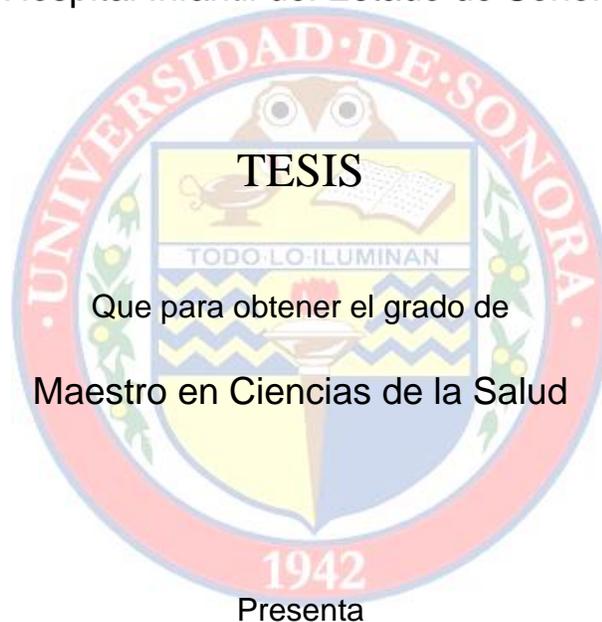


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“Determinación de la Recuperación Inmune Celular en Niños
Post-tratados con Antineoplásicos en Fase de Vigilancia que Asisten
al Hospital Infantil del Estado de Sonora”



Q.B. Ana Gloria Andrade Arteaga

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



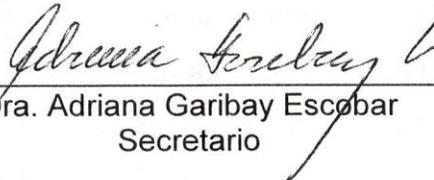
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

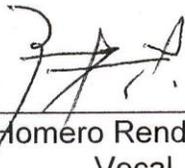
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de C. Q.B. Ana Gloria Andrade Arteaga, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



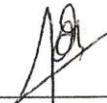
Dr. Gilberto Covarrubias Espinoza
Director Académico



Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dr. Homero Rendón García
Vocal



Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Suplente

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Durante el tiempo que estuve trabajando en obtener mi grado de Maestría, son muchas las personas que se cruzaron por mi camino y que participaron de manera directa o indirecta con la única finalidad de completar exitosamente el presente trabajo, es por ello que les expreso la mayor gratitud por todo el apoyo y confianza que depositaron en mí a todos los personajes de mi historia.

Iniciaré por agradecer **a Dios**, por permitirme llegar hasta donde estoy.

A mi familia, a **mis padres** y a **mi hijo** por su paciencia, por ser gran pilar en mi vida, apoyándome siempre de manera incondicional y por ser de los principales impulsores para que alcanzara un logro más en mi vida, junto con mis amigas: **Rosy Lerma, Lucila Rascón, Loren López, Aída Chaparro** por apoyarme siempre, especialmente a **Margarita Gutierrez Verduzco** por acompañarme y encarrilarme en esta vía desde el principio; a mi comadre **Rosa Estela Fraga Serrano**, por haber depositado en mí toda su confianza desde aquel momento que creyó en mi capacidad para ingresar al Alma Mater y proporcionarme medios y espacios incondicionalmente también para la realización del presente trabajo. Todos Ustedes se confabularon para empujarme y que iniciara este camino que hoy culmino.

Agradezco al Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, en particular, al que en su momento era el Jefe, el **Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda** y a la actual Jefa del Departamento, la **Dra. Adriana Garibay Escobar** (una de mis apreciadas sinodales) por su total apoyo desde el momento en que decidí ingresar al posgrado, por las facilidades otorgadas para la obtención de todos los permisos y financiamiento necesarios para lograrlo, en lo anterior y en lo sucesivo.

Agradezco infinitamente a mi director de Tesis, una muy apreciada persona, que hace honor a su profesión, el **Dr. Gilberto Covarrubias Espinoza** por haberme dado parte de su tiempo, conocimiento, confianza y apoyo total desde ese día que fui buscando un tema de tesis para la realización del presente trabajo.

Así mismo al **Dr. Homero Rendón García**, apreciado sinodal, por todo el tiempo que me proporcionó a pesar de sus múltiples ocupaciones, porque fue su idea la realización del presente trabajo y por todas sus sugerencias para mejorarlo, por el respaldo que siempre me ha proporcionado y por compartir su sabiduría.

Agradecimiento especial a la **Dra. Olivia Valenzuela Antelo**, también apreciada sinodal, por su valiosa participación en el desarrollo del presente trabajo y por su apoyo incondicional.

Al **equipo de oncología del HIES**, particularmente a la **Dra. Tania Larios**, por ayudarme y por estar al pendiente en lo relativo a la captación de casos; así mismo, agradezco muy especialmente a la **Enfermera Irma Zazueta** por su apoyo en la toma de muestras; al **Dr. Adrián Morales y a Claudia** por su buen humor, amable disposición, por todas sus atenciones y a todos ellos por su amistad.

Al **Servicio de Medicina Interna del HIES** por la captación y toma de muestra de los pacientes control, especialmente al **Dr. Jorge Bernardo Elizondo**, a la **Dra. Irma Lucía Jaramillo**, a la **Dra. Emma García**, así mismo al **Servicio de Alergología** especialmente al **Dr. Jorge Huerta**.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de inmunología: **David Ortega, Paola Gastélum, Ana Laura, Alejandro Urrea, Judith** que siempre estuvieron listos para prestarme su ayuda, por escucharme y aguantarme cuando ocupaba sus espacios y por su paciencia cuando me enseñaron a usar el citómetro de flujo.

Mi más sincero agradecimiento a **Q.B. Josefina López Pérez**, mi comadre, que, por formar parte del Servicio de Laboratorio Clínico del HIES, siempre estuvo dispuesta a ayudarme en todo lo referente al procesamiento de muestras y resultados oportunos.

Agradecimiento especial al departamento de inmunología del Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en particular a la **Dra. Verónica Mata**, por las facilidades otorgadas para el uso del citómetro de flujo en momentos necesarios.

Por supuestísimo mi gran agradecimiento a todos los **niños** que participaron como **caso o control y a sus padres** por confiar en mí, por haberme permitido ingresar en sus vidas para hacer realidad este trabajo, ya que sin ellos, definitivamente éste no hubiera sido posible.

A todos los que se me escapan y que de alguna manera aportaron un “granito” al presente trabajo...como dice un viejo y conocido refrán: “un grano no hace granero pero ayuda al compañero”.

DEDICATORIAS

Al que es mi motivación, causante de mi anhelo de salir adelante, para progresar y culminar con éxito esta tesis: **a tí Saith**, te dedico cada esfuerzo que realicé, agradezco infinitamente a Dios por darme tan hermosa y paciente compañía y ser mi motivación para ser cada día mejor.

Con todo mi cariño para las personas que siempre han hecho todo en su vida para que yo pueda lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano siempre, a ustedes, **mamá y papá**, por siempre mi agradecimiento.

Este también es logro de ustedes...

INDICE DE CONTENIDO

Lista de tablas	I
Lista de figuras	II
Objetivo general	IV
Objetivos particulares	IV
Resumen	V
Introducción	1
Antecedentes	4
Epidemiología	4
Tipos de cáncer más frecuentes en niños	7
Principios del tratamiento del cáncer infantil	8
Cirugía oncológica	9
Radioterapia	9
Quimioterapia	10
Bases cinéticas de la quimioterapia antineoplásica	11
Antineoplásicos	13
Sistema Inmune	16
Respuesta inmune del huésped frente a tumores	16
Mecanismos efectores de la actividad antitumoral	18
Células T	20
Células B	22
Células NK	24
Efectos inmunológicos del cáncer y la terapia del cáncer	27
Recuperación inmune en niños post-quimioterapia	28
Citometría de flujo	31
Fundamento de la citometría de flujo	32
Marcadores celulares	33

Materiales y métodos	38
Diseño del estudio	38
Consideraciones éticas	38
Consentimiento informado	38
Población y muestra	38
Muestreo	38
Tamaño de muestra	38
Criterios de inclusión	39
Casos	39
Controles	39
Criterios de exclusión	39
Criterios de eliminación	39
Variables	40
Metodología	40
Preparación de las muestras	40
Análisis citométrico	42
Análisis estadístico	44
Resultados	45
Características de los pacientes caso	46
Características de los pacientes control	46
Cuantificación celular	48
Discusión	58
Conclusiones	63
Recomendaciones	64
Limitaciones	64
Bibliografía	65
Anexos	71
I. Consentimiento Informado Para Paciente Caso	71
II. Consentimiento Informado Para Paciente Control	75

LISTA DE TABLAS

Tabla.		Página
I	Incidencia de cáncer en el Hospital infantil del Estado de Sonora (HIES) 1979-2009.	6
II	Quimioterapéuticos antineoplásicos más usados en el HIES.	12
III	Variables que se incluyeron en la investigación.	41
IV	Características de los niños del grupo de casos para el estudio de recuperación inmune en fase de vigilancia.	47
V	Características de los niños del grupo control para el estudio de recuperación inmune celular.	49
VI	Evaluación estadística del conteo de glóbulos blancos, leucocitos totales y subpoblaciones linfocitarias: CD3+, CD19+ y CD16+ tanto de casos como de controles.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura.		Página
1	Mecanismo de acción de fármacos antineoplásicos comúnmente usados en el tratamiento del cáncer infantil.	15
2	Células del sistema inmune.	17
3	Teoría de la inmunoeedición de tumores.	19
4	Respuesta de linfocitos T citolíticos frente a células tumorales.	21
5	Respuesta de linfocitos T cooperadores frente a células tumorales.	23
6	Respuesta de linfocitos NK frente a células tumorales.	26
7	Distribución de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de seres humanos.	35
8	Subpoblaciones de células NK humanas funcionalmente distintas	37
9	Representación del establecimiento de las regiones de las subpoblaciones linfocitarias CD3+, CD19+ y CD16+ para su estimación por citometría de flujo.	43
10	Recuperación inmune de leucocitos totales en el primer semestre de la fase de vigilancia de casos (n=7) vs controles (n=7).	50
11	Recuperación inmune en el grupo de casos con base en la cuenta de linfocitos totales en el primer semestre de la fase de vigilancia (n=7).	53
12	Recuperación inmune de casos (n=7) vs controles (n=7) con base en la cuenta de linfocitos T (CD3+) en el primer semestre de la fase de vigilancia.	54

13	Recuperación inmune en el grupo de casos, con base en la cuenta de linfocitos B durante el primer semestre de la fase de vigilancia (n=7).	55
14	Recuperación inmune de casos (n=7) vs controles (n=7) con base en la cuenta de linfocitos NK durante el primer semestre de la fase de vigilancia-	56
15	Recuperación inmune en el grupo de casos, con base en la cuenta de linfocitos NK durante el primer semestre de la fase de vigilancia.	57

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la recuperación inmune por citometría de flujo de células T (CD3⁺), B (CD19⁺) y NK (CD16⁺) en niños con cáncer tratados con antineoplásicos del Hospital Infantil del Estado de Sonora durante el primer semestre de la fase de vigilancia.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Cuantificar las células (linfocitos T, B y NK) por citometría hemática completa y por citometría de flujo empleando marcadores celulares CD3⁺, CD19⁺ y CD16⁺; al inicio, a los tres meses y al término del primer semestre de la fase de vigilancia.
2. Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células (linfocitos T, B y NK) evaluadas al inicio, a los tres meses y al término del primer semestre de la fase de vigilancia.

