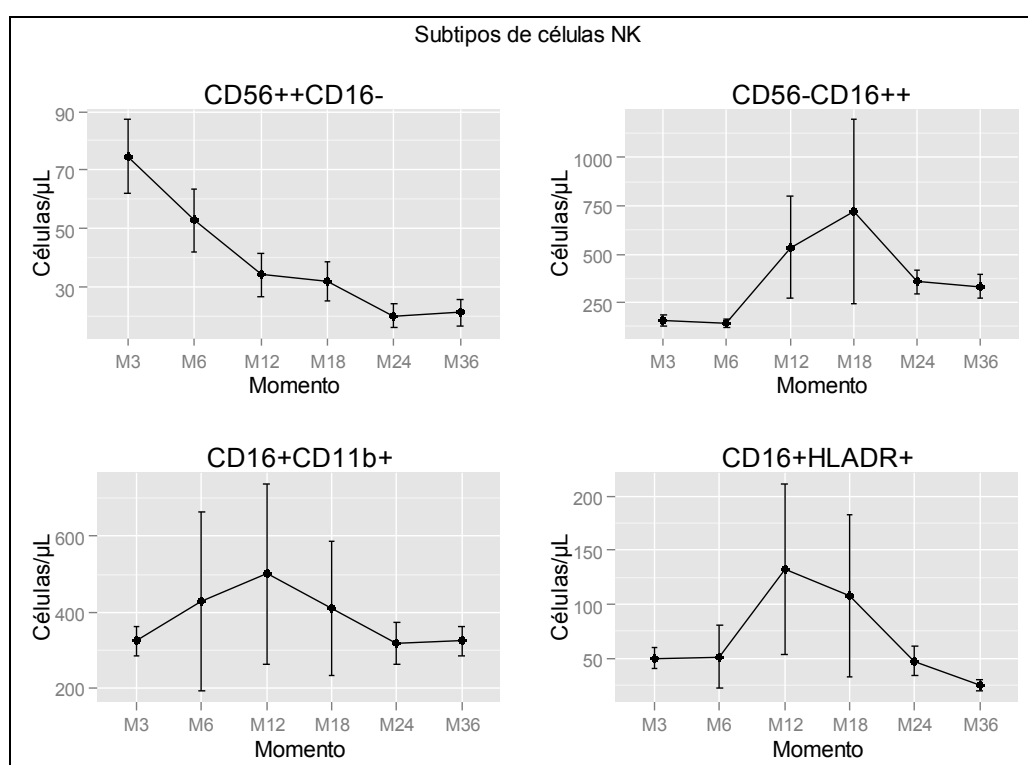


Figura 5.11. Medias y error estándar de los subtipos de células NK en cada momento de estudio que incluye el recuento absoluto en células/μL de las células NK inmaduras (CD56^{++brillante}CD16^{-/+débil}), maduras (CD56^{-/+débil}CD16⁺⁺) y activadas (CD16⁺CD11b⁺ y CD16⁺HLADR⁺)

Se observó una elevación del recuento absoluto de células NK inmaduras (CD56^{++brillante}CD16^{-/+débil}) al tercer mes que descendió progresivamente hasta los 12 meses pos-TSCU. A partir de este momento se estabilizaron los valores. El número absoluto de células NK maduras (CD56^{-/+débil}CD16⁺⁺) aumentó entre los meses 6 y 18 y a partir de este momento descendió para estabilizarse en torno al mes 24. Los valores de células NK activadas CD16⁺CD11b⁺ y CD16⁺HLADR⁺ mostraron un pico máximo a los 12 meses pos-TSCU y después disminuyeron su número. Las cifras de células CD16⁺CD11b⁺ parecieron tener una tendencia a estabilizarse a partir de los 24 meses, mientras que los valores de CD16⁺HLADR⁺ continuaron en descenso a partir de este momento.

5.3. Análisis de factores pronóstico de la reconstitución inmunológica

5.3.1. Variables asociadas a las características de los pacientes o de la enfermedad de base

Los pacientes con diagnóstico inicial de linfoma o síndromes linfoproliferativos crónicos tuvieron una peor reconstitución inmunológica en valores absolutos de linfocitos totales ($p=0,025$), linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) ($p=0,036$) y linfocitos B ($CD19^+$) ($p=0,045$) (Figura 5.12).

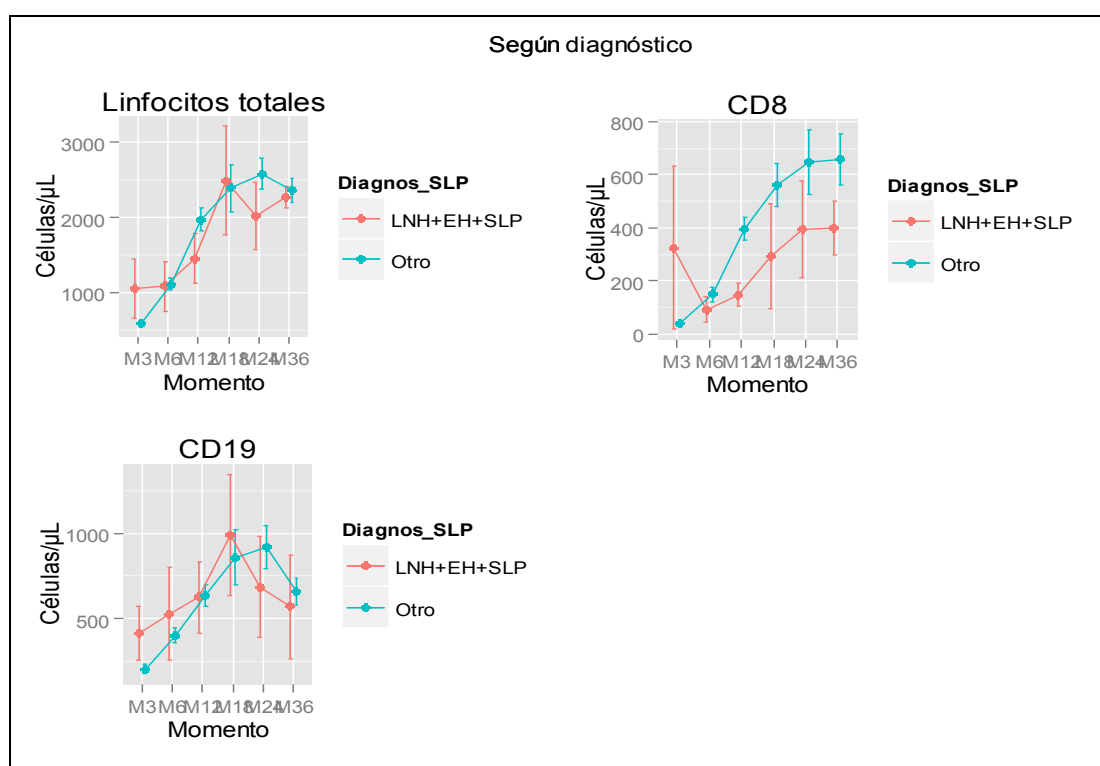


Figura 5.12. Gráficos de las poblaciones de linfocitos totales, linfocitos T $CD3^+$, linfocitos T $CD8^+$ y linfocitos B $CD19^+$ en células/ μ L en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) en el grupo de pacientes con diagnóstico de linfoma o síndromes linfoproliferativos (LNH+EH+SLP) (rojo) respecto al grupo con otros diagnósticos (azul). LNH: linfoma no Hodgkin; EH: enfermedad de Hodgkin; SLP: síndrome linfoproliferativo.

Los pacientes que recibieron un TPH autólogo previo al TSCU tuvieron una peor reconstitución inmunológica en valores absolutos de linfocitos B $CD19^+$ ($p=0,019$) (Figura 5.13).

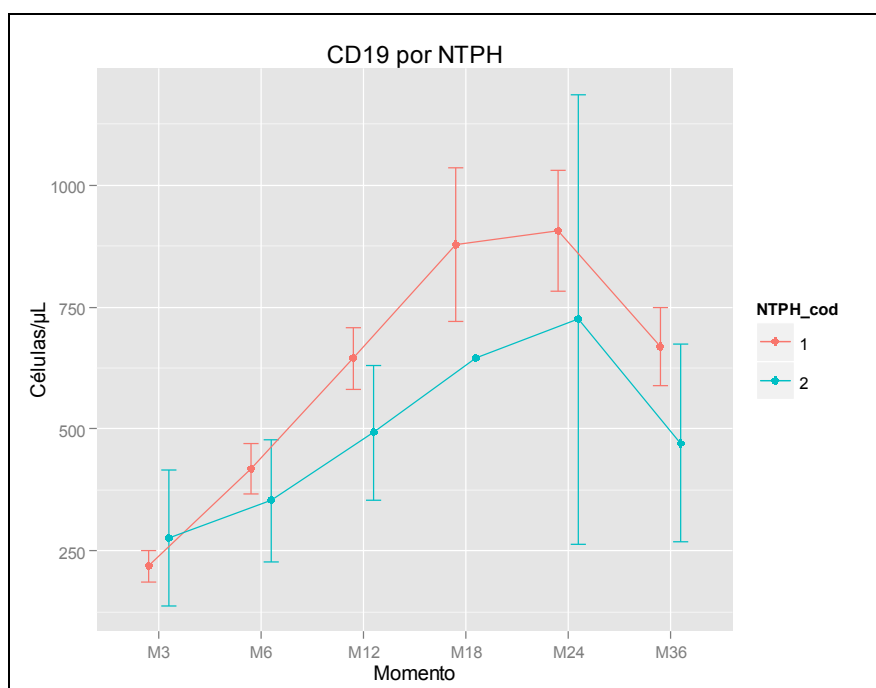


Figura 5.13. Gráfico de la población de linfocitos B CD19⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) en el grupo de pacientes que no recibieron TPH autólogo previo (rojo) respecto a los que recibieron TPH autólogo previo (azul). NTPH: no trasplante autólogo previo.

Los receptores de TSCU con estado serológico CMV-positivo presentaron una reconstitución más rápida en valores absolutos de las células NK ($p=0,042$) y los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) ($p=0,022$), pero recuperaron más lentamente la celularidad B (CD19⁺) ($p=0,035$) (Figura 5.14).

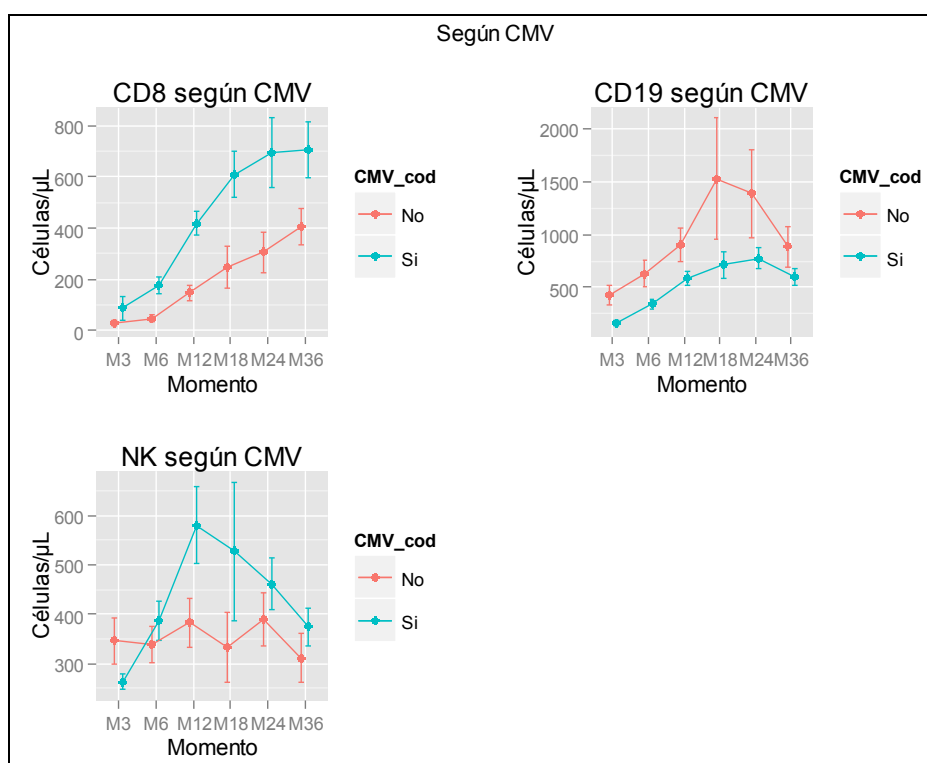


Figura 5.14. Gráficos de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺, linfocitos B CD19⁺ y células NK en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según ausencia de CMV (rojo) o seropositividad para CMV (azul) en el momento del TSCU.

5.3.2. Variables asociadas a las características y la celularidad de las unidades de SCU

Con respecto a la incompatibilidad ABO, se observaron diferencias en la recuperación de la población de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) ($p=0,043$) con una mejor reconstitución en valores absolutos de esta población en el grupo de pacientes sin incompatibilidad comparado con los grupos con incompatibilidad ABO mayor y menor (Figura 5.15).

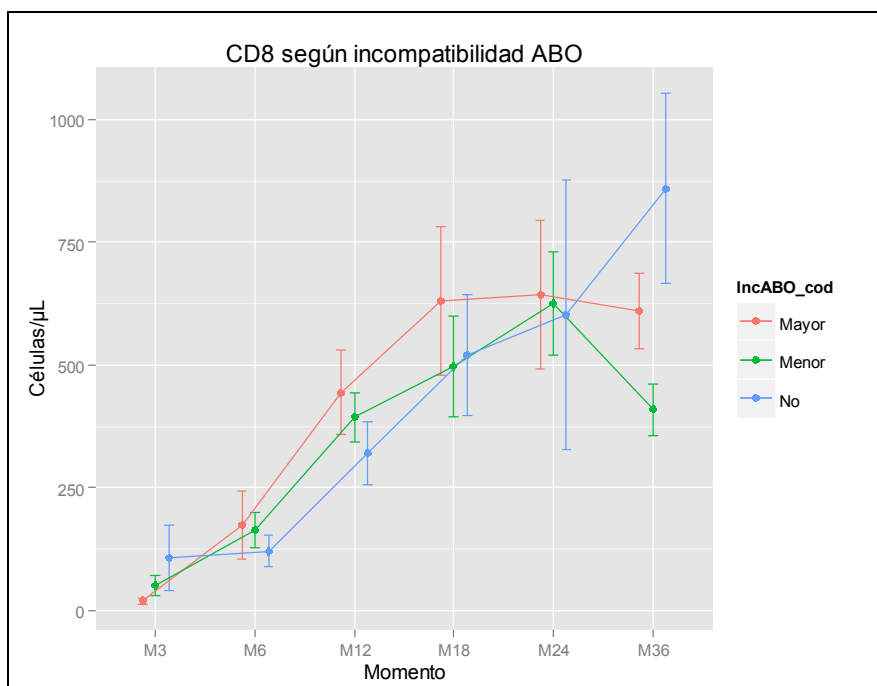


Figura 5.15. Gráfico de la población de linfocitos T CD8⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según incompatibilidad ABO mayor (rojo), menor (verde) o ausencia de incompatibilidad (azul).

Las unidades de SCU con mayor dosis de CNT antes de la criopreservación tuvieron una mejor reconstitución inmunológica en valores absolutos de la población CD4⁺ ($p=0,02$) (Figura 5.16). Las unidades de SCU con más células CD34⁺ infundidas por kg de peso del receptor reconstituyeron mejor las poblaciones de linfocitos T CD3⁺ ($p=0,047$) y T colaboradores CD4⁺ ($p=0,031$) en números absolutos (Figura 5.17). Si se considera la celularidad CD34⁺ infundida (sin tener en cuenta los kg de peso del receptor), también se observa una mejor reconstitución de los linfocitos T CD8⁺ ($p=0,036$) en números absolutos. Las unidades de SCU con menor tiempo de almacenamiento tienen mejor reconstitución inmunológica en valores absolutos de los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) ($p=0,016$) (Figura 5.18).

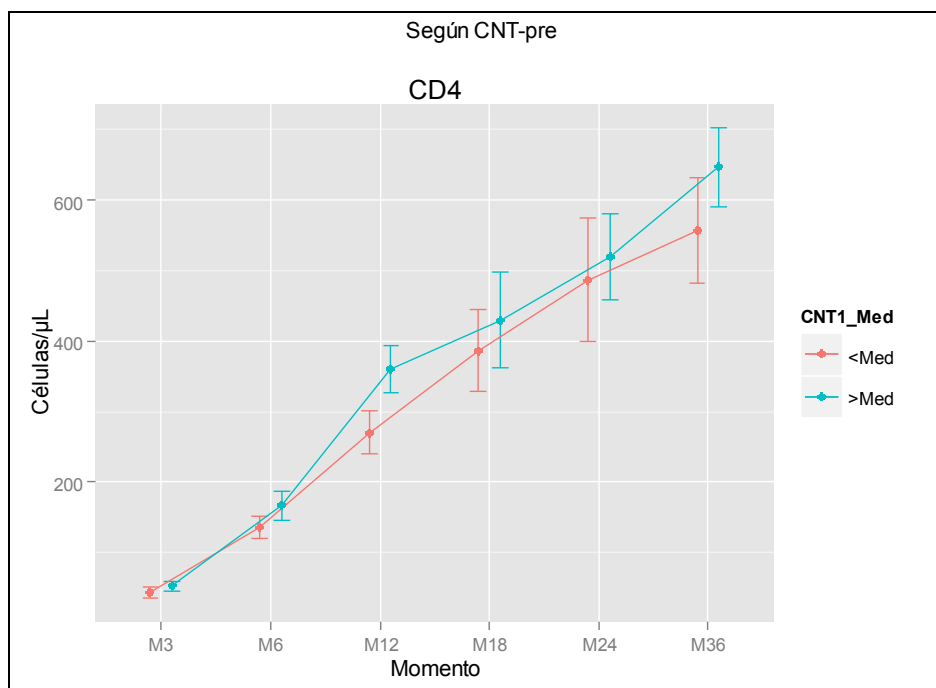


Figura 5.16. Gráfico de la población de linfocitos T CD4⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según CNT antes de la criopreservación inferior a la mediana (rojo) o superior a la mediana (azul).

