



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETERMINACIÓN DE CITOCINAS DE MACRÓFAGOS M1 Y M2 EN LA
ENFERMEDAD DEL INJERTO EN CONTRA DEL HUÉSPED**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. ROSALES HORTIALES ESTEFFY

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. JOSÉ MANUEL FRAGOSO LONA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de abril de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ROSALES HORTIALES ESTEFFY** con número de cuenta **410008713**, con la tesis titulada **"DETERMINACIÓN DE CITOCINAS DE MACRÓFAGOS M1 Y M2 EN LA ENFERMEDAD DEL INJERTO EN CONTRA DEL HUÉSPED"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal: DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA
Secretario: DR. JOSÉ MANUEL FRAGOSO LONA
Suplente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Suplente: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 11 de junio de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, una excelente entidad académica, por albergarme como alumna y brindarme mejor misión y visión de mi labor profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico aportado para mis estudios de maestría. Número de becario: 742821

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por la beca complementaria, asignada a través de la Coordinación de Investigación en salud, para estudiantes de posgrado. Número de matrícula: 99096866

Al IMSS, por el financiamiento otorgado al proyecto de tesis, a través de la convocatoria "Culminación de proyectos de maestría". Número de registro del proyecto: R-2016-3603-87 Número en el Fondo: FIS/IMSS/PROT/MD17/1689

A mi tutora principal, Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez, por su apoyo, asesoría y dirección académica en todo momento.

A mi apreciable Comité tutor: Dra. Ana María Salazar Martínez y Dr. José Manuel Fragoso Lona, por sus acertados comentarios y sugerencias para mejorar el trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi amiga Wendy, más que compañera de laboratorio, ha sido una excelente amiga, gracias por enseñarme y apoyarme en cuestiones laborales, pero más aún, gracias por ser la mejor amiga y confidente, te voy a extrañar.

A Danielita Mora por ayudarme siempre en el laboratorio con mi proyecto, y también por su valiosa amistad.

A mis niños de servicio social, Claudia, Omar y Alejandro, por su apoyo, siempre incondicional.

A mis compañeros Luz, Maripaz, Ricardito, Chío, Esteban y Jonathan, su presencia siempre le dio alegría a mi estancia en el laboratorio, lo cual fue determinante para disfrutar el trabajo.

Al Dr. Luis Chávez Sánchez, por su apoyo académico durante mis estudios de posgrado, ya que a pesar de no ser su alumna, me dedicó tiempo y orientación incondicional cuando lo necesité.

DEDICATORIAS

A mis padres, a quienes más amo en la vida, porque sin restricciones apoyaron incondicionalmente mi meta, siempre estuvieron para aplaudir mi esfuerzo y más aún en los momentos difíciles, cuando incluso lloraba por tanto trabajo, estaban ahí para abrazarme y alentarme. Sin ustedes no sería lo que soy hoy.

A mi hermana, por ser ese maravilloso ser que me ha orientado e inspirado para ser una excelente profesionista, eres un excelente ejemplo a seguir.

A mis tíos Mari y Mundo, que siempre han sido como mis segundos padres, por preocuparse siempre por mi bienestar emocional y profesional. ¡Los quiero!

Al resto de la familia, por ser parte de mis alegrías y tristezas, apoyándome siempre con su cariño.

A David, por haberme conducido sin querer hasta el laboratorio de HLA, tu presencia y ahora tu recuerdo siempre me dio fuerza para continuar con mi trabajo. Siempre te agradeceré todo lo que hiciste por mí.

A la hermosa Boti, por absorber mis tristezas y alegrías. Gracias por acompañarme estos dos años.

A mi bebé Cati, te extraño infinitamente. Sé que desde el cielo sigues acompañándome. Estuvimos juntos en muchas aventuras, y te dedico este logro, en agradecimiento por darme tanta alegría. Nunca nunca te olvidaré.

ÍNDICE

Lista de figuras y tablas	i
Abreviaturas	ii
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas	3
1.1 Células hematopoyéticas	3
1.2 Fuente de células progenitoras hematopoyéticas	4
1.3 Tipos de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas	5
1.4 Régimen de acondicionamiento	5
2. Reconstitución inmunológica	6
3. Reacciones posteriores al trasplante	8
4. Enfermedad del injerto en contra del huésped	9
4.1 EICH aguda	9
4.2 EICH crónica	12
4.3 Factores de riesgo	13
5. Macrófagos: componentes fundamentales del sistema inmunológico	13
6. Macrófagos y enfermedad del injerto en contra del huésped	15
7. Citocinas: moduladores de inflamación	18
7.1 Citocinas pro-inflamatorias	18
7.2 Citocinas anti-inflamatorias	20
8. Cinética de citocinas en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas	20
9. Citocinas y EICH	21
10. Regulación génica: polimorfismos de un solo nucleótido	22
11. Polimorfismos de un solo nucleótido y EICH	23
Justificación	25
Planteamiento del problema	26
Hipótesis	27
Objetivos	28
Metodología	29
Diagrama de flujo	36

Resultados	37
Polimorfismos de un solo nucleótido	37
Controles.....	37
Pacientes.....	39
Frecuencias alélicas.....	41
Frecuencias genotípicas	42
Identificación de macrófagos M1 y M2	45
Caracterización del fenotipo de macrófagos en donadores.....	47
Caracterización del fenotipo de macrófagos en pacientes con y sin EICH	49
Discusión	53
Conclusiones	58
Perspectivas	59
Literatura citada	60

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Reconstitución inmunológica postrasplante.....	7
Figura 2. Fisiopatología de la enfermedad del injerto en contra del huésped	10
Figura 3. Activación de macrófagos M1 y M2	14
Figura 4. Efecto funcional de los rSNP y cSNP	23
Figura 5. Distribución de pacientes con EICH, con base en su presentación aguda o crónica	41
Figura 6. Estrategia de identificación de macrófagos por citometría de flujo	45
Figura 7. Expresión de moléculas de superficie en macrófagos	46
Figura 8. Caracterización del fenotipo de macrófagos obtenidos de monocitos de donadores.....	47
Figura 9. Perfil de citocinas producidas por macrófagos obtenidos de monocitos de donadores ...	48
Figura 10. Caracterización del fenotipo de macrófagos en pacientes con y sin EICH.....	49
Figura 11. Citocinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos de pacientes con y sin EICH.....	51
Figura 12. Citocinas anti-inflamatorias producidas por macrófagos de pacientes con y sin EICH	52
Tabla 1. Citocinas con actividad pro-inflamatoria	19
Tabla 2. Citocinas con actividad anti-inflamatoria.....	20
Tabla 3. Descripción de polimorfismos estudiados	32
Tabla 4. Equilibrio de <i>Hardy-Weinberg</i> en sujetos clínicamente sanos del Valle de México	37
Tabla 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de estudio en sujetos del Valle de México y otras poblaciones	38
Tabla 6. Datos clínico – demográficos de los pacientes en estudio	40
Tabla 7. Análisis de asociación de alelos con EICH	42
Tabla 8. Análisis de asociación de genotipos – citocinas pro-inflamatorias – con EICH	43
Tabla 9. Análisis de asociación de genotipos – citocinas anti-inflamatorias – con EICH.....	44

ABREVIATURAS

Arg1	Arginasa 1
CMV	Citomegalovirus
PC	<i>Plasmatic cCell</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
cSNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido codificante (<i>coding Single Nucleotide Polymorphism</i>)
CTH	Células Troncales Hematopoyéticas
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño (<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>)
DC	<i>Dendritic Cell</i>
EICH	Enfermedad del Injerto en Contra del Huésped
EICL	Efecto Injerto Contra Leucemia
Fa	Frecuencia alélica
FasL	Ligando de Fas (<i>Fas Ligand</i>)
Fg	Frecuencia genotípica
FT	Factor de Transcripción
HPN	Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
IC	Intervalo de Confianza
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular (<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>)
ICT	Irradiación Corporal Total
IFN γ	Interferón gamma
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
iNOs	Óxido Nítrico Sintasa Inducible (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
LLA	Leucemia Linfoide Aguda

LLC	Leucemia Linfoide Crónica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LPS	Lipopolisacárido
MA	Mieloablativo
mHLA	Antígenos Menores de Histocompatibilidad (<i>minor Human Leukocyte Antigen</i>)
MO	Médula Ósea
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
RM	Razón de Momios
rSNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido regulador (<i>regulator Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SMP	Síndrome Mieloproliferativo
SNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPM	Sangre Periférica Movilizada
srSNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido estructural (<i>structural Single Nucleotide Polymorphism</i>)
Tc	Linfocitos T citotóxico
TCPH	Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas
TGFβ1	Factor de Crecimiento Transformante β1 (<i>Transforming Growth Factor β1</i>)
Th	Linfocito T helper
Treg	Linfocito T regulador
UTR	Región No Traducida (<i>Untranslated Region</i>)

RESUMEN

La enfermedad del injerto en contra del huésped (EICH) es el principal riesgo posterior al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) alogénico. En su origen participan elementos del sistema inmunológico innato y adaptativo. Al respecto, existen pocos estudios en la EICH acerca de la expresión de citocinas en macrófagos M1 y M2. Trabajos previos han reportado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) regulan el nivel de expresión de algunas citocinas, lo que contribuye al desarrollo de EICH. El objetivo de este trabajo fue analizar si SNPs en genes de *IL1A* (rs1800587), *IL6* (rs1800795), *IL12A* (rs2243123), *IL18* (rs187238), *TNF* (rs361525), *IL10* (rs1800872) y *TGFB1* (rs1800470), así como su expresión a nivel de proteína en macrófagos M1 y M2 se asocian con EICH. Para cumplir el objetivo se incluyeron 77 pacientes postrasplante, que se clasificaron con base en la presencia o ausencia de EICH. Del total de pacientes, solo 13 fueron seleccionados (6 con y 7 libres de la enfermedad) para el cultivo de macrófagos. Los genotipos de los SNPs se determinaron por discriminación alélica. La expresión de proteínas se midió en sobrenadantes de macrófagos M1 y M2, obtenidos a partir de monocitos de sangre periférica. Los fenotipos de superficie se analizaron mediante citometría de flujo, y los perfiles de citocinas se cuantificaron por tecnología Luminex. Los SNPs no se asociaron con susceptibilidad o protección a la enfermedad. Por otra parte, en pacientes con EICH, la expresión de IL-6 y TNF α en sobrenadantes de macrófagos M1 fue significativamente mayor, mientras que IL-12 mostró concentraciones más bajas. Los niveles de citocinas producidas por macrófagos M2 no fueron diferentes entre pacientes en ausencia y presencia de EICH. En conclusión, aunque los polimorfismos candidatos no intervienen en la enfermedad, la expresión de IL-6 y TNF α por macrófagos M1 de pacientes con EICH presenta relación inversa con respecto a IL-12, lo que sugiere que el fenotipo M1 podría estar involucrado en el comportamiento de la enfermedad, o bien representar un excelente criterio de predicción o tratamiento en la EICH.

ABSTRACT

Graft versus host disease (GVHD) is the major risk following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Elements of the innate and adaptive immune system participate in its beginning. In this regard, there are few studies in GVHD about the expression of cytokines in M1 and M2 macrophages. Previous studies have reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) regulate expression level of some cytokines, which contributes to development of GVHD. The aim of this study was to analyze the association between SNPs in *IL1A* (rs1800587), *IL6* (rs1800795), *IL12A* (rs2243123), *IL18* (rs187238), *TNF* (rs361525), *IL10* (rs1800872) and *TGFB1* (rs1800470), as well as the proteins expression levels in M1 and M2 macrophages with GVHD. For this purpose, the study included 77 post-transplant patients, who classified based on presence or absence of GVHD. From total of patients, only 13 were selected (six with GVHD and seven without it) for culture of macrophages. Genotypes of SNPs were determined by allelic discrimination. Proteins expression was measured in supernatants of M1 and M2 macrophages, which obtained from peripheral blood monocytes. Surface phenotypes were analyzed by flow cytometry, and cytokine profiles were quantified by Luminex technology. SNPs were not associated with susceptibility neither protection to disease. In contrast, in patients with GVHD, the expression of IL-6 and TNF α in supernatants of M1 macrophages was significantly higher, whereas IL-12 showed lower concentrations. Cytokines levels produced by M2 macrophages were not different between the patients in presence or absence of GVHD. In conclusion, although the candidate polymorphisms do not intervene in the disease, the expression of IL-6 and TNF α by M1 macrophages of patients with GVHD has an inverse relationship *versus* IL-12, which suggest that M1 phenotype could be involved in the behavior of the disease, as well as represent an excellent criterion for prediction or treatment of GVHD.

INTRODUCCIÓN

1. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es empleado como tratamiento de consolidación, cuya finalidad es reestablecer la hematopoyesis y el sistema inmunológico en pacientes con enfermedades hematológicas malignas (leucemia, linfoma, mieloma), enfermedades no malignas (aplasia medular), y enfermedades genéticas asociadas con alteraciones en la hematopoyesis (talasemia, inmunodeficiencia combinada severa).¹

El primer reporte del uso clínico de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), obtenidas de médula ósea, fue en un paciente con aplasia medular en 1939.² A partir de entonces, el TCPH ha sido un procedimiento con fines terapéuticos, que se lleva a cabo en receptores que han cursado una etapa de acondicionamiento (administración de irradiación y/o quimioterapia), previa a la infusión de CPH CD34+.³ En los últimos años, el número estimado de TCPH realizados anualmente en todo el mundo varía entre 55,000 a 60,000, y la mayoría de ellos se emplea como tratamiento para malignidades hematológicas.⁴

1.1. Células hematopoyéticas.

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) presentan 3 características únicas: capacidad de autorenovación, proliferación y potencial de diferenciación. Las CTH no pueden ser reconocidas por su morfología, por lo tanto, la presencia de antígenos en su membrana es lo que permite su identificación, esto se denomina inmunofenotipo; así, las CTH expresan CD34, CD117, CD90, CD133, y carecen de CD38 y moléculas de linaje específico (lin-).⁵ Las CTH dan origen a CPH, las cuales han perdido su capacidad de autorenovación, pero conservan su potencial proliferativo y la expresión de CD34, sin embargo, comienzan a expresar CD38 y algunos marcadores de linaje. Las CPH dan lugar a células precursoras, reconocibles por su morfología, por último, los precursores maduran y dan origen a todas las poblaciones de células sanguíneas funcionales presentes en circulación (eritrocitos, leucocitos y plaquetas).^{5, 6}

1.2. Fuente de células progenitoras hematopoyéticas.

Las CPH pueden obtenerse de diferentes fuentes: a partir de médula ósea (MO), de sangre de cordón umbilical (SCU) y de sangre periférica movilizada (SPM). El número de CPH varía entre las diferentes fuentes, siendo la MO el sitio con mayor cantidad, correspondiendo a 0.5% del total de células, en términos absolutos, se encuentra una célula CD34+ por cada 200,000 células mononucleares.^{5, 7}

La SCU también es una fuente rica en CPH, aunque ligeramente en menor proporción que la MO, en este sitio se tiene una célula CD34+ por cada 300,000 células mononucleares.^{5, 7}

Finalmente, en sangre periférica de manera normal se encuentran escasas CPH, correspondiendo al 0.006% del total de células mononucleares, sin embargo, posterior al procedimiento de movilización, que consiste en obtener CPH a partir de médula ósea mediante la administración de G-CSF, el número de CPH en circulación aumenta a 1.3%, en términos absolutos, se encuentra una célula CD34+ por cada 2,000,000 de células mononucleares.⁷

En el TCPH como primera opción se emplean células de SPM, ya que es un procedimiento de obtención no invasivo, en el que se puede obtener fácilmente la cantidad de células CD34+ a infundir, en comparación a la extracción de células de MO, las desventajas de este trasplante son el uso de factores estimuladores de hematopoyesis en personas sanas, y que generalmente para obtener la dosis celular necesaria se emplea más de un día. En segunda opción se elige la SCU, sin embargo, debido al limitado volumen de sangre por unidad, se ha destinado un uso principalmente pediátrico, no obstante, en caso de requerirse en personas adultas, se infunden hasta dos unidades de cordón umbilical no relacionadas pero compatibles entre sí, su desventaja es que la reconstitución inmunológica es larga, por lo que el paciente es susceptible a infecciones oportunistas. Actualmente, se encuentra en desuso la infusión de CPH derivadas de MO, aunque representa la principal fuente de CPH, es un método de obtención invasivo para el donador.^{1, 3}

1.3. Tipos de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

El tipo de trasplante se determina con base en la enfermedad que afecta al paciente, así como la disponibilidad del donador, en estos términos, el trasplante puede ser autólogo o alogénico.⁸ En el autólogo las CPH del propio paciente son extraídas, tratadas con altas dosis de quimioterapia y criopreservadas; posteriormente, se descongelan y re-infunden al paciente. Este tipo de trasplante en general es adecuado para enfermedades hematológicas no malignas.¹

En el trasplante alogénico las CPH provienen de un donador HLA compatible, los primeros candidatos para donar son hermanos consanguíneos del paciente, en este contexto, a la pareja receptor-donador usualmente se le denomina binomio.⁸ El sistema HLA es un conjunto de antígenos de superficie, caracterizados por un alto grado de polimorfismos alélicos en sus genes, su tipificación se realiza en muestras de sangre periférica, donde una compatibilidad es notada cuando antígenos de clase I (*locus* A y B) y de clase II (*locus* DR) en mediana resolución son idénticos entre paciente y donador.^{8, 9} Cuando se carece de un donador familiar, particularmente en enfermedades de alto riesgo como leucemias agudas, la aportación de donantes no relacionados es necesaria, y puede ser a través de bancos nacionales de donadores altruistas, o bien a partir SCU.⁹

1.4. Régimen de acondicionamiento.

Este procedimiento consiste en la administración de quimio y/o radioterapia previa al trasplante, con la finalidad de: 1) erradicar la hematopoyesis que favorece a la enfermedad basal, por ejemplo, células leucémicas residuales, 2) inmunosuprimir al receptor para que no rechace las células infundidas del donador y 3) “crear un espacio”, es decir, contar con un sitio anatómicamente disponible en la MO donde las CPH del donador puedan acceder, situarse dentro de un nicho hematopoyético e injertar.^{1, 9}

Dependiendo la dosis de quimio y/o radioterapia administrada, el acondicionamiento se clasifica en tres categorías: 1) mieloablato (MA), 2) de intensidad reducida y 3) no mieloablato. El régimen MA causa citopenia irreversible, es decir hay

destrucción total de la hematopoyesis, esto se ha relacionado con complicaciones posteriores al trasplante. En el régimen no mieloablativo se administran dosis bajas de quimioterapia y/o radioterapia, se reduce la toxicidad y la citopenia es mínima, esto lo hace adecuado para pacientes de edad avanzada (>60 años). En el régimen de intensidad reducida la citopenia es de duración variable, ya que puede ser transitoria o bien, irreversible, dependiendo el esquema empleado.¹⁰

La elección del régimen de acondicionamiento depende del tipo de enfermedad hematológica, así como de la edad del receptor. Por otra parte, el tipo de acondicionamiento se ha relacionado con ausencia o presencia de complicaciones posteriores al trasplante.^{11, 12}

2. Reconstitución inmunológica

Posterior al acondicionamiento, se infunden vía intravenosa las CPH provenientes del donador HLA compatible. En el receptor estas células tienen la capacidad de dirigirse hacia MO y situarse en nichos hematopoyéticos, lo que se conoce como *homing*. Una vez que han llegado a estos sitios, las CPH se auto-renuevan y diferencian a todos los linajes hematopoyéticos maduros, cuando las nuevas células maduras son detectables en sangre periférica se dice que ha ocurrido el injerto.¹³ Las primeras células detectadas en circulación pertenecen al sistema inmunológico innato; posteriormente, varía el tiempo necesario para que la inmunidad adaptativa alcance su concentración normal en sangre, esta cinética se denomina reconstitución inmunológica (Figura 1). En general, en etapas postrasplante tempranas, tanto la inmunidad innata como adaptativa son poco funcionales, por lo tanto, el paciente es susceptible a infecciones oportunistas.¹⁴

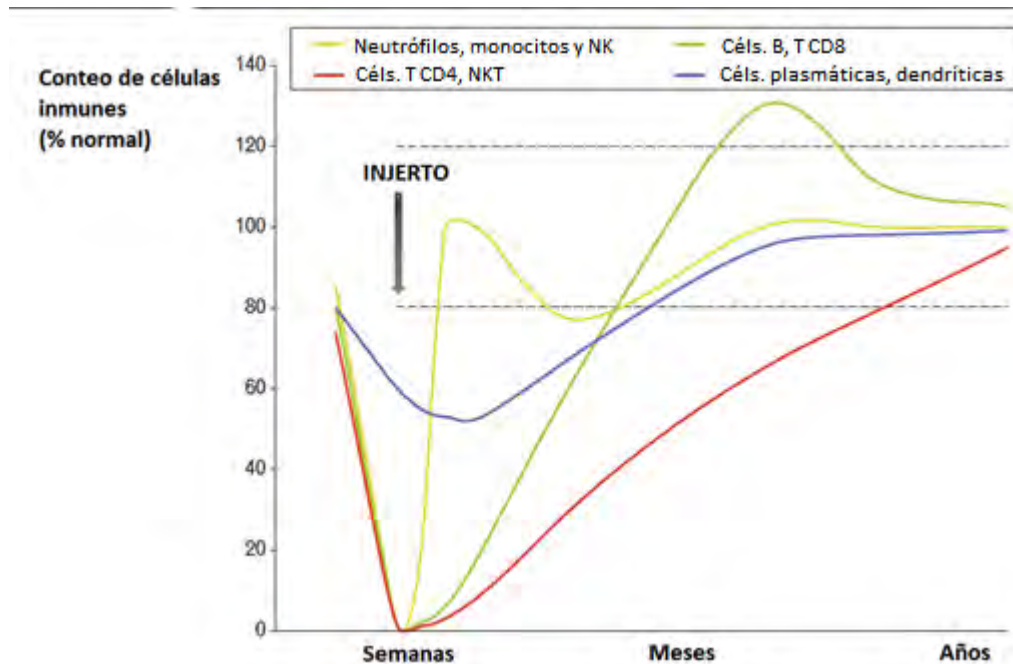


Figura 1. Reconstitución inmunológica postrasplante. Conteo aproximado de células inmunológicas innatas y adaptativas (expresado como porcentaje de un conteo normal) antes y después del TCPH con acondicionamiento mieloablativo. Tomada y modificada de Bosch M. *Curr Opin Hematol.* 2012, 19:324–335.