RESUMEN

Introducción. Recuperación inmune es el proceso de reconstitución de las células perdidas después de la exposición a altas dosis de tratamiento citotóxico en dependencia predominantemente de los elementos linfoides. **Justificación.** La predisposición a infecciones oportunistas o a complicaciones posteriores nos dirigió a caracterizar una población infantil para conocer cómo progresa la recuperación inmune celular post-tratamiento antineoplásico. No existen registros similares en nuestra región. **Objetivo.** Evaluar la recuperación inmune por citometría de flujo de células T (CD3⁺), B (CD19⁺) y NK (CD16⁺) en niños con cáncer tratados con antineoplásicos del Hospital Infantil del Estado de Sonora en el primer semestre de la fase de vigilancia. **Metodología.** Estudio de casos y controles de tipo no experimental, descriptivo, con muestreo no probabilístico de niños que asisten al HIES, previo consentimiento informado. Se investigó la recuperación inmune de leucocitos, particularmente subpoblaciones linfocitarias de niños caso con cáncer, que completaron su esquema de tratamiento antineoplásico y entraron en fase de vigilancia pareados por edad y género con niños control sin cáncer, con enfermedad crónica, tratados con inmunosupresores. **Resultados.** Al inicio de la fase de vigilancia, la mayoría de los pacientes mostraron leucocitos totales, linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias afectadas en número cuya recuperación se evidenció rápidamente excepto las células T. Como hallazgo se reportó que los pacientes que no presentaron recuperación inmune de linfocitos totales ni de linfocitos T (CD3⁺) en el primer trimestre en vigilancia, presentaron recaída de la enfermedad. **Conclusiones.** La reconstitución inmune celular de linfocitos T resultó ser más afectada que la de células B y NK en niños con cáncer tratados con antineoplásicos en el primer semestre de la fase de vigilancia.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es un complejo de órganos, tejidos, células, genes y moléculas de cuyo funcionamiento correcto depende la salud y la vida de los seres humanos (Abbas y col, 2004). Gran parte de las células y moléculas relacionadas con dicho sistema circula por sangre venosa y arterial, de modo que cualquier alteración de estos componentes se refleja en trastornos hematológicos (Miller y col., 2010).

El sistema inmunológico desempeña la función más importante en la respuesta a las enfermedades. Un sistema tan complejo como éste, involucra a muchos componentes. Tradicionalmente, el sistema inmunológico humano se divide en dos categorías principales: el sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico adaptativo. Ambas categorías se comunican entre ellas a través de citocinas, quimiocinas y otros mecanismos de señalización de células y de unión a receptor para coordinar una respuesta contra las enfermedades (Kelley y col., 2007).

La inmunidad innata comprende la barrera protectora formada por superficies epiteliales, inflamación, liberación de péptidos y proteínas (como el complemento) y la fagocitosis. En este sentido se identifican dos componentes celulares: el sistema fagocítico, cuya función es ingerir y destruir los microorganismos invasores. Dentro de los fagocitos se encuentran los neutrófilos, los monocitos (en la sangre) y los macrófagos (en los tejidos). Por otro lado, están las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés: "Natural Killer"), cuya función es destruir células infectadas por virus y células tumorales (James y col., 2007). Con respecto a la inmunidad adaptativa, es específica y adquirida de respuestas inmunológicas e involucra el desarrollo de linfocitos expandidos clonalmente. En este sentido se identifican las células T y las células B (Murphy y col, 2008).

Todas y cada una de las células de nuestro cuerpo están rigurosamente controladas en lo que se refiere al crecimiento, interacción con otras células y su ciclo vital. El cáncer ocurre cuando hay células que han perdido estos mecanismos normales de control y crece de una forma que el cuerpo no puede controlar. Estas

células dan lugar a clonas que pueden alcanzar un tamaño considerable con producción de un tumor o neoplasia (Miller y col., 2010).

El cáncer por sí mismo, como enfermedad invasiva, se ha encontrado que suprime la actividad de varias células involucradas en la respuesta inmune. Sin embargo, los tratamientos convencionales contra el cáncer (cirugía, radioterapia y quimioterapia) alteran la función inmune en diferentes grados durante el curso del tratamiento (Workman ML., 1989).

El tratamiento convencional del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas. La cirugía y radioterapia cumplen su objetivo de tratamiento cuando las células tumorales se encuentran puntualmente localizadas. Por el contrario, cuando éstas se han diseminado desde su lugar de origen, éstos métodos van perdiendo eficacia por lo que se requiere un procedimiento que destruya las células cancerosas donde sea que se encuentren. Aquí es donde se recurre a la quimioterapia (Maglioco, 2011).

El mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos antineoplásicos inciden sobre macromoléculas vitales para células malignas pero también sobre células sanas. A pesar de ello, la quimioterapia antineoplásica tiene un papel crítico en el tratamiento del cáncer infantil (Pizzo y col., 2004).

Un efecto secundario del uso de antineoplásicos a una edad temprana es la inmunosupresión profunda que persiste durante el tratamiento completo y después de su término (Jarosz y col, 2009). La inmunosupresión asociada a la neoplasia maligna subyacente y a la quimioterapia afecta la cantidad, calidad y función de células T, células B y células NK (Azburg, 2009).

La recuperación inmune se lleva a cabo gradualmente y el espectro de infecciones sufridas por el paciente refleja las diferentes etapas de la restauración de las defensas inmunitarias (Olkinuora y col, 2013). En el seguimiento es esencial observar la recuperación del sistema inmune ya que la inmunosupresión puede predisponer a los pacientes a infección a veces fatal o a complicaciones malignas secundarias (Katz y col, 1987).

Aunque se ha evidenciado en varios reportes de las alteraciones en la función inmune que se producen en los pacientes con cáncer mientras están recibiendo las diferentes fases de tratamiento: inducción a la remisión, consolidación, intensificación y mantenimiento, hay muy poca información documentada con respecto a la reconstitución inmune durante la fase de vigilancia a nivel mundial y nula a nivel nacional (Caver y col., 1998; Mustafá y col., 1998; Kostaridou y col., 2004; Ek y col., 2005; Mazur y col., 2006; Jarosz y col., 2009).

ANTECEDENTES

Los progresos obtenidos en la segunda mitad del siglo XX en el diagnóstico, tratamiento y curación de las enfermedades malignas del niño y del adolescente constituyen uno de los logros más significativos en el campo de la oncología. El retinoblastoma y el tumor de Wilms fueron los primeros tumores malignos que pudieron curarse con cirugía. La radioterapia, una técnica ya aplicada desde los años 30, solo logró, en la década del 50 al 60, curación de Linfoma de Hodgkin en sus etapas iniciales. La quimioterapia comenzó a desarrollarse en la década del 50 logrando mejorar las posibilidades de curación al ejercer una acción generalizada en todo el organismo, por lo cual resultó eficaz en los cánceres hematológicos, que desde el inicio comprometen todo o gran parte del organismo, y también contribuyó a disminuir las recaídas que se producían por metástasis microscópicas a distancia (no evidenciables clínicamente) de los tumores sólidos tratados sólo con cirugía (Vargas, 2000).

Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Se prevé que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 (pasará de 7.9 millones a 11.5 millones de defunciones), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que al año se detectan cerca de 160 mil casos nuevos de esta enfermedad en niños del mundo. Mueren cerca de 90 mil menores de 15 años de edad cada año (CeNSIA, 2010).

Los tipos de cáncer que padecen los niños son diferentes a los que padecen comúnmente los adultos. A diferencia del cáncer de adultos, en el que el consumo de tabaco, el exceso de peso, la obesidad y la inactividad física son causas conocidas que se pueden prevenir, el cáncer en la infancia y la adolescencia no se entiende bien. Algunas de las causas de los cánceres de la infancia incluyen cambios genéticos que se transmiten de padres a hijos, exposición a la radiación e infecciones debidas a ciertos virus. Por razones que aún no se entienden claramente, algunos cánceres infantiles son más comunes en los países desarrollados y otros en los países en vías de desarrollo (SAC, 2011).

En niños, las principales causas de muerte son accidentes (de tránsito de vehículos de motor), tumores malignos (leucemias) y malformaciones congénitas del sistema circulatorio. El cáncer infantil es la principal causa de muerte por enfermedad en mexicanos entre 5 y 14 años de edad, conforme a las cifras preliminares 2013 reportadas en el Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (SEED) (CeNSIA, 2010).

En México, se estima que existen anualmente 7mil casos nuevos de cáncer en menores de 18 años. Entre los que destacan principalmente las leucemias, que representan el 52% del total de los casos; linfomas el 10% y los tumores del sistema nervioso central el 10%. La sobrevivencia estimada en México es del 56% del diagnóstico. La razón de Incidencia de casos de cáncer es de 9 casos por 100 mil menores de 18 años para población no derechohabiente en la República Mexicana (OMS, 2013).

El Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) atendió a 981 menores de 18 años de edad, en el periodo de 1979 al 2009, tal como se muestra en la tabla 1, con diversos tipos de cáncer, de los cuales un 70 por ciento lograron sobrevivir. Se reciben entre 60 y 70 niños nuevos al año y actualmente hay cerca de 120 en tratamiento.

Tabla I. Incidencia de cáncer en el Hospital infantil del Estado de Sonora (HIES) 1979-2009

n=981		
Padecimiento	Casos	Porcentaje
Leucemias	394	40
Linfomas	149	15
Tumores de sistema nervioso central	101	10
Sarcomas de partes blandas	81	8
Tumores óseos	53	5
Tumor de Wilms	48	4
Histiocitosis de células de Langerhans	38	3
Retinoblastoma	31	3
Neuroblastoma	23	2
Tumores de gónadas	30	3
Tumores de hígado	7	0.7
Otros	26	2.