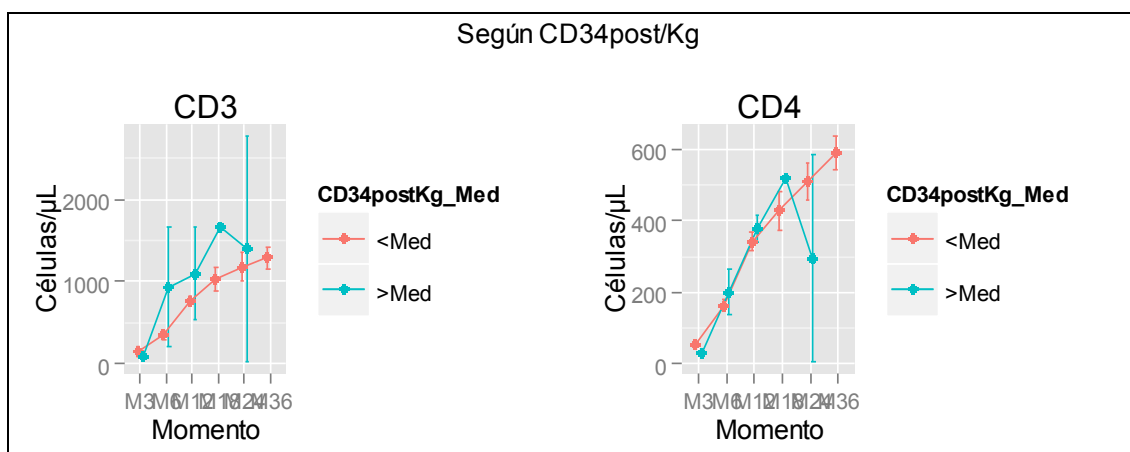


Figura 5.17. Gráfico de la población de linfocitos T CD3⁺ y T colaboradores CD4⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según celularidad CD34⁺ infundida inferior a la mediana (rojo) o superior a la mediana (azul).

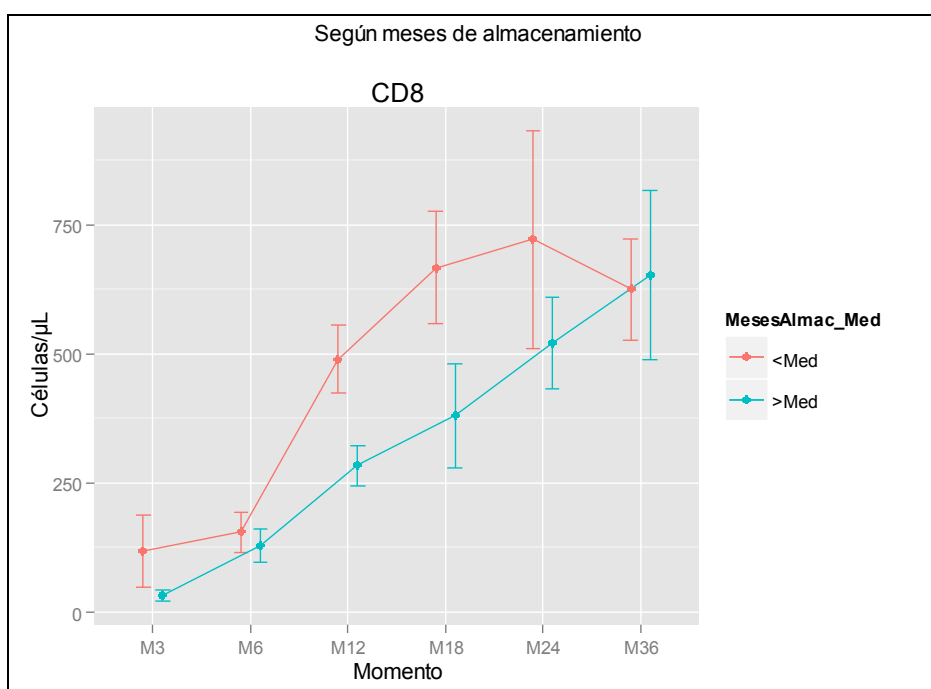


Figura 5.18. Gráfico de la población de linfocitos T CD8⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según meses de almacenamiento de las unidades de SCU inferior a la mediana (rojo) o superior a la mediana (azul).

5.3.3. Variables asociadas al procedimiento de TSCU

Los pacientes que recibieron profilaxis para la EICH con CSA + MFM tuvieron una mejor reconstitución inmunológica en valores absolutos de los linfocitos T (CD3⁺) ($p=0,01$) y los linfocitos T colaboradores (CD4⁺) ($p=0,007$) que los que recibieron profilaxis con CSA + prednisona (Figura 5.19).

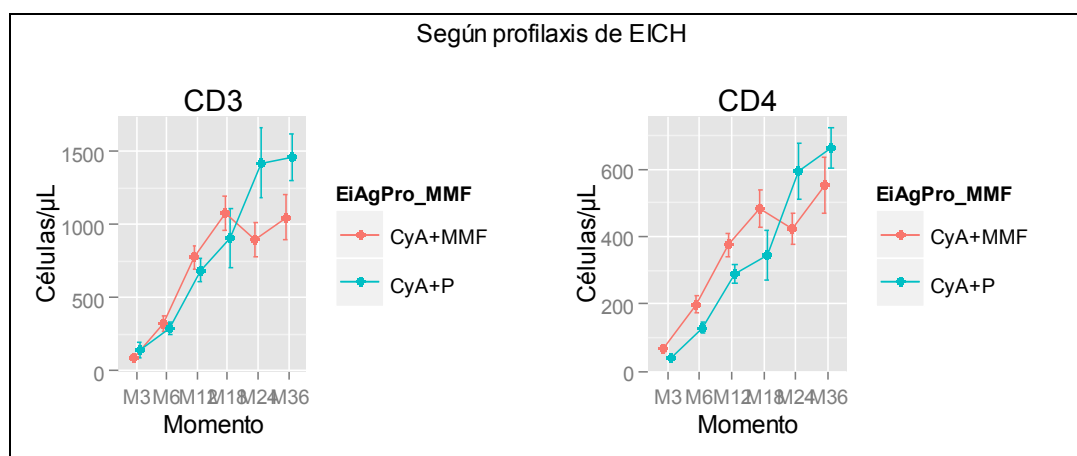


Figura 5.19. Gráficos de las poblaciones de linfocitos T CD3⁺ y los linfocitos T CD4⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según profilaxis de la EICH con CSA + MFM (rojo) o con CSA + prednisona (azul).

Los pacientes que presentaron EICH aguda tuvieron una reconstitución inmunológica peor de los linfocitos T (CD3⁺) ($p=0,016$) y T colaboradores (CD4⁺) ($p=0,009$) (Figura 5.20).

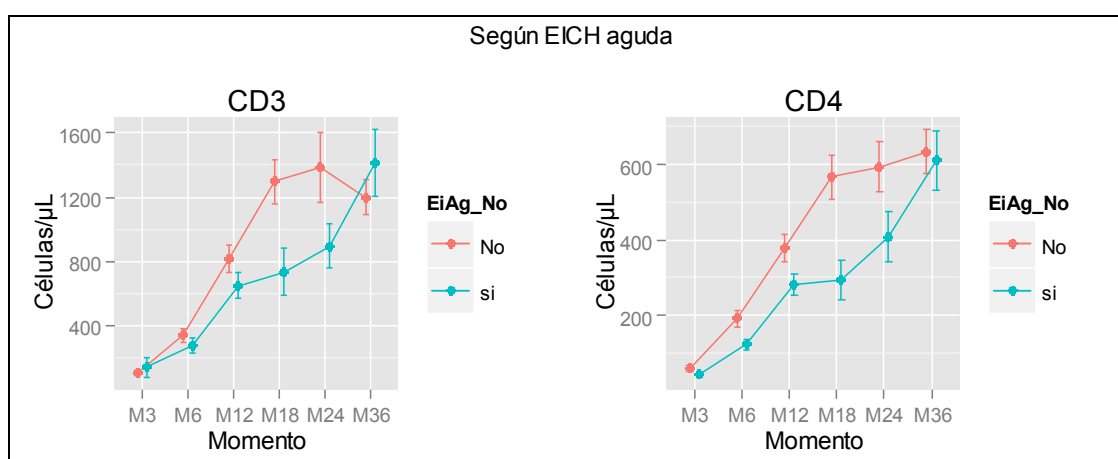


Figura 5.20. Gráficos de las poblaciones de linfocitos T CD3⁺ y los linfocitos T CD4⁺ en células/μL en los diferentes momentos pos-TSCU (3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses) según ausencia (rojo) o presencia de EICH aguda (azul).

5.4. Impacto de la reconstitución inmunológica sobre la mortalidad relacionada con el trasplante y la supervivencia global

5.4.1. Mortalidad relacionada con el trasplante

En la Tabla 5.27. se muestran los resultados del impacto de la reconstitución inmunológica sobre la MRT del recuento absoluto de las poblaciones linfocitarias a los 3, 6 y 12 meses. Atendiendo a la significación (p -valor) se utilizó la mediana o el primer cuartil (Q1) como el punto de corte para discriminar los grupos con menor o mayor MRT. El factor desfavorable para mayor mortalidad fue un valor absoluto de la población linfocitaria inferior al punto de corte establecido en todos los casos.

Tabla 5.27. Punto de corte en células/ μ L de las poblaciones linfocitarias a los 3, 6 y 12 meses para el porcentaje de incidencia acumulada (CI) a los 60 meses y significación (*p*-valor).

Población	Mes	Punto de corte (células/μL)	% CI (60 meses)	<i>p</i>-valor
Linfocitos totales	3	<Q1=263	64 vs 28	<0,001
Linfocitos T CD3 ⁺	3	Mediana=41	56 vs 17	<0,001
Linfocitos T CD4 ⁺	3	Mediana=26	56 vs 17	<0,001
Linfocitos T CD8 ⁺	3	Mediana=7	50 vs 23	<0,001
Linfocitos B CD19 ⁺	3	Q1=3	63 vs 28	<0,001
Linfocitos totales	6	Q1=507	54 vs 21	<0,001
Linfocitos T CD3 ⁺	6	Mediana=164	45 vs 14	<0,001
Linfocitos T CD4 ⁺	6	Mediana=109	46 vs 14	<0,001
Linfocitos T CD8 ⁺	6	Mediana=36	41 vs 19	0,01
Linfocitos B CD19 ⁺	6	Q1=45	57 vs 20	<0,001
Células NK CD16 ⁺ CD56 ⁺	6	Q1=168	41 vs 26	0,08
Linfocitos totales	12	Q1=1.099	46 vs 8	<0,001
Linfocitos T CD3 ⁺	12	Mediana=588	27 vs 6	0,004
Linfocitos T CD4 ⁺	12	Q1=154	49 vs 6	<0,001
Linfocitos T CD8 ⁺	12	Mediana=253	25 vs 9	0,02
Linfocitos B CD19 ⁺	12	Q1=257	39 vs 9	<0,001
Células NK CD16 ⁺ CD56 ⁺	12	Mediana=380	24 vs 9	0,09

En la Figura 5.21 se muestran las curvas de la incidencia acumulada de MRT global, a los 3, 6 y 12 meses después del TSCU. En la Figura 5.22, Figura 5.23 y Figura 5.24 se pueden observar las curvas de incidencia acumulada de MRT para el recuento absoluto de las poblaciones linfocitarias que resultaron ser significativas en el análisis a los 3, 6 y 12 meses tras el TSCU respectivamente.

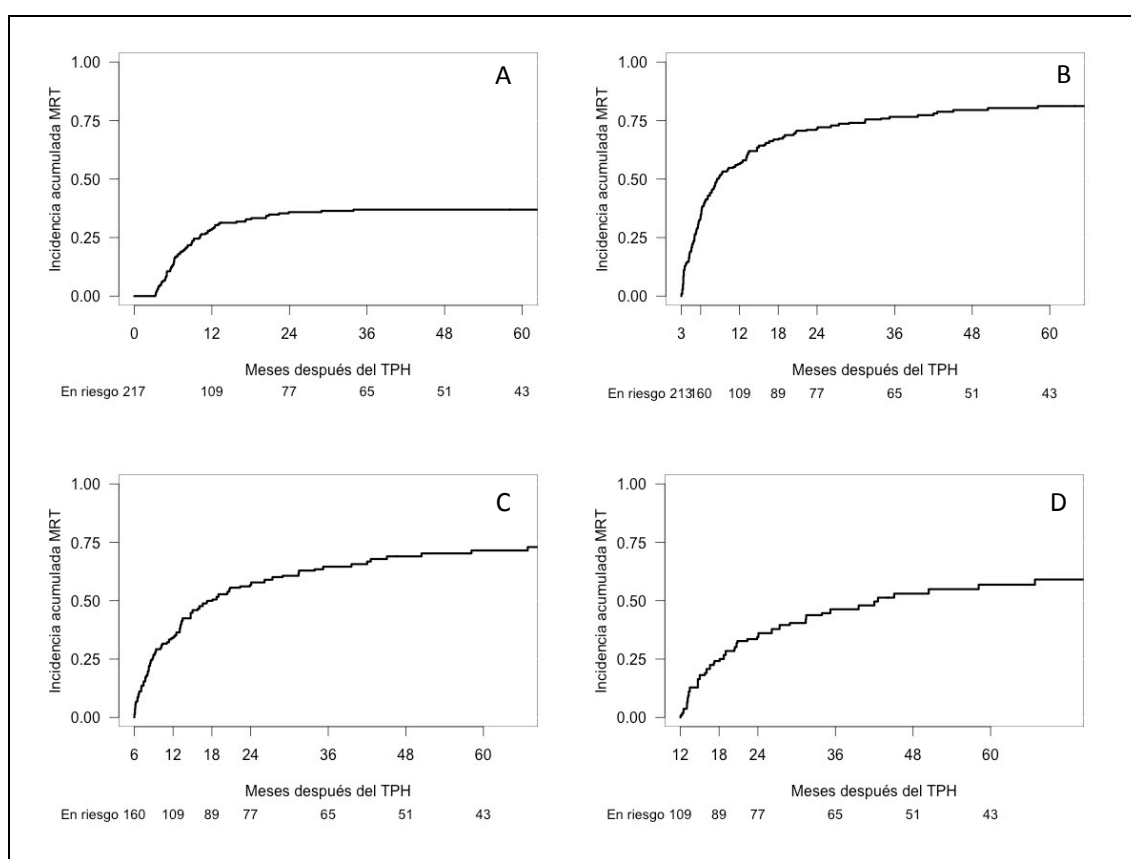


Figura 5.21. Curvas de incidencia acumulada de MRT en la serie global considerando los pacientes vivos al TSCU (A) y a los 3 (B), 6 (C) y 12 meses (D) después

Un total de 81 pacientes murieron por causas no relacionadas con recaída en una mediana de tiempo de 7 meses después del TSCU (extremos, 3-129). La incidencia acumulada de MRT a los 60 meses fue 37%.