En promedio, los neutrófilos injertan a las dos semanas, las células NK a los 30 días, y los monocitos variablemente después de semanas o meses postrasplante. A pesar de la temprana aparición de los neutrófilos en sangre, su función es reducida, normalizándose de manera gradual hasta los dos meses. Los monocitos tienen comportamiento similar.¹⁴ En cambio, es larga la reconstitución de macrófagos situados en dermis de cresta iliaca posterior, pues en biopsias de piel humana se ha observado que el 55% de macrófagos del receptor permanece durante al menos 365 días postrasplante.¹⁵

En la inmunidad adaptativa, los linfocitos B son indetectables durante los primeros dos meses, llegando a reconstituirse completamente hasta uno o dos años después. En cuanto a los linfocitos T, las cuentas de Tc CD8+ efectoras y de memoria típicamente se recuperan a los seis meses después del trasplante, mientras que los Th CD4+ efectoras y de memoria se observan hasta después de un año.¹⁴

La finalidad del trasplante es lograr una reconstitución, en la cual, la totalidad de células provenga del donador, es decir que el receptor presente quimera total; aunque también puede ser parcial cuando persisten células residuales pertenecientes al paciente.¹⁶ El quimerismo se evalúa con cariotipo cuando receptor y donador son de diferente género, y cuando son del mismo género se mide a través de sitios polimórficos o microsatélites. Los pacientes que muestran quimera total usualmente poseen mejor pronóstico postrasplante.¹⁷

En la reconstitución influyen factores como: edad, enfermedad hematológica del receptor, tipo de acondicionamiento y fuente de CPH recibida (MO, SPM o SCU), además, también es relevante la presencia de infecciones u otras complicaciones posteriores al trasplante.¹⁴

3. Reacciones posteriores al trasplante

Los efectos tempranos más comunes después del trasplante son náusea y vómito como reacción a los fármacos y quimioterapia administrados. Debido a la cinética de reconstitución inmunológica, el paciente con neutropenia puede desarrollar fiebre, además es susceptible a infecciones oportunistas bacterianas y/o fúngicas.¹⁸ Otra complicación es la reactivación de citomegalovirus (CMV); cabe mencionar que el 90% de la población en países en desarrollo, como México, es seropositiva a CMV, sin embargo, solo presentarán síndrome clínico grave pacientes inmunosuprimidos.^{18, 19}

Por otra parte, todos los pacientes requieren transfusión tanto de glóbulos rojos como de plaquetas, en proporción a su pancitopenia, pero todos los productos sanguíneos transfundidos deben ser irradiados a fin de prevenir proliferación e injerto de células linfoides, y evitar reacciones alo-inmunes como fiebre.¹

Posterior al trasplante, células inmunocompetentes provenientes del donador son responsables en el receptor de dos respuestas inmunológicas estrechamente relacionadas, el efecto injerto contra leucemia (EICL) y la enfermedad del injerto en contra del huésped (EICH).²⁰ EL EICL es el objetivo del trasplante en receptores con enfermedades hematológicas neoplásicas, este consiste en una respuesta

inmunológica donde linfocitos NK y Tc CD8+ citotóxicos lisan y destruyen células leucémicas residuales en el paciente, sin embargo, la respuesta no es selectiva contra células tumorales, sino que también genera daño en las no tumorales, por ejemplo células epiteliales que recubren órganos sólidos, esto se conoce como EICH, dicha enfermedad se considera la complicación postrasplante más importante, debido a que un proceso inflamatorio exacerbado puede aminorar la calidad de vida del paciente, conduciéndolo incluso a muerte. No obstante, cuando se desarrolla clínicamente en grado leve o limitado se considera de buen pronóstico, ya que a través de ella se infiere la presencia de EICL.^{20, 21} De hecho, se ha visto que los pacientes con EICH tienen mayor supervivencia postrasplante que los que no presentan EICH, y menor probabilidad de recaída a la leucemia.²² Por lo tanto, la EICH es un proceso inmunológico interesante, ya que dependiendo su gravedad y la presencia de otros factores inherentes al paciente y donador, podría ser un fenómeno favorecedor de mortalidad, o en contraste, de supervivencia acompañada con menor probabilidad de recaída en el paciente.

4. Enfermedad del injerto en contra del huésped

La EICH ocurre cuando linfocitos T provenientes del donador atacan células del receptor. En términos de temporalidad, la enfermedad se clasifica en dos tipos: aguda (EICHa) y crónica (EICHc), convencionalmente la EICHa se presenta antes del día 100 post-TCPH y la EICHc después de este tiempo, además, su fisiopatología y características clínicas son diferentes.²³

4.1. EICH aguda.

Los órganos afectados en la EICHa son intestino, piel e hígado.²³ La EICHa refleja una respuesta inflamatoria convencional, donde se involucran células T del donador, además de múltiples mediadores del sistema inmunológico innato y adaptativo. El mecanismo inmunológico de EICHa se divide en tres fases: 1) activación de células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cell*), 2) activación de linfocitos T del donador y 3) destrucción del tejido blanco (Figura 2).²⁴

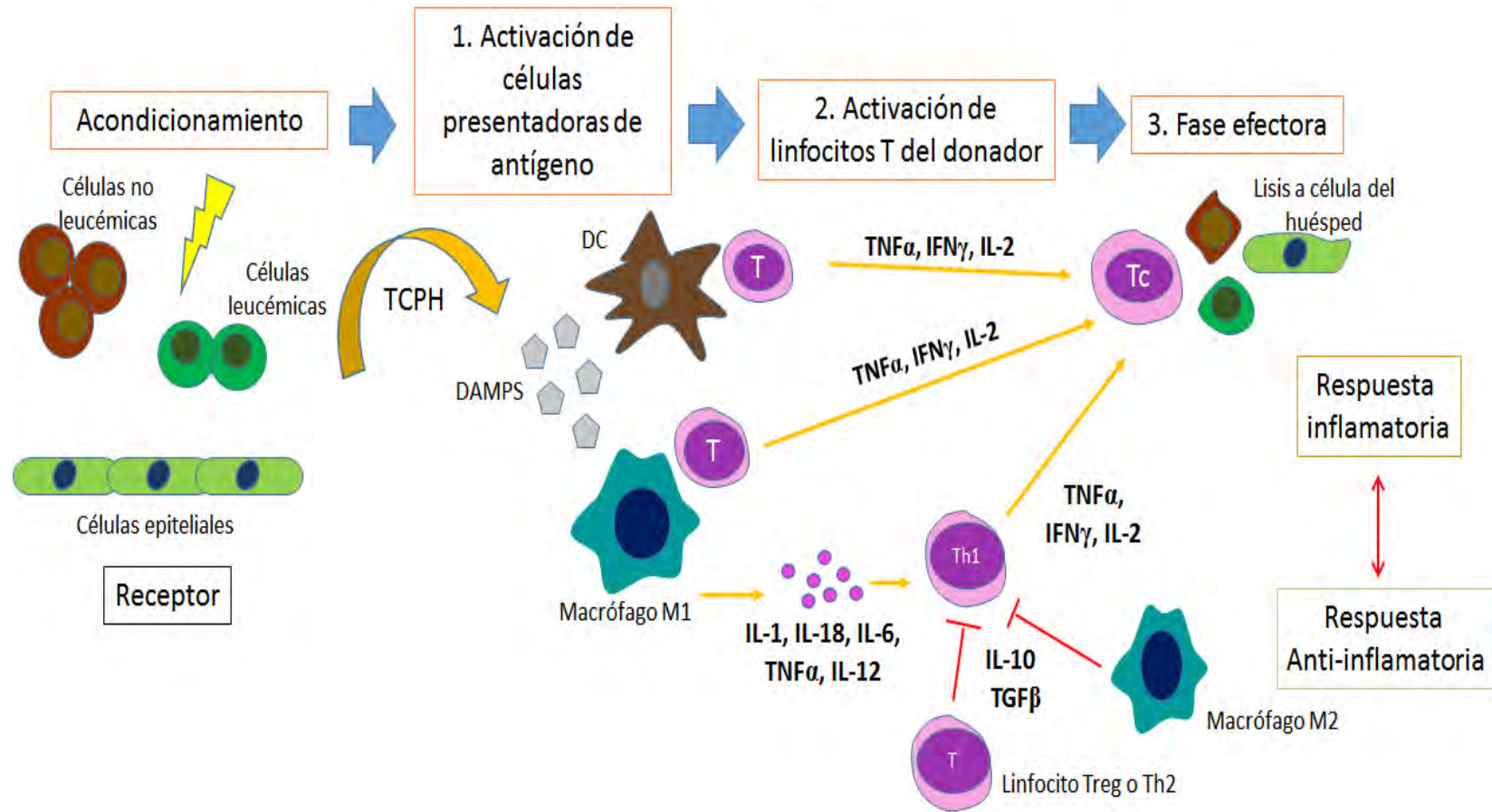


Figura 2. Fisiopatología de la enfermedad del injerto en contra del huésped. Fase 1. Activación de APC debido a la secreción de DAMPs liberados en la fase de acondicionamiento. Fase 2: Activación de linfocitos T del donador, a través de la presentación de antígenos o de citocinas pro-inflamatorias. Fase 3: Fase efectora, los linfocitos T citotóxicos del donador lisan células leucémicas, no leucémicas y endoteliales del huésped, mediante mecanismos de granzima/perforina o Fas/FasL. Finalmente, una respuesta anti-inflamatoria (IL-10, TGF β) regula y da lugar a la resolución del proceso inflamatorio en el sitio. DC: célula dendrítica. DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño.

Fase 1: Las APC son activadas por patrones moleculares asociados a daño (DAMP, del inglés *damage associated molecular patterns*), liberados en la enfermedad hematológica basal y en el régimen de acondicionamiento, de hecho se sugiere que la EICH incrementa en pacientes con acondicionamiento MA, y disminuye con los de intensidad reducida.^{12, 24-26} El daño celular en el huésped conduce a la secreción de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-1 por parte de APC: células dendríticas (DC, del inglés *Dendritic Cells*), monocitos y macrófagos, considerándolas como células iniciadoras o inductoras de la respuesta inflamatoria, sin embargo, la contribución precisa de las APC en la EICH permanece sin dilucidarse completamente.²⁴

Fase 2: Las APC activadas realizan sinapsis inmunológica con linfocitos T del donador, durante este proceso, los linfocitos T reconocen ya sea el péptido unido a las moléculas MHC, o propiamente a moléculas MHC extrañas. Esto conduce a la activación, proliferación, diferenciación y migración del linfocito T. Los linfocitos T CD8+ y CD4+ participan en esta fase. Una vez activadas, los linfocitos Tc CD8+ serán citotóxicos y los Th CD4+ secretarán citocinas; al respecto, se sugiere que el fenotipo Th1 induce EICH eficientemente, y particularmente se ha reportado que la desregulación en la expresión de citocinas podría contribuir a la severidad de la EICHa.^{24, 27}

Fase 3: Una compleja cascada de mediadores inflamatorios y celulares ocurre durante la fase efectora, esos componentes amplifican el daño en el paciente; las principales células efectoras son linfocitos Tc CD8+, las cuales lisan células blanco del huésped usando la vía Fas/Fas ligando (FasL) o granzima/perforina. La primera vía predomina en la EICH hepática, mientras la segunda es más importante en la EICH intestinal y cutánea. Dentro de los mediadores de inflamación, las citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-1 contribuyen al daño del órgano blanco. Por ejemplo, se ha reportado que TNF α puede: 1) activar APC y mejorar la presentación de alo-antígenos, 2) reclutar células efectoras hacia el tejido dañado, y 3) causar daño al tejido directamente vía apoptosis y necrosis.^{24, 27}

Finalmente, se sugiere que existe una respuesta anti-inflamatoria que regula las tres fases anteriores. Las poblaciones celulares que tienen implicación en esta fase son los linfocitos Treg, Th2, y de manera interesante, se podría sugerir la participación de macrófagos M2.²⁸⁻³⁰

Clínicamente, la EICHa se clasifica según el grado de daño de cada uno de los órganos afectados, la piel se estadifica de acuerdo al porcentaje superficial corporal con erupción maculopapular, el hígado se estadifica según el grado de bilirrubinemia, y el tracto gastrointestinal se evalúa con base en el volumen de producción de heces. De esta forma, la EICH grado I se cataloga como leve, la de grado II como moderada, el grado III se considera grave, y el grado IV es una enfermedad extremadamente grave y potencialmente mortal.^{24, 31}

4.2. EICH crónica.

La fisiopatología de la EICHc no está bien comprendida como la de EICHa. La EICHc puede originarse *de novo* o ser consecuencia de una enfermedad aguda prolongada. Los linfocitos T también han sido implicados en su desarrollo, sin embargo, su función no está bien dilucidada. Las manifestaciones clínicas de EICHc son similares a un proceso autoinmune, sugiriendo por lo tanto que existe similitud en su fisiopatología. Un probable mecanismo es que el timo sea dañado, ya sea por una EICHa previa, por el régimen de acondicionamiento, o simplemente porque en la etapa adulta este órgano disminuye su capacidad fisiológica normal, por lo tanto tenga una función alterada para eliminar células T auto-reactivas e inducir tolerancia inmunológica (selección negativa); por ello, receptores de edad avanzada se encuentran limitados para recobrar el repertorio normal de linfocitos T, lo que podría aumentar el riesgo de desarrollar EICHc.^{27, 32, 33}

Clínicamente la puntuación de EICHc se basa en signos específicos, en el grado de afectación de órganos blanco (limitada o extensa), en los datos de laboratorio y en la confirmación histopatológica. En la EICHc limitada la afectación al órgano blanco es <50%, mientras que en la extensa es >50%, además se nota daño en más de un órgano.³¹

4.3. Factores de riesgo

En general, la EICH puede ocurrir a pesar de administrar profilaxis inmunosupresora, su incidencia llega a ser hasta del 80% en pacientes con TCPH alogénico. El riesgo de presentar EICHa suele aumentar con el uso de donadores HLA no compatibles, donador de género femenino con antecedente de múltiples partos, receptor de edad avanzada (>60 años) y tipo de injerto, en estos términos, el uso de SCU representa menor riesgo, seguido de SPM y MO, debido a que las células de SCU poseen mayor plasticidad inmunológica, comparadas con células de SPM o MO adultas.^{9, 24} Además, otro factor es el tipo de acondicionamiento, el MA se considera de mayor riesgo.^{12, 26} Otros elementos que intervienen son los antígenos menores de histocompatibilidad (mHLA), gran parte de ellos se codifican en genes localizados en el cromosoma Y, por lo tanto, cuando receptores del género masculino cuentan con donadoras femeninas aumenta el riesgo a EICH. Además, receptores seronegativos para CMV que cuenten con donadores seropositivos para dicho virus también se encuentran en riesgo. Aunque estos factores influyen en el desarrollo de la EICH, existen otros elementos que tienen impacto sobre la enfermedad, como los componentes celulares o mediadores de inflamación que participan en su fisiopatología, por ejemplo, mucho se ha descrito acerca de los linfocitos Tc CD8+ citotóxicos (Tc), sin embargo, existen escasas investigaciones enfocadas en la función de otros componentes celulares como macrófagos, que son importantes, dado que por un lado se sabe que pueden inducir respuesta inflamatoria en la EICH y por otro se especula que podrían regular el proceso, conduciendo a la resolución del daño generado.^{15, 23}

5. Macrófagos: componentes fundamentales del sistema inmunológico

Los macrófagos tienen funciones inmunológicas interesantes que los hacen ser excelentes candidatos en el estudio de la EICH. Estas células corresponden a la población con mayor plasticidad en el sistema inmunológico innato, poseen actividades homeostáticas y de protección, al poner en marcha mecanismos como

fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos, además producen citocinas.³⁴

Su ontogenia difiere con respecto al sitio anatómico, en algunos tejidos son de origen embrionario, por ejemplo microglia, en cambio, en piel provienen de monocitos derivados de MO que finalmente, maduran a macrófagos con un fenotipo determinado por el microambiente tisular, esta especialización contribuye a su heterogeneidad.^{34, 35} Dependiendo del fenotipo, los macrófagos adoptan funciones específicas, por ejemplo, dar muerte o reparar *in vivo* e *in vitro*, lo cual bioquímicamente es determinado por su habilidad para metabolizar la arginina.³⁴ Cuando emplean la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOs) generan óxido nítrico como producto final y su fenotipo se denomina M1, estos macrófagos se asocian con funciones microbicidas, dan muerte a células dañadas en procesos inflamatorios e inhiben proliferación celular, por ello se consideran anti-tumorales. En cambio cuando ocupan la enzima arginasa-1 (Arg1), convierten la arginina a ornitina y se denominan macrófagos M2, la ornitina es una molécula que promueve reparación y crecimiento celular, de hecho los macrófagos M2 son el principal tipo celular presente en heridas tisulares no patológicas, cuya función es reparar el tejido; además, se asocian con el desarrollo de tumores debido a su capacidad para promover proliferación (Figura 3).^{34, 36}

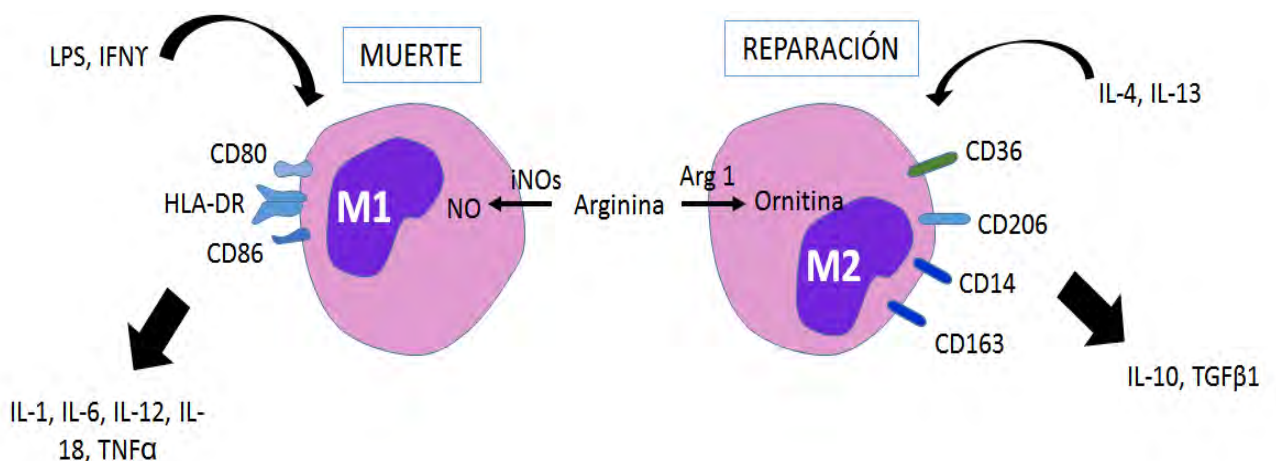


Figura 3. Activación de macrófagos M1 y M2. Se ilustran citocinas y otras moléculas asociadas con la respuesta M1 (muerte o inhibición de proliferación celular) y M2 (reparación tisular). LPS: lipopolisacárido. iNOs: óxido nítrico sintasa inducible. NO: óxido nítrico. Arg1: arginasa 1.