Fuente: Registro de casos del Hospital Infantil del Estado de Sonora

Tipos de Cáncer más Frecuentes en los Niños

El cáncer en la infancia se clasifica como neoplasias hematológicas (leucemias y linfomas) y como tumores sólidos (tumores cerebrales, neuroblastoma, tumor de Wilms, hepatoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de Ewing y retinoblastoma). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su reporte de cáncer de 2008, señala que, por tipo, la leucemia es la primera en incidencia; los casos de niños con leucemia son más frecuentes si las madres fumaron, ingirieron bebidas alcohólicas o consumieron drogas durante el embarazo. Se señala que los tumores que le siguen a las leucemias en frecuencia son los linfomas y los tumores del sistema nervioso central (SNC), la frecuencia de presentación varía según el país, y el grupo de edad. La leucemia es el cáncer más frecuente en la infancia y existen varios tipos, de los cuales, el más frecuente en niños de 2 a 8 años es la leucemia linfoblástica aguda. Los tumores del sistema nervioso pueden ocurrir desde el nacimiento (CeNSIA, 2010).

Al realizar un análisis de los casos atendidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora de 1979 al 2009, se observa que los cánceres más frecuentes son, como se muestra en la Tabla 1, las leucemias, seguida por los linfomas, tumores del SNC y los sarcomas de partes blandas. Dentro de las leucemias el diagnóstico más frecuente es la leucemia linfoblástica aguda; de los linfomas, el más frecuente es el Linfoma de Hodgkin, seguido del linfoma no Hodgkin; Respecto a los Tumores de SNC el más frecuente es el astrocitoma, el meduloblastoma, el glioma y el tumor neuroectodérmico primitivo; de los sarcomas de partes blandas el más frecuente es el Rabdomiosarcoma (datos del registro del Servicio de oncología del HIES, 2013).

Principios del Tratamiento de Cáncer Infantil

El objetivo primario del tratamiento del cáncer es erradicar la enfermedad. Si este objetivo no puede lograrse, el segundo es la paliación, la disminución de los síntomas y la conservación de la calidad de vida al tiempo que se intenta prolongarla. Los tratamientos del cáncer se dividen en cuatro grupos principales: cirugía, radioterapia, quimioterapia y bioterapia. Estas modalidades se utilizan a menudo en combinación y los fármacos que pertenecen a una categoría actúan por diversos mecanismos. La cirugía y la radioterapia se consideran tratamientos locales, aunque sus efectos pueden influir en el comportamiento tumoral en lugares distantes. La quimioterapia y la bioterapia suelen ser tratamientos sistémicos (Longo y col., 2013).

La actividad de la quimioterapia y radioterapia en el organismo generan destrucción de células cancerígenas, pero a su vez destruye células normales, provocando inmunosupresión en el paciente tratado. Cuando el tumor está localizado y es de tamaño pequeño, es probable que la cirugía y a veces la radioterapia, alcancen muy buenos resultados por sí solas. La quimioterapia por sí sola puede ser eficaz para un pequeño número de tipos de cáncer, que por lo general puede considerarse que están diseminadas desde el principio. Una modalidad de tratamiento combinado requiere la estrecha colaboración de todo un equipo de atención oncológica (OMS, 2013). Desgraciadamente la mayoría de los tratamientos eficaces conllevan toxicidad y efectos colaterales que es necesario conocer para adoptar medidas que conlleven a minimizarlos (Vargas, 2000).

Cirugía Oncológica

La cirugía se utiliza para la prevención, diagnóstico, estadificación, tratamiento, paliación y rehabilitación del cáncer (Longo y col., 2013). La cirugía curativa es la forma más antigua de tratamiento antineoplásico eficaz y requiere que el tumor se encuentre localizado o que tenga una diseminación localizada limitada, lo cual permite una resección en bloque. En las situaciones en que no pueda llevarse a cabo una resección en bloque, la politerapia con radioterapia, quimioterapia o quimiorradiación puede reducir el tamaño del cáncer, haciéndolo susceptible de ser curado mediante resección quirúrgica (Beers y col, 2005).

Radioterapia

La radioterapia utiliza la radiación para combatir el cáncer. La radiación es una forma física de tratamiento que daña todos los tejidos a su paso; su selectividad por células neoplásicas quizá se deba a defectos en la capacidad de estas células para reparar DNA con daño subletal y otros trastornos. La radiación ocasiona roturas en el DNA y genera radicales libres a partir del agua celular que pueden lesionar membranas, proteínas y organelos de las células. El daño por radiación depende del oxígeno y las células hipóxicas son más resistentes (Longo y col., 2013).

La radioterapia proporciona un control paliativo importante del cáncer, incluso cuando no es posible la curación. Por ejemplo, en los tumores cerebrales, prolonga la capacidad funcional del paciente; en los cánceres que provocan compresión medular, puede eliminar las deficiencias neurológicas y en las metástasis sintomáticas o dolorosas, suele controlar los síntomas (Beers y col, 2005).

La radioterapia, a pesar de ser un procedimiento muy útil en numerosas neoplasias ya que proporciona tasas elevadas de control local tumoral de la zona tratada (tumores cerebrales, sarcomas, retinoblastoma, tumor de Wilms, leucemias y linfomas como método profiláctico de compromiso tumoral del sistema nervioso central), las secuelas que produce en los tejidos en crecimiento así como también, a largo plazo, la aparición de segundos tumores, ha obligado a disminuir dosis o a prescindir de esta técnica en algunas circunstancias (Vargas, 2000).

Quimioterapia

La oncología médica es la subespecialidad dentro de la medicina interna que atiende y diseña los métodos para el tratamiento de pacientes con cáncer. En términos generales, la posibilidad de curar un tumor tiene relación inversa con su volumen y directa con la dosis de fármacos (Longo y col., 2013).

La quimioterapia se introdujo a fines de la década del 40 por Goodman y Gilman y por Farber y es uno de los pilares del tratamiento del cáncer infantil. Actualmente hay en uso más de 30 medicamentos aprobados internacionalmente (Vargas, 2000).

La quimioterapia está basada en la capacidad del fármaco para generar citotoxicidad de las células neoplásicas; es la primera elección en el caso de tumores diseminados, en los cuales la cirugía y la radioterapia tienen poca efectividad, tales como, tumores hematológicos y algunos linfomas y tumores sólidos, con el propósito de curar o prolongar la vida del paciente (De Vita, 2000). Los tumores avanzados que se consideran curables con los fármacos quimioterapéuticos en niños son: leucemia linfocítica aguda infantil, enfermedad de Hodgkin, algunos tipos de linfoma no Hodgkin, otras neoplasias (tumor de Wilms, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma) (Longo y col., 2013).

Bases cinéticas de la quimioterapia antineoplásica. Durante los últimos 50 años, el tratamiento antineoplásico ha tenido importantes avances en supervivencia prolongada libre de enfermedad a través de los avances de la biología del cáncer, el desarrollo tecnológico y la identificación de fármacos activos fundamentales. Los nuevos fármacos o asociaciones de diferentes drogas pueden introducirse secuencialmente en el tratamiento oncológico de pacientes con cáncer según el estadio de la enfermedad. Pueden seleccionarse diferentes opciones de tratamiento para cada tumor de acuerdo con la fase específica de la enfermedad (Ricevuto y col, 2010).

El objetivo del tratamiento farmacológico del cáncer es reducir la población celular del tumor a cero. El nuevo crecimiento del tumor ocurre durante el intervalo libre de medicamentos entre los ciclos. Cada ciclo de tratamiento elimina una

fracción específica de células remanentes. Los resultados del tratamiento son una función de la dosis del fármaco administrado y del número y la frecuencia de las repeticiones de tratamiento. Basado en estas consideraciones citocinéticas, la mayoría de los protocolos antineoplásicos consisten en ciclos de terapia intensiva repetidos tan frecuentemente como lo permita la tolerancia de limitación de dosis tisular tal como la médula ósea (Pizzo y col., 2004).

Por necesidad, los regímenes de tratamiento de mayor éxito han combinado múltiples agentes con diferentes mecanismos de acción. En la actualidad se tiende a utilizar los agentes quimioterapéuticos en combinación con el fin de aprovechar el sinergismo, usándolos simultáneamente cubriendo un espectro más amplio de resistencia "de novo" de la célula cancerosa y para evitar la aparición de resistencia adquirida. En la Tabla II se muestran los fármacos antineoplásicos de uso habitual en cáncer infantil, así como aspectos pertinentes sobre su uso (Pizzo y col., 2004).

Tabla II. Quimioterapéuticos antineoplásicos más usados en el HIES

CLASE FARMACOLÓGICA	FÁRMACO	DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN
Agentes alquilantes	Ifosfamida	1800 mg/m ² (SC)
	Ciclofosfamida	1200 mg/m ² (SC)
Antimetabolitos Antagonistas de folato	Metotrexato	3000-5000 mg/m ² (SC)
Antagonistas de las purinas.	6-MP	75-100 mg/ m ² (SC)
Antagonistas de las pirimidinas	Citarabina	100-300 mg/m ² (SC)
Alcaloides (de plantas) derivados de la vinca	Vinblastina	6 mg/m ² (SC)
	Vincristina	2 mg/m ² (SC)
Podofilotoxinas	Etopósido	300 mg/m ² (SC)
Antibióticos	Doxorrubicina	30 mg/m ² (SC)
	Bleomicina	15 mg/m ² (SC)
Enzimas	Asparaginasa	6000 U/m ² (SC)

mg/m²: miligramos por metro cuadrado; SC: superficie corporal; L-Asn: L-Asparagina; ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Fuente: Modificado de Pizzo y col., 2004.

Los protocolos de tratamiento tienen la finalidad de obtener la máxima efectividad a través de una terapia antineoplásica sistémica que controle y, de ser posible, modifique la enfermedad; las células más afectadas por el efecto citotóxico de la quimioterapia son aquellas que comparten características con las células tumorales, especialmente la multiplicación celular a gran velocidad, como son las de los folículos pilosos, de la médula ósea, el tubo digestivo y el sistema reproductor; con esto, células malignas y tejidos de alta replicación celular se ven afectadas (SEOM, 2013). Otros reportes han mencionado diferencias en la funcionalidad de tejidos, por ejemplo en el sistema retículo endotelial y timo se ocasionan inmunodeficiencias secundarias, implicando una supresión de la linfopoyesis y de la respuesta inmune durante la fase de mantenimiento en niños con leucemia linfoblástica aguda con la aparición de complicaciones infecciosas (Pizzo y col., 2004).