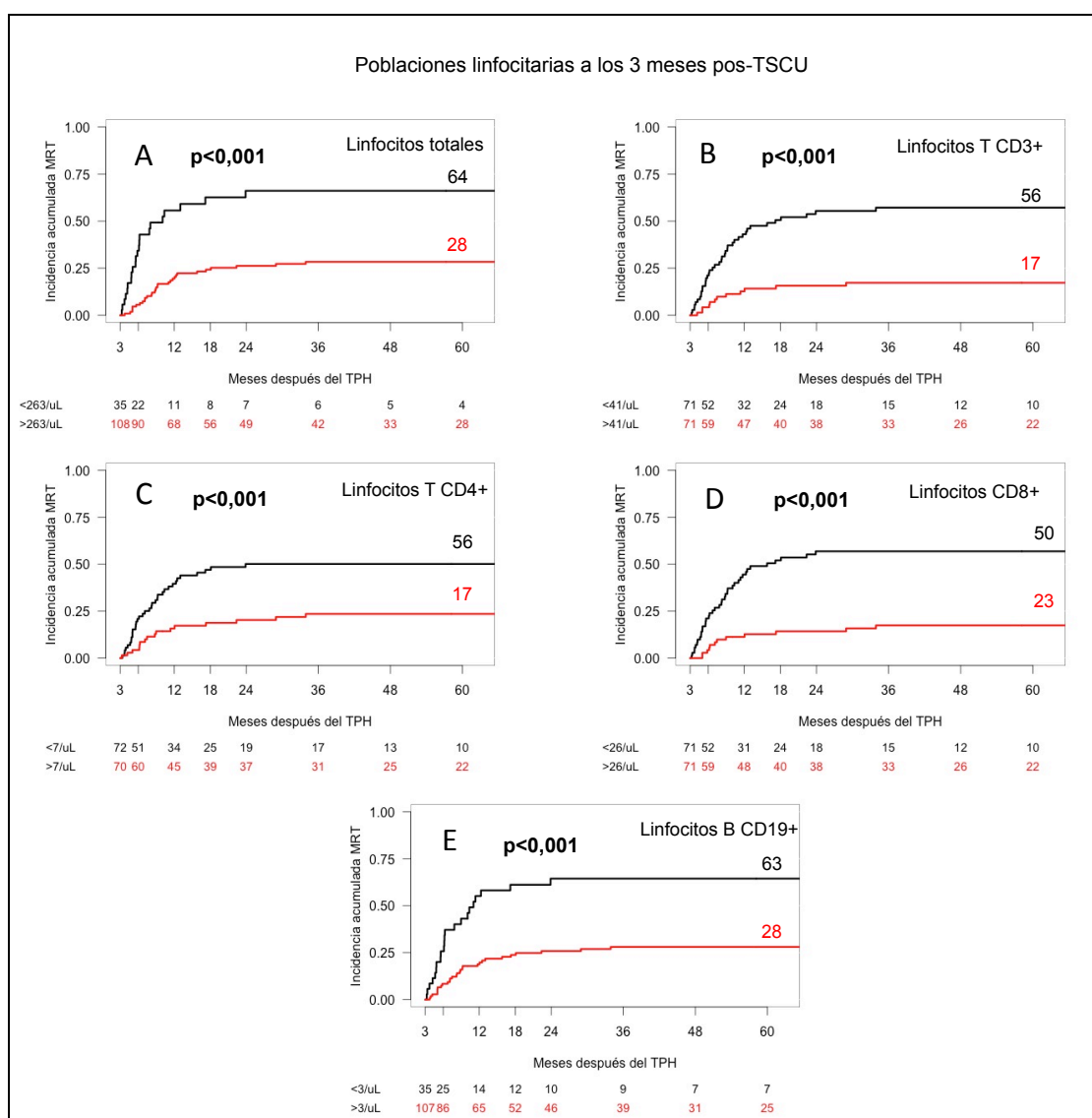


Figura 5.22. Curvas de incidencia acumulada de MRT según el número absoluto a los 3 meses del TSCU de diferentes poblaciones linfocitarias: linfocitos (A), linfocitos CD3⁺ (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D) y linfocitos B CD19⁺ (E). Las diferencias entre curvas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (ver **Tabla 5.27**)

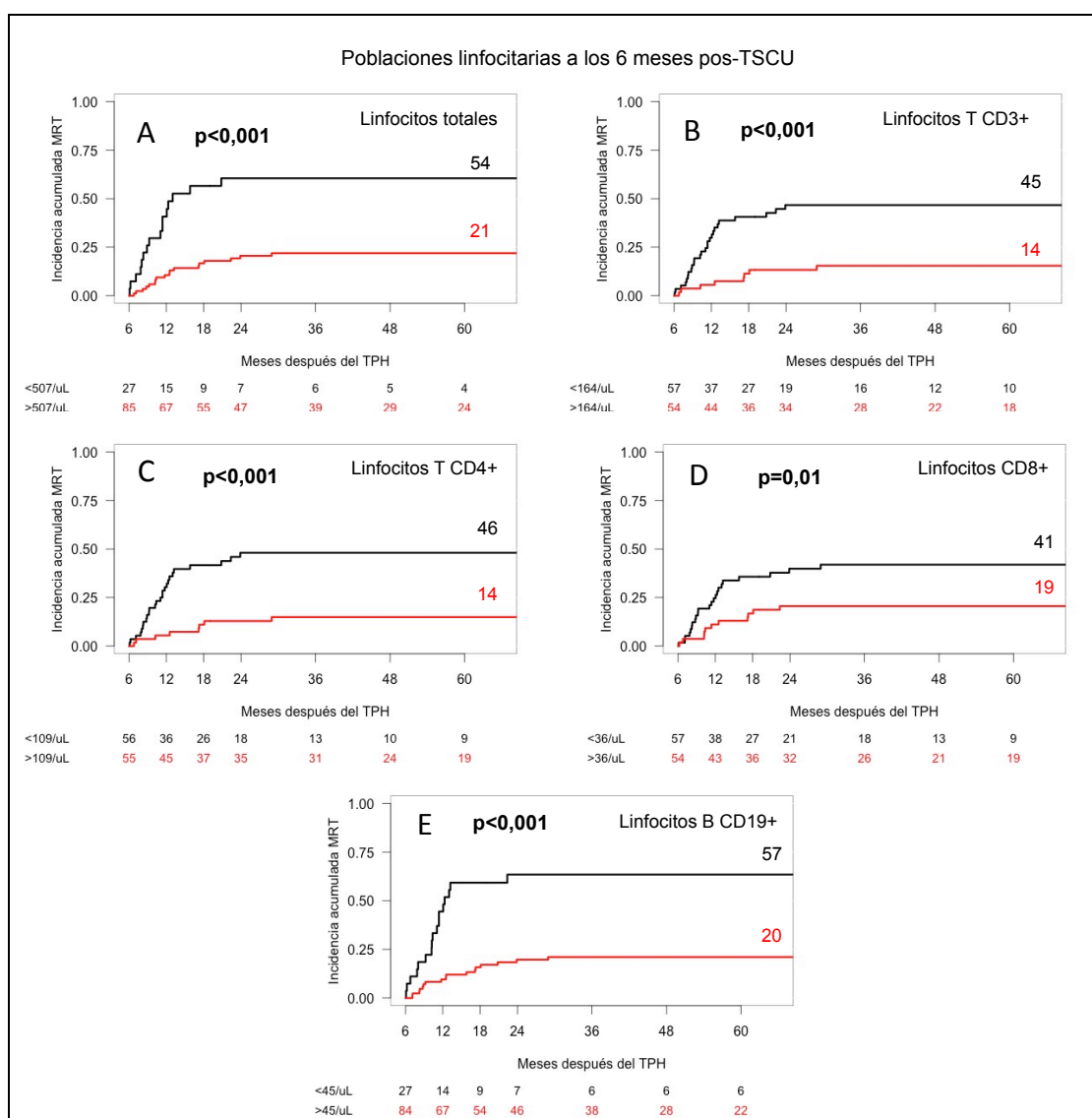


Figura 5.23. Curvas de incidencia acumulada de MRT según el número absoluto a los 6 meses del TSCU de diferentes poblaciones linfocitarias: linfocitos (A), linfocitos CD3⁺ (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D) y linfocitos B CD19⁺ (E). Las diferencias entre curvas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (ver **Tabla 5.27**)

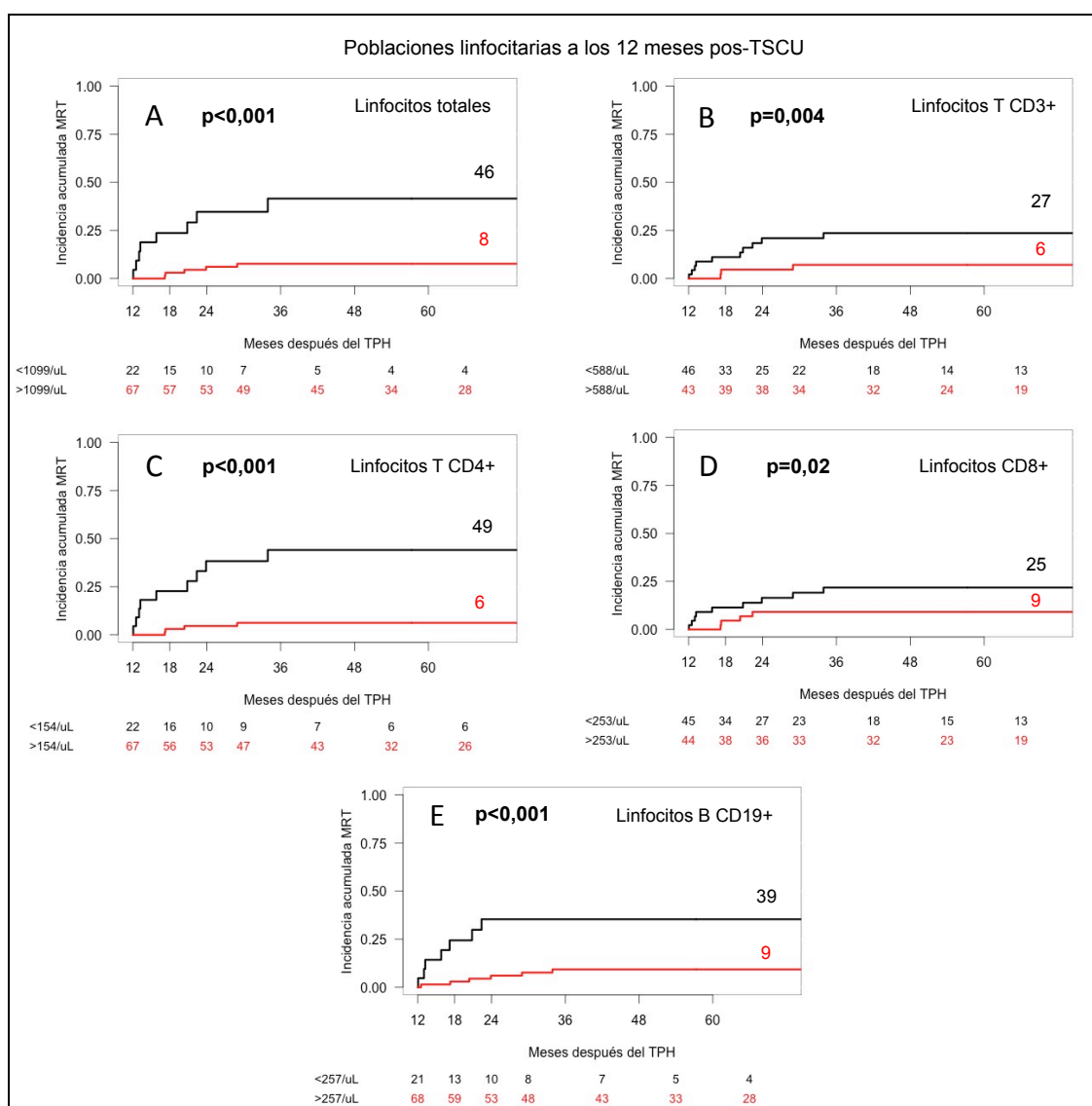


Figura 5.24. Curvas de incidencia acumulada de MRT según el número absoluto a los 12 meses del TSCU de diferentes poblaciones linfocitarias: linfocitos (A), linfocitos CD3⁺ (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D) y linfocitos B CD19⁺ (E). Las diferencias entre curvas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (ver **Tabla 5.27**)

5.4.2. Supervivencia global

En la **Tabla 5.28** se muestran los resultados del impacto de la reconstitución inmunológica sobre la SG del recuento absoluto de las poblaciones linfocitarias a los 3, 6 y 12 meses. Atendiendo a la significación (p -valor) se utilizó la mediana o el primer cuartil (Q1) como el punto de corte para discriminar los grupos con menor o mayor SG. El factor favorable para mayor supervivencia fue un recuento absoluto de la población linfocitaria superior al punto de corte establecido en todos los casos.

Tabla 5.28. Punto de corte en células/ μ L de las poblaciones linfocitarias a los 3, 6 y 12 meses para el porcentaje de probabilidad de supervivencia global (SG) a los 60 meses y significación (p -valor)

Población	Mes	Punto de corte (células/ μ L)	% SG (60 meses)	p -valor
Linfocitos totales	3	Q1=263	24 vs 45	<0,001
Linfocitos T CD3 ⁺	3	Mediana=41	25 vs 51	<0,001
Linfocitos T CD4 ⁺	3	Mediana=26	25 vs 51	<0,001
Linfocitos T CD8 ⁺	3	Mediana=7	29 vs 48	0,003
Linfocitos B CD19 ⁺	3	Q1=3	28 vs 42	0,008
Linfocitos totales	6	Q1=507	22 vs 55	<0,001
Linfocitos T CD3 ⁺	6	Mediana=164	31 vs 61	<0,001
Linfocitos T CD4 ⁺	6	Mediana=109	27 vs 64	<0,001
Linfocitos T CD8 ⁺	6	Mediana=36	33 vs 58	0,006
Linfocitos B CD19 ⁺	6	Q1=45	27 vs 53	<0,001
Células NK CD16 ⁺ CD56 ⁺	6	Q1=168	28 vs 52	0,006
Linfocitos totales	12	Q1=1.099	43 vs 72	0,003
Linfocitos T CD3 ⁺	12	Mediana=588	51 vs 80	<0,001
Linfocitos T CD4 ⁺	12	Q1=154	36 vs 76	<0,001
Linfocitos T CD8 ⁺	12	Mediana=253	53 vs 78	0,003
Linfocitos B CD19 ⁺	12	Q1=257	42 vs 74	<0,001
Células NK CD16 ⁺ CD56 ⁺	12	Mediana=380	55 vs 76	0,01

En la Figura 5.25 se muestran las curvas de la incidencia acumulada de SG global, a los 3, 6 y 12 meses después del TSCU. En la Figura 5.26, Figura 5.27 y Figura 5.28 se muestran las curvas de probabilidad de SG para las poblaciones linfocitarias que resultaron ser significativas en el análisis a los 3, 6 y 12 meses tras el TSCU respectivamente.

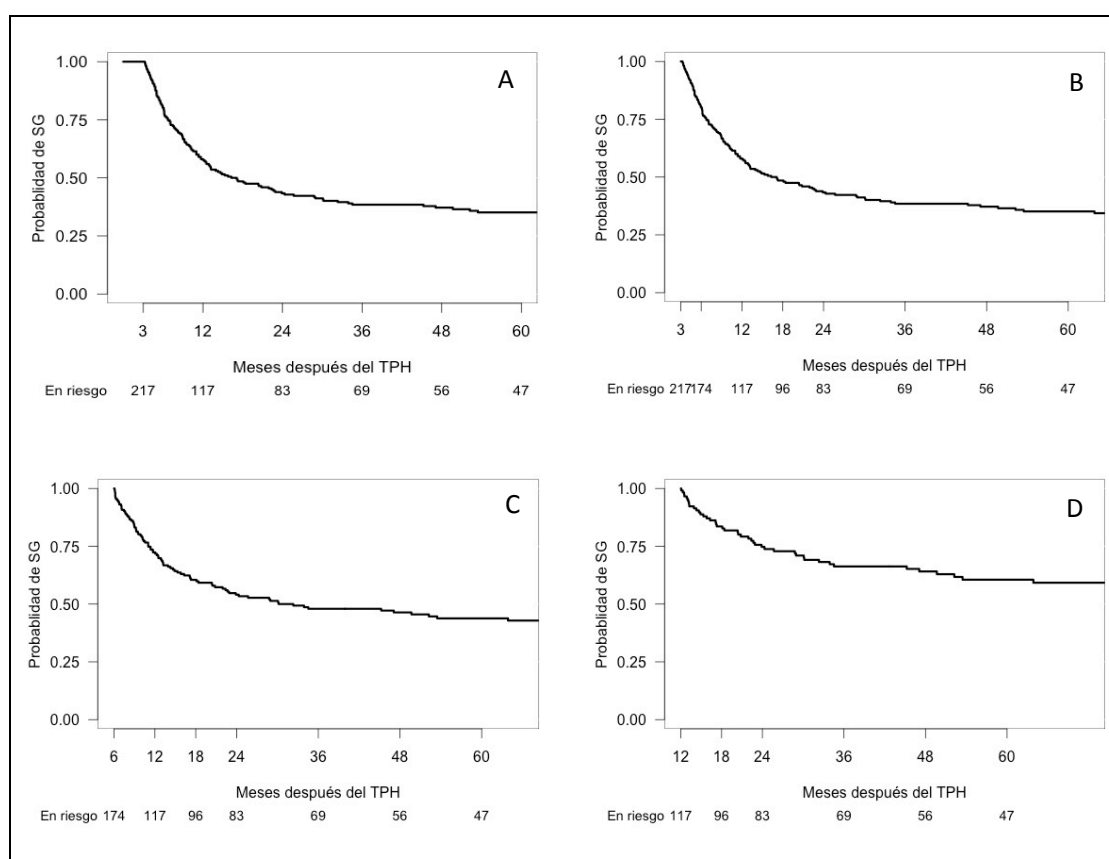


Figura 5.25. Curvas de incidencia acumulada de SG en la serie global considerando los pacientes vivos al TSCU (A) y a los 3 (B), 6 (C) y 12 meses (D) después

La supervivencia global fue del 35% con una mediana de seguimiento post-TSCU de 63 meses (extremos, 10-161), por lo que 77 pacientes permanecían vivos al final del análisis.