La nomenclatura M1 y M2 fue dada por Mills y colaboradores en el año 2000, pues observaron que el IFN γ de ratones con fenotipo Th1 activaba macrófagos productores de NO (M1), en cambio, la IL-4 de ratones Th2 promovía macrófagos productores de ornitina (M2).³⁷

Para dar lugar *in vitro* al fenotipo M1, las células se activan con IFN γ y lipopolisacárido (LPS), esto favorece la expresión de citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 y TNF α . En contraste, para generar el fenotipo M2 los macrófagos se activan con IL-4 e IL-13, favoreciendo la secreción de IL-10 y TGF β 1 que son citocinas anti-inflamatorias.^{34, 36} Por lo tanto, dependiendo el fenotipo, los macrófagos secretan moléculas que pueden participar ya sea en la promoción o resolución de procesos inflamatorios. Por otra parte, en cuanto al inmunofenotipo, aunque en general los macrófagos expresan CD80, CD86, CD14, CD36, CD206, CD163 y HLA-DR, particularmente, la expresión de CD86, CD80 y HLA-DR es característica de macrófagos M1, mientras que CD14, CD36, CD163 y CD206 se expresan principalmente en macrófagos M2.^{34, 38}

6. Macrófagos y enfermedad del injerto en contra del huésped.

En la EICH participan células efectoras provenientes del donador, fundamentalmente linfocitos Tc CD8+ y NK citotóxicos. Para activar estas células se necesitan APC, que a su vez se activan a través del reconocimiento de DAMPS. Las APC más importantes dentro del sistema inmunológico son DC y macrófagos, al respecto, se ha documentado la presencia de macrófagos en tejido con EICH, sin embargo, de acuerdo a los escasos trabajos publicados no está claro aún el mecanismo preciso por el que intervienen en la enfermedad, y tampoco si algún fenotipo en particular se asocia con la EICH.^{15, 39}

A principios de los noventas, P. F. Nestel y colaboradores emplearon un modelo de EICH con ratones B6AF1, de los cuales obtuvieron macrófagos y los activaron *in vitro* con IFN γ y LPS para producir TNF α , una citocina que encontraron relacionada con los síntomas característicos y gravedad de la EICHa.⁴⁰ Posteriormente en 1997, T. Facon y su grupo publicaron tres casos clínicos de pacientes con EICHa cuyas

biopsias mostraron principalmente presencia de grandes infiltrados de macrófagos en los sitios de inflamación, acompañados de cantidades elevadas de TNF α .⁴¹ Adicionalmente en ese año, se observó en modelos de ratón que recibieron acondicionamiento con irradiación corporal total (ICT), que a mayores dosis de ICT incrementaba el número de macrófagos activados, causando elevados niveles de citocinas pro-inflamatorias sistémicas y mayor severidad de EICH.⁴² En 2009 se encontró en biopsias de piel de pacientes con EICH importante infiltrado de macrófagos, no sólo pertenecientes al donador, sino también al receptor, además, se observó que estas células sobrevivían y eran resistentes al acondicionamiento, persistiendo al menos durante 1 año postrasplante. Con lo anterior se sugiere que los macrófagos son incapaces por sí solos de desarrollar EICH, pero son importantes en la fisiopatología de la enfermedad, ya que inducen secreción de citocinas pro-inflamatorias y activan linfocitos T; en general, es posible que los macrófagos contribuyan a la EICH debido a su capacidad de mantener la respuesta inflamatoria de células T previamente activadas.¹⁵ Además, se documentó en un modelo de ratones B6D2F1, que los receptores de injertos provenientes de *Knock-out* del factor estimulador de colonias de macrófagos (*M-csf*^{-/-}) tenían sustancialmente menor infiltrado de macrófagos y signos patológicos de EICH, comparados con los que recibían injertos provenientes de ratones *wild-type*, sugiriendo que la molécula M-CSF era indispensable para regular la EICH.⁴³ Por otra parte, en un modelo de ratón NOD/SCID “humanizado”, se encontró que durante el desarrollo de EICH se inducía una mezcla de macrófagos con fenotipo M1 y M2, cuya presencia se relacionaba directamente con el infiltrado de linfocitos Th CD4+ en tejido con EICH.³⁹ Además, la importancia que tienen los macrófagos se describió también en biopsias de piel de 104 pacientes, donde se notó que grandes infiltrados de macrófagos (>200 células CD163+/campo) se asociaban con EICHa refractaria (término empleado para una enfermedad sin respuesta al tratamiento) y menor sobrevida.⁴⁴ En contraste, Hashimoto D. documentó que los macrófagos tenían funciones protectoras para EICH, en un modelo de ratón postrasplante encontró inesperadamente, que los macrófagos residuales del receptor, que habían sido resistentes al régimen de acondicionamiento, modulaban

la activación de células T alo-reactivas, limitando así la severidad de la enfermedad.⁴⁵ Con base en las evidencias dadas, es posible que los macrófagos participen en la EICH, por tal razón otros grupos de investigación se han encargado de estudiar estrategias terapéuticas dirigidas contra este tipo celular para tratar la enfermedad. Recientemente, en 2014 Nishiwaki y colaboradores encontraron en un modelo de ratón que la infiltración de macrófagos en biopsias de piel con EICH correlacionaba directamente con la severidad de la enfermedad, y reportaron que el palmitato de dexametasona, un esteroide, aminoraba la gravedad de la EICH, debido a que inhibía la viabilidad y migración de macrófagos, siendo éste el primer estudio en proporcionar evidencia de que la terapia para EICH debería basarse en el tipo celular infiltrante del tejido inflamado.⁴⁶ En el mismo año se mostró que durante la EICH el tratamiento con CYM-5442, un agonista selectivo para receptores de esfingosina 1-fosfato, disminuía la expresión de CCL-2 y CCL-7 (quimiocinas que reclutan monocitos en procesos inflamatorios) en células endoteliales, reduciendo de esa forma la migración de monocitos a tejido y la subsecuente maduración a macrófagos, aminorando así la severidad de la EICH.⁴⁷ En contraste, Hashimoto y colaboradores encontraron en modelos de ratón que los macrófagos residuales del receptor podían inhibir el desarrollo de la enfermedad, por ello propusieron una terapia basada en la administración de M-CSF en el ratón pretrasplante, con la finalidad de expandir su población de macrófagos y aminorar la probabilidad de EICH después del TCPH alogénico.⁴⁵ Con base en las evidencias mencionadas, se sugiere que los macrófagos participan en la EICH, sin embargo, aún hay mucho que investigar en cuanto a los mecanismos moleculares que hacen esto posible.

Recordando, los macrófagos poseen tres funciones: fagocitosis, presentación antigénica y secreción de citocinas, particularmente es interesante su función como células productoras de citocinas, ya que dependiendo su fenotipo, los macrófagos pueden secretar moléculas pro o anti-inflamatorias, las cuales regulan el proceso inflamatorio que ocurre en la EICH.

7. Citocinas: moduladores de inflamación.

Las citocinas son un grupo extenso y heterogéneo de glicoproteínas de bajo peso molecular (8 a 26 KDa, excepto IL-12 que pesa 75 KDa), secretadas por diversos tipos celulares. Estas se unen a receptores presentes en varios tipos celulares, principalmente leucocitos, y regulan la respuesta inmunológica innata y adaptativa.^{48, 49} Las citocinas pueden tener un efecto diferente, de acuerdo con la célula blanco a la que regulen, esta propiedad se denomina pleiotropismo. Adicionalmente, diferentes citocinas pueden inducir el mismo efecto sobre una población celular, acción llamada redundancia. Cuando ejercen su acción sobre la misma célula que las sintetiza se trata de un efecto autócrino, por el contrario, si se ejerce sobre células diferentes pero cercanas al sitio se llama efecto parácrino, y si actúan en sitios lejanos presentan efecto endócrino. La acción que ejercen las citocinas por lo general se asocia con regulación del crecimiento, diferenciación y activación de las células pertenecientes al sistema inmunológico. Su síntesis se inicia a partir de transcripción *de novo*, como consecuencia de señales de activación celular. Su proceso de transcripción es transitorio, ya que los mRNA que se traducen para citocinas son inestables.⁴⁹ Con base en su propiedad de favorecer o no la inflamación, se clasifican en dos grupos: anti-inflamatorias y pro-inflamatorias.

7.1. Citocinas pro-inflamatorias

Las citocinas de este grupo son producidas predominantemente por macrófagos activados y promueven la iniciación y/o progresión de respuestas inflamatorias. En la tabla 1 se muestran citocinas pro-inflamatorias de interés para el presente trabajo, su función, así como las células de origen y destino.

Tabla1. Citocinas con actividad pro-inflamatoria.⁴⁹⁻⁵¹

Citocina	Célula origen	Célula blanco	Función
IL-1α	Macrófagos, DC, fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos	Linfocitos T <i>naive</i> , linfocitos Tc, DC y macrófagos	Proliferación y diferenciación de células de la respuesta innata y adaptativa. Pirógeno endógeno. Activación de macrófagos y linfocitos T
IL-1β	Macrófagos, DC, fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos	Linfocitos T, macrófagos	Posee mismas funciones que IL-1 α , pero IL-1 β es sintetizada como pro IL-1 y debe ser procesada por caspasa-1 para tener actividad biológica
IL-6	Linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos	Linfocitos T, B, monocitos, hepatocitos	Actividad tanto pro como anti-inflamatoria. Promueve producción de proteínas de fase aguda, diferenciación de linfocitos Th2 y Th17, diferenciación de linfocitos B hacia PC, regula la diferenciación de monocitos a macrófagos, Induce expresión de ICAM-1
IL-12	Macrófagos, DC, linfocitos B, neutrófilos, monocitos	Linfocitos T y NK	Heterodímero conformado por la subunidad A (p35) y B (p40). Desarrollo, mantenimiento y diferenciación de linfocitos Th1, induce actividad citotóxica y producción de IFN γ por células NK, favorece expresión del receptor de IL-18, inhibe formación de linfocitos Th2, promueve actividad antitumoral de macrófagos.
IL-18	Monocitos, macrófagos, DC, fibroblastos	Linfocitos NK, Linfocitos B	Sirve como cofactor de IL-12, induce producción de IFN γ , inhibe la secreción de IgG1 e IgE, y refuerza la de IgG2a por linfocitos B.
TNFα	Macrófagos, células NK, linfocitos Th1	Macrófagos, células endoteliales, linfocitos T y NK	Pirógeno endógeno, promueve producción de proteínas de fase aguda, activación del endotelio, inflamación local. Apoptosis.

DC: célula dendrítica. Tc: linfocitos T citotóxicos. Th: linfocito T helper. PC: *Plasmatic Cell* (Célula plasmática). ICAM: molécula de adhesión intercelular. IFN γ : interferón gamma. NK: *natural killer*. Ig: inmunoglobulina.

7.2. Citocinas anti-inflamatorias

Las citocinas anti-inflamatorias son moléculas inmunoreguladoras que controlan las respuestas generadas por citocinas pro-inflamatorias, restaurando la homeostasis del sitio dañado. Ejemplos de ellas: IL-4, IL-10, IL-13, IL-6 (también posee actividad pro-inflamatoria) y TGF β 1 (Factor de crecimiento transformante β 1). En la tabla 2 se encuentra información de IL-10 y TGF β 1 por ser de interés para este trabajo, indicando su función, origen y destino celular.⁴⁹

Tabla 2. Citocinas con actividad anti-inflamatoria.^{49, 52}

Citocina	Célula origen	Célula blanco	Función
IL-10	Macrófagos, linfocitos Treg, linfocitos Th2, linfocitos B, DC	Linfocito B, Linfocitos T, macrófagos	Inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos, DC y linfocitos T, aumenta proliferación de linfocitos B, inhibe activación de linfocitos Th1.
TGFβ1	Macrófagos, linfocitos Treg, plaquetas	Linfocitos Th1, macrófagos	Inhibe proliferación y funciones efectoras de linfocitos T y macrófagos, favorece el desarrollo de linfocitos Treg, inhibe la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2. Citocina anti-inflamatoria por excelencia.

Treg: linfocito T regulador. Th: linfocito T helper. DC: célula dendrítica.

Finalmente, cabe destacar que el balance entre citocinas pro y anti-inflamatorias es clave para dar inicio o regular la fisiopatología de diversas enfermedades, por ejemplo las respuestas inmunológicas que se generan posterior al TCPH.

8. Cinética de citocinas en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Las citocinas participan en el desarrollo de las reacciones generadas después del TCPH, es importante describir lo que hasta el momento se ha estudiado en cuanto a su cinética postrasplante. C. K. Min y colaboradores trabajaron con un grupo de 52 pacientes que recibieron TCPH alogénico, a quienes determinaron

semanalmente sus niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF α e IL-8) y anti-inflamatorias (IL-10). IL-6 incrementó inmediatamente después del trasplante, llegando a un pico máximo a la semana +3, IL-8 estuvo elevada sólo durante la primera semana; por otro lado, después de una ligera disminución en la semana +1, TNF α incrementó significativamente de la semana +2 a la semana +3. Los valores de IL-10 comenzaron a elevarse en la segunda semana, llegando a su máximo en la semana +4. En resumen, elevados niveles séricos de IL-6 en la primera semana podrían ser un predictor temprano de complicaciones postrasplante, particularmente EICHa, ya que su secreción podría desencadenar una cascada de citocinas pro-inflamatorias.⁵³

9. Citocinas y enfermedad del injerto en contra del huésped.

Los linfocitos T son una fuente de citocinas, las cuales se sabe que participan en la enfermedad. Sin embargo, los linfocitos T no son la única fuente, también son secretadas por células del sistema inmunológico innato, como macrófagos, los cuales influyen en el inicio de la EICH. En la fisiopatología de la EICH, el acondicionamiento desencadena una “tormenta de citocinas” pro-inflamatorias, clásicamente TNF α , IL-1 e IL-6.⁵⁴ Estas moléculas promueven diferenciación y expansión de linfocitos T. Cuando aumentan significativamente los niveles de TNF α de la segunda a la cuarta semana post-TCPH, incrementa la severidad de EICH intestinal.⁵⁵ IL-6 se considera modulador de la EICH, debido a que la administración de anticuerpos neutralizantes para IL-6 disminuye su gravedad.⁵⁶ Por otra parte, se han observado niveles elevados de IL-12 en suero de pacientes con EICHa, sugiriendo que tienen una función en el desarrollo de la enfermedad, y que su inhibición mediante anticuerpos disminuiría el riesgo de presentarla.⁵⁷ Otro estudio reveló que pacientes con niveles elevados de IL-12 en suero después del trasplante, muestran menor probabilidad de recaída sin aumentar el riesgo de EICH.⁵⁸ Además, por medio de inmunohistoquímica se ha demostrado sobreexpresión de IL-18 en tejido cutáneo de pacientes en fases tempranas de EICHa, considerándose un factor pronóstico.⁵⁹ En términos de citocinas anti-inflamatorias, se ha visto que si se administran bajas dosis de IL-10 a ratones con EICH, el efecto es inmunosupresor,

sin embargo, si la dosis es elevada se exagera la severidad de la enfermedad.⁶⁰ Adicionalmente, se ha visto que bajos niveles de TGF β 1, se relacionan con el desarrollo de EICHa, por otro lado, los síntomas de EICHc se asocian con elevada expresión de TGF β 1 a nivel de RNAm y proteína.⁶¹ En resumen, las citocinas y sus niveles de expresión tienen un efecto importante sobre el desarrollo de la EICH.

10. Regulación génica: polimorfismos de un solo nucleótido.

La expresión génica es de vital importancia para la regulación del sistema inmunológico, dicho proceso depende de elementos *cis* reguladores encontrados en las regiones promotoras de los genes, específicamente en la región mínima (*core promoter*) y en elementos próximos al promotor. Además de las secuencias consenso *cis* ubicadas en el promotor, existen también proteínas que actúan en *trans*, como factores de transcripción y RNA polimerasa II. Un mecanismo regulador de expresión génica son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que son las variantes génicas más frecuentes en el genoma humano, pues se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma.⁶² Con base en su funcionalidad, los SNPs se clasifican en: 1) SNP reguladores (rSNP) que se encuentran en promotores y tienen implicaciones sobre los niveles de expresión, 2) SNPs RNA estructurales (srSNP) que afectan la estructura y función de los RNA, incluyendo el *splicing* (corte y empalme), traducción, estabilidad y poliadenilación, 3) SNPs codificantes (cSNP), se localizan en los exones y se subdividen en sinónimos (si el cambio de nucleótido no modifica el aminoácido) y no sinónimos (si el cambio de nucleótido cambia el aminoácido); cada uno de ellos puede afectar la cantidad o actividad de las proteínas codificadas.^{62, 63} En la figura 4 se ilustra el mecanismo molecular de los rSNP y cSNP. Así, los rSNP situados en regiones promotoras pueden modificar, eliminar o crear sitios de unión y reconocimiento para factores de transcripción, alterando los niveles de expresión génica, conduciendo a sobre o subexpresión de las proteínas. En estos términos, se ha documentado que diferencias en la expresión génica entre un sujeto y otro pueden modificar el fenotipo en enfermedades complejas.⁶²

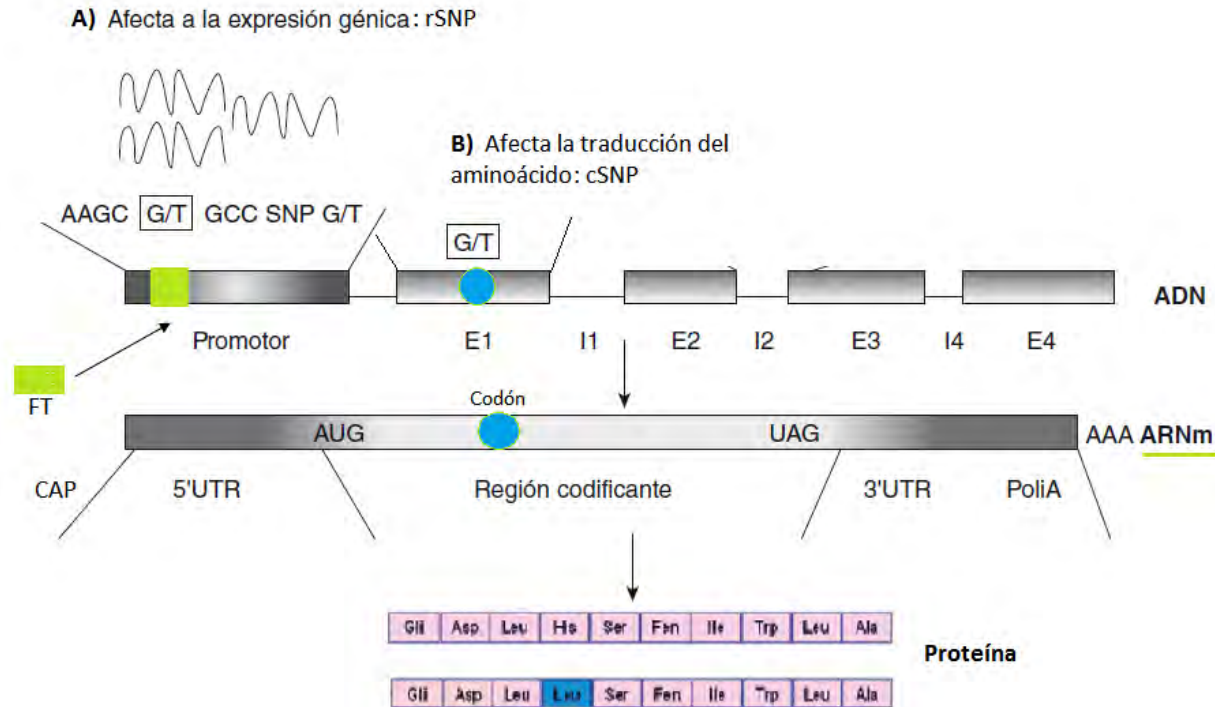


Figura 4. Efecto funcional de los rSNP y cSNP. Los SNP reguladores (rSNP) pueden afectar la expresión si están en el promotor porque alteran o modifican la unión de factores de transcripción (color verde). Los SNP codificantes (cSNP) se encuentran en exones, su presencia puede alterar la secuencia de codones, modificando o no el aminoácido traducido (color azul). FT: factor de transcripción. CAP: sitio 7- metil guanósina trifosfato en el extremo 5'. UTR: región no traducida del inglés "untranslated region". Modificada de Ramírez Bello J. Gac Med Méx. 2013; 149: 220-8.