Antineoplásicos. La utilidad de cualquier fármaco está determinada por el grado con el que una dosis dada produce un resultado útil (en el caso de fármacos antineoplásicos, toxicidad para células tumorales) en contraposición con un efecto tóxico (Longo, 2013). Los tratamientos antineoplásicos se clasifican en cuatro tipos generales; 1. Fármacos citoespecíficos están diseñados para interactuar con una molécula destinataria que sea importante para conservar el estado neoplásico o que es expresada selectivamente por las células tumorales. 2. Hormonoterapias aprovechan vías bioquímicas que sustentan funciones y acciones de estrógenos y andrógenos. 3. Tratamientos biológicos que a menudo incluyen macromoléculas que tienen un punto particular de destino o que poseen la capacidad de organizar o regular la respuesta inmunitaria del hospedador para destruir células neoplásicas, incluyen anticuerpos, citocinas y terapias génicas. 4. Los Quimioterapéuticos habituales orientan su actividad contra la estructura del DNA o la segregación del mismo en los cromosomas durante la mitosis (Longo y col., 2013).

Los quimioterapéuticos habituales, a su vez, se agrupan en categorías según cómo funcionan en la destrucción de las células cancerosas. De modo más específico, los medicamentos se ubican en una categoría específica según la parte

del ciclo celular que interrumpen. Las categorías son: agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos antitumorales y alcaloides de plantas (OCF, 2013).

En la Figura 1 se muestran los mecanismos de acción de quimioterapéuticos habituales usados en el tratamiento de cáncer infantil. El mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos antineoplásicos inciden sobre macromoléculas vitales o vías metabólicas que son importantes para células malignas y células sanas. A pesar de ello, los fármacos antineoplásicos continúan teniendo un papel fundamental como parte del tratamiento de cáncer infantil (Pizzo y col., 2004).

Dependiendo del medicamento elegido, la quimioterapia afecta a las células malignas en una de tres formas: 1) dañando el DNA de las células cancerosas de tal modo que éstas ya no puedan reproducirse por la alteración de la estructura del DNA en el núcleo de la célula, evitando así la replicación; durante la fase S del ciclo celular; 2) inhibiendo la síntesis de DNA nuevo de tal manera que no sea posible replicación celular alguna cuando los fármacos bloquean la formación de los nucleótidos necesarios para la creación de DNA nuevo; 3) pueden detener el proceso mitótico de tal modo que la célula cancerosa no pueda dividirse en dos células. (OCF, 2013).

El tratamiento antineoplásico se divide en 4 fases: inducción a la remisión, consolidación, mantenimiento y vigilancia. Basado en la histología del tumor, extensión de la enfermedad y ajustada al peso del paciente, se inicia con la inducción a la remisión, cuyo principal objetivo es erradicar el clon leucémico y alcanzar la remisión completa mientras se restaura la hematopoyesis normal.

La fase de consolidación o de intensificación, es una quimioterapia adicional para prolongar la remisión y evitar infiltración al sistema nervioso central. La fase de mantenimiento tiene el objetivo de destruir cualquier célula residual que pudiera haber quedado, dura aproximadamente 2 años. La fase de vigilancia es cuando ya se ha terminado el esquema de quimioterapia completo y en esta fase se evalúa al paciente periódicamente durante 10 años aproximadamente.

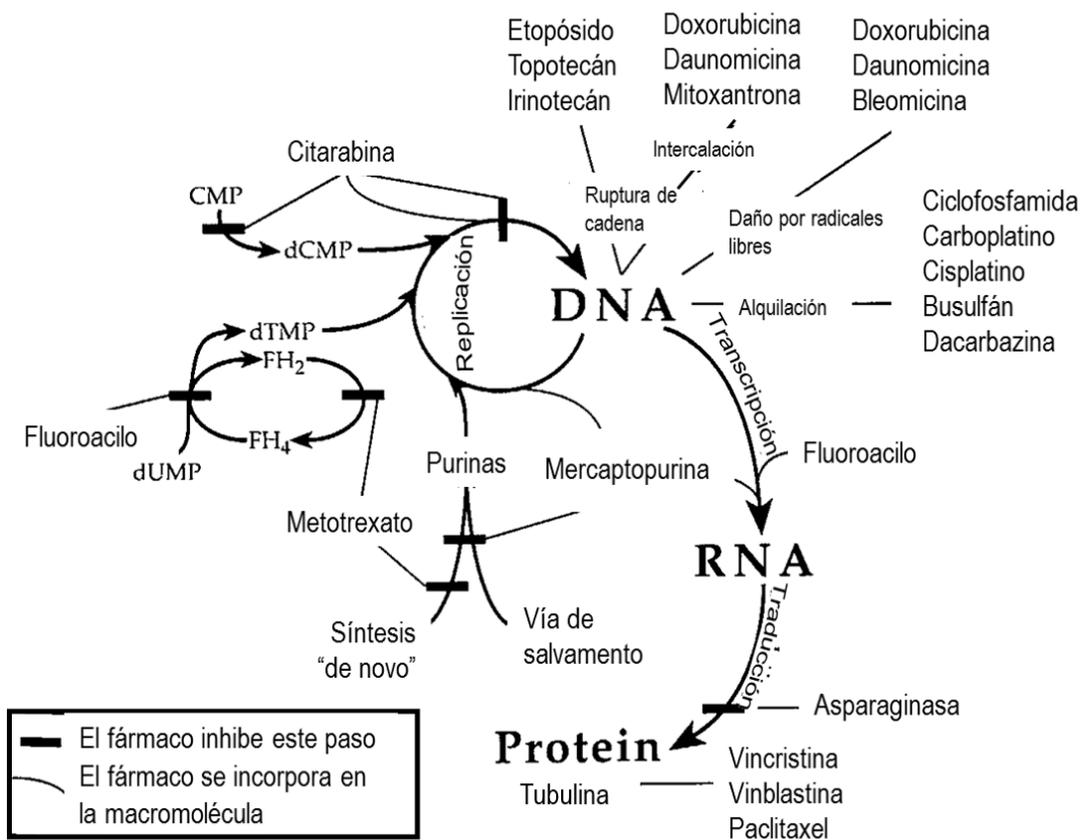


Figura 1. Mecanismo de acción de fármacos antineoplásicos comúnmente usados en el tratamiento del cáncer infantil.

Fuente: Modificada de Pizzo y col., 2004

Sistema Inmune

Todas las células sanguíneas proceden de un mismo progenitor hematopoyético que genera las líneas celulares linfoide, mieloide, eritroide, monocítica y megacariocítica tal como se observa en la Figura 2 (Pizzo y col., 2004). El progenitor linfoide común tiene el potencial para diferenciarse en células T, B, NK y células dendríticas linfoides dependiendo del microambiente del cual provienen (como por ejemplo timo o médula ósea). Las células inmunes derivadas del progenitor mieloide incluyen efectores fagocíticos (por ejemplo macrófagos, neutrófilos y monocitos) y células dendríticas mieloides. A través de una activación ordenada y sucesiva de varios factores de transcripción, las células evolucionan en primer lugar hacia la línea linfoide y luego producen las células B y T. Alrededor del 75% de todas las leucemias linfoides y del 90% de todos los linfomas proceden de las células B (Longo y col., 2013).

Respuesta inmune del huésped frente a los tumores

El sistema inmunológico funciona primariamente por discriminación entre lo propio y no propio. Este modelo da prioridad a prevenir autoinmunidad desde el desarrollo celular, enfatizando que el sistema inmune se vuelve tolerante a los antígenos propios durante la linfopoyesis a través de la “delección clonal” de células T y células B que poseen receptores antígeno específicos para reconocer lo propio (Abbas y col, 2004).

Este modelo sostiene que el repertorio inmune elimina eficientemente las células autorreactivas durante la linfopoyesis, eliminando así la necesidad de mecanismos periféricos para mantener la tolerancia a lo propio (Abbas y col, 2004).

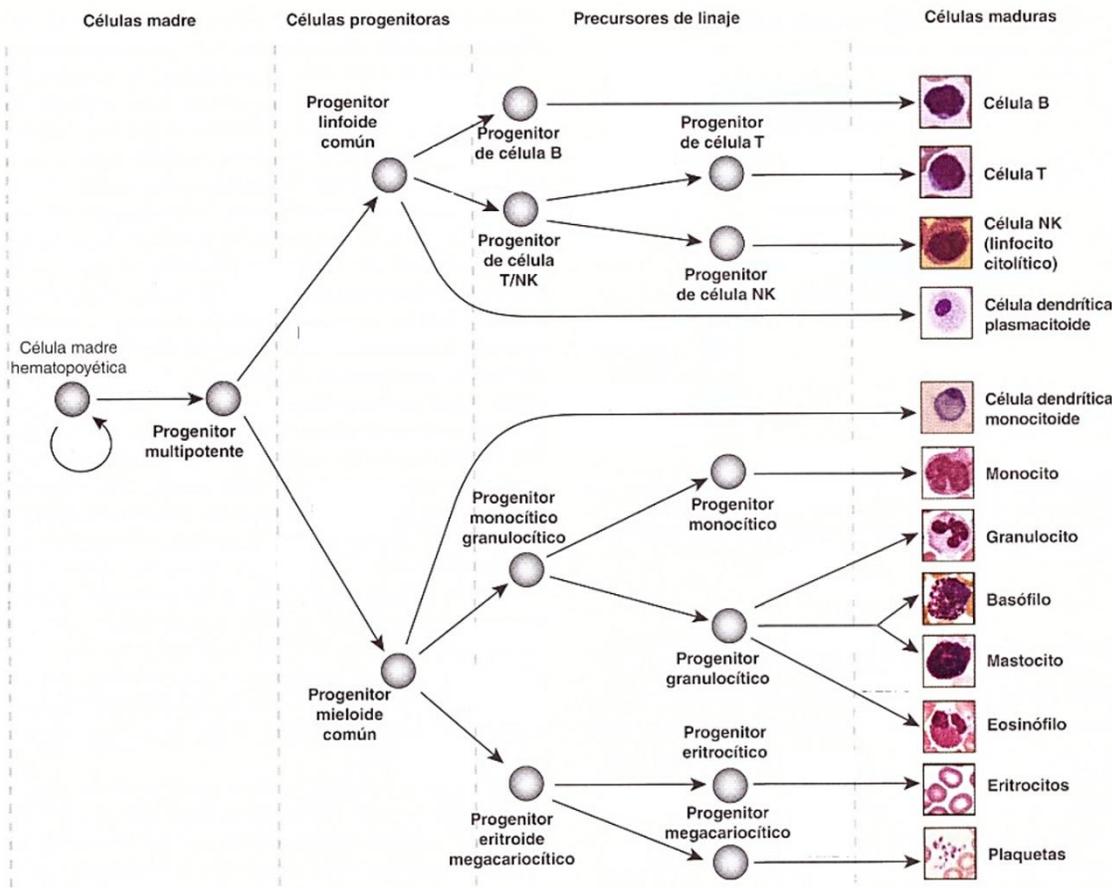


Figura 2. Células del sistema inmune.