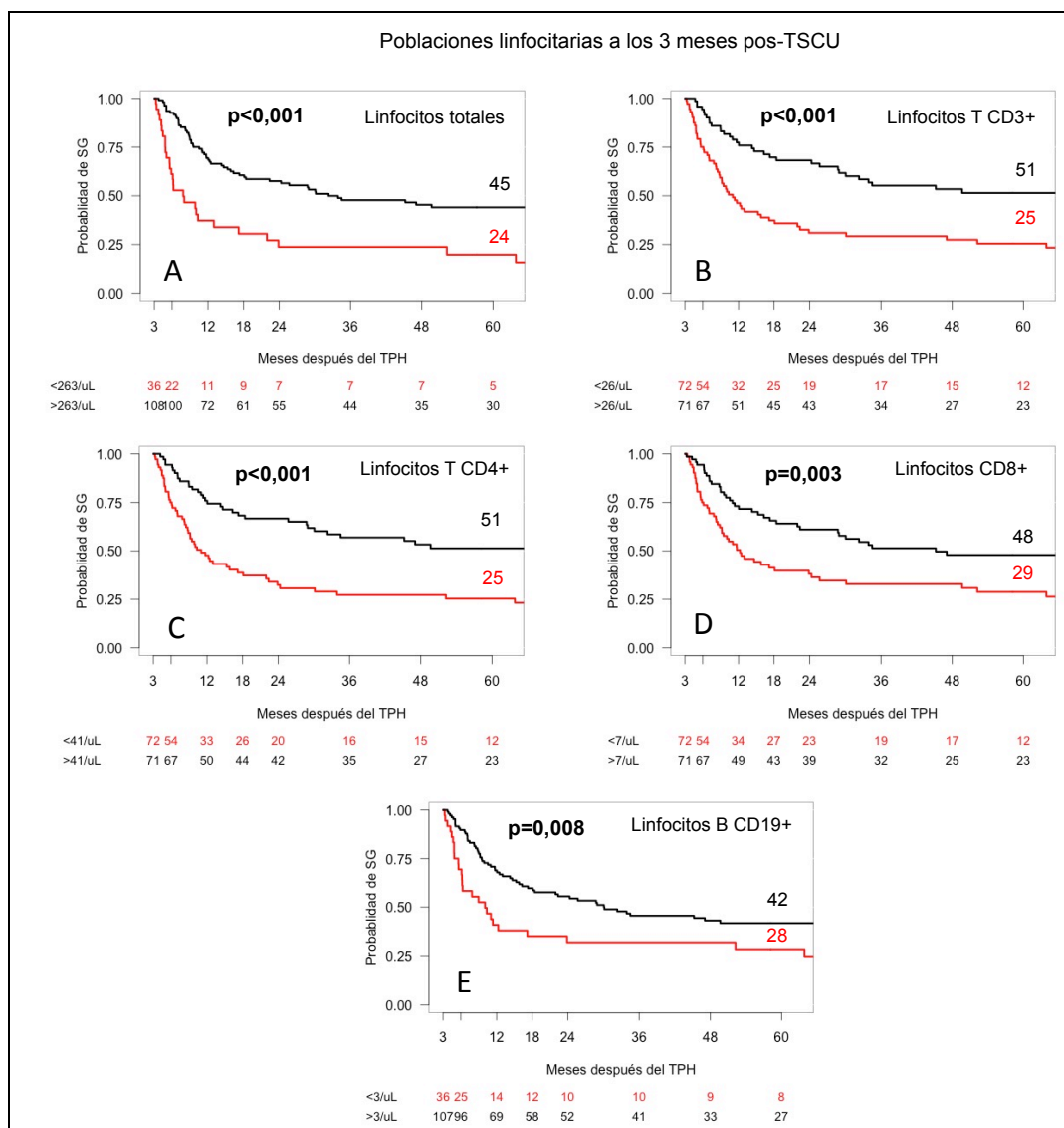


Figura 5.26. Curvas de incidencia acumulada de SG según el número absoluto a los 3 meses del TSCU de diferentes poblaciones linfocitarias: linfocitos (A), linfocitos CD3⁺ (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D) y linfocitos B CD19⁺ (E). Las diferencias entre curvas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (ver **Tabla 5.28**)

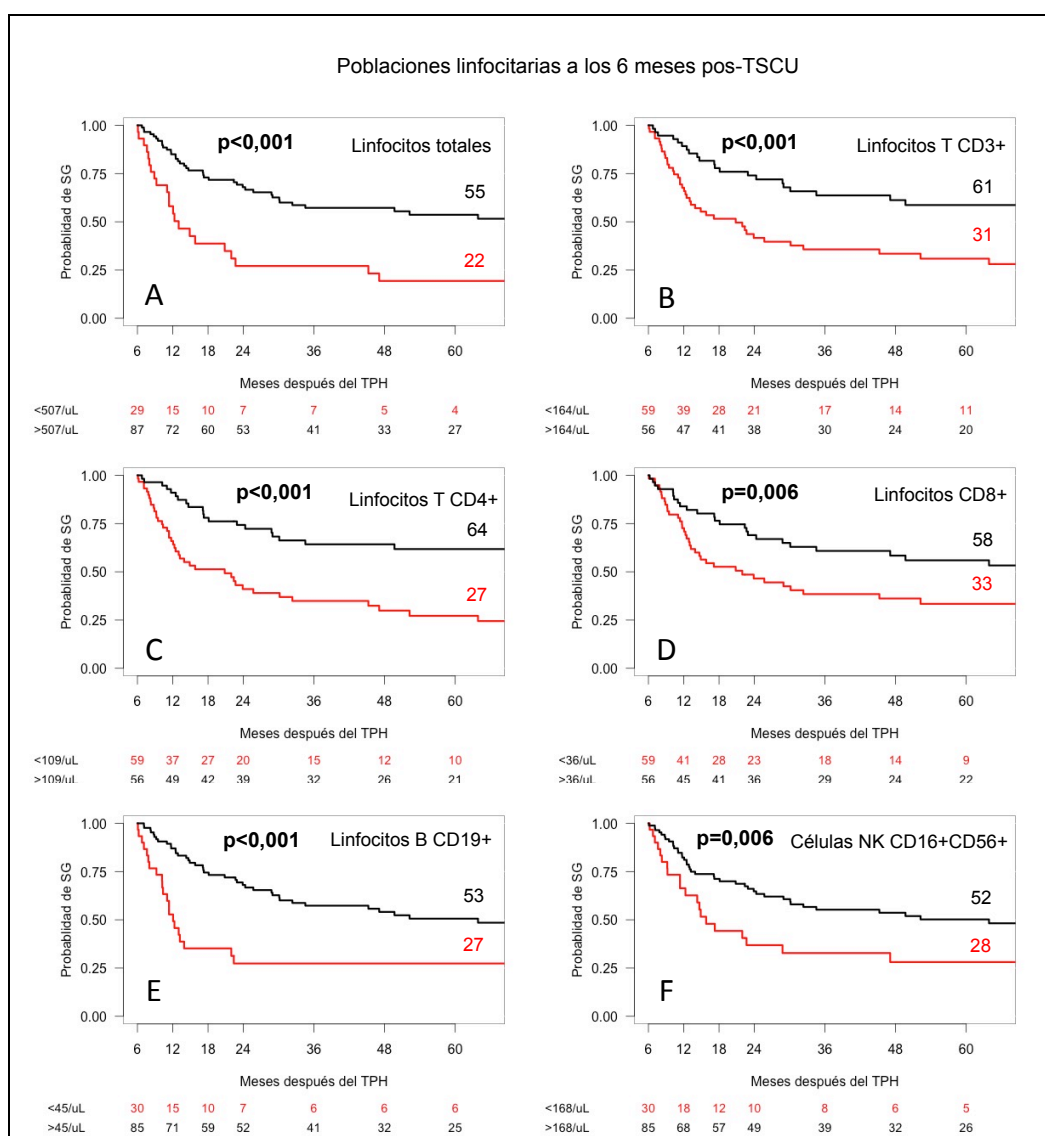


Figura 5.27. Curvas de incidencia acumulada de SG según el número absoluto a los 6 meses del TSCU de diferentes poblaciones linfocitarias: linfocitos (A), linfocitos CD3⁺ (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D), linfocitos B CD19⁺ (E) y células NK CD16⁺CD56⁺ (F). Las diferencias entre curvas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (ver **Tabla 5.28**)

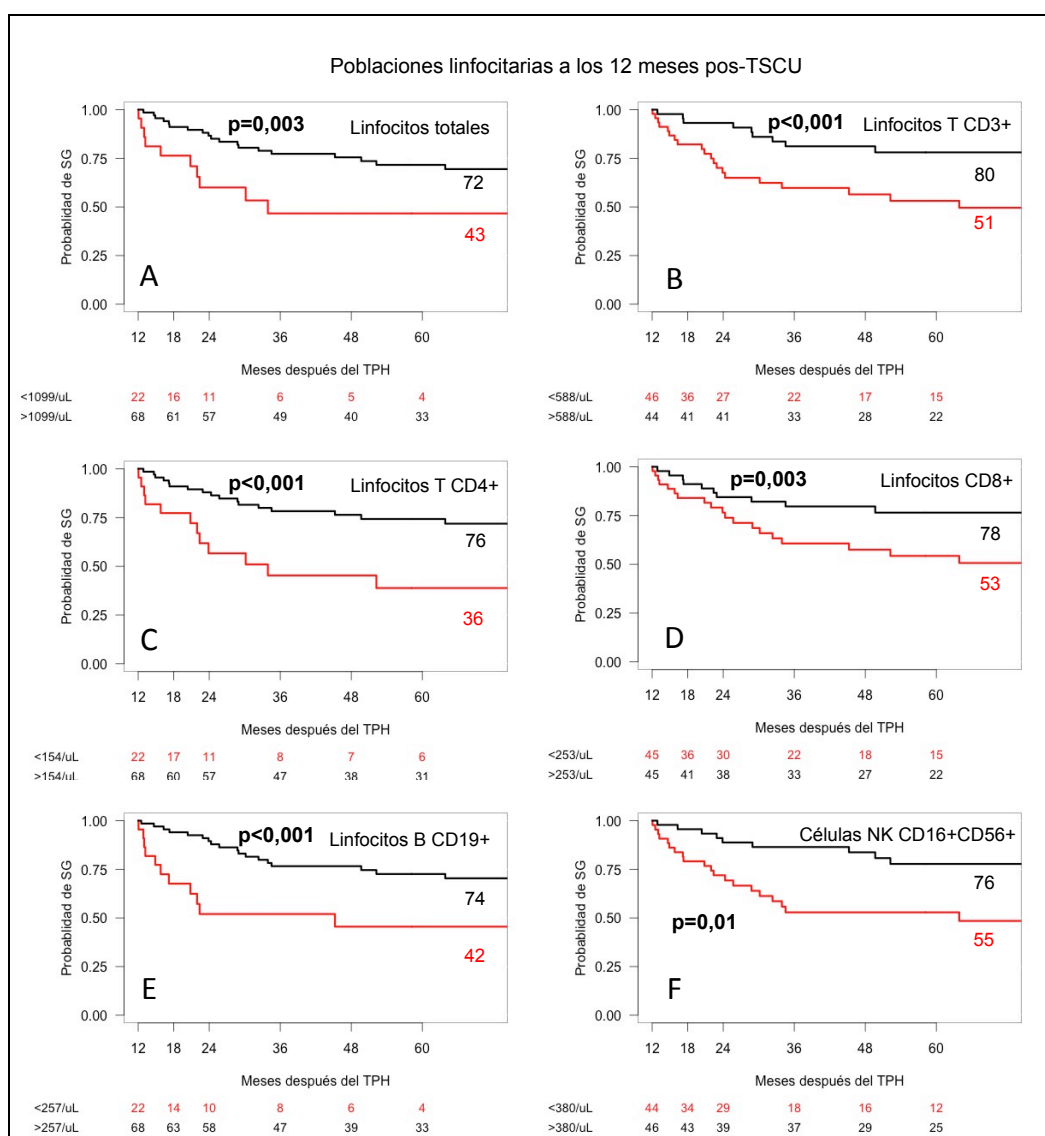


Figura 5.28. Curvas de incidencia acumulada de SG según el número absoluto a los 12 meses del TSCU de diferentes poblaciones linfocitarias: linfocitos (A), linfocitos CD3⁺ (B), linfocitos CD4⁺ (C), linfocitos CD8⁺ (D), linfocitos B CD19⁺ (E) y células NK CD16⁺CD56⁺ (F). Las diferencias entre curvas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (ver **Tabla 5.28**)

6. DISCUSIÓN

El TSCU ha demostrado ser un procedimiento alternativo a otros tipos de trasplante alogénico en pacientes adultos que no disponen de un donante familiar HLA-idéntico (Sanz *et al*, 2001), (Brown & Boussiotis, 2008), (Muñoz *et al*, 2014). Una de las principales limitaciones del TSCU es el retraso en la reconstitución inmunológica que expone a los pacientes a sufrir graves complicaciones relacionadas fundamentalmente con infecciones oportunistas y EICH.

La incorporación de la CMF a los laboratorios asistenciales extendió inicialmente su aplicación al análisis del estado inmunológico de los trasplantes hematopoyéticos, lo que ha propiciado el desarrollo de numerosos estudios en el marco de los alo-TPH de sangre periférica o médula ósea. En el área del TSCU, el conocimiento de la dinámica y los mecanismos de la reconstitución inmunológica ha favorecido una comprensión más profunda de su inmunobiología. Esta información podría facilitar el seguimiento de los pacientes y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a controlar las complicaciones que surgen en el periodo postrasplante, lo que contribuiría a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes que reciben un TSCU como única posibilidad de curación.

Aunque en los últimos años el número de publicaciones que evalúa el TSCU ha aumentado considerablemente, en general las series analizadas no incluyen muchos pacientes, observándose una gran heterogeneidad en lo que respecta a los parámetros analizados que dificulta la comparación de los resultados. Estos factores condicionan que muchas de las conclusiones deban ser confirmadas en futuros estudios prospectivos. Las series más actuales en pacientes pediátricos analizan la reconstitución inmunológica tras el TSCU comparando las características respecto a otras modalidades de trasplante en enfermedades hematológicas malignas y no malignas (inmunodeficiencias) (Oshrine *et al*, 2013), (Charrier *et al*, 2013), (Bartelink *et al*, 2013), (Rénard *et al*, 2011). En otros trabajos se evalúa la influencia de diferentes regímenes de acondicionamiento sobre la recuperación linfocitaria (Bae *et al*, 2012), (Geyer *et al*, 2011). Recientemente, se han publicado algunos artículos en los que se revisa la recuperación inmunológica en la población adulta. Jacobson *et al*. comparan los resultados obtenidos en 144 pacientes trasplantados con dos unidades de SCU vs alo-TPH con sangre periférica movilizada, todos ellos tratados con regímenes de intensidad reducida (Jacobson *et al*, 2012). Otros grupos han decidido el empleo de dos unidades de SCU en pacientes tratados con esquemas de acondicionamiento mieloablativo (Ramirez *et al*, 2013). Kanda *et al*. valoran la recuperación inmunológica en 95 pacientes que recibieron un TSCU con dos unidades frente a alo-TPH de hermano compatible o no emparentado acondicionados con regímenes mieloablativos

(Kanda *et al*, 2012). En otro estudio, se comparó la reconstitución inmunológica a largo plazo en TSCU frente a alo-TPH no emparentado en enfermedades hematológicas malignas y anemia aplásica (Servais *et al*, 2014). Nakatani *et al*. evaluaron la regeneración de células B en TSCU y alo-TPH de médula ósea tanto en niños como en adultos tratados con regímenes de acondicionamiento mieloablativo o de intensidad reducida con enfermedades malignas y no malignas (Nakatani *et al*, 2014). El trabajo más reciente sobre reconstitución inmunológica en adultos (Politikos *et al*, 2015) se centra en la recuperación de las células T en pacientes trasplantados con dos unidades de SCU con diagnóstico de neoplasias hematológicas que recibieron esquemas mieloablativos o de intensidad reducida. Nuestra serie de pacientes incluyó a 221 pacientes adultos, todos ellos con enfermedades hematológicas malignas. Una característica que aporta homogeneidad a nuestros datos es que el estudio se ha realizado en un único centro, lo que redujo la variabilidad inherente a algunos factores que podrían influir sobre los resultados, tales como la modalidad de trasplante y el empleo de diferentes regímenes de acondicionamiento y tratamientos de profilaxis de la EICH. En nuestra serie se objetivó una mayor diversidad en cuanto a los diagnósticos de los pacientes, siendo el más frecuente el de las leucemias agudas de mal pronóstico (LLA y LMA) que representaban un 76%. A diferencia de algunas de las series pediátricas (Oshrine *et al*, 2013), (Geyer *et al*, 2011), (Rénard *et al*, 2011), (Clave *et al*, 2013), observamos sólo un 38% de LLA, posiblemente debido a la menor incidencia de este tipo de leucemia en los pacientes adultos, objetivando una mayor proporción de linfoma y síndromes linfoproliferativos. Pese a que el número de pacientes de la serie global para este tipo de trasplante fue alto, el análisis de las diferentes poblaciones linfocitarias en cada momento de estudio no se pudo realizar en todos ellos. La importante morbi-mortalidad de este tipo de procedimiento condicionó la realización de los estudios inmunofenotípicos durante el seguimiento postrasplante, así como la imposibilidad de disponer de muestras de todos los pacientes durante todos los momentos de la monitorización.