11. Polimorfismos de un solo nucleótido y enfermedad del injerto en contra del huésped.

En el contexto de la EICH, se ha observado sub o sobreexpresión en los niveles de diversas citocinas, sin embargo, no se han propuesto mecanismos en particular responsables de dicha regulación.⁵⁴ Existen trabajos donde se reportan SNPs en genes de citocinas como factores de riesgo para el desarrollo de EICH; esto resulta interesante pues podría sugerir una relación entre el SNP con la expresión de la citocina, y por consiguiente con el desarrollo o gravedad de la enfermedad. Para fines de este trabajo, con base en las siguientes evidencias, se eligió estudiar SNPs presentes en *IL1A*, *IL6*, *IL10*, *IL12A*, *IL18*, *TNF* y *TGFB1*. En un estudio realizado en pacientes iraníes, se analizó el subgrupo de sujetos trasplantados por leucemia y

se observó tendencia de riesgo a EICH para el alelo C del SNP rs1800587 en *IL1A*.⁶⁴ En sujetos británicos se encontró asociación de riesgo a la enfermedad crónica para el genotipo GG del SNP rs1800795 en *IL6*, con RM=4.25, IC 95% 1.49 – 12.16 y $p=0.007$.⁶⁵ En una cohorte asiática con TCPH alogénico, los portadores del genotipo GG en el SNP rs187238 en *IL18*, mostraban injerto mieloide más rápido (15 días *versus* 17 días, $p=0.01$), pero mayor incidencia de EICHc (20.6% *versus* 3.3%, $p=0.029$).⁶⁶ Además, un estudio realizado en población brasileña sugirió asociación entre el genotipo GA del SNP rs361525 en *TNF*, con la ocurrencia y severidad de EICHc, pues la incidencia de EICHc en pacientes con dicho genotipo fue de 91.7%, en contraste a 59.4% para el genotipo GG.⁶⁷

Por otra parte, un meta-análisis realizado en poblaciones china, brasileña, caucásica e iraní, reportó que receptores de TCPH alogénico con genotipo CC en el SNP rs1800872 de *IL10* mostraban riesgo de presentar EICHa grado II a IV (RM=1.999, IC 95% 1.230 – 3.250, $p=0.005$).⁶⁸ En contraste, en una cohorte inglesa de pacientes con donador HLA compatible, el genotipo AA del mismo SNP se consideró factor de protección para la enfermedad aguda grado III y IV (RM=0.4, IC 95% 0.2 - 0.9, $p=0.02$); cabe mencionar que se trata de un SNP etiqueta, y en la misma cohorte se encontró el haplotipo TCATA, definido por 5 polimorfismos (rs1800890, rs6693899, rs1800896, rs1800871 y rs1800872) del promotor de *IL10*, el cual se asoció con mayor sobrevida postrasplante.⁶⁹ Así mismo, en un meta-análisis de población caucásica y asiática, el SNP rs1800470 localizado en el exón 1 de *TGFB1*, cuyo efecto biológico consiste en el cambio de una lisina (K) por prolina (P), se consideró factor de protección para la enfermedad (RM=0.65, IC 95% 0.63 – 0.85, $p=0.02$); una observación similar fue documentada en pacientes iraníes con TCPH alogénico, cuyos portadores del alelo A en el mismo SNP mostraron menor frecuencia de EICHa, en comparación a los sujetos sin el alelo A (RM=0.334, $p=0.026$).^{70, 71}

JUSTIFICACIÓN

Las neoplasias hematológicas representan un problema de salud a nivel nacional y mundial. En México, la leucemia es una de las enfermedades malignas más frecuentes en población adulta, con una incidencia de 4.3%, mientras que la octava causa de muerte por cáncer, según datos de la Organización Mundial de la Salud. El TCPH es un tratamiento de consolidación para neoplasias hematológicas, así como enfermedades hematológicas no malignas. El objetivo es reconstituir el sistema inmunológico y hematológico del paciente. No obstante, este tratamiento posee complicaciones, de las cuales la EICH es la más frecuente e importante por determinar el pronóstico favorable o no en el paciente postrasplante. Con base en las evidencias dadas, se destaca la importancia del tipo celular infiltrado en EICH, así como del balance adecuado entre citocinas pro y anti-inflamatorias, su regulación génica y la presencia de SNPs. Interesantemente, gran parte de las citocinas ejemplificadas que participan en la EICH pueden ser secretadas por macrófagos M1 (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF α) y M2 (IL-10 y TGF β 1), por ello, resulta importante investigar a este tipo celular como fuente productora de dichas citocinas, ya que ese conocimiento podría ser aplicado posteriormente en el diseño de nuevos tratamientos específicos y selectivos para macrófagos, inhibiendo su función, migración o proliferación, y con ello evitar la cascada de citocinas, dicho enfoque podría utilizarse en pacientes susceptibles de desarrollar EICH, dependiendo sus resultados de tipificación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TCPH es un tratamiento de consolidación para enfermedades hematológicas, como es el caso de las leucemias que representan la neoplasia hematológica con mayor mortalidad en México. La EICH es una complicación frecuente en pacientes post-TCPH alogénico, pues se presenta aproximadamente en el 80% de los receptores. Esta consiste en una reacción inflamatoria exacerbada, la cual puede ser fatal en el paciente. No obstante, cuando su gravedad es leve o limitada se asocia con menor probabilidad de recaída. En estos términos, un factor importante para su desarrollo son las variantes génicas, como los SNPs, que existen entre un paciente y otro. Por otra parte, se conoce que el número de células infiltrantes del sistema inmunológico en tejido también influye en el desarrollo y gravedad de la enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado en su conjunto si la presencia de variantes génicas, como polimorfismos de un solo nucleótido, presentes en genes de citocinas producidas particularmente por macrófagos M1 (*IL1A*, *IL6*, *IL12A*, *IL18* y *TNF*) y M2 (*IL10* y *TGFB1*), así como su expresión a nivel de proteína, se asocian con la susceptibilidad a desarrollar EICH.

HIPÓTESIS

SNPs en genes de *IL1A* (rs1800587), *IL6* (rs1800795), *IL12A* (rs2243123), *IL18* (rs187238), *TNF* (rs361525), *IL10* (rs1800872) y *TGFB1* (rs1800470), así como su expresión a nivel de proteína se asociarán con susceptibilidad de desarrollar EICH.

OBJETIVOS

- **General**

Analizar si SNPs en los genes *IL1A* (rs1800587), *IL6* (rs1800795), *IL12A* (rs2243123), *IL18* (rs187238), *TNF* (rs361525), *IL10* (rs1800872) y *TGFB1* (rs1800470), así como su expresión a nivel de proteína en macrófagos M1 y M2, se asocian con EICH.

- **Particulares**

1. Determinar la frecuencia alélica de los SNPs rs1800587, rs1800795, rs2243123, rs187238, rs361525, rs1800872 y rs1800470 en un grupo de sujetos clínicamente sanos.
2. Analizar la frecuencia alélica y genotípica de los SNPs rs1800587, rs1800795, rs2243123, rs187238, rs361525, rs1800872 y rs1800470 en pacientes con EICH *versus* sin EICH.
3. Caracterizar el fenotipo de macrófagos M1 y M2, derivados de monocitos de sangre periférica, en pacientes con y sin EICH, así como en un grupo de donadores alogénicos.
4. Determinar la producción de citocinas características de macrófagos M1 (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 y TNF α) y M2 (IL-10 y TGF β 1) en pacientes con y sin EICH, así como en un grupo de donadores alogénicos.

METODOLOGÍA

- Diseño de estudio

De cohorte, prospectivo.

- Universo de estudio

Pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), anemia aplásica e inmunodeficiencia, que acudieron al servicio de Hematología de la UMAE, Hospital de Especialidades CMN-SXXI, IMSS, y que, dado el curso de su enfermedad, recibieron TCPH alogénico.

- Población de estudio

Pacientes adultos con TCPH, que contaban con donador familiar (hermano consanguíneo) HLA idéntico en mediana resolución para los *loci* A, B, Cw y DR.

- Grupo control

Se incluyó un grupo control de sujetos clínicamente sanos del Valle de México, con el fin de conocer las frecuencias génicas de los SNPs de estudio y el equilibrio de *Hardy-Weinberg* en población asintomática. Se trató de sujetos nacidos y residentes en la zona sur, oriente y centro de la Ciudad de México, elegidos de esa manera por pertenecer a la misma región del grupo de pacientes.

- Criterios de inclusión

Controles

- Sujetos entre 17 y 60 años de edad.
- Masculino o femenino.
- Ser mexicano con ascendencia de mínimo dos generaciones.
- Residir en la zona del Valle de México.

Pacientes

- Pacientes con TCPH alogénico.
- Contar con un donador (hermano consanguíneo) HLA compatible.
- Sujetos entre 17 y 60 años de edad al momento del diagnóstico.
- Masculino o femenino.
- Ser mexicano con ascendencia de mínimo dos generaciones.

- Criterios de exclusión

Controles

- Tener relación consanguínea con el grupo de pacientes destinados a recibir TCPH.
- Contar con diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune, diabetes, o algún tipo de cáncer.
- Tener diagnóstico de enfermedad cardiovascular.

Pacientes

- Pacientes que cursan adicionalmente con alguna enfermedad autoinmune, diabetes u otro tipo de cáncer.
- Pacientes con trasplante autólogo.
- Pacientes con trasplante de sangre de cordón umbilical.

- Criterios de eliminación de muestras

- Muestra de sangre periférica insuficiente.
- Escasa concentración de DNA extraído.
- Cantidad insuficiente de monocitos purificados a partir de sangre periférica.
- Resultados incompletos de genotipificación de SNPs, caracterización de macrófagos y cuantificación de citocinas.

- Variables

Variable dependiente:

- Enfermedad del injerto en contra del huésped.

Variables independientes:

- Polimorfismos de un solo nucleótido: rs1800587, rs1800795, rs2243123, rs187238, rs361525, rs1800872 y rs1800470
- Concentración de citocinas: IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α y TGF β 1

- Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se calculó con respecto a la frecuencia del alelo menor (MAF) reportada en la base de datos *1000 genomes*, con una razón de momios (RM) de 3.0, confianza de 95%, poder de 80% y α de 0.05%. El resultado fue de 77 binomios (donador-receptor). El grupo control fue de 245 individuos.

- Material biológico

Se recolectaron 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA del grupo control y del grupo de binomio para la extracción de DNA genómico. Posterior al trasplante, en el día 140, adicionalmente se obtuvo 10 ml de sangre periférica a 7 pacientes sin EICH, 6 con EICH y a 5 donadores para la diferenciación de monocitos a macrófagos M1 y M2.

- Extracción de DNA

La extracción del DNA se realizó a partir de células provenientes de 5 ml de sangre periférica, mediante la microtécnica de *salting-out*. La concentración y calidad del DNA obtenido se evaluó por espectrofotometría en un equipo NanoDrop 1000 (*Thermo Fisher*, Waltham, MA, EE. UU.). La integridad del DNA se analizó en un gel de agarosa al 0.8%.

- Selección de SNPs

Se eligieron SNPs asociados previamente a EICH o neoplasias hematológicas, y que su frecuencia alélica correspondía a $\geq 10\%$. Los datos genéticos para cada polimorfismo están descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de polimorfismos estudiados

Gen	SNP	Posición	Cambio
<i>IL1A</i>	rs1800587	-889	G>A
<i>IL6</i>	rs1800795	-174	G>C
<i>IL-10</i>	rs1800872	-592	G>T
<i>IL12A</i>	rs2243123	-1148	T>C
<i>IL18</i>	rs187238	-137	C>G
<i>TNF</i>	rs361525	-238	G>A
<i>TGFB1</i>	rs1800470	+869	A>G

- Genotipificación

La tipificación de los SNPs rs1800587, rs1800795, rs2243123, rs187238, rs361525, rs1800872 y rs1800470 fue realizada mediante discriminación alélica, usando sondas *TaqMan* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EE. UU.). Las condiciones de reacción y de amplificación fueron de acuerdo a la casa comercial. La reacción fue a 25 µl de volumen final que incluyó 12.5 µl de *Master Mix TaqMan® 2X*, 1.25 µl de sonda SNP assay 20X y 11.25 µl de DNA genómico a 20 ng/µl. En cuanto a las condiciones de amplificación fueron 15 seg a 95°C; 15 seg a 95°C, 60 seg a 60°C y 60 seg a 72°C (35 ciclos); y 60 seg a 60°C.

- Purificación de la población de monocitos

Se aislaron células mononucleares por gradiente de densidad celular con *Lymphoprep* (*Axis-Shield*, Oslo, Noruega) a partir de 10 ml de sangre periférica. La población de monocitos totales (CD14⁺⁺/CD16⁻ (clásicos), CD16⁺⁺/CD14⁺ (no clásicos) y CD16⁺/CD14⁺⁺ (intermedios)) se purificó mediante selección inmunogenética negativa, siguiendo las indicaciones del kit *Pan Monocyte Isolation, human* (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Alemania).

- Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos M1 y M2

Los monocitos totales purificados fueron cultivados en placas de 96 pozos a una concentración de 150,000 células por pozo, con medio de cultivo RPMI al 10% de

suero fetal bovino (*HyClone*, Logan, UT, EE. UU.) por seis días a 37°C y 5% de CO₂. Cada tercer día se cambió el medio de cultivo y los factores de crecimiento GM-CSF o M-CSF (*R&D Systems*, Minneapolis, MN, EE. UU.). Desde el día cero, las células se estimularon con GM-CSF o M-CSF, y como control negativo se ocuparon monocitos cultivados únicamente con medio de cultivo. Al día cinco, las células estimuladas con GM-CSF se polarizaron a macrófagos M1 con la adición de IFN- γ (*R&D Systems*, Minneapolis, MN, EE. UU.) y LPS (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 24 horas, mientras que las estimuladas con M-CSF se polarizaron a macrófagos M2 con IL-4 e IL-13 (*R&D Systems*, Minneapolis, MN, EE. UU.) por el mismo tiempo. Los monocitos cultivados sólo con medio RPMI se denominaron macrófagos M0 al término de los seis días. Las células fueron recolectadas en el día seis para la identificación del fenotipo mediante moléculas de superficie y los sobrenadantes del cultivo celular se conservaron para la cuantificación de citocinas.

- Determinación de la expresión de moléculas de superficie en macrófagos

A los macrófagos obtenidos en el día seis del cultivo celular se les realizó tinción de viabilidad con el Kit *Zombie/VioBlue* (*Biolegend*, San Diego, CA, EE. UU.), los cuales fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió con la tinción de moléculas de superficie para la identificación de macrófagos M1 y M2, usando a los macrófagos M0 como control negativo. Los anticuerpos que se ocuparon fueron: anti-CD86-PE, anti-HLA DR-PECy7, anti-CD14-FITC y anti-CD163-APC (*Biolegend*, San Diego, CA, EE. UU.). Cada tipo de macrófago recolectado (M0, M1 y M2) fue teñido con todos los anticuerpos a la vez, incubando a 4°C durante 20 minutos, en seguida, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2%. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo MACSQuant, (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Alemania) para determinar la expresión de moléculas de superficie.

- Cuantificación de citocinas

Al sexto día de cultivo celular, se recolectaron los sobrenadantes de cada pozo de macrófagos M0, M1 y M2 y fueron conservados a -70°C hasta su determinación. Previo a la cuantificación las muestras fueron descongeladas, centrifugadas y se colocaron 25 μl de sobrenadante en cada pozo de la placa. La determinación de IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF α se realizó siguiendo las indicaciones del kit multiplex MILLIPLEX MAP *Human Cytokine* (Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Por otra parte, la determinación de TGF β 1 fue independiente con el kit MILLIPLEX MAP TGF β (Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.).