Fuente: Modificado de Longo y col., 2006

Mecanismos efectores en la actividad antitumoral. El sistema inmune puede responder a las células cancerosas reaccionando frente a antígenos específicos de las mismas o frente a antígenos asociados al tumor. En 1950, Burnet y Thomas, postularon la teoría de la inmunovigilancia proponiendo que el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar las células transformadas antes de que puedan crecer e invadir nuevos tejidos. A lo largo de los años, numerosas evidencias experimentales y clínicas demuestran que el sistema inmune es fundamental para prevenir, limitar y suprimir el crecimiento neoplásico (Maglioco, 2011).

Sobre la base de la hipótesis de inmunovigilancia se propuso la teoría de inmunoedición de tumores definida por tres eventos clave: eliminación, equilibrio y escape. Tal como se muestra en la Figura 3, la fase de eliminación corresponde con el concepto original de inmunovigilancia, donde el tumor es detectado y destruido por diversos componentes del sistema inmune. Las células que no son eliminadas en esta fase, proceden hacia una fase de equilibrio donde se establece un balance entre el tumor y el sistema inmune y ambos ejercen presión sobre el otro. Finalmente el sistema inmune contribuye en la selección de las variantes tumorales que crecerán incontroladamente “escapando” al control inmunológico, ya sea eludiendo el reconocimiento inmunitario o inhibiendo los mecanismos inductores o efectores de la respuesta inmune antitumoral (Dunn y col., 2002).

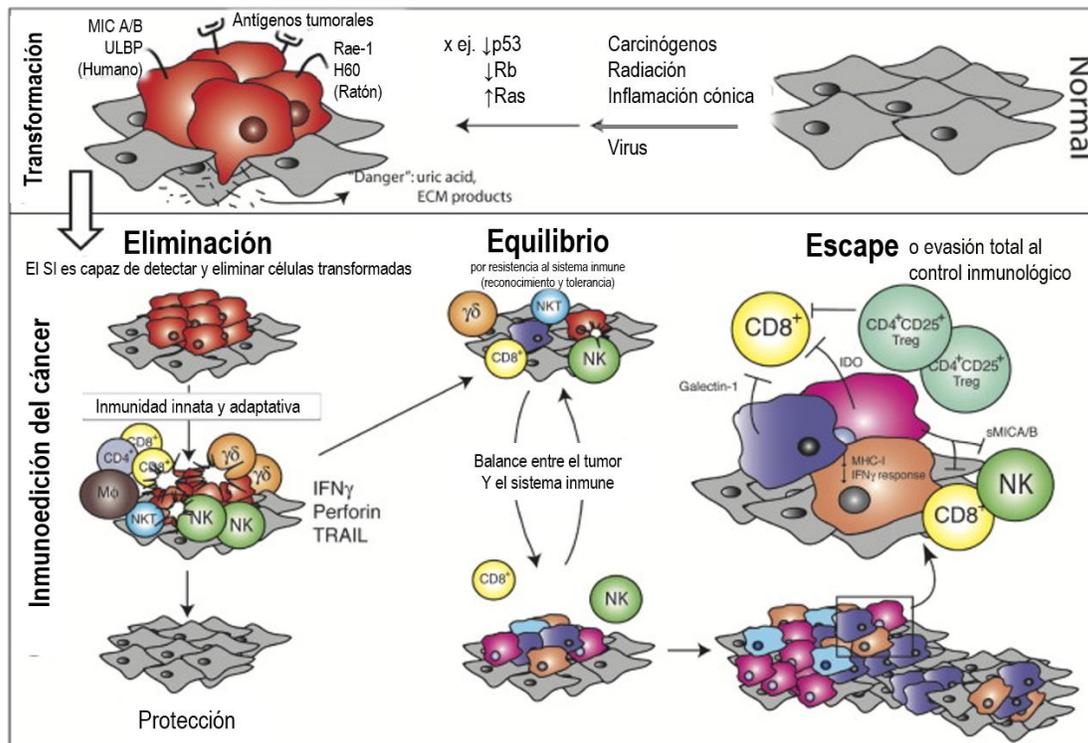


Figura 3. Teoría de la inmunoedición de tumores

Fuente: Modificado de Dunn y col., 2001

Células T. Una célula tumoral produce una proteína que no es expresada por las células normales o es una versión mutada de una proteína normal. Los péptidos derivados de esta proteína tumoral pueden ser presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés “major histocompatibility complex”) de clase I en la superficie de la célula tumoral y ser reconocidos como extraños por los linfocitos T CD8+ citolíticos (CTL) del huésped. La vía MHC de clase I de presentación del antígeno muestrea proteínas citoplasmáticas y presenta péptidos derivados de éstas proteínas en la superficie celular. Debido a la tolerancia de lo propio, las células T responden a los péptidos derivados de las proteínas celulares normales. Los CTL reconocerán péptidos derivados de las proteínas mutantes o de expresión aberrante presentes en las células malignas y eliminarán a las células cancerosas que expresan estas proteínas (Abbas y col, 2004) mediante la exocitosis de perforinas (proteínas formadoras de poros) serina esterases, granzima B, TNF (por sus siglas en inglés “tumoral necrosis factor”) e interferón- γ (IFN- γ), como se observa en la Figura 4 (Álvaro y col., 2005).

También es posible que las proteínas que son liberadas en el medio extracelular por células tumorales viables o muertas o las propias células tumorales enteras, puedan ser endocitadas en la vía del MHC de clase II del procesamiento del antígeno por células presentadoras de antígeno profesionales (APC) y que los péptidos asociados al MHC de clase II derivados de estas células tumorales puedan ser presentadas para su reconocimiento por las células T colaboradoras CD4 (Abbas y col, 2004) cuyo papel principal es suministrar citocinas para el desarrollo de CTL, secretar además TNF- α e INF- γ que pueden aumentar la expresión de MHC clase I por la célula tumoral y por lo tanto, su sensibilidad a la lisis por CTL. Así mismo, las células CD4+ responden

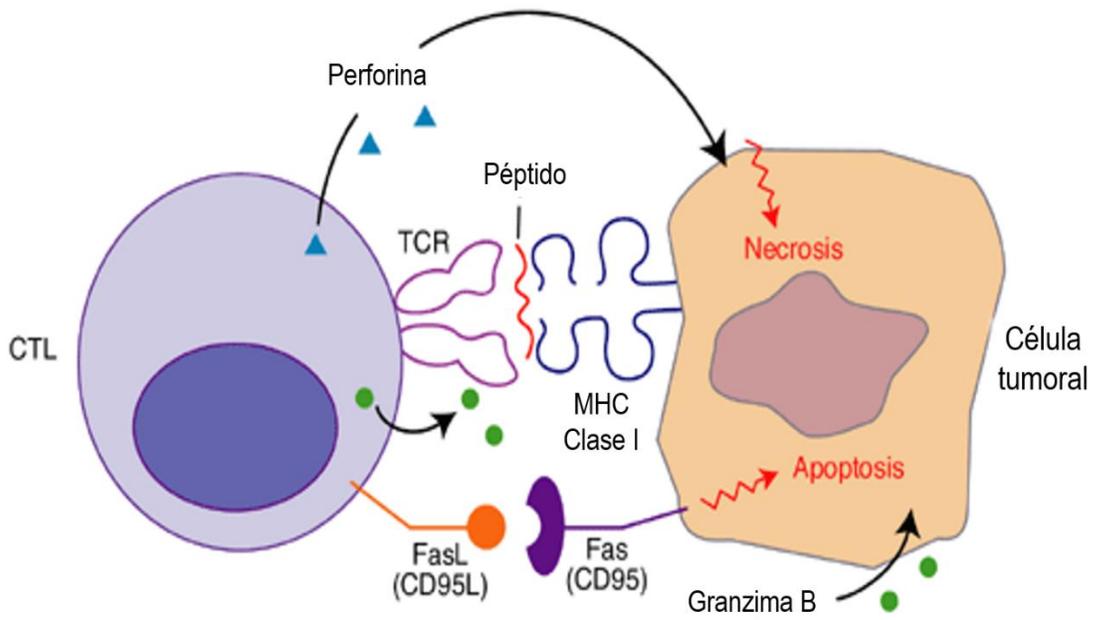


Figura 4. Respuesta de linfocitos T citolíticos frente a células tumorales.

Fuente: Modificado de Roshni y col., 2003 en Álvaro y col., 2005.

secretando citocinas que activan otras células inmunes como las NK, tal como se observa en la Figura 5 (Álvaro, 2005). A diferencia de las moléculas MHC de clase I, que se expresan en todas las células nucleadas, las moléculas de MHC de clase II se expresan sólo en células presentadoras de antígenos especializadas (APC) incluyendo los monocitos- macrófagos, células B y células dendríticas. Los péptidos presentados por MHC de clase II incluyen los productos derivados de muestreo del medio externo. Por lo tanto, MHC de clase II se presenta principalmente proteínas "exógenas" a las células T, mientras que la clase I del MHC presenta principalmente péptidos endógenos (Abbas y col., 2004).

Células B. La función principal de los linfocitos B (designado "B" por su origen en la bolsa de Fabricio en aves) es la producción de inmunoglobulinas, moléculas solubles que reconocen específicamente glicoproteínas y antígenos de carbohidratos desencadenando respuestas celulares y moleculares tras la unión al antígeno. Las inmunoglobulinas se unen a las proteínas circulantes enteras o moléculas expresadas sobre la superficie de las células o agentes patógenos. Las moléculas de inmunoglobulina intactas tienen un extremo de unión a antígenos variables (Fab) y un extremo constante (Fc) que se puede fijar activando el complemento y se unen a los receptores Fc expresadas por una variedad de células. Las células B de memoria y células plasmáticas continúan produciendo inmunoglobulinas años después de la inmunización (Abbas y col, 2004).

Lo que se ha demostrado "in vitro" es el potencial para la destrucción de células tumorales mediada por anticuerpos atribuible a la activación del complemento o bien a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) en que la muerte de células cancerosas está mediada por otros elementos celulares como macrófagos o células NK (Abbas y col, 2004).