La mayoría de los TSCU realizados en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (74%) se efectuaron entre los años 2006 y 2014. Este incremento posiblemente estuvo condicionado por la mayor experiencia adquirida por nuestro grupo en este tipo de trasplante durante la última década, que permitió que este procedimiento fuese una opción a considerar para el tratamiento de estas enfermedades.

En lo que respecta a las características pretrasplante, un 8% de los pacientes recibieron previamente un trasplante autólogo, que unido al mal pronóstico de los

casos de leucemias agudas incluidas en la serie, impactó de forma negativa sobre la MRT. Aunque se trata de una serie de pacientes adultos, la mediana de edad fue de 35 años. Más de la mitad (58%) tenían edades comprendidas entre 21 y 40 años y tan sólo una minoría (8%) eran mayores de 50 años. El TSCU es una modalidad de trasplante agresiva, lo que explica que la mediana de edad corresponda a adultos jóvenes si la comparamos con la mediana de los pacientes que reciben otro tipo de trasplante alogénico. Posiblemente esto justifica que existan más trabajos en niños que reciben TSCU que en adultos (Lindemans *et al*, 2014), (Charrier *et al*, 2013), (Clave *et al*, 2013). La edad del trasplante tiene una repercusión importante en la recuperación de la celularidad T. Ambos factores se encuentran inversamente relacionados, observándose una timopoyesis menos eficiente en adultos (Danby & Rocha, 2014), (Komanduri *et al*, 2007), (Weinberg *et al*, 2001). Mackall *et al*. estudiaron un grupo de 15 pacientes jóvenes (con edad inferior a 25 años) observando un menor recuento de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos vírgenes en los de mayor edad. Confirmaron que la reconstitución de los linfocitos T CD4⁺ es timo-dependiente, siendo superior en niños y en adultos jóvenes (Mackall *et al*, 1995). Sus resultados sugieren que una función tímica residual es necesaria para una rápida regeneración de las células T en pacientes que reciben altas dosis de quimioterapia. La comparación realizada por Small *et al*. en adultos vs niños trasplantados con médula ósea objetivó una peor recuperación de los linfocitos T, CD4⁺ y CD8⁺ en adultos, que se relacionó con un mayor riesgo de infecciones oportunistas (Small *et al*, 1999). Klein *et al*. compararon la reconstitución de las poblaciones T en niños vs adultos de hasta 58 años observando un retraso en la reconstitución de las células T centrales en éstos últimos, que se vio influenciada por edad, EICH o su profilaxis. Sorprendentemente, en nuestro estudio no se han encontrado diferencias en la reconstitución de los linfocitos T en valores absolutos en función de la edad de los receptores del TSCU. La baja mediana de edad de los pacientes pudo contribuir en la obtención de estos resultados.

El análisis de las diferentes poblaciones y subtipos linfocitarios fue realizado en un mismo laboratorio, sin variaciones en lo que respecta a la metodología y los reactivos utilizados, lo que permitió una mayor homogeneidad de los resultados inmunofenotípicos. En el caso de los estudios automatizados, esta sistemática de trabajo redujo la variabilidad. La utilización de controles externos periódicos y el riguroso mantenimiento de los equipos de citometría aumentó la fiabilidad de los resultados. En el caso de los análisis manuales los datos fueron consensuados por dos citometristas. A pesar de ello, una limitación importante ha sido la escasa

estandarización de los paneles multicolor empleados para los estudios inmunológicos de citometría (Maecker *et al*, 2012).

La SCU es una fuente rica en progenitores hematopoyéticos, pero el bajo número de linfocitos relativamente inmaduros y el limitado volumen contribuyen al retraso en la reconstitución inmunológica. La depleción de células T unida a los regímenes de acondicionamiento empleados en los TSCU provocan una persistente linfopenia en los receptores de este tipo de trasplante. En los análisis realizados mediante CMF en nuestra serie se observó una linfopenia mantenida hasta los 12 meses postrasplante, normalizándose el recuento linfocitario a partir de los 18 meses. En el periodo temprano pos-TSCU, la expansión de las células NK y los linfocitos B compensó la escasez de linfocitos T. La recuperación de la población linfocitaria depende de la supervivencia de las células de las unidades de SCU, que está constituida fundamentalmente por células T vírgenes y es menor que en los trasplantes de sangre periférica, así como de la producción *de novo* de células T por el timo del receptor (Komanduri *et al*, 2007). Klein *et al*. observaron una recuperación de la población T en niños a los 9-12 meses pos-TSCU (Klein *et al*, 2001), más rápida que en adultos. Comparado con otros estudios de recuperación inmunológica con las mismas características realizados en niños (Geyer *et al*, 2011), (Oshrine *et al*, 2013) en los que se también se observó una recuperación más rápida de la población T, nuestro estudio en adultos mostró un retraso en la recuperación del número absoluto de linfocitos T, que no se completó en el último momento del estudio. Algunos trabajos en adultos han mostrado una más temprana recuperación de los linfocitos T a los 3 meses (Jacobson *et al*, 2012). Estas diferencias podrían ser consecuencia de los distintos esquemas de acondicionamiento o debidos a las características del TSCU (SCU con dos unidades, expansión *ex vivo*). En nuestra serie la administración de un esquema quimioterápico más agresivo y el empleo de una sola unidad de SCU, unido a la depleción T *in vivo*, podrían justificar en parte la lenta recuperación del recuento absoluto de la población linfocitaria T.

La comparación de pacientes pediátricos y adultos muestra que la recuperación de los linfocitos T en niños que reciben TPH no emparentado es similar a la de los receptores emparentados, mientras que la recuperación T es más lenta en adultos no emparentados, indicando una función tímica reducida en estos últimos (Small *et al*, 1999). En este caso, la reconstitución inmunológica debe derivar de las células de la unidad de SCU, aumentando la probabilidad de infecciones oportunistas en los receptores de TPH con depleción T. En TPH haploidéntico de sangre periférica con depleción T puede producirse una grave depresión en el recuento de linfocitos T CD4⁺

hasta 1-2 años después del TPH, lo que explicaría la mayor tasa de infecciones fúngicas o víricas (CMV) (Volpi *et al*, 2001). Tanto los estudios realizados con TSCU en niños (Charrier *et al*, 2013), y adultos (Talvensaari *et al*, 2002) (Komanduri *et al*, 2007), como los efectuados con trasplante autólogo (Parkman & Weinberg, 2009), objetivan un retraso más acusado de los linfocitos T CD4⁺ frente a los CD8⁺, produciéndose una inversión del cociente. Esta diferencia en el número de linfocitos colaboradores y citotóxicos se ha descrito también en los alo-TPH de sangre periférica vs médula ósea, aunque en los primeros parece que la recuperación de los linfocitos T CD4⁺ es más rápida. En el alo-TPH de médula ósea los linfocitos T CD8⁺ se normalizan más rápidamente, lo que condiciona la inversión en el cociente hasta los 6-9 meses postrasplante (Parkman & Weinberg, 2009). En concordancia con estos hallazgos, observamos una lenta recuperación de las cifras absolutas de linfocitos T CD4⁺, que a los 36 meses todavía no se había completado, y una reconstitución más temprana del recuento de linfocitos T CD8⁺ que se normalizaron alrededor de los 18 meses pos-TSCU. El número de linfocitos T tampoco alcanzó valores normales en el último momento del estudio, probablemente debido en parte al retraso en la recuperación de las cifras de células T CD4⁺. El fallo en la recuperación del recuento de las células T CD4⁺ no permitió que se alcanzara esta relación entre ambas poblaciones T. La diferente dinámica en la recuperación de ambos tipos celulares se explicaría fundamentalmente por la dependencia tímica de los linfocitos T CD4⁺. Mientras que los linfocitos T CD8⁺ proliferan por expansión homeostática, los CD4⁺ requieren de una adecuada timopoyesis, que está dañada en estos pacientes. La depleción de células T *in vivo* producida por el tratamiento con ATG fue otro factor añadido que retrasó la recuperación de esta población linfocitaria.

En pacientes pediátricos, las células B alcanzan niveles normales con una mediana de 6 meses pos-TSCU, diferenciándose gradualmente hacia fenotipos más maduros (Niehues *et al*, 2001), (Giraud *et al*, 2000). Nakatani *et al*. demostraron una mejor neogénesis de los linfocitos B en TSCU comparado con alo-TPH de sangre periférica o médula ósea, detectando una activación funcional normal de los linfocitos B alrededor de los 12 meses postrasplante (Nakatani *et al*, 2014). Los valores medios normales de linfocitos B fueron observados en nuestro análisis a partir de los 6 meses pos-TSCU, con un progresivo incremento hasta el mes 18, objetivándose a partir de este momento recuentos que superaron el valor máximo de referencia, con una posterior normalización después de los 24 meses. Esta expansión de los linfocitos B podría ser un efecto producido por el origen medular de estas células unido a una compensación por la falta de linfocitos T. Teniendo en cuenta que algunos pacientes

de nuestra serie fueron tratados con rituximab por aumento de la carga viral de VEB, estas cifras podrían estar incluso infravaloradas.

Del mismo modo que se ha descrito en el alo-TPH con otras fuentes de progenitores hematopoyéticos, las células NK son las primeras en expandirse después del TSCU. En concreto, la subpoblación de células NK inmaduras es la predominante en el periodo temprano pos-TSCU tanto en adultos como en niños (Giraud *et al*, 2000). Aunque los valores normales de células NK se alcanzan a los 3 meses en la mayoría de las series, muchos autores han descrito una sobreexpansión de esta población (Niehues *et al*, 2001), (Komanduri *et al*, 2007), (Ruggeri *et al*, 2011) que puede durar hasta 9 meses y que contribuiría al efecto de injerto contra leucemia observado con esta modalidad de trasplante en neoplasias hematológicas (Parkman *et al*, 2006). En nuestro estudio detectamos valores absolutos normales de las células NK a los 3 meses pos-TSCU, con una posterior expansión que alcanzó un pico máximo a los 12 meses y un progresivo descenso con tendencia a la normalización sobre los 36 meses.

Respecto a los subtipos específicos de linfocitos analizados manualmente en el grupo de 52 pacientes, el número de casos disponibles en cada momento de estudio no permitió extraer conclusiones estadísticas que correlacionaran su reconstitución con otros parámetros clínico-biológicos. Existen pocos estudios que analicen en diferentes momentos todas estas poblaciones minoritarias en su conjunto aunque sí se han caracterizado algunas de ellas en el marco del TSCU. Una de las principales limitaciones para su análisis es la ya comentada elevada morbi-mortalidad de los pacientes que dificulta su seguimiento durante los meses postrasplante, momentos en los que sería interesante su valoración para la monitorización de este tipo de trasplante.

Algunos grupos han destacado la temprana recuperación de los linfocitos T vírgenes ($CD3^+CD4^+CD45RA^+$) en TSCU. Otros como Jacobson *et al*. observaron diferencias en la proporción de linfocitos T vírgenes y memoria ($CD3^+CD45RO^+$) en trasplante con dos unidades de SCU respecto al alo-TPH convencional, con una menor proporción de la población T $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ en el TSCU que puede detectarse en muy bajo número en sangre periférica a los 6 meses (Jacobson *et al*, 2012). La recuperación de estas células depende de la diferenciación de las células hematopoyéticas y su maduración en el microambiente tímico. Otros trabajos sugieren que la capacidad funcional de las células T $CD8^+$ efectoras contra CMV depende de la presencia de células $CD4^+CD45RA^+$ a los 6-12 meses pos-TSCU (Brown *et al*, 2010). Los compartimentos de células $CD4^+$ y $CD8^+$ presentan baja proporción de células

vírgenes, mientras que el último presenta mayor número de células T memoria. Por otra parte, se ha observado que la expresión de CD45RA⁺ no identifica de forma inequívoca a las células T vírgenes puesto éstas también pueden expandirse fuera del timo sin previa estimulación y además la población CD45RO⁺ puede revertir a un fenotipo de célula virgen (Haynes *et al*, 1999), (Picker *et al*, 1993). En general, la población de linfocitos T memoria predomina sobre la de T vírgenes en adultos sanos. En nuestro estudio, los linfocitos T vírgenes y memoria no fueron evaluables hasta los 12 meses pos-TSCU. En el caso de los T vírgenes CD3⁺CD45RA⁺ se observó una estabilización de su recuento a partir de los 18 meses, con una ligera caída a partir de los 24 meses, mientras que los linfocitos T memoria CD3⁺CD45RO⁺ se estabilizaron en torno a los 18 meses, mostraron una tendencia a seguir en aumento. A largo plazo se hizo patente la predominancia de los T memoria sobre los T vírgenes. En lo que respecta a los linfocitos T activados CD3⁺CD8⁺HLADR⁺ detectamos un aumento entre los 6-18 meses, momento en el que su recuento fue máximo, lo que podría coincidir con la mayor incidencia de reactivación de CMV. No obstante, como se comentará más adelante, esta subpoblación activada de linfocitos T no es CMV-específica y podría incrementarse ante cualquier tipo de viriasis. CCR7⁺ se expresa en la mayoría de células T de sangre periférica (Campbell *et al*, 2001). En TSCU gran parte de las células T expandidas presentan una hiporregulación de la expresión de CCR7 (Mazur *et al*, 2008), observándose una menor proporción de linfocitos T CD3⁺CCR7⁺ que en controles sanos (Komanduri *et al*, 2007). Los linfocitos T memoria CCR7⁻ muestran receptores para la migración a los tejidos inflamados, mientras que los CCR7⁺ expresan receptores de migración a nódulos linfáticos y carecen de función efectora inmediata (Sallusto *et al*, 1999). En nuestra serie, el recuento absolutos de la subpoblación T CCR7⁺ aumentó a partir de los 18 meses con un máximo a los 24 meses. Estos datos podrían indicar el momento en que estos linfocitos adquieren la capacidad de migración a los órganos linfoides secundarios con la recuperación tímica en el TSCU.

Los linfocitos B CD19⁺CD20⁺ presentaron un valor máximo a los 18 meses, en concordancia con lo observado para la población de linfocitos B total estudiada mediante técnicas automatizadas. La expresión de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas Kappa y Lambda aumentó de forma paralela, estabilizándose a partir de los 12 meses, con un predominio de Kappa como corresponde a la población linfoide B normal. En SCU los linfocitos B1 (CD19⁺CD5⁺) pueden representar hasta el 50% del total de células B. En individuos sanos, la población de células B1 es superior en niños que en adultos, mientras que el recuento de células B memoria

(CD19⁺CD27⁺) se incrementa con la edad, disminuyendo las células B vírgenes. Estos cambios funcionales están estrechamente relacionados con la estimulación antigénica (Veneri *et al*, 2009). En nuestra serie los linfocitos B1 se detectaron a los 12 meses pos-TSCU, siendo su número absoluto muy bajo pero constante hasta los 36 meses. Los linfocitos B memoria aumentaron entre los 12-18 meses y luego se estabilizaron. Los linfocitos B activados CD19⁺CD23⁺ con función reguladora suponen aproximadamente el 5% de los linfocitos B de sangre periférica en niños. En SCU se pueden encontrar hasta un 40% de estos linfocitos (Chirumbolo *et al*, 2011). Su expresión en las células B de sangre periférica decrece gradualmente conforme los linfocitos B reaccionan frente a los antígenos y se activan. Los valores absolutos que obtuvimos para esta población alcanzaron un máximo a los 24 meses, lo que indicaría que a partir de este momento muchos de los linfocitos B ya han sido activados y comienzan a decaer. Las células B activadas CD19⁺CD38⁺ podrían mediar la eliminación de células B autorreactivas antes de que se conviertan en linfocitos B memoria (García-Muñoz, 2010). El recuento más alto de linfocitos B con este fenotipo se observó a los 18 meses y después su tendencia fue a disminuir. Las células B CD19⁺CD38⁺ aumentarían un poco antes que las CD19⁺CD23⁺ eliminando las células autorreactivas previamente a la activación antigénica.