- Análisis estadístico

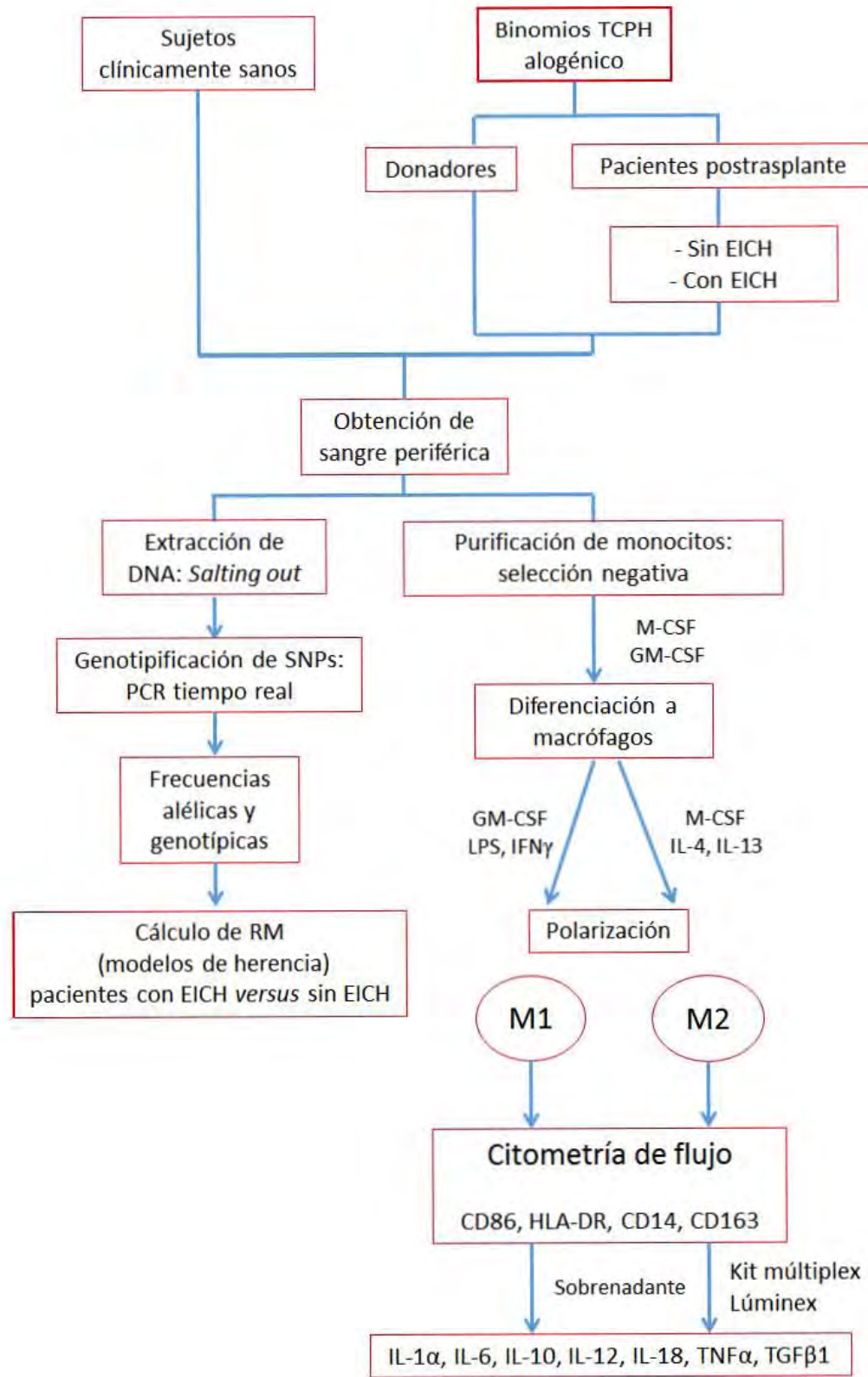
En el análisis de los datos demográficos se realizó estadística descriptiva de las variables con distribución normal con cálculo de medidas de tendencia central (frecuencias, medias y ± 2 desviaciones estándar) y pruebas no paramétricas correspondientes para las variables con libre distribución (mediana y rangos intercuartiles).

El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los grupos de estudio se realizó con el programa SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) mediante regresión logística usando los modelos co-dominante, dominante, recesivo, heterocigoto y aditivo, los cuales se ajustaron por una o más variables con relevancia biológica para la enfermedad, eligiendo aquellas que no modificaran los valores de riesgo con respecto al análisis en crudo. Los modelos finales se ajustaron por género, compatibilidad HLA, compatibilidad de género, acondicionamiento y quimerismo. Los valores de razón de momios (RM) fueron calculados con intervalos de confianza del 95%, y se consideró $p < 0.05$ como resultado estadísticamente significativo. El estudio de asociación para EICH se basó en los valores de RM. Resultados iguales a 1 se consideraron sin afección, $\text{RM} > 1$ se asociaron con susceptibilidad al desarrollo de la EICH, y $\text{RM} < 1$ se relacionaron con menor riesgo para la enfermedad. En los datos demográficos, el análisis de variables categóricas se hizo

usando la prueba de *Chi* cuadrada, mientras que los datos cuantitativos se compararon con la prueba de U Mann-Whitney.

La expresión de moléculas de superficie en macrófagos M0, M1 y M2 entre los diferentes grupos de estudio (pacientes con/sin EICH y donadores) fue analizada con la media geométrica de fluorescencia obtenida con el software *FlowJo* 10.2, mientras la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la cuantificación de citocinas en sobrenadantes fue obtenida con el software *Milliplex Analyst* 5.1. Los resultados de moléculas de superficie como de cuantificación de citocinas fueron analizados con la prueba de ANOVA en el programa *GraphPad Prism* 4.0.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Polimorfismos de un solo nucleótido

- **Controles**

Se obtuvieron 245 muestras de DNA de sujetos clínicamente sanos del Valle de México, y se tipificaron para los SNPs de estudio. El grupo se formó por 172 mujeres y 73 hombres, con media de 42 (± 14) y 33 (± 9) años, respectivamente. En la tabla 4 se muestran los resultados del equilibrio de *Hardy-Weinberg* del grupo control. Las siete variantes génicas cumplieron con el equilibrio.

Tabla 4. Equilibrio de *Hardy-Weinberg* en el grupo de sujetos clínicamente sanos del Valle de México.

SNP	rs1800587	rs1800795	rs1800872	rs2243123	rs187238	rs1800470	rs361525
p	0.30	0.35	0.21	1.0	0.67	0.58	0.22

p= significancia con test *Chi* cuadrada.

Debido a que la población mexicana posee componentes genéticos provenientes de otras poblaciones (europea 31-40% y africana-asiática 3-10%) ⁷², los resultados de las frecuencias alélicas del grupo control de los SNPs estudiados se comparó con las frecuencias de otras poblaciones. En la tabla 5 se muestran las frecuencias alélicas en la población mexicana de los Ángeles, ibéricos (caucásicos), chinos Han (asiáticos) y yorubas (africanos). En efecto, los sujetos del Valle de México fueron muy similares a la población mexicana de los Ángeles, en contraste a la población asiática, de quienes difirieron significativamente en la mayoría de los polimorfismos. Se puede observar que la similitud en las frecuencias alélicas con las poblaciones caucásicas, asiática y africana corresponde al porcentaje de la composición ancestral en la población mexicana.

Tabla 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de estudio en sujetos del Valle de México y otras poblaciones.

	Población mexicana				Población caucásica		Población asiática		Población africana	
	Del Valle de México (n=245)		De los Ángeles (n=64)		Ibérico (n=107)		Chino-Han (n=103)		Yoruba (n=108)	
	n	fa	n	fa	n	fa	n	fa	n	fa
IL1A rs1800587										
G	390	79.6	98	76.6	159	74.3	193	93.7 ^e	122	56.5 ^e
A	100	20.4	30	23.4	55	25.7	13	6.3 ^e	94	43.5 ^e
IL6 rs1800795										
G	450	91.8	111	86.7	139	65.0 ^e	206	100.0	216	100.0
C	40	8.2	17	13.3	75	35.0 ^e	0	0.0	0	0.0
IL10 rs1800872										
G	285	58.2	74	57.8	158	73.8 ^e	53	25.7 ^e	115	53.2
T	205	41.8	54	42.2	56	26.2 ^e	153	74.3 ^e	101	46.8
IL12A rs2243123										
T	290	59.2	86	67.2	171	79.9 ^e	187	90.8 ^e	181	83.8 ^e
C	200	40.8	42	32.8	43	20.1 ^e	19	9.2 ^e	35	16.2 ^e
IL18 rs187238										
C	336	68.6	84	65.6	151	70.6	189	91.7 ^e	172	79.6 ^d
G	154	31.4	44	34.4	63	29.4	17	8.3 ^e	44	20.4 ^d
TNF rs361525										
G	479	97.8	115	89.8 ^e	203	94.9	199	96.6	215	99.5
A	11	2.2	13	10.2 ^e	11	5.1	7	3.4	1	0.5
TGFB1 rs1800470										
G	276	56.3	58	45.3 ^b	90	42.1 ^e	99	48.1 ^a	96	44.4 ^c
A	214	43.7	70	54.7 ^b	124	57.9 ^e	107	51.9 ^a	120	55.6 ^c

Diferencias significativas en frecuencias alélicas de los SNPs de estudio, al comparar a sujetos del Valle de México con otras poblaciones, p =significancia con test *Chi* cuadrada.

^a SNP TGF β 1 +889 G/A diferente entre sujetos del Valle de México y población asiática ($p=0.04$)

^b SNP TGF β 1 +889 G/A diferente entre sujetos del Valle de México y población mexicana de los Ángeles ($p=0.02$)

^c SNP TGF β 1 +889 G/A diferente entre sujetos del Valle de México y población africana ($p=0.003$)

^d SNP IL-18 -137 C/G diferente entre sujetos del Valle de México y población africana ($p=0.002$)

^e Varios SNPs significativamente diferentes entre sujetos del Valle de México y otras poblaciones ($p<0.001$)

Únicamente las frecuencias alélicas de los SNP rs1800470 y rs361525 en sujetos del Valle de México difirieron significativamente de la población mexicana de los Ángeles.

- **Pacientes**

Se estudiaron 77 pacientes que ingresaron a TCPH alogénico, 33 fueron mujeres y 44 hombres, la mediana de edad del grupo de pacientes fue de 34 años, en un rango intercuartil (RI) de 25 a 43 años. En la tabla 6 se describen los datos clínico-demográficos clasificados con base en la presencia de EICH. De la cohorte de estudio, 59 (76.6%) pacientes desarrollaron EICH, con una mediana de edad de 32 años en un RI de 25 a 45 años, el género masculino correspondió a 62.7%, el 74.6% de los pacientes trasplantados fueron por leucemias agudas, y el 13.6% presentó recaída a la enfermedad hematológica original. En cambio, de los 18 pacientes que no desarrollaron EICH (23.4%), la mediana de edad fue de 38 años en un RI de 34 a 41 años, siendo en su mayoría receptores del género femenino (61.1%), 15 pacientes (83.3%) de este grupo se trasplantaron por leucemias agudas, sin embargo, 61.1% de los receptores recayeron. Los datos de recaída fueron comparados estadísticamente entre ambos grupos de pacientes, encontrando a la EICH como factor protector para tal complicación (RM=0.10, IC 95% 0.03 – 0.33, $p<0.001$), este resultado es equiparable con lo reportado en trabajos previos, es decir, a pesar de considerarse un riesgo posterior al trasplante, la EICH es necesaria para evitar la recaída y favorecer la cura oncológica de los pacientes con TCPH.²²

Tabla 6. Datos clínico-demográficos de los pacientes en estudio. Todos recibieron TCPH alogénico y fueron agrupados con base en la presencia de EICH.

	Sin EICH (n=18)	Con EICH (n=59)	Valor p
Edad, años (mediana/rango)	38 / 34-41	32 / 25-45	0.38
Género (%)			0.07
F	11 (61.1)	22 (37.3)	
M	7 (38.9)	37 (62.7)	
Compatibilidad género R/D, (%)			0.27
F/F	6 (33.3)	9 (15.3)	
F/M	5 (27.8)	13 (22.0)	
M/M	4 (22.2)	23 (39.0)	
M/F	3 (16.7)	14 (23.7)	
Diagnóstico (%)			0.72
LMA	8 (44.4)	21 (35.5)	
LLA	7 (38.8)	23 (39.0)	
LMC	0 (0.0)	2 (3.4)	
LLC	0 (0.0)	1 (1.7)	
SMD/SMP	1 (5.6)	5 (8.5)	
Linfoma linfoblástico	0 (0.0)	1 (1.7)	
Anemia aplásica	1 (5.6)	5 (8.5)	
Inmunodeficiencia	1 (5.6)	0 (0.0)	
HPN	0 (0.0)	1 (1.7)	
Acondicionamiento (%)			0.73
Mieloablativo	15 (83.3)	47 (79.7)	
No mieloablativo	3 (16.7)	12 (20.3)	
Compatibilidad HLA (%)			0.85
HLA compatible	17 (94.4)	55 (93.2)	
HLA parcialmente compatible	1 (5.6)	4 (6.8)	
Compatibilidad grupo sanguíneo (%)			0.08
Compatible	16 (88.9)	40 (67.8)	
Incompatible	2 (11.1)	19 (32.2)	
Quimerismo (%)			0.53
Quimera completa	15 (83.3)	45 (76.3)	
Quimera parcial	3 (16.7)	14 (23.7)	
Recaída (%)	11 (61.1)	8 (13.6)	
Dosis células CD34⁺ (x10⁶), (mediana/rango)	4.8 / 3.8 – 7.1	6.6 / 4.6 – 11.0	0.09

R: receptor, D: donador, F: femenino, M: masculino, LMA: leucemia mieloide aguda, LLA: Leucemia linfocítica aguda, LMC: leucemia mieloide crónica, LLC: leucemia linfocítica crónica, SMD: síndrome mielodisplásico, SMP: síndrome mieloproliferativo, HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna.

Los 59 pacientes que desarrollaron EICH se clasificaron con base en el tipo de enfermedad, la EICH aguda se presentó antes del día 100 y la crónica después de este tiempo. Se encontró que 40 (67.8%) de ellos desarrollaron EICH crónico, y los 19 restantes (32.2%) agudo (Figura 5).

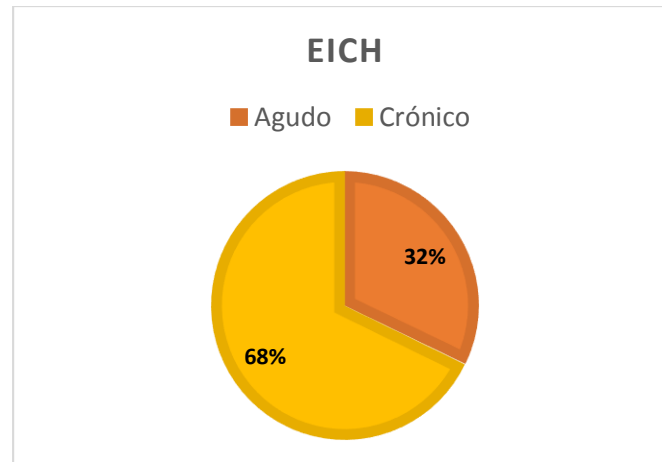


Figura 5. Distribución de pacientes con EICH, con base en su presentación aguda o crónica.
Pacientes con EICH=59: EICH agudo=19. EICH crónico=40.

Frecuencias alélicas

Los SNPs rs1800587, rs1800795, rs2243123, rs187238, rs361525, rs1800872 y rs1800470 se tipificaron en la cohorte de 77 pacientes postrasplante, clasificados de acuerdo con la presencia o ausencia de EICH. En cada grupo se calcularon las frecuencias alélicas y se obtuvieron los valores de razón de momios (RM) para analizar la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de asociación de alelos con EICH.

SNP	Alelo	Sin EICH	EICH	RM (IC 95%)	p
		(n=18) n (fa)	(n=59) n (fa)		
IL1A rs1800587	G	28 (78.0)	90 (76.0)	1.09 (0.45 – 2.66)	0.85
	A	8 (22.0)	28 (24.0)	0.92 (0.38 – 2.24)	
IL6 rs1800795	G	34 (94.0)	105 (89.0)	0.48 (0.10 – 2.21)	0.33
	C	2 (6.0)	13 (11.0)	2.11 (0.45 – 9.80)	
IL10 rs1800872	G	23 (64.0)	68 (58.0)	0.77 (0.36 – 1.66)	0.50
	T	13 (36.0)	50 (42.0)	1.30 (0.60 – 2.82)	
IL12A rs2243123	T	21 (58.0)	71 (60.0)	1.08 (0.51 – 2.30)	0.84
	C	15 (42.0)	47 (40.0)	0.93 (0.43 – 1.98)	
IL18 rs187238	C	28 (78.0)	83 (70.0)	0.68 (0.28 – 1.63)	0.38
	G	8 (22.0)	35 (30.0)	1.48 (0.61 – 3.56)	
TGFB1 rs1800470	G	21 (58.0)	60 (51.0)	0.74 (0.35 – 1.57)	0.43
	A	15 (42.0)	58 (49.0)	1.35 (0.64 – 2.88)	
TNF rs361525	G	35 (97.0)	112 (95.0)	0.53 (0.06 – 4.59)	0.56
	A	1 (3.0)	6 (5.0)	1.88 (0.22 – 16.12)	

fa= frecuencia alélica. RM=razón de momios. IC= intervalo de confianza. p= significancia con test *Chi* cuadrada.

A nivel alélico no se encontraron diferencias entre pacientes con EICH *versus* sin EICH, es decir que en ningún caso poseer un alelo u otro otorgó riesgo o protección.

Frecuencias genotípicas

A nivel genotípico se evaluó el riesgo con RM empleando diferentes modelos de herencia. En la tabla 8 se muestran resultados para los SNPs de citocinas pro-inflamatorias, representativas de macrófagos M1, en los cuales no se encontró asociación con EICH; aun así, los valores de RM fueron ajustados por género, compatibilidad HLA receptor/donador, acondicionamiento, compatibilidad de género receptor/donador y quimerismo.

Tabla 8. Análisis de asociación de genotipos – citocinas pro-inflamatorias – con EICH. Polimorfismos en *IL1A*, *IL6*, *IL12A*, *IL18* y *TNF* en pacientes postrasplante con EICH *versus* sin EICH.

	n (fg)			Modelo	RM (IC 95%)	p
<i>IL1A</i> rs1800587	GG	AG	AA			
Sin EICH (n=18)	10 (55.6)	8 (44.4)	0 (0.0)	Co-dominante	0.78 (0.25 – 2.43)	0.46
EICH (n=59)	33 (55.9)	24 (40.7)	2 (3.4)	Dominante	0.89 (0.29 – 2.70)	0.84
				Recesivo	-	-
				Heterocigoto	0.74 (0.24 – 2.31)	0.61
				Aditivo	1.04 (0.39 – 2.83)	0.93
<i>IL6</i> rs1800795	GG	CG	CC			
Sin EICH (n=18)	16 (88.9)	2 (11.1)	0 (0.0)	Co-dominante	1.67 (0.32 – 8.68)	0.72
EICH (n=59)	47 (79.7)	11 (18.6)	1 (1.7)	Dominante	1.74 (0.34 – 9.05)	0.49
				Recesivo	-	-
				Heterocigoto	1.64 (0.31 – 8.55)	0.54
				Aditivo	1.77 (0.36 – 8.73)	0.46
<i>IL12A</i> rs2243123	TT	CT	CC			
Sin EICH (n=18)	6 (33.3)	9 (50.0)	3 (16.7)	Co-dominante	0.76 (0.22 – 2.69)	0.91
EICH (n=59)	20 (33.9)	31 (52.5)	8 (13.6)	Dominante	0.78 (0.24 – 2.58)	0.68
				Recesivo	0.98 (0.21 – 4.67)	0.98
				Heterocigoto	0.80 (0.26 – 2.52)	0.70
				Aditivo	0.88 (0.39 – 2.00)	0.77
<i>IL18</i> rs187238	CC	CG	GG			
Sin EICH (n=18)	12 (66.7)	4 (22.2)	2 (11.1)	Co-dominante	2.45 (0.67 – 8.88)	0.37
EICH (n=59)	30 (50.8)	23 (39.0)	6 (10.2)	Dominante	2.13 (0.68 – 6.67)	0.19
				Recesivo	1.08 (0.18 – 6.47)	0.93
				Heterocigoto	2.31 (0.65 – 8.18)	0.18
				Aditivo	1.54 (0.65 – 3.64)	0.31
<i>TNF</i> rs361525	GG	AG	AA			
Sin EICH (n=18)	17 (94.4)	1 (5.6)	0 (0.0)	Co-dominante	1.90 (0.16 – 23.32)	0.61
EICH (n=59)	54 (91.5)	4 (6.8)	1 (1.7)	Dominante	2.46 (0.22 – 27.26)	0.44
				Recesivo	-	-
				Heterocigoto	1.87 (0.15 – 23.17)	0.61
				Aditivo	2.43 (0.27 – 21.58)	0.37

Continuación de tabla 8. fg= frecuencia genotípica. RM= razón de momios. IC= intervalo de confianza. p= significancia con test *Chi* cuadrada.

Por otra parte, en la tabla 9 se describen los resultados para los SNPs de citocinas anti-inflamatorias características de macrófagos M2, los cuales tampoco fueron estadísticamente significativos. Los resultados se ajustaron con las variables de género, compatibilidad HLA receptor/donador, acondicionamiento, compatibilidad de género receptor/donador y quimerismo.