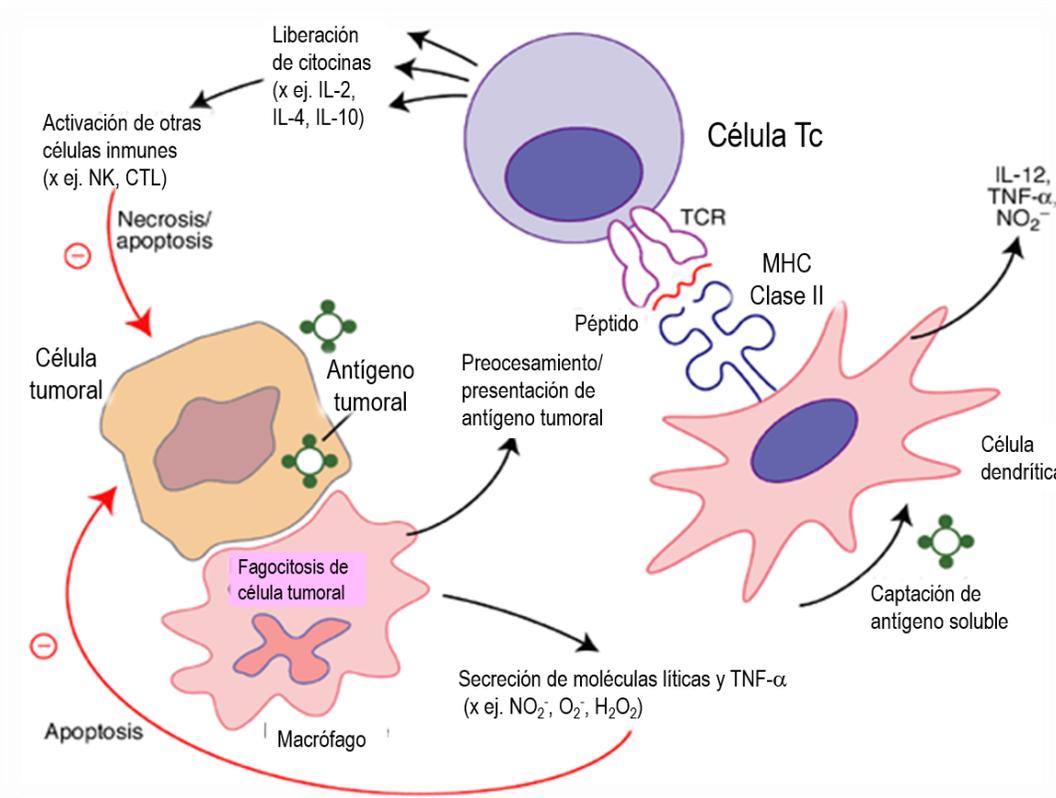


Figura 5. Respuesta de linfocitos T cooperadores frente a células tumorales.

Fuente: Modificado de Roshni y col., 2003 en Álvaro y col., 2005

Células NK. La importancia del sistema inmune innato radica en que aun cuando este sistema puede ser incapaz de eliminar a los patógenos, logra por un lado, atenuar su proliferación y además generar las señales de peligro adecuadas que permitan la participación del sistema inmune específico (James y col., 2007). Las células asesinas naturales, NK, son una sub-población de linfocitos no T (CD3 negativos) y no B (CD19 negativos) caracterizada por su tamaño grande y numerosos gránulos citoplasmáticos. Las células NK constituyen entre un 5 y 14% de los mononucleares de sangre periférica, y fenotípicamente han sido caracterizadas por la expresión en su membrana las moléculas CD16 y CD56 (Montoya y col., 2007).

Funcionalmente estas células se caracterizan porque constituyen una de las primeras líneas de defensa contra los microorganismos patógenos invasores, principalmente los virus. Además, las células NK pueden destruir células tumorales en forma espontánea, es decir, sin haber sido sensibilizadas previamente (Abbas y col., 2004). La manera en la que las células NK reconocen a las células normales de las células tumorales es un proceso que hasta hace poco no se entendía del todo. En condiciones normales, la mayoría de las células expresan una gran cantidad de proteínas del MHC clase I y de esta forma son reconocidas por el sistema inmunológico. Cuando por alguna causa se presenta una disminución o pérdida total de dichas proteínas, las células NK tienen la capacidad de detectar dicho cambio y destruyen a las células alteradas, esta idea ha sido confirmada con algunos experimentos realizados en ratones (Mendoza, 2004).

Las células NK pueden ser activadas por el reconocimiento directo de los tumores o como consecuencia de las citocinas producidas por linfocitos T específicos del tumor. Para eliminar células, utilizan los mismos mecanismos líticos que los CTL pero no expresan los receptores para el antígeno de las células T y poseen un extenso intervalo de especificidades. El reconocimiento por la célula NK de moléculas MHC en una diana potencial inhibe la lisis por células NK de esa diana. Por lo tanto, la regulación negativa de la expresión de MHC en muchas células tumorales, que permite su escape de la lisis por CTL, las convierte en dianas especialmente idóneas para las células NK. Además las células NK pueden estar

dirigidas contra células recubiertas de anticuerpo ya que expresan receptores FC de baja afinidad para moléculas de IgG. La capacidad tumoricida de las células NK aumenta con las citocinas como los INF, TNF, interleucina-2 (IL-2) e IL-12. Por lo tanto, su participación en la inmunidad antitumoral puede depender de la estimulación concurrente de las células T y de los macrófagos que producen estas citocinas (Abbas y col., 2004).

Las células NK eliminan a las células tumorales a través de mecanismos que involucran la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) en la cual la porción Fc del anticuerpo acoplada al antígeno presente en la superficie de la célula tumoral se une al receptor Fc de la célula NK, interacción Fas (CD95)-Fas ligando (CD95L) y la exocitosis de perforinas y granzima B que causan la apoptosis/necrosis de la célula tumoral, tal como se muestra en la Figura 6 (Álvaro, 2005)

La función citotóxica es la más reconocida de estas células y la ejercen sobre diferentes tipos celulares: células transformadas por virus, células infectadas con bacterias u otros patógenos y células tumorales, lo que les confiere un amplio papel defensivo, frente a enfermedades infecciosas y neoplásicas (Sepúlveda y col., 2000). El importante papel que las células NK desempeñan en la prevención de crecimiento del tumor y su potencial como agentes terapéuticos en la inmunoterapia del cáncer ha evolucionado recientemente como resultado de una mejor comprensión de los componentes de reconocimiento de células NK. (Pizzo y col., 2004).

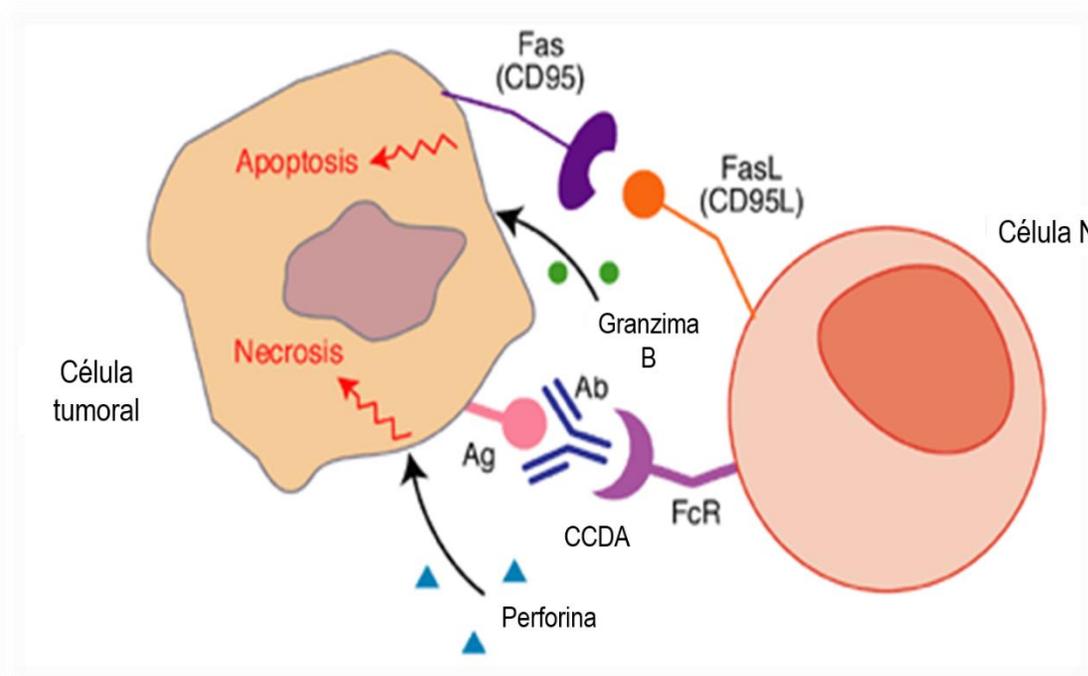


Figura 6. Respuesta de linfocitos NK frente a células tumorales.

Fuente: Modificado de Roshni y col., 2003 en Álvaro y col., 2005

Efectos inmunológicos del cáncer y la terapia del cáncer. El cáncer por sí mismo, como enfermedad invasiva, se ha encontrado que suprime la actividad de varias células involucradas en la respuesta inmune, sin embargo, todos los tratamientos convencionales para el cáncer (cirugía, radioterapia y quimioterapia) alteran la función inmune en varios niveles durante el curso del tratamiento. Estas alteraciones van desde la depresión total de la cantidad y función inmune a la estimulación transitoria de la proliferación y actividad de leucocitos específicos (Workman, 1989).

El quimiotratamiento antineoplásico se basa en la histología del tumor y la extensión de la enfermedad ajustada al peso corporal y basado en la toxicidad subsecuente. Se divide en 4 fases de aplicación: 1) Fase de inducción a la remisión, 2) Fase de consolidación, 3) Fase de mantenimiento 4) Fase de vigilancia, cuando ya se terminó la aplicación del tratamiento, dando seguimiento para identificar recaídas. La intensificación del tratamiento quimioterapéutico se ha asociado con numerosas complicaciones relacionadas a la toxicidad del tratamiento, incluyendo su influencia negativa en el sistema inmunológico que afecta a la calidad y función de las células B y linfocitos T (Toubert, 2008).

La inmunosupresión relacionada con la quimioterapia afecta también la inmunidad innata y la población de células NK (Alanko y col., 1995), así mismo, se ha reportado, después de la quimioterapia en leucemias agudas y linfoma no Hodgkin, una disminución en la cantidad y función de las células NK en sangre periférica y se han descrito defectos cuantitativos persistentes de células NK después de 12 meses de la última dosis de tratamiento de consolidación (Jarosz y col, 2009).