En TSCU se ha observado la presencia de valores normales de células NK a los 3 meses postrasplante, inicialmente con predominio de células NK inmaduras (CD56^{+brillante}CD16^{-/+débil}) que no presentan citotoxicidad dependiente de anticuerpos ni capacidad de lisis. Esta población se incrementa rápidamente tras el prendimiento de los granulocitos neutrófilos, aproximadamente al mes pos-TSCU, y después decae para madurar hacia un fenotipo intermedio CD56^{+brillante}/CD16⁺. Por último aparecen las células NK maduras CD56⁻CD16⁺⁺ en torno a los 12 meses (Béziat *et al*, 2011). Estas observaciones están en concordancia con nuestros resultados, en los que se observó un elevado recuento absoluto de células NK inmaduras a los 3 meses pos-TSCU, que descendió hasta valores en torno a la normalidad a partir de los 12 meses coincidiendo con el incremento de células NK maduras al año del trasplante, que representaron la mayoría de la población NK. Las células NK activadas en procesos agudos aumentan la expresión de HLADR y disminuyen la reactividad para CD11b, mientras que las que se activan en procesos crónicos se asocian con una menor expresión de ambos antígenos, llegando a desaparecer la expresión de HLADR con el paso del tiempo (Lima *et al*, 2001), (Lima *et al*, 2002). En nuestra serie las subpoblaciones de células NK activadas CD16⁺CD11b⁺ y CD16⁺HLADR⁺ presentaron un recuento máximo a los 12 meses pos-TSCU, coincidiendo con el aumento que se observó en la población de

células NK maduras, e iniciando posteriormente un descenso. A los 24 meses la población CD16⁺CD11b⁺, implicada en la adhesión y la expansión de las células NK, pareció presentar una tendencia a estabilizarse, mientras que las células NK CD16⁺HLADR⁺ presentaron recuentos muy bajos a partir de este momento.

En los pacientes con diagnóstico inicial de linfoma y síndromes linfoproliferativos se observó una peor reconstitución inmunológica de las poblaciones de linfocitos totales, linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y linfocitos B (CD19⁺). De forma similar, los pacientes que recibieron un TPH autólogo previo al TSCU tuvieron una peor reconstitución inmunológica de los valores absolutos de la población CD19⁺, incluyéndose en este grupo de pacientes la mayoría de los casos con diagnóstico de linfoma o síndromes linfoproliferativos. El rituximab es una de las terapias más utilizadas en los esquemas de tratamiento del linfoma B y los síndromes linfoproliferativos y fue administrado en la mayoría de estos pacientes. La diana terapéutica de este fármaco son los linfocitos B, por lo que podría considerarse al anti-CD20 pudo ser responsable de este hallazgo por la influencia en la recuperación de las células B. No obstante, el largo periodo de tiempo transcurrido desde su administración (aproximadamente un año y medio antes de la realización del TSCU) hace necesario plantearse otros factores que expliquen este resultado.

Algunos estudios han analizado el impacto que tiene la reactivación del CMV sobre la recuperación de las cifras de linfocitos en el primer mes pos-TSCU (Beck *et al*, 2010) observando que los mayores recuentos de linfocitos totales se asociaron con una elevada probabilidad de reactivación de este virus. Otro trabajo en series pediátricas objetivó que en los pacientes CMV-positivos la recuperación de los linfocitos T totales y T CD8⁺ era superior (Niehues *et al*, 2001). Brown *et al*. encontraron en adultos trasplantados con doble unidad de SCU que los linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ detectables a las 8 semanas postrasplante no eran capaces de eliminar el CMV. El control de la infección producida por este virus depende de la recuperación de la población CD4⁺CD45RA⁺, la restauración de una timopoyesis normal y el reordenamiento de los TRECs (Brown *et al*, 2010). McGoldrick *et al*. encontraron en trasplante con dos unidades de cordón una recuperación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a los 42 días postrasplante. Pero ninguna de las poblaciones proliferaba de forma adecuada, posiblemente por el daño inducido sobre el timo, y las células no presentaban especificidad frente al virus del CMV (McGoldrick *et al*, 2013). En nuestra serie, la mayoría de los pacientes (77%) eran CMV positivos en el momento del TSCU, dato que se corresponde con lo referido en la población española adulta (Sanz & Andreu, 2014). La seropositividad para CMV condiciona el riesgo de

reinfección por este virus en el periodo postrasplante (Walker *et al*, 2007), lo cual influye negativamente en la supervivencia de los pacientes trasplantados con SCU. Los receptores de TSCU con estado serológico CMV-positivo presentaron una reconstitución más rápida de las cifras absolutas de células NK y linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), pero recuperaron más lentamente la población B (CD19⁺). En pacientes pediátricos se ha evidenciado que la infección por CMV aumenta los linfocitos T CD8⁺ pero no los CD4⁺ (Farnault *et al*, 2012). En adultos, la recuperación postrasplante de la población T CD8⁺ CMV-específica es necesaria para controlar la reactivación vírica (Borchers *et al*, 2012). El desarrollo de estudios funcionales linfocitarios podría mejorar la información sobre el estado inmunológico de estos pacientes. La subpoblación CD3⁺CD8⁺HLADR⁺ identifica a linfocitos T activados que podrían estar respondiendo ante una infección vírica aguda, incluyendo la provocada por el CMV. Un análisis minucioso de citoquinas permitiría confirmar la especificidad contra el CMV de estos linfocitos T. Tal como sugieren Della Chiesa *et al*. el CMV podría promover el desarrollo de las células NK en los pacientes que experimentan una reactivación vírica tras el TSCU (Chiesa *et al*, 2012). Por otra parte, los pacientes seropositivos en el momento del trasplante pueden experimentar una reactivación del virus (Walker *et al*, 2007). Esto podría explicar la rápida aparición de las células NK que se observó en los pacientes seropositivos en el periodo pos-TSCU. Foley *et al*. observaron que a los 12 meses del alo-TPH, la reactivación del CMV estimulaba el desarrollo de células NK de fenotipo maduro (Foley *et al*, 2012). Estas células de la inmunidad innata podrían desempeñar un papel protector frente a la recaída de la enfermedad neoplásica y controlar las enfermedades infecciosas durante un largo periodo postrasplante. En nuestra serie, encontramos en los pacientes seropositivos que las células NK presentaron un recuento máximo a los 12 meses pos-TSCU, resultado que estaría de acuerdo con lo observado por Foley *et al*. La información disponible respecto a la relación entre la seropositividad para CMV y la recuperación de la población CD19⁺ es escasa. El bajo recuento de la población de linfocitos B podría ser consecuencia de la elevación de las poblaciones linfoides T y NK secundario a la reactivación vírica.

Con respecto a la incompatibilidad ABO, el grupo de pacientes que no presentaron incompatibilidad recuperaron mejor las cifras absolutas de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) que los que presentaron incompatibilidad mayor o menor. No encontramos diferencias en la recuperación del resto de poblaciones linfocitarias, por lo que la influencia aislada de la población T CD8⁺ sobre la incompatibilidad ABO fue de difícil interpretación.

En cuanto a las unidades de SCU, el 46% procedían de bancos de cordón españoles, y en concreto el 33% de Barcelona. El suministro de unidades de SCU procedentes de bancos nacionales se ha incrementado hasta llegar a situarse ligeramente por encima de la mitad en los últimos años, como ya fue descrito por Sanz (Sanz, 2012). Esta circunstancia podría suponer una autosuficiencia en el suministro de las unidades procedentes de bancos españoles, lo que implicaría ventajas tanto logísticas como económicas de este tipo de procedimiento. El bajo recuento celular de las unidades de SCU comparado con otras fuentes de CPH como la médula ósea o la sangre periférica podría condicionar un retraso en la recuperación hematopoyética, así como un incremento en el fallo de injerto (Welniak *et al*, 2007). Por esta razón, otras estrategias empleadas en el marco del TSCU han sido la infusión de dos unidades de SCU o de unidades de SCU expandidas *ex vivo* (Horwitz & Frassoni, 2015), con la finalidad de incrementar el número de células progenitoras y así acelerar la recuperación hematopoyética. En el caso del TSCU con dos unidades de SCU se ha observado que la unidad predominante en el injerto suele ser la que contiene mayor número de células CD3⁺ (Ramirez *et al*, 2011). En nuestra serie, las unidades de SCU con mayor dosis de CNT antes de la criopreservación tuvieron una mejor reconstitución inmunológica de la población CD4⁺. Las unidades de SCU con más células CD34⁺ infundidas por kg de peso del receptor reconstituyeron mejor las poblaciones de linfocitos T CD3⁺ y T colaboradores CD4⁺. Cuando se consideró la celularidad CD34⁺ infundida (sin tener en cuenta los kg de peso del receptor), también se observó una mejor reconstitución de los linfocitos T CD8⁺. En general, a mayor número de CNT infundidas, y en particular a mayor número de células CD34⁺, se observa una mejor reconstitución inmunológica. Un hallazgo a comentar en nuestra serie fue que las unidades de SCU con menor tiempo de almacenamiento tuvieron una mejor reconstitución inmunológica sólo de los valores absolutos de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), no observándose diferencias en los que respecta al resto de las poblaciones. Sería esperable que un menor tiempo de almacenamiento de las unidades se hubiera relacionado con una mejor reconstitución global de todas las poblaciones linfoides.

En el tratamiento de profilaxis de la EICH la sustitución de prednisona por MFM tiene como finalidad reducir la inmunosupresión y acelerar la reconstitución inmunológica pos-TSCU. Como contrapartida, el MFM produce cierta mielotoxicidad (Sanz *et al*, 2013) que podría estar mediada por la inhibición de la proliferación y la función citotóxica de las células NK (Ohata *et al*, 2011). En nuestra serie, los pacientes que recibieron profilaxis de la EICH con CSA + MFM tuvieron una mejor reconstitución

inmunológica de las cifras absolutas de linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos T colaboradores (CD4⁺). No se observaron diferencias significativas en la recuperación de las células NK. Los corticoides como la prednisona influyen desfavorablemente en la recuperación de la población de linfocitos T. Estos resultados parecen indicar que el MFM propiciaría una mejor recuperación de los linfocitos T.

La presencia de EICH aguda es un factor predictivo de EICH crónica y ambas tienen un impacto negativo sobre la función tímica. El tratamiento inmunosupresor empleado para tratar la EICH aguda intensifica la inmunodeficiencia del receptor, lo que explicaría el mayor riesgo de infecciones asociadas a esta complicación por la menor proporción de linfocitos T y B presentes en el periodo pos-TSCU (Parkman & Weinberg, 2009). Los valores de TRECs se correlacionan con el número de células T vírgenes. La presencia de EICH aguda en alo-TPH afecta negativamente al timo tal como se ha demostrado mediante el análisis de TRECs (Toubert *et al*, 2012), de forma que la escasez de progenitores de las células T hace que se produzca un retraso en su reconstitución. Cuando se midieron los TRECs en TSCU vs trasplante de médula ósea HLA-idéntico se detectaron valores bajos de TRECs en ambos grupos a los 12 meses, mejorando a los 24 meses en los TSCU (Talvensaari *et al*, 2002). Estos datos indicarían que se produce una recuperación tímica eficiente a partir de los progenitores linfoides de SCU a pesar del menor número de células infundidas comparado con el TPH de médula ósea. En nuestra serie, no se realizó la detección de TRECs, pero en los pacientes que presentaron EICH aguda se observó una peor reconstitución inmunológica del recuento absoluto de linfocitos T (CD3⁺), colaboradores (CD4⁺) y citotóxicos (CD8⁺), probablemente asociada a la deficiente reconstitución del timo.

Los datos disponibles sobre la MRT en TSCU mieloablativo provienen principalmente de análisis retrospectivos realizados en series pediátricas. Estos estudios indican una MRT del 27-39% a los 100 días pos-TSCU y del 30-44% a los 12 meses (Rocha *et al*, 2004), (Laughlin *et al*, 2004). La elevada incidencia de mortalidad sin recaída en estos pacientes es en parte atribuible a las infecciones y la EICH aguda que sobrevienen en los primeros 100 días debido al retraso en la reconstitución inmunológica, así como a la toxicidad producida por el tratamiento intensivo administrado. Algunos trabajos realizados en alo-TPH (Le Blanc *et al*, 2009), (Savani *et al*, 2007) y TSCU (Burke *et al*, 2011) han mostrado que un mayor recuento absoluto de linfocitos predice la SG. En un estudio realizado por Szabolcs *et al*. en una serie de pacientes trasplantados con SCU se observó una SG a los 78 meses ligeramente inferior al 50% (Szabolcs & Niedzwiecki, 2007). En las dos últimas décadas, la SG al año tras alo-TPH se ha incrementado del 40 al 70% en pacientes con leucemia

mieloides aguda (Komanduri *et al*, 2013). Otras series han comparado diferentes tipos de alo-TPH, encontrando una SG a los 3 años en TSCU del 26% (Laughlin *et al*, 2004). De forma similar a lo observado en los citados estudios, la MRT a los 60 meses fue del 37% en nuestra serie, con un aumento considerable entre los 3-12 meses pos-TSCU, y una tendencia a estabilizarse en torno a los 21 meses. La MRT a los 3, 6 y 12 meses fue <1%, 14% y 29%, respectivamente. La SG a los 60 meses fue del 35%, con un descenso muy pronunciado hasta los 12 meses pos-TSCU, que se estabilizó alrededor de los 35 meses. La SG a los 3, 6 y 12 meses fue 99%, 87% y 61%, respectivamente. La reconstitución inmunológica de las células NK no pareció ser un factor predictor de la MRT, aunque sí influyó a los 6 y 12 meses en la SG. En cambio, la recuperación de los linfocitos T y B proporcionó información sobre qué pacientes tendrían mayor probabilidad de supervivencia o mayor riesgo de morir por causas no relacionadas con la recaída de la enfermedad. Puesto que las células NK son las primeras en recuperarse tras el TSCU, podrían no suponer una población celular limitante para disminuir la MRT o aumentar la SG a los 3 meses. En el caso de las células T, la timopoyesis se encuentra muy dañada en el contexto de este tipo de trasplante observándose escasos precursores T y células vírgenes. Una de las estrategias terapéuticas para optimizar la reconstitución inmunológica podría ser la administración de IL-17 que intensifica la timopoyesis, induciendo la regeneración tímica, aumentando la proliferación de los linfocitos T y la diversidad en el repertorio del RCT (Mackall *et al*, 2011), (Perales *et al*, 2012). Varios autores han encontrado esta relación positiva entre IL-17 y timopoyesis, pero otros (Politikos *et al*, 2015) han obtenido resultados contrarios. A pesar de que la neogénesis de los linfocitos B no es edad-dependiente como ocurre como la timopoyesis, tras el TSCU también se ha observado una escasez de linfocitos B. La falta de linfocitos T antígeno-específicos imposibilita su interacción con los linfocitos B, lo que repercute en la producción de inmunoglobulinas específicas por parte de éstos, haciendo más vulnerable al sistema inmunológico que no puede protegerse de infecciones. Una estrategia que se ha propuesto para la protección frente a infecciones víricas ha sido la generación de células T virus-específicas a partir de SCU, pero esta opción está limitada por el escaso número de linfocitos T presentes en las SCU disponibles para su manipulación, su fenotipo virgen su baja actividad citotóxica y su alta tasa de apoptosis. Otra opción explorada por Bari *et al*. ha sido la expansión *ex vivo* de las células de SCU y la optimización de su capacidad migratoria (Bari *et al*, 2015).

La información aportada en este trabajo ha permitido mejorar nuestro conocimiento sobre el estado inmunológico de los pacientes sometidos a TSCU. Son

necesarios estudios prospectivos funcionales y de poblaciones linfocitarias minoritarias en un mayor número de pacientes que contribuyan a ampliar la información sobre la reconstitución inmunológica en este tipo de trasplante. La aplicación de estos análisis podría favorecer el diseño de terapias inmunomoduladoras para el manejo de las complicaciones relacionadas con este procedimiento, acortando el retraso en la recuperación inmunológica y, en consecuencia, mejorando la supervivencia de los pacientes con TSCU.

7.CONCLUSIONES

Este proyecto de Tesis Doctoral cuyo objetivo primordial ha sido evaluar la dinámica de la reconstitución inmunológica y su potencial relación con las complicaciones asociadas a la inmunodepresión que se produce tras el TSCU mieloablativo de DNE en pacientes con neoplasias hematológicas permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La dinámica de reconstitución inmunológica tras el TSCU muestra una rápida recuperación de las cifras absolutas de células NK, un lento restablecimiento del recuento de linfocitos B y un retraso importante en la normalización de los valores de los diferentes subtipos de linfocitos T.
2. La recuperación del recuento de linfocitos T en la mayoría de los pacientes es todavía incompleta a los 3 años del trasplante, siendo especialmente evidente para los linfocitos T colaboradores CD4⁺.
3. Los pacientes con linfoma o síndromes linfoproliferativos experimentan un mayor retraso en la normalización de los valores absolutos de linfocitos B.
4. La seropositividad para citomegalovirus supone un aumento significativo de las cifras absolutas de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y mayor incremento de los valores de células NK en el primer año postrasplante, así como un retraso de la recuperación de los números absolutos de linfocitos B.
5. La profilaxis de la EICH con ciclosporina A y micofenolato mofetil se asocia a la reconstitución inmunológica más precoz del recuento absoluto de linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos T colaboradores (CD4⁺) que la profilaxis con corticoides.
6. El recuento absoluto de linfocitos T totales fue significativamente más bajo en los pacientes que desarrollaron EICH aguda y su recuperación más lenta.
7. La recuperación del número absoluto de linfocitos T y B se asoció directamente a la supervivencia global (más rápida recuperación mejor supervivencia) e inversamente a la mortalidad relacionada con el trasplante (más rápida recuperación menor mortalidad). La recuperación del recuento absoluto de células NK a los 6 y 12 meses postrasplante se relacionó con mejor supervivencia global.
8. El conocimiento detallado de la dinámica y características de la recuperación inmunológica en los pacientes sometidos a TSCU que hemos analizado en esta Tesis Doctoral, ayudarán a trazar estrategias profilácticas y terapéuticas adaptadas al riesgo que estén orientadas a promover una reconstitución inmunológica más eficiente y reducir la mortalidad infecciosa, el mayor problema de esta modalidad de trasplante.