Tabla 9. Análisis de asociación de genotipos - citocinas anti-inflamatorias – con EICH. Polimorfismos en *IL10* y *TGFB1* en pacientes postrasplante con EICH *versus* sin EICH.

	n (fg)			Modelo	RM (IC 95%)	p
	GG	GT	TT			
<i>IL10</i> rs1800872						
Sin EICH (n=18)	7 (38.9)	9(50.0)	2 (11.1)	Co-dominante	1.04 (0.31 – 3.54)	0.45
EICH (n=59)	22 (37.3)	24 (40.7)	13 (22.0)	Dominante	1.34 (0.42 – 4.29)	0.63
				Recesivo	2.68 (0.51 – 14.12)	0.21
				Heterocigoto	0.75 (0.25 – 2.28)	0.62
				Aditivo	1.49 (0.67 – 3.32)	0.32
<i>TGFB1</i> rs1800470						
	GG	AG	AA			
Sin EICH (n=18)	5 (27.8)	11 (61.1)	2 (11.1)	Co-dominante	1.05 (0.28 – 3.90)	0.48
EICH (n=59)	15 (25.4)	30 (50.9)	14 (23.7)	Dominante	1.27 (0.35 – 4.59)	0.71
				Recesivo	2.58 (0.50 – 13.37)	0.23
				Heterocigoto	0.70 (0.23 – 2.15)	0.54
				Aditivo	1.52 (0.64 – 3.61)	0.34

fg= frecuencia genotípica. RM= razón de momios. IC= intervalo de confianza. p= significancia con test *Chi* cuadrada.

Aunque no hubo asociaciones significativas, se puede observar que el riesgo y la significancia difieren entre modelos de herencia, por ejemplo, en los SNPs rs1800872 y rs1800470 el valor de *p* fue menor en el modelo recesivo.

Identificación de macrófagos M1 y M2 derivados de monocitos de sangre periférica

La estrategia de análisis consistió en la selección de eventos únicos, excluyendo agregados celulares (Figura 6a), posteriormente se identificó la población mediante los parámetros de tamaño y granularidad (Figura 6b), finalmente se seleccionaron sólo los eventos viables, es decir los negativos al colorante Zombie/vioBlue (Figura 6c).

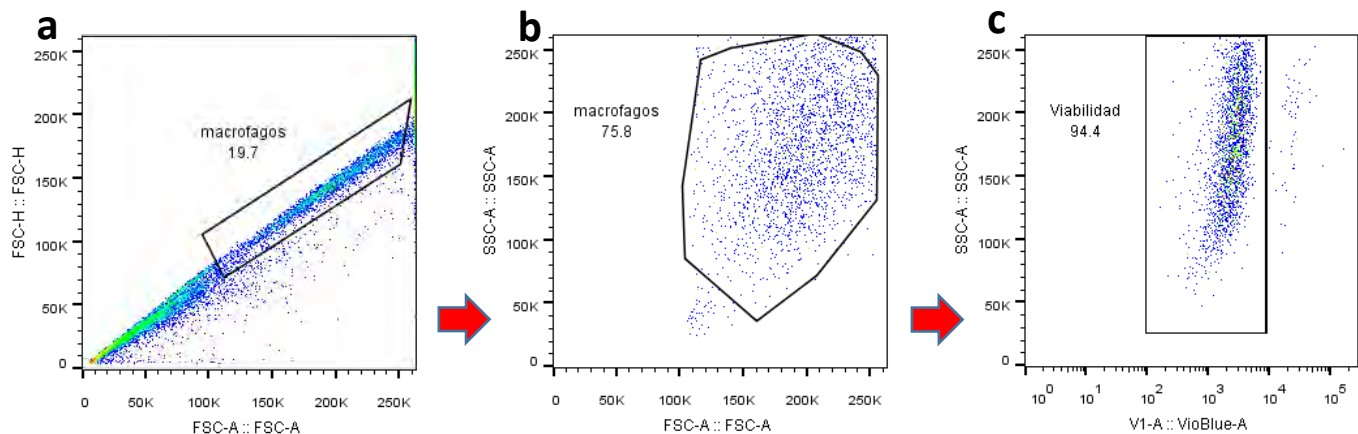


Figura 6. Estrategia de identificación de macrófagos por citometría de flujo. Monocitos totales fueron cultivados durante 6 días con o sin estímulo para obtener los diferentes fenotipos de macrófagos. (a) Gráficos para descartar agregados celulares (FSC-H vs. FSC-A), (b) Identificación de la población (SSC-A vs. FSC-A) y (c) evaluación de viabilidad (SSC-A vs. VioBlue). FSC-H: Forward Scatter Height (Altura). FSC-A: Forward Scatter Area (Tamaño). SSC-A: Side Scatter Area (Granularidad por área). Un experimento representativo de n=5.

La expresión de moléculas de superficie se analizó con las medias geométricas de fluorescencia, a partir de los eventos viables. En los histogramas de fluorescencia (Figura 7) se observó más expresión de CD86 y HLA-DR en macrófagos M1 que en M2, mientras que CD14 y CD163 se expresaron más en macrófagos M2. Los macrófagos M0 también expresaron CD86, CD14 y CD163, pero principalmente HLA-DR.

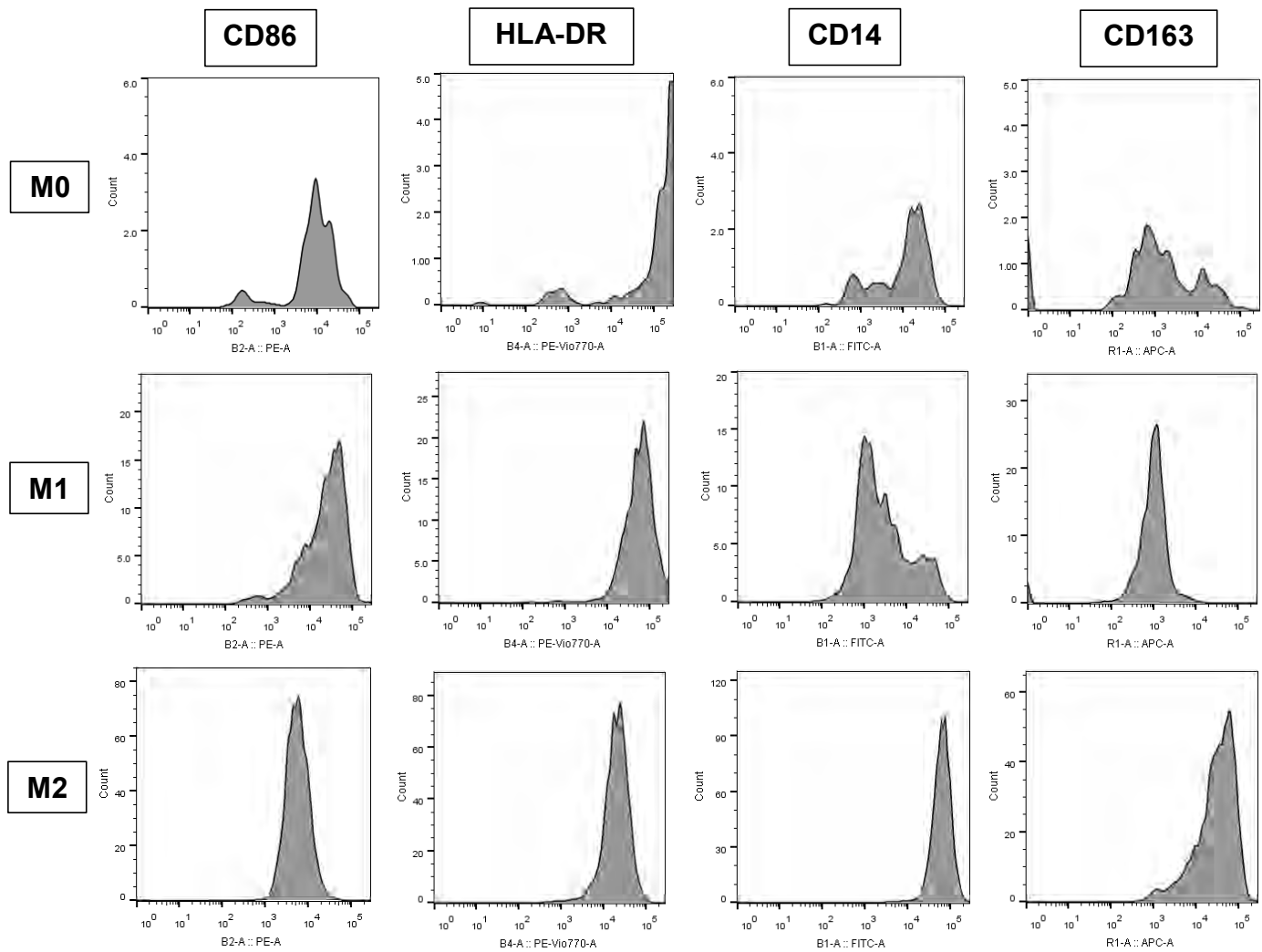


Figura 7. Expresión de moléculas de superficie en macrófagos. Los fenotipos M0, M1 y M2 fueron teñidos con anticuerpos monoclonales humanos anti-CD86/PE, anti-HLA-DR/PECy7, anti-CD14/FITC y anti-CD163/APC. Un experimento representativo de n=5.

- **Caracterización del fenotipo de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica en donadores**

Con la finalidad de evaluar el fenotipo basal de macrófagos en condiciones de no enfermedad, se caracterizaron muestras provenientes de donadores, es decir hermanos (HLA compatibles) de pacientes que recibieron TCPH, todos los macrófagos expresaron CD86, HLA-DR, CD14 y CD163, aunque la expresión de CD86 y HLA-DR fue característica de macrófagos M1, mientras CD14 y CD163 se expresaron principalmente en macrófagos M2, similar a lo encontrado previamente en macrófagos de sujetos sanos *in vitro*⁷⁵⁻⁷⁶. En términos de fluorescencia, se encontró significativamente más expresión de CD86 (Figura 8a) en macrófagos M1 que en M2 (11,203.6 y 2,915, respectivamente, $p=0.02$). La expresión de HLA-DR fue superior en macrófagos M0, seguida de M1 y escasa para M2 (Figura 8b). Así, para CD163 la mayor expresión fue observada en macrófagos M0, seguida por M2 y pobre en M1 (Figura 8d).

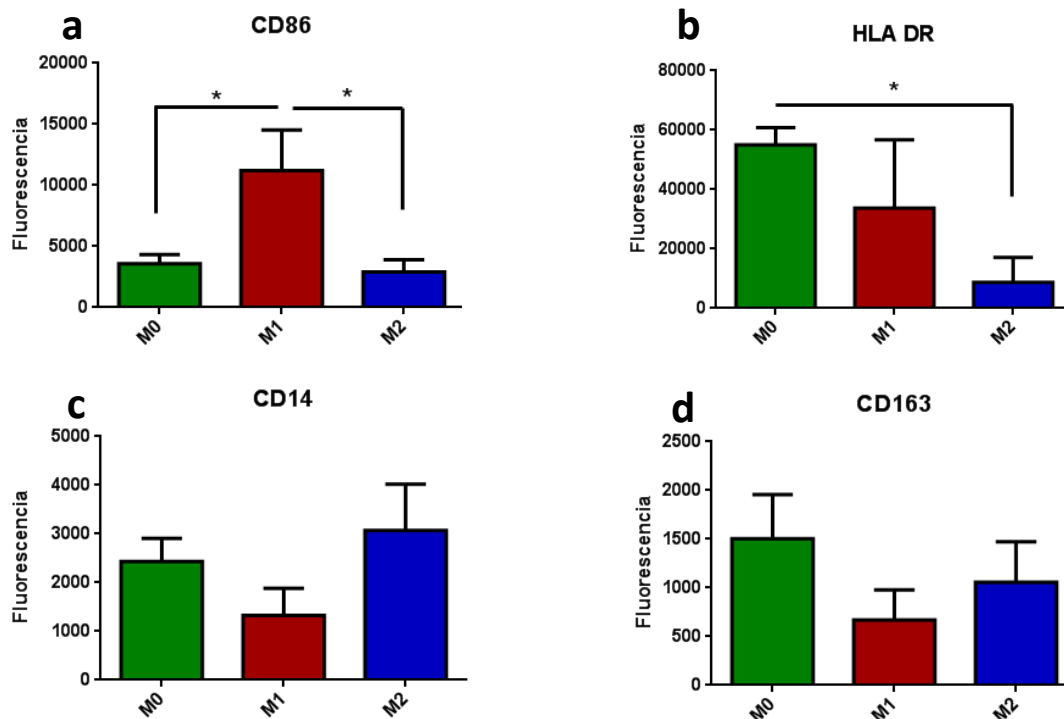


Figura 8. Caracterización del fenotipo de macrófagos obtenidos de monocitos de donadores, clínicamente sanos. (a-b) Marcadores característicos de macrófagos M1, estimulados con GM-CSF, IFN γ y LPS (c-d) Marcadores representativos de macrófagos M2, que se obtuvieron con M-CSF, IL-4 e IL-13. Los macrófagos M0 correspondieron a los cultivados sin estímulo. CD86: * $p=0.02$; HLA-DR: * $p=0.02$. $n=5$. Medias geométricas de fluorescencia \pm error estándar de la media.

Adicionalmente, se analizó la secreción de citocinas en sobrenadantes de cultivo de macrófagos, donde se encontró que IL-1 α , IL-6, IL-12 y TNF α fueron producidas exclusivamente por macrófagos M1 (Figura 9a-d); mientras IL-10 y TGF β , se detectaron tanto en macrófagos M1 como M2 (Figura 9e-f). Por ello, con la finalidad de corroborar el fenotipo M2 (anti-inflamatorio), se cuantificó también IL-4, siendo nula su presencia en macrófagos M1 (Figura 9g). En todos los casos se determinó el perfil de citocinas en sobrenadantes de macrófagos M0 como control negativo.

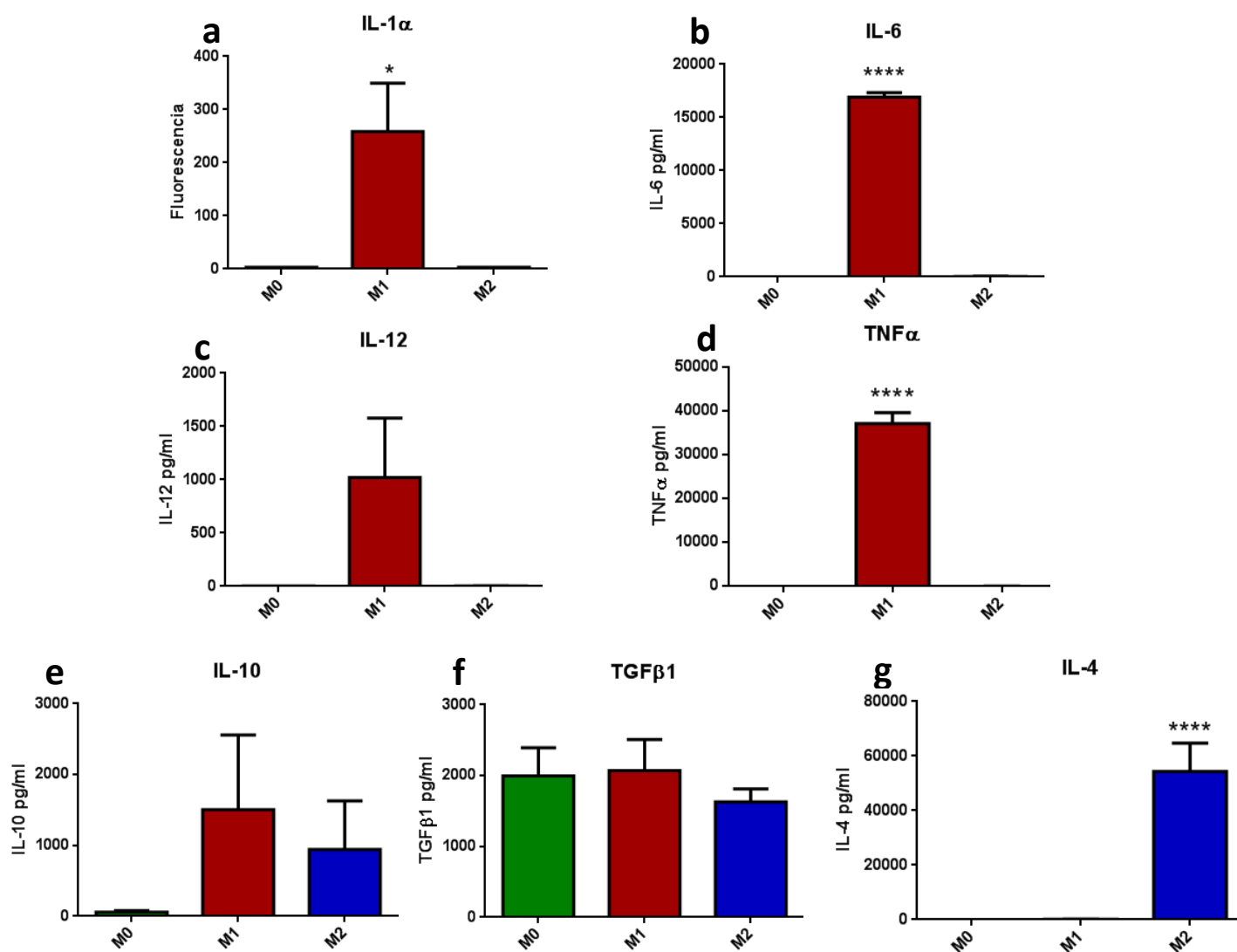


Figura 9. Perfil de citocinas producidas por macrófagos obtenidos de monocitos de donadores. (a-d) Citocinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos M1. (e-f) Citocinas anti-inflamatorias producidas por ambos tipos de macrófagos. (g) IL-4 anti-inflamatoria secretada exclusivamente por macrófagos M2. Los macrófagos M0 se obtuvieron a partir de monocitos sin estímulo. IL-1 α : M1 vs. M0 y M2 *p<0.05; IL-6: M1 vs. M0 y M2 ****p<0.0001; TNF α : M1 vs. M0 y M2 ****p<0.0001; IL-4: M2 vs. M0 y M1 ****p<0.0001. n=5. pg/ml \pm error estándar de la media.

- **Caracterización del fenotipo de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica en pacientes con y sin EICH**

Se determinó el fenotipo de superficie de macrófagos en pacientes con y sin EICH, y se comparó con el observado en donadores. En general, no se encontraron diferencias significativas de expresión entre pacientes y donadores. En los tres grupos de estudio se observó mayor expresión de CD86 en macrófagos M1 (Figura 10a); HLA-DR fue significativamente elevada en macrófagos M0 de donadores ($p < 0.05$) que en pacientes sin EICH y con EICH (Figura 10b). CD14, aunque sin significancia estadística, se expresó más en macrófagos M2 de pacientes con EICH (7,323.8), en comparación a los de sin EICH (3,222.6), seguido por donadores (3,073.5) (Figura 10c). Finalmente, CD163 se expresó más en macrófagos M2 de pacientes con EICH, mientras que en donadores y en pacientes sin EICH no mostró ninguna diferencia (Fig. 10d).