Las interacciones entre el cáncer y el sistema inmune son complejos. La inmunosupresión asociada con el cáncer puede ser clínicamente significativa; las anomalías combinadas en la inmunidad innata y adaptativa, tales como las que existen en la leucemia aguda con pancitopenia, se asocian con una alta incidencia de complicaciones infecciosas. Los pacientes con tumores sólidos muestran anomalías subclínicas en la inmunidad de células T. Sin embargo, las terapias

usadas para tratar la malignidad son a menudo el factor más importante para determinar el grado de inmunosupresión presente. Muchas terapias contra el cáncer que se administran comúnmente inducen alteraciones dramáticas en los componentes tanto innata y adaptativa de la inmunidad del huésped, que predispone a los pacientes a la infección (Pizzo y col., 2004).

El efecto más obvio de la quimioterapia convencional del cáncer en el sistema inmune es la disminución importante de los neutrófilos, lo que predispone a los pacientes a la infección bacteriana. Los monocitos también se agotan drásticamente después de la quimioterapia, pero se recuperan rápidamente; preceden a la recuperación de neutrófilos. La quimioterapia citotóxica agota las poblaciones de linfocitos, pero la sensibilidad y la velocidad de recuperación varían sustancialmente entre los subgrupos de linfocitos (Pizzo y col., 2004).

Recuperación inmune en niños post-quimioterapia. La inmunosupresión es el principal efecto secundario de muchos fármacos antineoplásicos. Estudios previos han demostrado que los niños están predispuestos a trastornos inmunológicos persistentes después del término del tratamiento antineoplásico (Jaroz y col., 2009). El proceso de recuperación inmune puede ser disimilar dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, el tipo y dosis de los fármacos antineoplásicos administrados y la edad del paciente que recibe el tratamiento (Ek y col., 2005).

Aunque se ha evidenciado en varios reportes las alteraciones en la función inmune que se producen en los pacientes con cáncer mientras están recibiendo las diferentes fases de tratamiento: inducción a la remisión, intensificación y mantenimiento (Caver y col., 1998; Mustafá y col., 1998; Kostaridou y col., 2004; Ek y col., 2005; Mazur y col., 2006; Jarosz y col., 2009), hay muy poca información documentada con respecto a la recuperación inmune durante la fase de vigilancia una vez que se ha completado el esquema de tratamiento en el paciente con cáncer.

Hitzig y col., evaluaron 11 niños de Suiza con leucemia linfoblástica aguda (LLA) a los 3, 6 y 12 meses post-quimioterapia y los datos que obtuvieron mostraron una cuenta de leucocitos totales sin cambio estadísticamente significativo, los linfocitos

B (LB) se recuperaron lentamente y no alcanzaron valores normales después de 1 año de estudio en contraste con los linfocitos T (LT) que aumentaron en número rápidamente alcanzando valores normales después de 3 a 6 meses post-quimioterapia manteniéndose subnormales sólo en un par de casos. Exponen que los hallazgos de una marcada depresión del número y función inmune son importantes por dos razones: 1) explica el aumento a la susceptibilidad a infecciones a largo plazo en sobrevivientes de LLA y 2) apoyan la hipótesis de una débil respuesta del paciente contra sus propias células mutantes.

Katz y col., evaluaron el efecto de la quimioterapia en pacientes de Orange, Ca., menores de 14 años con LLA durante un año post-tratamiento antineoplásico. Obtuvieron cantidad disminuida de neutrófilos, linfocitos totales, subpoblaciones de células T (CD4 y CD8). Adicionalmente un número disminuido de células Natural Killer (NK) circulantes. El número de LB resultó dentro del valor de referencia en todos los niños estudiados. Finalmente observaron que la cuenta de neutrófilos, linfocitos totales y LT regresaron a su valor normal al término de un año de estudio. No así la cantidad de las células NK circulantes que mostraron cantidad variada: algunos pacientes mostraron rebote mayor que los valores normales y otros pacientes mostraron valores bajos; Después de 6 meses se encontró cantidad disminuida estadísticamente significativa de células NK circulantes en los pacientes estudiados. Consideraron que los valores anormales obtenidos pudieron deberse a la quimioterapia multiagente utilizada.

Alanko y col., investigaron la recuperación de inmunidad humoral al cesar la quimioterapia en niños de Finlandia con LLA para determinar leucocitos, linfocitos totales y linfocitos B al tiempo 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses post-quimioterapia en 14 pacientes con LLA usando citometría de flujo y anticuerpo monoclonal CD20. Concluyeron que a los 6 meses post-quimioterapia para LLA se estableció cantidad y función del sistema inmune suficiente y que los antibióticos profilácticos pueden administrarse e iniciar las inmunizaciones correspondientes (Alanko y col., 1992). Así mismo, pero dos años después, también investigaron la recuperación inmune celular en niños con LLA cuantificando células T sanguíneas y sus subpoblaciones (CD4 y CD8) al tiempo 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses post-quimioterapia para monitorizar

la duración de la inmunodeficiencia. La cuenta total de células T resultó disminuida al término de la quimioterapia pero se normalizó en 1 a 3 meses post-quimioterapia. Aunque los grupos estudiados presentaron valores normales a los 6 meses post-quimioterapia, hubo pacientes que continuaron con valores subnormales después de un año de seguimiento y presentaron mayor susceptibilidad a infecciones (Alanko y col., 1994).

Los mismos investigadores, al ver que la información disponible con respecto a la recuperación de células NK post-quimioterapia en niños era inconsistente, decidieron dar seguimiento a la recuperación de células NK CD3-CD16+ y/o CD56+ en sangre periférica con anticuerpos monoclonales por citometría de flujo en tiempo 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses post-quimioterapia. Para ello evaluaron 14 pacientes con LLA y 11 pacientes con tumor sólido con edades de 3 a 18 años. Observaron que la cuenta de CD3-CD56+ y CD16+ en pacientes con LLA fue menor comparada con los controles pero se normalizó al mes del estudio. Con respecto a los pacientes con tumor sólido, se observaron menos afectadas ya que presentaron cuentas normales de células NK comparados con el grupo control y concluyeron que esta diferencia pudo denotarse por la duración e intensidad del tratamiento que se administra en LLA con respecto a tumores sólidos (Alanko y col., 1995).

En años más recientes, otros investigadores, como Kosmidis y col., evaluaron prospectivamente el grado de depresión inmune celular y humoral así como la tasa de recuperación del sistema inmune en niños de Atenas, Grecia, de 12 meses a 15 años de edad, con LLA en primera remisión completa post-quimioterapia de mantenimiento y concluyeron que la inmunidad celular se redujo significativamente al final del tratamiento manteniéndose anormal al menos un años post-quimioterapia (Kosmidis y col., 2007).

La inmunosupresión es un efecto secundario importante del tratamiento antineoplásico. A pesar de la utilidad en la clínica, no se han realizado reportes de la evaluación de la respuesta inmune post-tratamiento antineoplásico en niños mexicanos durante la fase de vigilancia así como tampoco en niños sonorenses. Debido a que es difícil predecir cómo un régimen inmunosupresor en particular será

para un paciente individual, la cuantificación de las poblaciones de linfocitos mediante el uso de citometría de flujo es de gran utilidad para estimar el nivel de inmunosupresión inducida por la quimioterapia citotóxica (Couston-Smith y col, 2006).

Citometría de Flujo

El profundo impacto que han tenido las técnicas de genética y biología molecular en el campo de la inmunología, ha permitido dilucidar varias interrogantes sobre el funcionamiento del sistema inmune y, además, ha aumentado enormemente la habilidad para entender, diagnosticar y tratar una gran variedad de enfermedades inmunológicas (Carrión y col. 2000).

Fundamento de la Citometría de Flujo

La Citometría de Flujo (CF) representa uno de los desarrollos tecnológicos de mayor impacto para la medicina moderna, al permitirnos realizar mediciones muy rápidas en células (u otras partículas) individuales en suspensión. Es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. En el momento de realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijas, pero obligadamente en suspensión celular y en forma de célula única. Al obligarlas a pasar alineadas una a una frente a un haz láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez que dispersa la luz, emite luz fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida. Básicamente se pueden obtener los siguientes datos: el tamaño celular relativo ("Forward Scatter" o FSC), la complejidad interna o granularidad relativa ("Side Scatter" o SSC) y las intensidades relativas de emisión de fluorescencia (FL1, FL2, FL3 ,FL4, etc.) (Murphy y col., 2008).

En los campos de la inmunología y la hematología, las técnicas de citometría de flujo emergen como un pilar fundamental para el análisis y la caracterización detallada de las células sanguíneas. Entre las aplicaciones clínicas más frecuentes de estos métodos se encuentran la caracterización de leucocitos en estados de inmunodeficiencia (innatos o adquiridos) y en enfermedades onco-hematológicas por ejemplo la tipificación de las leucemias y los linfomas que permite alcanzar un diagnóstico preciso, permitiendo un tratamiento y seguimiento más adecuado y eficaz (Murphy y col., 2008). Por conveniencia, los leucocitos de la sangre periférica se evalúan con regularidad. Para evaluar las células del sistema inmunitario, puede requerirse la información con respecto a las cantidades de células presentes, su fenotipo y sus funciones (Burnett y col., 2005).

A través de la marcación específica de moléculas expresadas en las células es posible medir parámetros de membrana, citoplasma o núcleo celular. Esto proporciona datos cualitativos y cuantitativos acerca de las células que portan los líquidos corporales analizados (Murphy y col, 2008). Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno/anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula (Resino, 2013).

Los componentes celulares del sistema inmune pueden ser identificados por citometría de flujo (CF) en las diferentes etapas de su ontogenia. Se ha descrito que la CF tiene una sensibilidad de 1 en 10,000 células, por ejemplo los linfocitos en reposo tienen un aspecto engañosamente uniforme; todos son pequeñas células redondas con núcleo denso y poco citoplasma. Estas células comprenden muchas subpoblaciones funcionales, que, por lo general, se identifican y distinguen una de otra con base en su expresión diferencial de proteínas de superficie celular que pueden detectarse al usar antígenos específicos (Murphy y col, 2008).

Marcadores Celulares

Los linfocitos y otros leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos, presentan patrones característicos de moléculas de superficie, que pueden ser

aprovechadas como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares. Son moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares con el uso de anticuerpos monoclonales específicos marcados con una sustancia fluorescente. El término CD ("cluster of differentiation" o designación de agrupamiento) se usa para la denominación de marcadores. De los marcadores celulares que se utilizan para distinguir los estadios del desarrollo de una célula T, CD3 es característico de linaje y es el que permanece en todo el linaje T (Longo, 2013).