8.BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillal, S. (2012) *Inmunologia Celular y Molecular*, 7^a ed. Elsevier.
- Auletta, J.J. & Lazarus, H.M. (2005) Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplantation*, **35**, 835–857.
- Ault, K.A., Antin, J.H., Ginsburg, D., Orkin, S.H., Rappeport, J.M., Keohan, M.L., Martin, P. & Smith, B.R. (1985) Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *The Journal of Experimental Medicine*, **161**, 1483–1502.
- Bae, K.W., Kim, B.E., Koh, K.N., Im, H.J. & Seo, J.J. (2012) Factors influencing lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *The Korean journal of hematology*, **47**, 44–9.
- Bari, S., Seah, K.K.H., Poon, Z., Cheung, A.M.S., Fan, X., Ong, S.-Y., Li, S., Koh, L.P. & Hwang, W.Y.K. (2015) Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **21**, 1008–1019.
- Bartelink, I.H., Belitser, S.V., Knibbe, C.A.J., Danhof, M., de Pagter, A.J., Egberts, T.C.G. & Boelens, J.J. (2013) Immune reconstitution kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **19**, 305–313.
- Beck, J.C., Wagner, J.E., DeFor, T.E., Brunstein, C.G., Schleiss, M.R., Young, J.-A., Weisdorf, D.H., Cooley, S., Miller, J.S. & Verneris, M.R. (2010) Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **16**, 215–222.
- Béziat, V., Duffy, D., Quoc, S.N., Le Garff-Tavernier, M., Decocq, J., Combadière, B., Debré, P. & Vieillard, V. (2011) CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **186**, 6753–6761.
- Bhandoola, A., Boehmer, von, H., Petrie, H.T. & Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007) Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity*, **26**, 678–689.
- Bone Marrow Donors Worldwide. www.bmdw.org.
- Borchers, S., Bremm, M., Lehrnbecher, T., Dammann, E., Pabst, B., Wölk, B., Esser, R., Yildiz, M., Eder, M., Stadler, M., Bader, P., Martin, H., Jarisch, A., Schneider, G., Klingebiel, T., Ganser, A., Weissinger, E.M. & Koehl, U. (2012) Sequential Anti-Cytomegalovirus Response Monitoring May Allow Prediction of Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PLOS ONE*, **7**, 50248.

- Brown, J.A. & Boussiotis, V.A. (2008) Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, **127**, 286–297.
- Brown, J.A., Stevenson, K., Kim, H.T., Cutler, C., Ballen, K., McDonough, S., Reynolds, C., Herrera, M., Liney, D., Ho, V., Kao, G., Armand, P., Koreth, J., Alyea, E., McAfee, S., Attar, E., Dey, B., Spitzer, T., Soiffer, R., Ritz, J., et al (2010) Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*, **115**, 4111–4119.
- Burke, M.J., Vogel, R.I., Janardan, S.K., Brunstein, C., Smith, A.R., Miller, J.S., Weisdorf, D., Wagner, J.E. & Verneris, M.R. (2011) Early lymphocyte recovery and outcomes after umbilical cord blood transplantation (UCBT) for hematologic malignancies. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **17**, 831–840.
- Buyse, I., Decorte, R., Baens, M., Cuppens, H., Semana, G., Emonds, M.P., Marynen, P. & Cassiman, J.J. (1993) Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue antigens*, **41**, 1–14.
- Campbell, J.J., Murphy, K.E., Kunkel, E.J., Brightling, C.E., Soler, D., Shen, Z., Boisvert, J., Greenberg, H.B., Vierra, M.A., Goodman, S.B., Genovese, M.C., Wardlaw, A.J., Butcher, E.C. & Wu, L. (2001) CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **166**, 877–884.
- Carreras, E., Rovira, M., Martínez, C. (2010) Manual de trasplante hematopoyético, 4^a ed. Escofet Zamora.
- Charrier, E., Cordeiro, P., Brito, R.-M., Mezziani, S., Herblot, S., Le Deist, F. & Duval, M. (2013) Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone Marrow Transplantation*, **48**, 376–382.
- Chen, X., Barfield, R., Benaim, E., Leung, W., Knowles, J., Lawrence, D., Otto, M., Shurtleff, S.A., Neale, G.A.M., Behm, F.G., Turner, V. & Handgretinger, R. (2005) Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood*, **105**, 886–893.
- Chiesa, Della, M., Falco, M., Podestà, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F. & Moretta, A. (2012) Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*, **119**, 399–410.
- Chirumbolo, S., Ortolani, R., Veneri, D., Raffaelli, R., Peroni, D., Pigozzi, R., Colombatti, M. & Vella, A. (2011) Lymphocyte phenotypic subsets in umbilical cord blood compared to peripheral blood from related mothers. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, **80**, 248–253.
- Chklovskaja, E., Nowbakht, P., Nissen, C., Gratwohl, A., Bargetzi, M. & Wodnar-Filipowicz, A. (2004) Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood*, **103**, 3860–3868.

- Ciceri, F., Bonini, C., Stanghellini, M.T.L., Bondanza, A., Traversari, C., Salomoni, M., Turchetto, L., Colombi, S., Bernardi, M., Peccatori, J., Pescarollo, A., Servida, P., Magnani, Z., Perna, S.K., Valtolina, V., Crippa, F., Callegaro, L., Spoldi, E., Crocchiolo, R., Fleischhauer, K., et al (2009) Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *The Lancet. Oncology*, **10**, 489–500.
- Clave, E., Lisini, D., Douay, C., Giorgiani, G., Busson, M., Zecca, M., Moretta, F., Acquafredda, G., Brescia, L.P., Locatelli, F. & Toubert, A. (2013) Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation correlates with leukemia relapse. *Frontiers in immunology*, **4**, 54.
- Comoli, P., Basso, S., Labirio, M., Baldanti, F., Maccario, R. & Locatelli, F. (2008) T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. *Blood cells, molecules & diseases*, **40**, 68–70.
- Comoli, P., Basso, S., Zecca, M., Pagliara, D., Baldanti, F., Bernardo, M.E., Barberi, W., Moretta, A., Labirio, M., Paulli, M., Furione, M., Maccario, R. & Locatelli, F. (2007) Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, **7**, 1648–1655.
- Danby, R. & Rocha, V. (2014) Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Frontiers in immunology*, **5**, 68.
- Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., Aloisi, T., Perruccio, K., Ruggeri, L., Balucani, C., Pierini, A., Sportoletti, P., Aristei, C., Falini, B., Reisner, Y., Velardi, A., et al (2011) Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, **117**, 3921–3928.
- Dumont-Girard, F., Roux, E., van Lier, R.A., Hale, G., Helg, C., Chapuis, B., Starobinski, M. & Roosnek, E. (1998) Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood*, **92**, 4464–4471.
- Escalón, M.P. & Komanduri, K.V. (2010) Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution. *Current opinion in oncology*, **22**, 122–129.
- Farnault, L., Chambost, H., Zandotti, C., Mallet, F., Barlogis, V., Galambrun, C., Michel, G. & Olive, D. (2012) Early recovery of immunity after cord-blood transplantation in children: qualitative features and impact of cytomegalovirus infection. *Acta haematologica*, **128**, 7–16.
- Fearnley, D.B., Whyte, L.F., Carnoutsos, S.A., Cook, A.H. & Hart, D.N. (1999) Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood*, **93**, 728–736.
- Feuchtinger, T., Opherk, K., Bicanic, O., Schumm, M., Grigoleit, G.U., Hamprecht, K., Jahn, G., Handgretinger, R. & Lang, P. (2010) Dendritic cell vaccination in an allogeneic stem cell recipient receiving a transplant from a human cytomegalovirus

- (HCMV)-seronegative donor: induction of a HCMV-specific T(helper) cell response. *Cytotherapy*, **12**, 945–950.
- Fine, J.P. & Gray, R.J. (1999) A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association*, **94**, 496.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D. & Miller, J.S. (2012) Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*, **119**, 2665–2674.
- García-Muñoz, R. (2010) Aspectos inmunológicos relacionados con la generación de linfomas y autoinmunidad. *Inmunología*, **29**, 34–49.
- Geenen, V., Poulin, J.-F., Dion, M.L., Martens, H., Castermans, E., I Hansenne, Moutschen, M., Sékaly, R.P. & Cheynier, R. (2003) Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *The Journal of endocrinology*, **176**, 305–311.
- Geyer, M.B., Jacobson, J.S., Freedman, J., George, D., Moore, V., van de Ven, C., Satwani, P., Bhatia, M., Garvin, J.H., Bradley, M.B., Harrison, L., Morris, E., Della-Latta, P., Schwartz, J., Baxter-Lowe, L.A. & Cairo, M.S. (2011) A comparison of immune reconstitution and graft-versus-host disease following myeloablative conditioning versus reduced toxicity conditioning and umbilical cord blood transplantation in paediatric recipients. *British Journal of Haematology*, **155**, 218–234.
- Giraud, P., Thuret, I., Reviron, D., Chambost, H., Brunet, C., Novakovitch, G., Farnarier, C. & Michel, G. (2000) Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience. *Bone Marrow Transplantation*, **25**, 53–57.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G. & Lehn, P. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine*, **321**, 1174–1178.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Lerner, K.G. & Thomas, E.D. (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, **18**, 295–304.
- Gooley, T.A., Leisenring, W., Crowley, J. & Storer, B.E. (1999) Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Statistics in medicine*, **18**, 695–706.
- Gratama, J.W., Naipal, A., Olijans, P., Zwaan, F.E., Verdonck, L.F., de Witte, T., Vossen, J.M., Bolhuis, R.L., de Gast, G.C. & Jansen, J. (1984) T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood*, **63**, 1416–1423.
- Guillaume, T., Rubinstein, D.B. & Symann, M. (1998) Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*,

92, 1471–1490.

- Hayakawa, Y. & Smyth, M.J. (2006) CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *The Journal of Immunology*, **176**.
- Haynes, B., Hale, L., Weinhold, K., Patel, D., Liao, H., Bressler, P., Jones, D., Demarest, J., Gebhard-Mitchell, K., Haase, A. & Bartlett, J. (1999) Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *The Journal of clinical investigation*, **103**, 921.
- Hazenberg, M.D., Verschuren, M.C., Hamann, D., Miedema, F. & van Dongen, J.J. (2001) T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, **79**, 631–640.
- Heemskerk, M.B.A., van Walraven, S.M., Cornelissen, J.J., Barge, R.M.Y., Bredius, R.G.M., Egeler, R.M., Tj Lie, J.L.W., Révész, T., Sintnicolaas, K., Wulffraat, N.M., Donker, A.E., Hoogerbrugge, P.M., van Rood, J.J., Claas, F.H.J. & Oudshoorn, M. (2005) How to improve the search for an unrelated haematopoietic stem cell donor. Faster is better than more! *Bone Marrow Transplantation*, **35**, 645–652.
- Hokland, M., Jacobsen, N., Ellegaard, J. & Hokland, P. (1988) Natural killer function following allogeneic bone marrow transplantation. Very early reemergence but strong dependence of cytomegalovirus infection. *Transplantation*, **45**, 1080–1084.
- Horwitz, M.E. & Frassoni, F. (2015) Improving the outcome of umbilical cord blood transplantation through ex vivo expansion or graft manipulation. *Cytotherapy*, **17**, 730–738.
- Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H. & Schmidt, R.E. (1992) CD16-CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood*, **79**, 3239–3244.
- Jacobson, C.A., Turki, A.T., McDonough, S.M., Stevenson, K.E., Kim, H.T., Kao, G., Herrera, M.I., Reynolds, C.G., Alyea, E.P., Ho, V.T., Koreth, J., Armand, P., Chen, Y.-B., Ballen, K., Soiffer, R.J., Antin, J.H., Cutler, C.S. & Ritz, J. (2012) Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **18**, 565–574.
- Janeway, C. (2005) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 6th ed. Garland Science Taylor & Francis Group.
- Kalina, T., Flores-Montero, J., Lecomte, Q., Pedreira, C.E., van der Velden, V.H.J., Novakova, M., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Böttcher, S., Karsch, D., Sędek, Ł., Trinquand, A., Boeckx, N., Caetano, J., Asnafi, V., Lucio, P., Lima, M., Helena Santos, A., Bonaccorso, P., van der Sluijs-Gelling, A.J., et al (2015) Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, **87**, 145–156.
- Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V.H.J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, A., de Tute, R.,

- Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M.B., Pérez, J.J., Marvelde, te, J.G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepański, T., van Dongen, J.J.M., et al (2012) EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, **26**, 1986–2010.
- Kanda, J., Chiou, L.-W., Szabolcs, P., Sempowski, G.D., Rizzieri, D.A., Long, G.D., Sullivan, K.M., Gasparetto, C., Chute, J.P., Morris, A., McPherson, J., Hale, J., Livingston, J.A., Broadwater, G., Niedzwiecki, D., Chao, N.J. & Horwitz, M.E. (2012) Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **18**, 1664–1676.e1.
- Kaplan, E.L. & Meier, P. (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, **53**, 457.
- Kawai, K., Tsuno, N.H., Matsubashi, M., Kitayama, J., Osada, T., Yamada, J., Tsuchiya, T., Yoneyama, S., Watanabe, T., Takahashi, K. & Nagawa, H. (2005) CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **116**, 192–197.
- Kjeldsen, M.K., Perez-Andres, M., Schmitz, A., Johansen, P., Boegsted, M., Nyegaard, M., Gaihede, M., Bukh, A., Johnsen, H.E., Orfao, A. & Dybkaer, K. (2011) Multiparametric flow cytometry for identification and fluorescence activated cell sorting of five distinct B-cell subpopulations in normal tonsil tissue. *American Journal of Clinical Pathology*, **136**, 960–969.
- Klein, A.K., Patel, D.D., Gooding, M.E., Sempowski, G.D., Chen, B.J., Liu, C., Kurtzberg, J., Haynes, B.F. & Chao, N.J. (2001) T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biology of Blood and Marrow Trasplantation*, **7**, 454–466.
- Klyuchnikov, E., Asenova, S., Kern, W., Kilinc, G., Ayuk, F., Wiedemann, B., Lioznov, M., Freiburger, P., Zalyalov, Y., Zander, A.R., Kröger, N. & Bacher, U. (2010) Post-transplant immune reconstitution after unrelated allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, **51**, 1450–1463.
- Komanduri, K.V., St John, L.S., de Lima, M., McMannis, J., Rosinski, S., McNiece, I., Bryan, S.G., Kaur, I., Martin, S., Wieder, E.D., Worth, L., Cooper, L.J.N., Petropoulos, D., Molldrem, J.J., Champlin, R.E. & Shpall, E.J. (2007) Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*, **110**, 4543–4551.
- Komanduri, K.V., Wieder, E.D., Benjamin, C.L. & Levy, R.B. (2013) The evolving art of hematopoietic stem cell transplantation: translational research in post-transplant immune reconstitution and immunosuppression. *Immunologic research*, **57**, 140–150.
- Kook, H., Goldman, F., Giller, R., Goeken, N., Peters, C., Comito, M., Rumelhart, S., Holida, M., Lee, N. & Trigg, M. (1997) Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: functional analyses of lymphocytes and correlation with immunophenotypic recovery following transplantation. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **4**, 96–103.

- Laughlin, M.J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J.E., Zhang, M.-J., Champlin, R.E., Stevens, C., Barker, J.N., Gale, R.P., Lazarus, H.M., Marks, D.I., van Rood, J.J., Scaradavou, A. & Horowitz, M.M. (2004) Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **351**, 2265–2275.
- Le Blanc, K., Barrett, A.J., Schaffer, M., Hägglund, H., Ljungman, P., Ringdén, O. & Remberger, M. (2009) Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **15**, 1108–1115.
- Leen, A.M., Christin, A., Myers, G.D., Liu, H., Cruz, C.R., Hanley, P.J., Kennedy-Nasser, A.A., Leung, K.S., Gee, A.P., Krance, R.A., Brenner, M.K., Heslop, H.E., Rooney, C.M. & Bollard, C.M. (2009) Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*, **114**, 4283–4292.
- Leino, L., Lilius, E.M., Nikoskelainen, J., Pelliniemi, T.T. & Rajamäki, A. (1991) The reappearance of 10 differentiation antigens on peripheral blood lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, **8**, 339–344.
- Lima, M., Almeida, J., Anjos Teixeira, dos, M., Queirós, M.L., Justiça, B. & Orfao, A. (2002) The 'ex vivo' patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood cells, molecules & diseases*, **28**, 181–190.
- Lima, M., Teixeira, M.A., Queirós, M.L., Leite, M., Santos, A.H., Justiça, B. & Orfao, A. (2001) Immunophenotypic characterization of normal blood CD56^{lo} versus CD56^{hi} NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood cells, molecules & diseases*, **27**, 731–743.
- Lindemans, C.A., Chiesa, R., Amrolia, P.J., Rao, K., Nikolajeva, O., de Wildt, A., Gerhardt, C.E., Gilmour, K.C., Bierings, M., Veys, P. & Boelens, J.J. (2014) Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood*, **123**, 126–132.
- Ljungman, P., Bregni, M., Brune, M., Cornelissen, J., de Witte, T., Dini, G., Einsele, H., Gaspar, H.B., Gratwohl, A., Passweg, J., Peters, C., Rocha, V., Saccardi, R., Schouten, H., Sureda, A., Tichelli, A., Velardi, A., Niederwieser, D. European Group for Blood and Marrow Transplantation (2010) Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplantation*, **45**, 219–234.
- Mackall, C.L., Bare, C.V., Granger, L.A., Sharrow, S.O., Titus, J.A. & Gress, R.E. (1996) Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **156**, 4609–4616.

- Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Andrich, M.P., Chen, C.C., Feuerstein, I.M., Horowitz, M.E., Magrath, I.T., Shad, A.T. & Steinberg, S.M. (1995) Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, **332**, 143–149.
- Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Andrich, M.P., Chen, C.C., Feuerstein, I.M., Magrath, I.T., Wexler, L.H., Dimitrov, D.S. & Gress, R.E. (1997) Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*, **89**, 3700–3707.
- Mackall, C.L., Fry, T.J. & Gress, R.E. (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature reviews. Immunology*, **11**, 330–342.
- Maecker, H.T., McCoy, J.P. & Nussenblatt, R. (2012) Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews. Immunology*, **12**, 191–200.
- Mantel, N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, **50**, 163–170.
- Martelli, M.F., Di Ianni, M., Ruggeri, L., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Pierini, A., Marsei, M.S., Amico, L., Urbani, E., Del Papa, B., Zei, T., Iacucci Ostini, R., Cecchini, D., Tognellini, R., Reisner, Y., Aversa, F., Falini, B. & Velardi, A. (2014) HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*, **124**, 638–644.
- Mazur, M.A., Davis, C.C. & Szabolcs, P. (2008) Ex vivo expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **14**, 1190–1196.
- McGoldrick, S.M., Bleakley, M.E., Guerrero, A., Turtle, C.J., Yamamoto, T.N., Pereira, S.E., Delaney, C.S. & Riddell, S.R. (2013) Cytomegalovirus-specific T cells are primed early after cord blood transplant but fail to control virus in vivo. *Blood*, **121**, 2796–2803.
- Moretta, A., Maccario, R., Fagioli, F., Giraldi, E., Busca, A., Montagna, D., Miniero, R., Comoli, P., Giorgiani, G., Zecca, M., Pagani, S. & Locatelli, F. (2001) Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Experimental hematology*, **29**, 371–379.
- Mosaad, Y.M. (2014) Immunology of hematopoietic stem cell transplant. *Immunological investigations*, **43**, 858–887.
- Moscardó, F., Sanz, J., Carbonell, F., Sanz, M.A., Larrea, L., Montesinos, P., Lorenzo, I., Vera, B., Boluda, B., Salazar, C., Cañigral, C., Planelles, D., Jarque, I., Solves, P., Martín, G., López, F., la Rubia, de, J., Martínez, J., Carpio, N., Martínez-Cuadrón, D., et al (2014) Effect of CD8+ cell content on umbilical cord blood transplantation in adults with hematological malignancies. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **20**, 1744–1750.
- Muñoz, J., Shah, N., Rezvani, K., Hosing, C., Bollard, C.M., Oran, B., Olson, A., Popat, U., Molldrem, J., McNiece, I.K. & Shpall, E.J. (2014) Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. *Stem cells translational medicine*,

3, 1435–1443.

- Nakatani, K., Imai, K., Shigeno, M., Sato, H., Tezuka, M., Okawa, T., Mitsuiki, N., Isoda, T., Tomizawa, D., Takagi, M., Nagasawa, M., Kajiwara, M., Yamamoto, M., Arai, A., Miura, O., Kamae, C., Nakagawa, N., Honma, K., Nonoyama, S., Mizutani, S., et al (2014) Cord blood transplantation is associated with rapid B-cell neogenesis compared with BM transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, **49**, 1155–1161.
- Nguyen, V.H., Shashidhar, S., Chang, D.S., Ho, L., Kambham, N., Bachmann, M., Brown, J.M. & Negrin, R.S. (2008) The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood*, **111**, 945–953.
- Niehues, T., Rocha, V., Filipovich, A.H., Chan, K.W., Porcher, R., Michel, G., Ortega, J.J., Wernet, P., Göbel, U., Gluckman, E. & Locatelli, F. (2001) Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *British Journal of Haematology*, **114**, 42–48.
- Ohata, K., Espinoza, J.L., Lu, X., Kondo, Y. & Nakao, S. (2011) Mycophenolic acid inhibits natural killer cell proliferation and cytotoxic function: a possible disadvantage of including mycophenolate mofetil in the graft-versus-host disease prophylaxis regimen. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **17**, 205–213.
- Olerup, O. & Zetterquist, H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue antigens*, **39**, 225–235.
- Oshrine, B.R., Li, Y., Teachey, D.T., Heimall, J., Barrett, D.M. & Bunin, N. (2013) Immunologic recovery in children after alternative donor allogeneic transplantation for hematologic malignancies: comparison of recipients of partially T cell-depleted peripheral blood stem cells and umbilical cord blood. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **19**, 1581–1589.
- Parkman, R. & Weinberg, K.I. (2009) *Immune Reconstitution Following Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Parkman, R., Cohen, G., Carter, S.L., Weinberg, K.I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J.E. & Kernan, N.A. (2006) Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **12**, 919–927.
- Perales, M.-A., Goldberg, J.D., Yuan, J., Koehne, G., Lechner, L., Papadopoulos, E.B., Young, J.W., Jakubowski, A.A., Zaidi, B., Gallardo, H., Liu, C., Rasalan, T., Wolchok, J.D., Croughs, T., Morre, M., Devlin, S.M. & van den Brink, M.R.M. (2012) Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **120**, 4882–4891.
- Perez-Andres, M., Grosserichter-Wagener, C., Teodosio, C., van Dongen, J.J.M., Orfao, A. & van Zelm, M.C. (2011) The nature of circulating CD27⁺CD43⁺ B cells. *The Journal of experimental medicine*, **208**, 2565–2566.

- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W.G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R.F., Marti, G.E., Rawstron, A.C., Van Zelm, M.C., van Dongen, J.J.M., Johnsen, H.E., Klein, B., Orfao, A. Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL (2010) Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, **78 Suppl 1**, S47–60.
- Perruccio, K., Tosti, A., Burchielli, E., Topini, F., Ruggeri, L., Carotti, A., Capanni, M., Urbani, E., Mancusi, A., Aversa, F., Martelli, M.F., Romani, L. & Velardi, A. (2005) Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*, **106**, 4397–4406.
- Picker, L.J., Treer, J.R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P.A., Buck, D. & Terstappen, L.W. (1993) Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **150**, 1105–1121.
- Politikos, I., Kim, H.T., Nikiforow, S., Li, L., Brown, J., Antin, J.H., Cutler, C., Ballen, K., Ritz, J. & Boussiotis, V.A. (2015) IL-7 and SCF Levels Inversely Correlate with T Cell Reconstitution and Clinical Outcomes after Cord Blood Transplantation in Adults. *PLOS ONE*, **10**, e0132564–15.
- Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J. & Thomas, E.D. (1995) 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. In pp 825–828.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.
- Ramirez, P., Nervi, B., Bertin, P., Poggi, H., Lagos, M., Selman, C., Pizarro, I., Jara, V., Wiestruck, A. & Barriga, F. (2013) Umbilical cord blood transplantation in hematologic diseases in patients over 15 years old: long-term experience at the Pontificia Universidad Católica de Chile. *Transplantation proceedings*, **45**, 3734–3739.
- Ramirez, P., Wagner, J.E., DeFor, T.E., Blazar, B.R., Verneris, M.R., Miller, J.S., McKenna, D.H., Weisdorf, D.J., McGlave, P.B. & Brunstein, C.G. (2011) Factors predicting single-unit predominance after double umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, **47**, 799–803.
- Rénard, C., Barlogis, V., Mialou, V., Galambrun, C., Bernoux, D., Goutagny, M.P., Glasman, L., Loundou, A.D., Poitevin-Later, F., Dignat-George, F., Dubois, V., Picard, C., Chabannon, C., Bertrand, Y. & Michel, G. (2011) Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *British Journal of Haematology*, **152**, 322–330.
- Rocha, V., Labopin, M., Sanz, G., Arcese, W., Schwerdtfeger, R., Bosi, A., Jacobsen, N., Ruutu, T., de Lima, M., Finke, J., Frassoni, F., Gluckman, E., Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group Eurocord-Netcord Registry (2004) Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **351**, 2276–2285.
- Roitt. (2008) *Inmunologia: Fundamentos*, 10ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

- Rovira M., Mensa J., Carreras E. (2012) Infections after HSCT, chapter 12. Ed. 2012. The EBMT Handbook.
- Ruggeri, A., Peffault de Latour, R., Carmagnat, M., Clave, E., Douay, C., Larghero, J., Cayuela, J.-M., Traineau, R., Robin, M., Madureira, A., Ribaud, P., Ferry, C., Devergie, A., Purtill, D., Rabian, C., Gluckman, E., Toubert, A., Socie, G. & Rocha, V. (2011) Outcomes, infections, and immune reconstitution after double cord blood transplantation in patients with high-risk hematological diseases. *Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society*, **13**, 456–465.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F. & Velardi, A. (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **94**, 333–339.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.F. & Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, N.Y.)*, **295**, 2097–2100.
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M.F. & Velardi, A. (2007) Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*, **110**, 433–440.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, **401**, 708–712.
- Sanz, G.F., Saavedra, S., Planelles, D., Senent, L., Cervera, J., Barragán, E., Jiménez, C., Larrea, L., Martín, G., Martínez, J., Jarque, I., Moscardó, F., Plumé, G., Andreu, R., Regadera, A.I., García, I., Mollá, S., Solves, P., La Rubia, de, J., Bolufer, P., et al (2001) Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood*, **98**, 2332–2338.
- Sanz, J. (2012) Trasplante de sangre de cordón umbilical de donante no emparentado en adultos con enfermedades hematológicas malignas. Tesis Doctoral.
- Sanz, J. & Andreu, R. (2014) Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation. *Current opinion in oncology*, **26**, 677–683.
- Sanz, J., Picardi, A., Hernández-Boluda, J.C., Martín, C., Ferrá, C., Nozzoli, C., Gonzalez-Vicent, M., Rambaldi, A., Valcárcel, D., Verdeguer, A., Serrano, D., de Heredia, C.D., Pascual, M.J., de Paz, R., Montesinos, P., Bartolozzi, B., Algarotti, A., Sanz, M.A., Arcese, W., Sanz, G.F., et al (2013) Impact of graft-versus-host disease prophylaxis on outcomes after myeloablative single-unit umbilical cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **19**, 1387–1392.
- Savani, B.N., Mielke, S., Rezvani, K., Montero, A., Yong, A.S., Wish, L., Superata, J., Kurlander, R., Singh, A., Childs, R. & Barrett, A.J. (2007) Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biology*

- of Blood and Marrow Transplantation*, **13**, 1216–1223.
- Servais, S., Lengline, E., Porcher, R., Carmagnat, M., Peffault de Latour, R., Robin, M., Sicre de Fontebrune, F., Clave, E., Maki, G., Granier, C., Xhaard, A., Dhedin, N., Molina, J.-M., Toubert, A., Moins-Teisserenc, H. & Socie, G. (2014) Long-term immune reconstitution and infection burden after mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **20**, 507–517.
- Shilling, H.G., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Shizuru, J.A., Negrin, R.S. & Parham, P. (2003) Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*, **101**, 3730–3740.
- Shulman, H.M., Sullivan, K.M., Weiden, P.L., McDonald, G.B., Striker, G.E., Sale, G.E., Hackman, R., Tsoi, M.S., Storb, R. & Thomas, E.D. (1980) Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *The American journal of medicine*, **69**, 204–217.
- Small, T.N., Keever, C.A., Weiner-Fedus, S., Heller, G., O'Reilly, R.J. & Flomenberg, N. (1990) B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood*, **76**, 1647–1656.
- Small, T.N., Papadopoulos, E.B., Boulad, F., Black, P., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Collins, N., Gillio, A., George, D., Jakubowski, A., Heller, G., Fazzari, M., Kernan, N., MacKinnon, S., Szabolcs, P., Young, J.W. & O'Reilly, R.J. (1999) Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*, **93**, 467–480.
- Solano, C., Benet, I., Clari, M.A., Nieto, J., la Cámara, de, R., López, J., Hernández-Boluda, J.C., Remigia, M.J., Jarque, I., Calabuig, M.L., Garcia-Noblejas, A., Alberola, J., Tamarit, A., Gimeno, C. & Navarro, D. (2008) Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*, **93**, 1434–1436.
- Storek, J., Ferrara, S., Ku, N., Giorgi, J.V., Champlin, R.E. & Saxon, A. (1993) B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplantation*, **12**, 387–398.
- Storek, J., Geddes, M., Khan, F., Huard, B., Helg, C., Chalandon, Y., Passweg, J. & Roosnek, E. (2008) Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Seminars in Immunopathology*, **30**, 425–437.
- Storek, J., Wells, D., Dawson, M.A., Storer, B. & Maloney, D.G. (2001) Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, **98**, 489–491.
- Storek, J., Witherspoon, R.P., Webb, D. & Storb, R. (1996) Lack of B cells precursors in marrow transplant recipients with chronic graft-versus-host disease. *American Journal of Hematology*, **52**, 82–89.
- Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R. & Chin-Yee, I. (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International

- Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Journal of hematotherapy*, **5**, 213–226.
- Sutherland, D.R., Keeney, M. & Gratama, J.W. (2003) Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]*, **Chapter 6**, Unit 6.4–6.4.23.
- Szabolcs, P. (2010) The immunobiology of cord blood transplantation. *The Korean journal of hematology*, **45**, 224–235.
- Szabolcs, P. & Cairo, M.S. (2010) Unrelated umbilical cord blood transplantation and immune reconstitution. *Seminars in Hematology*, **47**, 22–36.
- Szabolcs, P. & Niedzwiecki, D. (2007) Immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation. *Cytotherapy*, **9**, 111–122.
- Talvensaari, K., Clave, E., Douay, C., Rabian, C., Garderet, L., Busson, M., Garnier, F., Douek, D., Gluckman, E., Charron, D. & Toubert, A. (2002) A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood*, **99**, 1458–1464.
- Terasaki, P.I. & McClelland, J.D. (1964) Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, **204**, 998–1000.
- Thiago, L.S. & Sutherland, D.R. (2015) CD34(+) B-cell progenitors in mobilized peripheral blood apheresis collections: implications for flow cytometric assessment of graft adequacy. *Cytotherapy*, **17**, 689–691.
- Tolar, J., Hippen, K.L. & Blazar, B.R. (2009) Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells. *British Journal of Haematology*, **147**, 200–206.
- Toubert, A. (2008) Immune reconstitution after allogeneic HSCT, chapter 15: pp 296–307. *The EBMT Handbook*.
- Toubert, A., Glauzy, S., Douay, C. & Clave, E. (2012) Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue antigens*, **79**, 83–89.
- Vago, L., Oliveira, G., Bondanza, A., Noviello, M., Soldati, C., Ghio, D., Brigida, I., Greco, R., Lupo Stanghellini, M.T., Peccatori, J., Fracchia, S., Del Fiacco, M., Traversari, C., Aiuti, A., Del Maschio, A., Bordignon, C., Ciceri, F. & Bonini, C. (2012) T-cell suicide gene therapy prompts thymic renewal in adults after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **120**, 1820–1830.
- van Dongen, J.J.M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V.H.J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A.W., Mendonça, A., Macintyre, E., et al (2012) EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, **26**, 1908–1975.
- van Dongen, J.J.M., Orfao, A. EuroFlow Consortium (2012) EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia*, **26**, 1899–1907.

-
- Veneri, D., Ortolani, R., Franchini, M., Tridente, G., Pizzolo, G. & Vella, A. (2009) Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages. *Blood transfusion*, **7**, 29–34.
- Volpi, I., Perruccio, K., Tosti, A., Capanni, M., Ruggeri, L., Posati, S., Aversa, F., Tabilio, A., Romani, L., Martelli, M.F. & Velardi, A. (2001) Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood*, **97**, 2514–2521.
- Walker, C.M., van Burik, J.-A.H., De For, T.E. & Weisdorf, D.J. (2007) Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **13**, 1106–1115.
- Weinberg, K., Blazar, B.R., Wagner, J.E., Agura, E., Hill, B.J., Smogorzewska, M., Koup, R.A., Betts, M.R., Collins, R.H. & Douek, D.C. (2001) Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **97**, 1458–1466.
- Welniak, L.A., Blazar, B.R. & Murphy, W.J. (2007) Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annual review of immunology*, **25**, 139–170.
- Woessner, S., Lafuente, R., Florensa L. (2006) La citología óptica en el diagnóstico hematológico, 1ª Ed. Medici.