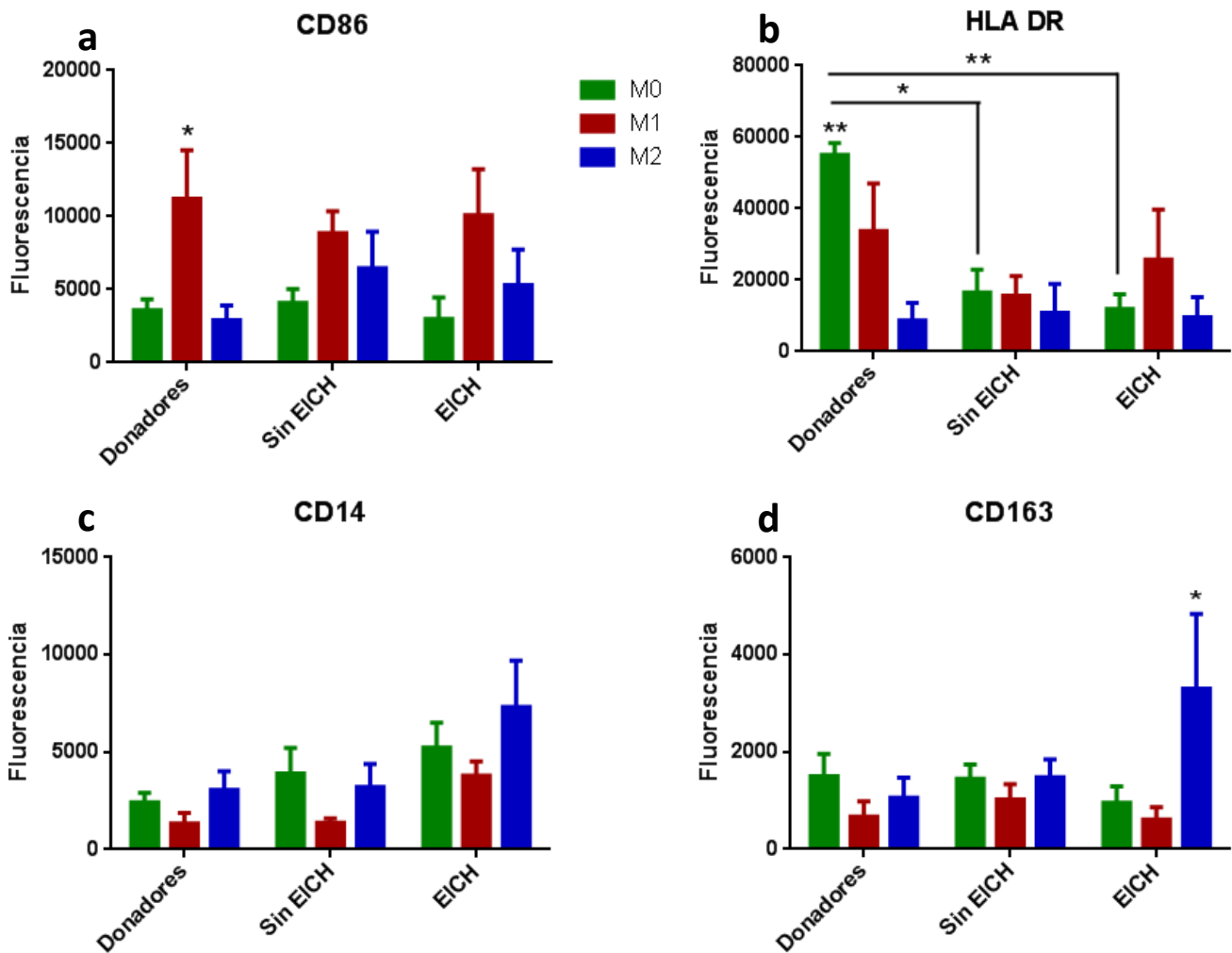


Figura 10. Caracterización del fenotipo de macrófagos en pacientes con y sin EICH. (a-b) Marcadores característicos de macrófagos M1. (c-d) Marcadores representativos de macrófagos M2. Los macrófagos M0 correspondieron a los cultivados sin estímulo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (CD86: donadores M1 vs. M2; HLA-DR: donadores M0 vs. M2; CD163: EICH M2 vs. M0 y M1). Donadores $n=5$. Pacientes sin EICH $n=7$. Pacientes con EICH $n=6$. Medias geométricas de fluorescencia \pm error estándar de la media.

En el perfil de citocinas de pacientes con y sin EICH, macrófagos M1 secretaron principalmente citocinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-6, IL-12 y TNF α ; mientras IL-10 y TGF β fueron detectadas en macrófagos M1 como M2, similar a lo observado en donadores. Al igual que en los donadores, se cuantificó el nivel de IL-4 para corroborar el fenotipo M2 anti-inflamatorio, y en efecto su presencia sólo se detectó en macrófagos M2. Los niveles de IL-1 α fueron significativamente menores en pacientes con EICH en relación con donadores ($p < 0.05$) (Figura 11a). Los macrófagos de pacientes sin EICH produjeron significativamente menores concentraciones de IL-6 y TNF α ($p < 0.0001$, Figura 11b, c); pero secretaron elevada IL-12 en relación a los otros dos grupos (Figura 11d), además, la concentración de estas moléculas fue similar entre donadores y pacientes con EICH. El perfil pro-inflamatorio se amplió con IFN γ , cuyo patrón fue comparable a IL-1 α (Figura 11e). Por otra parte, el perfil de IL-10 y TGF β 1 fue muy similar, en macrófagos M1 mostraron mayor expresión en donadores, seguido de pacientes sin EICH, y finalmente con EICH. Mientras que en macrófagos M2, niveles inferiores de citocina fueron detectados en pacientes sin EICH, en comparación con donadores y pacientes con EICH (Figura 12a, b). Finalmente, la inclusión de IL-4 corroboró el fenotipo anti-inflamatorio de macrófagos M2, su concentración fue baja en sobrenadantes de pacientes sin EICH, además, entre donadores y pacientes con EICH los niveles fueron elevados y muy similares entre sí (Fig. 12c).

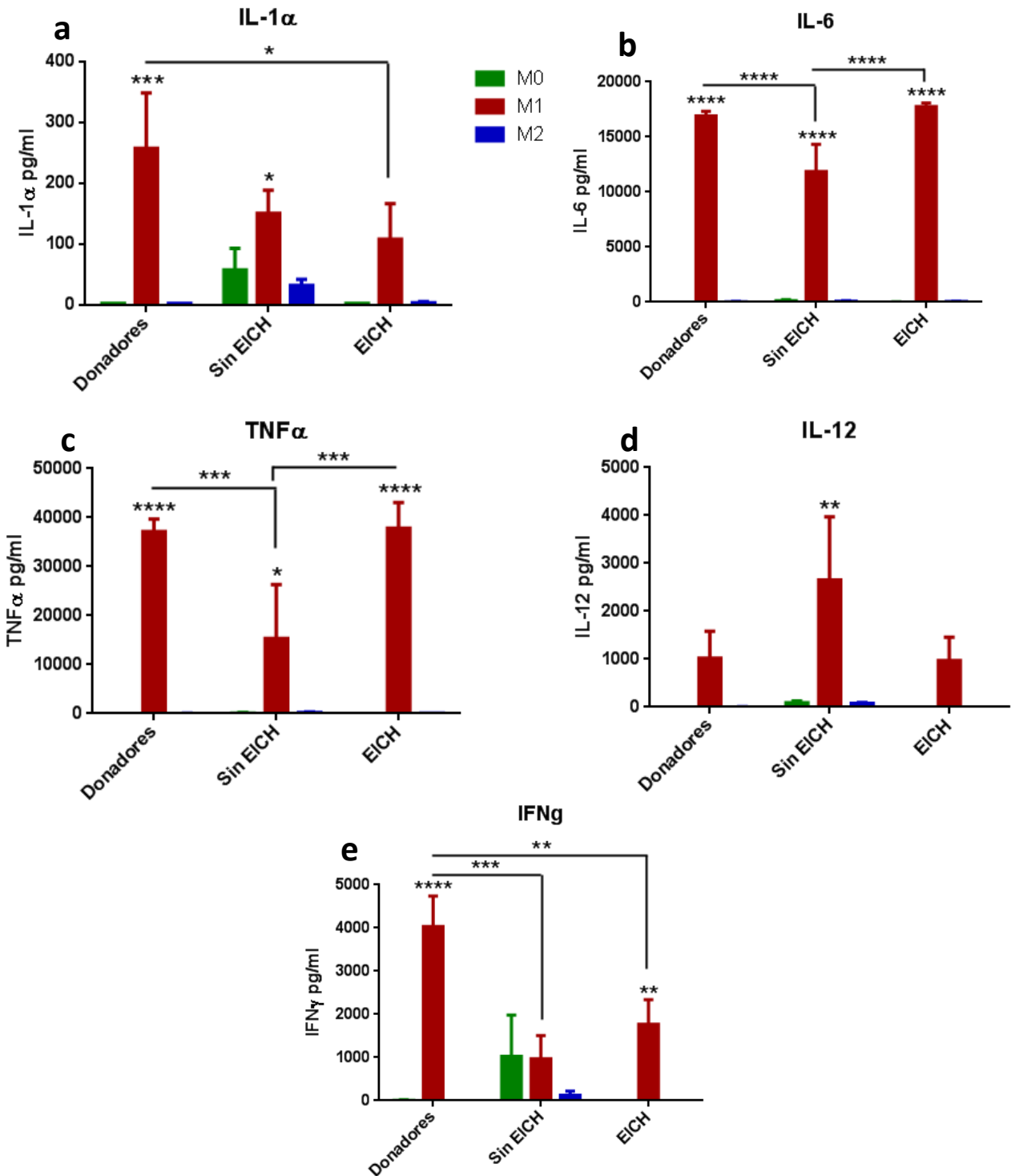


Figura 11. Citocinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos de pacientes con y sin EICH. (a-e) Citocinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos M1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (IL-1 α : donadores M1 vs. M0 y M2, sin EICH M1 vs. M2; IL-6: todos los grupos M1 vs. M0 y M2; TNF α : todos los grupos M1 vs. M0 y M2; IL-12: sin EICH M1 vs. M0 y M2; IFN γ : donadores y EICH M1 vs. M0 y M2). Donadores n=5. Pacientes sin EICH n=7. Pacientes con EICH n=6. pg/ml \pm error estándar de la media.

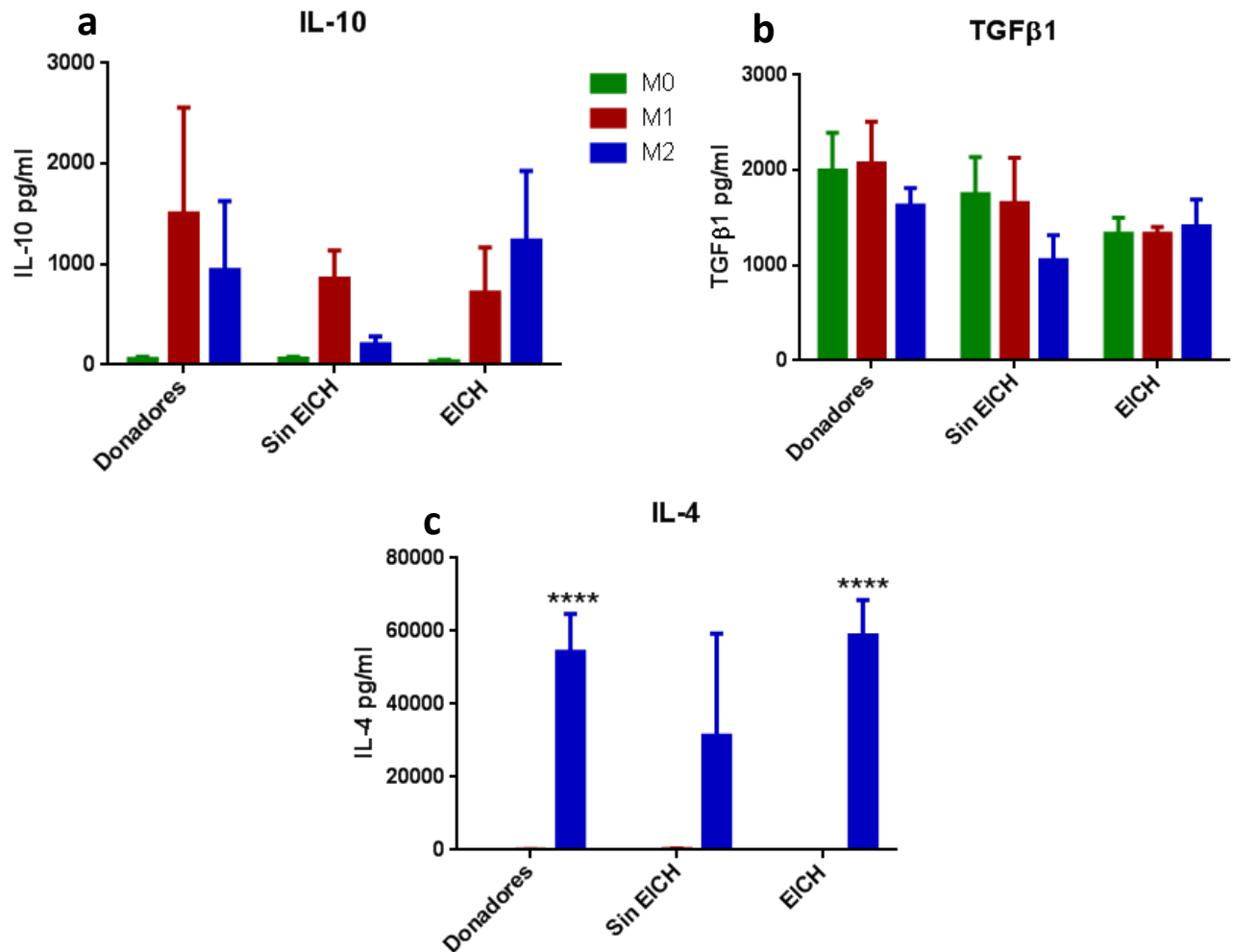


Figura 12. Citocinas anti-inflamatorias producidas por macrófagos de pacientes con y sin EICH. (a-b) Citocinas anti-inflamatorias producidas por ambos tipos de macrófagos. (c) IL-4 detectada exclusivamente en macrófagos M2. Los macrófagos M0 se obtuvieron a partir de monocitos sin estímulo. IL-4: donadores y EICH M2 vs. M0 y M1 **** $p < 0.0001$. Donadores $n=5$. Pacientes sin EICH $n=7$. Pacientes con EICH $n=6$. $\text{pg/ml} \pm$ error estándar de la media.

DISCUSIÓN

La EICH es un riesgo importante en pacientes con TCPH alogénico. En dicho proceso intervienen factores clínico-demográficos como edad, compatibilidad de género, compatibilidad HLA y tipo de acondicionamiento, sin embargo, en este estudio ninguna de esas variables se asoció con la enfermedad (Tabla 5), únicamente podría estar implicado el género, incompatibilidad de grupo sanguíneo y dosis de células CD34+. Los pacientes masculinos fueron más susceptibles a EICH, esto apoya lo publicado previamente, independientemente del género que sea su donador, es probable que algún antígeno menor de histocompatibilidad, codificado exclusivamente en hombres por el cromosoma Y desencadene una respuesta alo-inmune.⁷⁷ La incompatibilidad de grupo ABO es controversial, algunos investigadores reportan que es una variable de riesgo,⁷⁸⁻⁷⁹ mientras otros descartan su implicación en la EICH;⁸⁰ en este trabajo se encontró que la incompatibilidad ABO tiende a aumentar el riesgo de EICH, lo cual podría deberse a que anticuerpos del donador reconocen antígenos A o B localizados en endotelio y epitelio del receptor, promoviendo daño e inflamación.⁷⁸⁻⁷⁹ La dosis de células CD34+ fue mayor en pacientes con EICH, aunque sin ser significativo, sería equiparable con trabajos previos que reportan que es una variable de riesgo, debido a que altas dosis ($>8 \times 10^6$ células/Kg) incrementan el porcentaje de injerto, promoviendo mayor disponibilidad de células para ser activadas,⁸¹⁻⁸² no obstante, para confirmar o descartar las posibles asociaciones con género, incompatibilidad ABO y dosis CD34+ se tendría que aumentar el tamaño de muestra. Existen otros factores que influyen en los pacientes trasplantados para desarrollar EICH, particularmente variantes génicas situadas en mediadores de inflamación, por ejemplo, citocinas del sistema inmunológico innato.⁷⁸⁻⁷⁹

Se sabe que la secuencia del genoma humano es al menos 99.9% idéntica, es decir, sólo existe variación de 0.1% entre individuos, no obstante, es suficiente para que algunas personas sean susceptibles o no a ciertas enfermedades. Las variantes génicas más frecuentes en el genoma son los SNPs.⁶² En este trabajo se estudiaron 7 SNPs: *IL1A* (rs1800587), *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800872), *IL12A* (rs2243123),

IL18 (rs187238), *TNF* (rs361525) y *TGFB1* (rs1800470); se eligieron aquellos que pudieran ser funcionales debido a su ubicación en región promotora o exón. La mayoría de ellos se asoció previamente con la EICH. En población caucásica y asiática los SNPs rs1800587, rs1800795, rs1800872, rs187238 y rs361525 se asociaron con riesgo,^{65, 83, 84} mientras que rs1800470 fue un factor de protección en población asiática.^{64, 66, 70} En población africana, el SNP rs361525 se asoció con riesgo.⁸³ Finalmente, el polimorfismo rs2243123 no había sido estudiado anteriormente en otras poblaciones. Sin embargo, en nuestra cohorte de pacientes ningún SNP se asoció con la EICH (Tablas 6-8), es decir, que portar un alelo u otro, así como diferentes genotipos, incluso analizados por modelos de herencia, no confiere susceptibilidad ni protección. Estos resultados se deben a que la constitución genética de nuestra población, en términos de frecuencia alélica, varía con respecto a la de otras poblaciones (Tabla 4), por lo tanto, es diferente la participación de los SNPs sobre el desarrollo de la enfermedad. Los SNPs estudiados se eligieron en genes de citocinas que involucradas en modular la capacidad inmunológica del injerto en contra del huésped, específicamente estas citocinas se relacionan con la respuesta de macrófagos M1 y M2, los cuales, se especula que participan en el inicio, amplificación y eliminación del proceso inflamatorio en la EICH. IL-1 α , IL-6, IL-12A, IL-18 y TNF α son pro-inflamatorias y características de macrófagos M1, mientras IL-10 y TGF β 1 se relacionan con macrófagos M2 por ser anti-inflamatorias.⁸³

Con el fin de analizar su producción en macrófagos M1 y M2, así como su relación con la EICH, en principio se evaluó el fenotipo de macrófagos mediante moléculas de superficie, en todos los análisis se incluyó un grupo de donadores (hermanos de pacientes trasplantados, HLA compatibles) como medida basal. CD86 fue distintivo de macrófagos M1 tanto en pacientes como donadores (Figura 10a), lo que indica su función coestimuladora para activar linfocitos T, similar a lo reportado en la literatura.⁸³ En cambio, HLA-DR se expresó significativamente más en donadores que en pacientes, particularmente en macrófagos M0 y M1 (Figura 10b); esta molécula se encuentra en todas las APC profesionales,⁸⁷ por lo tanto, el resultado podría indicar una diferencia en la capacidad de presentar antígenos entre células

de donadores y pacientes. Por otro lado, en todos los grupos la expresión de CD14 y CD163 fue mayor en macrófagos M2 (Figura 10c, d); la presencia de CD14 en macrófagos de sujetos sanos ha sido controversial, algunos autores reportan que es propia del fenotipo M1 por ser correceptor de TLR4 en el reconocimiento de LPS,⁸⁸ sin embargo, su expresión en macrófagos M2 podría explicarse porque es un receptor que se asocia con fagocitosis de células apoptóticas,⁸⁹ actividad característica del fenotipo M2. En cambio, CD163 es un receptor tipo *scavenger* que se asoció con macrófagos M2, similar a lo reportado anteriormente.³⁴ Una vez caracterizado el fenotipo de superficie, se procedió a determinar el perfil de citocinas; en pacientes y donadores la secreción en macrófagos M1 fue básicamente de carácter pro-inflamatorio, mientras que en M2 se detectaron citocinas tanto pro, como anti-inflamatorias, esto concuerda con lo publicado por otros autores.^{34, 85} IL-1 α e IFN γ (Figura 11a, e) mostraron perfiles similares: las células de pacientes con y sin EICH produjeron menor citocina que lo detectado en donadores, esto podría ser efecto de la inmunosupresión, cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de algunas citocinas a nivel transcripcional.^{90, 91} Por otra parte, elevadas concentraciones de IL-6 y TNF α se asociaron con EICH (Figura 11b, c), además, se sugiere que las células de pacientes con EICH en relación a pacientes sin EICH son más competentes para desencadenar inflamación, ya que sus niveles fueron similares a lo detectado en donadores, es decir, entre más competentes sean los macrófagos, es más probable desarrollar EICH. Se sabe que IL-6 y TNF α son estables durante 48 h en sobrenadantes de cultivo,^{92, 93} por lo tanto, es poco probable que lo cuantificado en pacientes sin EICH sea por efecto de degradación. En contraste, la elevada concentración de IL-12 podría ser un factor protector para EICH (Figura 11d), debido a que esta citocina también posee propiedades anti-inflamatorias,⁹⁴ o a que de forma dosis-dependiente es capaz de inducir sobreexpresión de Fas en linfocitos T CD4+ y CD8+, ocasionándoles apoptosis,⁹⁵ por lo tanto, habría menos células aloreactivas para desencadenar enfermedad. Interesantemente, el perfil de IL-12 fue inverso al de IL-6 y TNF α . Al respecto, TNF α se ha considerado un potente inhibidor a nivel transcripcional de la subunidad IL-12 p40;⁹⁶ un mecanismo similar podría tener IL-6 sobre la expresión

de IL-12. Con base en ello, se sugiere que los macrófagos de pacientes con EICH, altamente capaces de producir TNF α , inhiben la producción de IL-12 haciendo que se encuentren susceptibles o poco protegidos para desarrollar la enfermedad. Por otra parte, en todos los grupos las moléculas anti-inflamatorias IL-10 y TGF β 1 fueron secretadas por macrófagos M2, sin embargo, también por macrófagos M1 (Figura 11f, g), esto es debido a que su plasticidad les permite modificar su fenotipo de acuerdo a su microambiente, en este caso, la elevada concentración de TNF α en sobrenadantes de macrófagos M1 pudo haber desencadenado un balance, induciendo la síntesis simultánea de citocinas anti-inflamatorias, de hecho recientemente se reportó que TNF α , incluso el LPS están involucrados en la inducción de IL-10 a nivel transcripcional en monocitos estimulados *in vitro*.⁹⁷ Una vez presente IL-10 en los sobrenadantes pudo estimular la síntesis de TGF β 1. Particularmente, la producción de IL-10 y TGF β 1 en macrófagos M1 fue ligeramente mayor en pacientes sin EICH; esto podría indicar que a pesar de su estímulo pro-inflamatorio, tienen más capacidad o predisposición para la respuesta anti-inflamatoria, lo que contribuye a que no presenten la enfermedad. En cambio, la secreción de IL-10 y TGF β 1 en macrófagos M2 fue mayor en pacientes con EICH, es decir, que ante un estímulo anti-inflamatorio, sus células son capaces de responder adecuadamente, como lo hacen los macrófagos M2 de donadores, sugiriendo que las células de pacientes con EICH son más eficientes para regular procesos inflamatorios.

Finalmente, se midió la concentración de IL-4 para confirmar el fenotipo M2 (Figura 11h), se observó que niveles elevados se asocian con el desarrollo de la enfermedad, aunque podría ser indicio de la diferente funcionalidad celular para responder ante determinados estímulos. En resumen, existe marcada diferencia en los perfiles de citocinas entre los grupos de estudio, un dato importante es que los macrófagos M1 y M2 de pacientes con EICH son más pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, respectivamente, en comparación a los de sujetos sin EICH. Además, los macrófagos M1 y M2 de pacientes con la enfermedad son funcionales, ya que en general responden a estímulos dados, similar a los donadores. En cambio, al parecer las células de pacientes sin la enfermedad son menos eficientes para

producir citocinas, incluso al ser estimuladas con moléculas pro-inflamatorias (macrófagos M1), conservan la expresión de citocinas anti-inflamatorias. Estos hallazgos de expresión podrían ser debidos a diferencias en variantes génicas entre pacientes.

Los SNPs estudiados en este trabajo no tuvieron implicación en la enfermedad, incluso se hizo un análisis para relacionar genotipos con concentración de citocinas (datos no mostrados), aunque el tamaño de muestra limitó la parte estadística, descriptivamente al parecer ningún genotipo influye en el nivel de proteína. Sin embargo, es probable que otros SNPs o haplotipos regulen la expresión de estas moléculas, y así participen en el desarrollo de EICH.

CONCLUSIONES

- La presencia de polimorfismos en *IL1A* (rs1800587), *IL6* (rs1800795), *IL12A* (rs2243123), *IL18* (rs187238), *TNF* (rs361525), *IL10* (rs1800872) y *TGFB1* (rs1800470) no se encuentran asociados con susceptibilidad o protección a EICH.
- Los macrófagos M1 de pacientes con EICH expresan significativamente más IL-6 y TNF α . Además, su perfil de expresión de citocinas en general es similar al de donadores clínicamente sanos, lo cual sugiere que los macrófagos son igual de inmunocompetentes para responder a estímulos pro- y anti-inflamatorios, característica que no se observa en células provenientes de pacientes libres de EICH.

PERSPECTIVAS

Existen diferencias en la expresión de citocinas pro-inflamatorias por macrófagos M1 entre pacientes trasplantados con y sin desarrollo de EICH, particularmente en IL-6, TNF α e IL-12, esto sugiere la importante participación de estas células en la EICH. La variación en la expresión de tales citocinas podría ser atribuida a polimorfismos presentes en dichos genes, para averiguarlo sería necesario aumentar el número de muestras en cultivo, con el fin de estudiar estadísticamente la relación entre SNP y concentración de citocina, incluso ampliar el número de SNPs permitiría analizar esta relación a nivel de haplotipos; además, sería adecuado medir su expresión relativa a nivel de mRNA.

Por otra parte, resultaría interesante cuantificar las mismas citocinas en suero de pacientes con y sin EICH, con el objetivo de corroborar que su expresión sea un efecto propiamente biológico de la enfermedad. Adicionalmente, se podría asegurar la participación de macrófagos M1 y M2 mediante un estudio donde se analice su infiltrado en biopsias de pacientes con la enfermedad.

Finalmente, aunque en este trabajo no fue posible cuantificar IL-18, es necesario considerar su estudio, ya que es una citocina que podría tener importante participación en la enfermedad debido a sus funciones inmunológicas pro-inflamatorias.

LITERATURA CITADA

1. Oliveros JW, Sandoval C, Cires RS, Blum MA, Tafur AJ. Trasplante de células hematopoyéticas. *Medicina*. 2003; 9(2): 174-185.
2. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med*. 1939; 13: 357-367.
3. Li HW, Sykes M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12(6): 403-416.
4. Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol*. 2010; 3(3): 285-299.
5. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyésis. *Cancerología*. 2007; 2: 95-107.
6. Mayani H. The regulation of hematopoietic stem cell populations. *F1000 Res*. 2016; 5:1-6.
7. Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I. Células troncales y medicina regenerativa. *PUIS UNAM*. 2012; pp. 357.
8. Rifón JJ. Trasplante de progenitores hematopoyéticos. *An Sist Sanit Navar*. 2006; 29 (Supl. 2): 137-152.
9. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T. *EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation*. 6a ed. Paris: ESH European School of Haematology. 2012; pp. 665.
10. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, *et al*. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15: 1628-1633.
11. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014; 124(3): 344-353.
12. Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, de Lima M, *et al*. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004; 10: 178-185.
13. Ruutu T. Engraftment. *EBMT*. 2011; pp. 27
14. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2012; 19(4): 324-335.
15. Haniffa M, Ginhoux F, Wang XN, Bigley V, Abel M, Dimmick I, *et al*. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 2009; 206(2): 371-385.
16. Reshef R, Hexner EO, Loren AW, Frey NV, Stadtmauer EA, Luger SM, *et al*. Early donor chimerism levels predict relapse and survival after allogeneic stem-cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20(11): 1758-1766.
17. Tang X, Alatrash G, Ning J, Jakher H, Stafford P, Zope M, *et al*. Increasing chimerism following allogeneic stem cell transplantation is associated with longer survival time. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20(8): 1139-1144.
18. Protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Hospital Infantil de México Federico Gómez: Departamento de Oncología Pediátrica. 2011.
19. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por Citomegalovirus en la edad pediátrica. México: Secretaría de Salud, 2012.
20. Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens*. 2013; 81(4): 183-193.

21. Cruz CR, Bollard CM. T-cell and natural killer cell therapies for hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: enhancing the graft-versus-leukemia effect. *Haematol.* 2015; 100(6): 709-719.
22. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Whiterspoon RP, Fefer A, Fisher L, *et al.* Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood.* 1989; 73(6): 1720-1728.
23. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(2): 101-117.
24. Choi SW, Levine JE, Farrara J. Pathogenesis and management of graft *versus* host disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010; 30(1): 75-101.
25. Heidegger S, van den Brink MRM, Haas T, Poeck H. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2014; 5(337): 1-7.
26. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Gutiérrez-Aguirre CH, Jaime-Pérez JC. Trasplante no mieloablativo de células progenitoras hematopoyéticas. Mitos y realidades. *Revista de Investigación Clínica.* 2005; 57(2): 291-297.
27. Beirana A, Pérez DA, Franco A. Enfermedad injerto contra hospedero. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 2000; 9(2): 74-80.
28. Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol.* 2013; 4(163): 1-9.
29. Foley JE, Mariotti J, Ryan K, Eckhaus M, Fowler DH. Th2 cell therapy of established acute graft-versus-host disease requires IL-4 and IL-10 and is abrogated by IL-2 or host-type-antigen-presenting-cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(9): 959-972.
30. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, *et al.* The biology of chronic graft-versus-host disease: a task force report from the national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017; 23: 211-234.
31. BMJ Best practice [Internet]. BMJ publishing group. Criterios de diagnóstico: enfermedad de injerto contra huésped. [citado 15 de abril de 2015]. Disponible en: <http://es.bp.api.bmj.com/best-practice/monograph/946/diagnosis/criteria.html>
32. Acute and chronic graft-versus-host disease. Boston: Hospital Physician Hematology Board Review Manual. 2008.
33. Giraldo M, Ossa JE. Reacción de injerto versus huésped: de la comprensión a la utilización de un fenómeno biológico. *Iatreia.* 1999; 12(1): 27-37.
34. Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Front Immunol.* 2015; 6(212): 212.
35. Provan D, Baglin T, Dokal I, de Vos J. Manual de hematología clínica. 4ª ed. Barcelona: Elsevier; 2017.
36. Martínez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 1-13.
37. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 164: 6166-6173.
38. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015; 15: 1-14.
39. Greenblatt MB, Vbranac V, Tivey T, Tsang K, Tager AM, Aliprantis AO. Graft *versus* host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model. *Plos One.* 2012; 7(9): 1-9.

40. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor α during Graft-Versus-Host-Disease. *J Exp Med*. 1992; 175: 405-413.
41. Facon T, Jouet JP, Noel-Walter MP, Bloget F, Bauters F, Janin A. Involvement of TNF-alpha secreting macrophages in lethal forms of human graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20(6): 511-515.
42. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JLM. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. 1997; 90(8): 3204-3213.
43. Alexander KA, Flynn R, Lineburg KE, Kuns RD, Teal BE, Olver SD, *et al*. CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2014; 124(10): 4266-4280.
44. Nishiwaki S, Terakura S, Ito M, Goto T, Seto A, Watanabe K, *et al*. Impact of macrophage infiltration of skin lesions on survival after allogeneic stem cell transplantation: a clue to refractory graft-versus-host disease. *Blood*. 2009; 114(14): 3113-3116.
45. Hashimoto D, Chow A, Greter M, Saenger Y, Kwan WH, Leboeuf M, *et al*. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med*. 2011; 208(5): 1069-1082.
46. Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Terakura S, Saito S, *et al*. Dexamethasone palmitate ameliorates macrophages-rich graft-versus-host disease by inhibiting macrophage functions. *Plos One*. 2014; 9(5): 1-7.
47. Cheng Q, Ma S, Lin D, Mei Y, Gong H, Lei L, *et al*. The S1P1 receptor-selective agonist CYM-5442 reduces the severity of acute GVHD by inhibiting macrophage recruitment. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12(6): 681-691.
48. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 8^a ed. Barcelona: Elsevier; 2015.
49. Pavón L, Jiménez MC, Garcés ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. México: LWW; 2016.
50. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(5): 878-888.
51. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 2013; 4(289): 1-10.
52. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, *et al*. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(1): 93-97.
53. Min CK, Lee WY, Min DJ, Lee DG, Kim YJ, Park YH, *et al*. The kinetics of circulating including IL-6, TNF- α , IL-18, and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 28(10): 935-940.
54. Henden AS, Hill GR. Cytokines in graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2015; 194: 4604-4612.
55. Levine JE. Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*. 2011; 93(5): 571-577.
56. Tawara I, Koyama M, Liu C, Toubai T, Thomas D, Evers R, *et al*. Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(1): 77-88.
57. Yabe M, Yabe H, Hattori K, Shimizu T, Matsumoto M, Morimoto T, *et al*. Role of interleukin-12 in the development of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24(1): 29-34.

58. Reddy V, Winer AG, Eksioglu E, Meier-Kriesche HU, Schold JD, Wingard JR. Interleukin 12 is associated with reduced relapse without increased incidence of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11(12): 1014-1021.
59. Liu J, Zhang XG, Lu DP. Correlation between serum levels of IL-18 and acute graft versus host disease in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2007; 15(3): 553-557.
60. Tawara I, Sun Y, Liu C, Toubai T, Nieves E, Evers R, *et al.* Donor-but not host-derived interleukin-10 contributes to the regulation of experimental graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol.* 2012; 91(4): 667-675.
61. Kyrz-Krzemiń S, Helbig G, Zielinska P, Markiewicz M. The kinetics of mRNA transforming growth factor beta1 expression and its serum concentration in graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemias. *Med Sci Monit.* 2011; 17(6): CR322-328.
62. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcon G, Tovilla-Zárate, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Méd Méx.* 2013; 149: 220-228.
63. Prokunina L, Alarcón-Riquelme ME. Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation. *Expert Rev Mol Med.* 2004; 6(10): 1-15.
64. Noori-Dalooi MR, Jalilian N, Izadi P, Sobhani M, Rabii-Gilani Z, Yekaninejad MS. Cytokine gene polymorphism and graft-versus-host-disease: a survey in Iranian bone marrow transplanted patients. *Mol Biol Rep.* 2013; 40(8): 4861-4867.
65. Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PRA, Jackson JH, Middleton PG. Interferon- γ and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host-disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2001; 98(5): 1594-1600.
66. Cai X, Song A, Wang H, Zhang P, Zhang G, Yang F, *et al.* IL-18 single nucleotide polymorphisms in hematologic malignancies with HLA matched sibling donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014; 35(3): 215-20.
67. Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SB, Vigorito AC, *et al.* IL-2 and TNF α gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host-disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol.* 2007; 66(6): 703-710.
68. Cho IH, Song YK, Kim MG, Han N, Kim T, Oh JM. Association between interleukin-10 promoter gene polymorphisms and acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Hematology.* 2015; 20(3): 121-128.
69. Lin MT, Storer B, Martin PG, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, *et al.* Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host-disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003; 349(23): 2201-2210.
70. Zhang L, Mao L, Xu J. Transforming growth factor- β 1 polymorphisms and graft-versus-host disease risk: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2016; 7(3): 2455-2461.
71. Noori-Dalooi MR, Rashidi-Nezhad A, Izadi P, Hossein-Nezhad A, Sobhani M, Derakhshandeh-Peykar P, *et al.* Transforming growth factor- β 1 codon 10 polymorphism is associated with acute GVHD after allogeneic BMT in Iranian population. *Ann Transplant.* 2007; 12(4): 5-10.
72. Rubi-Catellanos R, Martínez-Cortés G, Muñoz-Valle JF, González-Martín A, Cerdas-Flores RM, Anaya-Palafox M. *et al.* Pre-hispanic mesoamerican demography

- approximates the present-day ancestry of mestizos throughout the territory of Mexico. *Am J Phys Anthropol.* 2009; 139(3): 284-294.
73. Nordlander A, Mattson J, Ringdén O, Leblanc K, Gustafsson B, Ljungman P, *et al.* Graft versus host disease is associated with a lower relapse incidence after hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004; 10(3): 195-203.
 74. Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C, *et al.* Impact of graft versus host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia.* 2012; 26: 2462-2468.
 75. Zhang YH, He M, Wang Y, Liao AH. Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy. *Front Immunol.* 2017; 8(120): 1-12.
 76. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *Plos One.* 2013; 8(11): 8-11.
 77. Kim HT, Zhang MJ, Woolfrey AN, Martin AS, Chen J, Saber W, *et al.* Donor and recipient sex in allogeneic stem cell transplantation: what really matters. *Haematologica.* 2016; 101(10): 1260-1266.
 78. Stussi G, Muntwyler J, Passweg JR, Seebach L, Schanz U, Gmur J, *et al.* Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30: 87-93.
 79. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeboller H, Rosenmayr A, Fischer GF, Faé I, *et al.* Minor ABO-mismatches are risk factors for acute graft versus host disease in hematopoietic stem cell transplant patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15(11): 1400-1406.
 80. Blin N, Traineau R, Houssin S, Peffault de Latour R, Petropoulou A, Robin M, *et al.* Impact of donor-recipient major ABO mismatch on allogeneic transplantation outcome according to stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: 1315-1323.
 81. Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, Heimfeld S, Chauncey TR, Zaucha R, *et al.* CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft versus host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood.* 2001; 98(12): 3221-3227.
 82. Sohn SK, Kim JG, Kim DH, Lee NY, Suh JS, Lee KB. Impact of transplanted CD34+ cell dose in allogeneic unmanipulated peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 967-972.
 83. Martin PJ, Fan W, Storer BE, Levine DM, Zhao LP, Warren EH, *et al.* Replication of associations between genetic polymorphisms and chronic graft versus host disease. *Blood.* 2016; 128(20): 2450-2456.
 84. Hyvarinen K, Ritari J, Koskela S, Niittyvuopio R, Nihtinen A, Volin L, *et al.* Genetic polymorphism related to monocyte-macrophage function is associated with graft versus host disease. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1-10.
 85. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014; 5(491): 1-12.
 86. Woldai S. The role of CD80 and CD86 in macrophage activation and its regulation following LPS stimulation. [Tesis maestría]. Ottawa, Canada: Microbiology and Immunology, University of Ottawa; 2014.

87. Ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. MHC class II antigen presentation by dendritic cell regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(12): 1-21.
88. Da Silva TA, Zorzetto-Fernandes ALV, Cecílio NT, Sardinha-Silva A, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1-14.
89. Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler WH, Gregory CD. CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ.* 2003; 10(3): 371-382.
90. Nelson PA, Kawamura A, Akselband Y, Peattie DA, Aldape RA, Harding MW. Effect of immunosuppressive drugs on cytokine gene transcription studied by message amplification phenotyping (MAPPING) polymerase chain reaction. *Transplant Proc.* 1991; 23(6): 2867-2869.
91. Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediated by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol.* 1993; 43(2): 176-182.
92. DeForge LE, Remick DG. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 174(1): 18-24.
93. Lonnemann G, Endres S, Van der Meer JWM, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA. Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 1989; 19: 1531-1536.
94. Chang HD, Radbruch A. The pro- and anti-inflammatory potential of interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1109: 40-46.
95. Dey BR, Yang YG, Szot GL, Pearson DA, Sykes M. Interleukin-12 inhibits graft versus host disease through a Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion. *Blood.* 1998; 91(9): 3315-3322.
96. Ma X, Sun J, Papasavvas E, Riemann H, Robertson S, Marshall J, *et al.* Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J Immunol.* 2000; 164: 1722-1729.
97. Shmarina GV, Pukhalsky AL, Kokarovtseva SN, Pukhalskaya DA, Shabalova LA, Kapranov NI, *et al.* Tumor necrosis factor- α /interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children. *Mediators Inflamm.* 2001; 10(4): 191-197.