Como se muestra en la Figura 7, en el exterior del círculo, los linfocitos pueden dividirse en células T que portan receptores de célula T (detectados con anticuerpos contra CD3), células B que portan receptores de inmunoglobulina (detectados con anticuerpos contra inmunoglobulina), incluso los linfocitos citolíticos (NK), que no se marcan con ninguno de los dos. Dentro se muestran divisiones adicionales de las poblaciones de células T y B. Al usar anticuerpos contra CD4 y contra CD8, las células T $\alpha:\beta$ pueden subdividirse en dos poblaciones, mientras que las células T $\gamma:\delta$ se identifican con anticuerpos contra el receptor de la célula T $\gamma:\delta$ y principalmente carecen de CD4 y CD8. Una población minoritaria de células B expresa CD5 sobre su superficie. Con la CF se pueden identificar componentes inmunológicos anormales de las células neoplásicas, por las moléculas de superficie de los linfocitos, como en el caso de los linfocitos B maduros que expresan las moléculas CD19. Las moléculas relacionadas con el receptor de célula T es el CD3 que distingue a estas células. CD16 y CD56 distingue a las células NK (Murphy y col., 2008; Calderón, 2007).

En todas las etapas del proceso de diferenciación de las células B se expresa CD19⁺, que es el mejor marcador de linaje B (Resino y col., 2015). Dentro de la población de linfocitos morfológicamente similares, hay una población relativamente pequeña de células en circulación (constituyen en el humano aproximadamente del 10 al 20% de las células mononucleares de la sangre periférica y del bazo y son poco frecuentes en otros órganos linfoides),

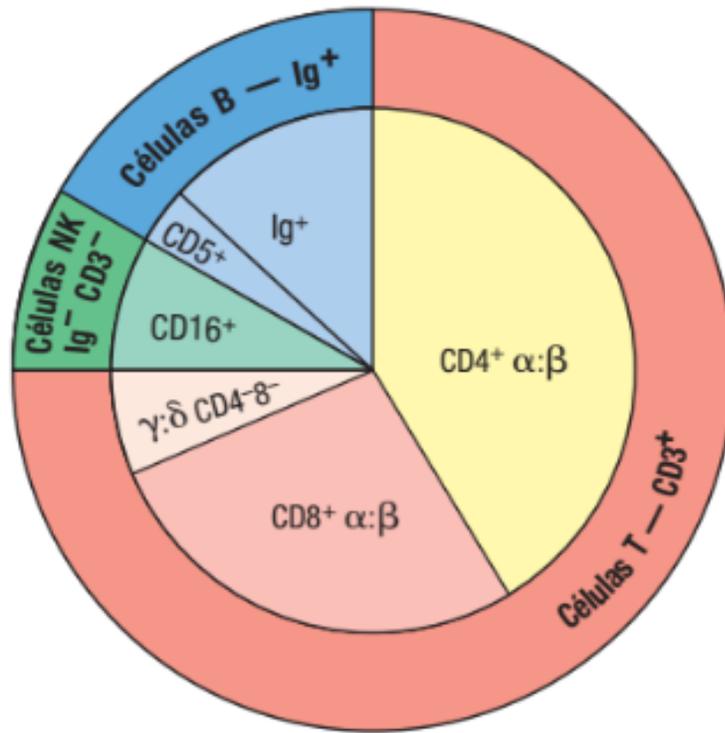


Figura 7. Distribución de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de seres humanos.

Fuente: Murphy y col., 2008

que no expresan marcadores de células T maduras o de células B maduras (CD3 o inmunoglobulina respectivamente), son las células NK (Sepúlveda y col., 2000).

Se ha demostrado que las células NK pueden dividirse en 3 distintos subtipos basados en la expresión sobre su superficie del receptor CD16. La mayoría de las células NK (90%) expresan altos niveles de CD16 (CD16^{bright}) además de CD56^{dim} (en cantidad baja). En contraste el subtipo NK CD56^{bright} es heterogénea en su expresión de CD16 y puede dividirse en CD16^{dim} y CD16^{neg}. Se ha teorizado que las células NK se desarrollan progresivamente y esto se puede correlacionar con la expresión sobre su superficie de CD16. En otras palabras, las células NK CD56^{bright} CD16^{neg} representan una población inmadura de las células NK, que posteriormente evolucionaran a un fenotipo CD56^{dim} CD16^{bright}. De esta manera, las células CD56^{bright} CD16^{dim} sería una población intermedia de las células NK (Mendoza, 2004).

Las células NK que predominan en la sangre periférica y los tejidos inflamados son CD56 (dim) CD16 (bright), además, muestran una menor producción de citocinas, y expresan un receptor de baja afinidad por la porción Fc de inmunoglobulinas (FcR γ III o CD16), tal como se muestra en la Figura 8a, el cual se une a ellos en células marcadas con anticuerpos para llevar a cabo la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (CCDA). Por otro lado, las células NK CD56 (bright) CD16 (dim), predominan en gran medida en los ganglios linfáticos, tienen poca actividad citolítica pero liberan altos niveles de citocinas (INF- γ , TNF- β , GM-CSF, IL-10 e IL-13) como se observa en la Figura 8b. (García y col., 2003; Moretta y col., 2008).

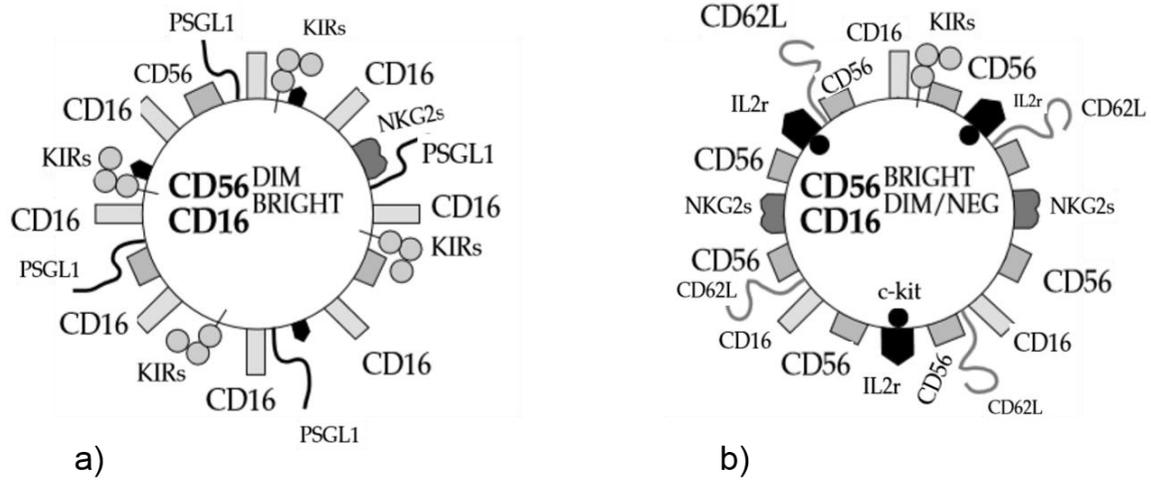


Figura 8. Subpoblaciones de células NK humanas funcionalmente distintas:
a) células NK CD56^{dim} CD16^{bright}; b) células NK CD56^{bright} CD16^{dim/neg}

Fuente: Modificado de García y col., 2003.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Estudio de casos y controles de tipo no experimental y descriptivo, donde se determinaron los valores de leucocitos totales, linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias T, B y NK en sangre periférica.

Consideraciones Éticas

Consentimiento Informado

Previa identificación de los niños que cumplieron los criterios de inclusión se les informó oral y por escrito del estudio a sus padres y aquellos que manifestaron su deseo de participar firmaron un informe de consentimiento escrito aprobado por el Comité de Ética del HIES (ver Anexo I). Cada control se incluyó, así mismo, bajo consentimiento informado oral y escrito en las mismas condiciones establecidas que para los casos (ver Anexo II).

Población y Muestra

Muestreo

Muestreo no probabilístico, por conveniencia.

Tamaño de muestra

El tamaño de muestra que se determinó para este estudio fue de 13 casos y 15 controles. Considerando como tamaño de población a 70 niños que son los que se reciben aproximadamente por año en el HIES. En este periodo llegan al HIES aproximadamente 25 niños con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), cuyo tratamiento dura 30 meses y 45 niños con tumor sólido (TS) (70 niños en total) cuyo tratamiento es de 12 meses. De estos niños, un 60% resuelve su problema y salen del tratamiento aproximadamente el 10% por año.

Criterios de inclusión

Casos. Niños o niñas, menores de 18 años de edad, con diagnóstico de tumor hematológico o tumor sólido, expuestos a quimioterapia antineoplásica, que completaron su esquema de tratamiento y entraron en fase de vigilancia. Los cuales se tomaron consecutivamente del área de Oncología del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), y recibieron quimioterapia de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento de acuerdo al protocolo establecido de quimioterapia en el área de Oncología del HIES.

Controles. Niños y niñas pareados por edad y género con los casos, sin cáncer, que visitaron el HIES por enfermedad crónica diferente al cáncer por la que requirieron tratamiento inmunosupresor.

Criterios de exclusión.

Pacientes que estuvieron recibiendo tratamiento inmunosupresor durante el estudio o con antecedentes de radiación en su tratamiento.

Criterios de eliminación

Pacientes que presentaron complicaciones (infección sistémica seria tal como septicemia, bacteremia o neumonía; hemorragia), que recayeron durante la fase de vigilancia y que desistieron en seguir participando.

Variables

En la Tabla III se muestran las variables que se incluyeron en el presente trabajo.

Metodología

Durante el 2014, que fue el año en el cual se desarrolló el proyecto, se capturaron pacientes que ingresaron a este estudio tanto del Servicio de Oncología como del Servicio de Medicina Interna y del Servicio de Alergología, de los cuales se fueron conformado el grupo de casos y controles con base en los criterios de inclusión y exclusión previamente mencionados. Tanto a los casos como a los controles se les tomó su historial, exámenes de laboratorio: Biometría Hemática Completa (BHC) y estimación de CD3+, CD19+ y CD16+ por citometría de flujo al inicio, al tercer mes y al sexto mes de incluidos en el estudio.

Preparación de las Muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, usando el sistema de tubo al vacío "Vacutainer" con EDTA como anticoagulante, al inicio, a los tres y a los seis meses de su captación como caso o control. Se cuantificaron células en sangre total incluyendo un conteo diferencial automatizado en un analizador hematológico automático XE-2100 Sysmex Co. Japón, para diagnóstico "in vitro" en el laboratorio clínico del HIES, cuyo procedimiento de calibración se realizó siguiendo la metodología de referencia de acuerdo al protocolo de estandarización en el área de hematología del laboratorio clínico del HIES. Para la citometría de flujo, la muestra de sangre total se tiñó con el anticuerpo monoclonal conjugado con el fluorocromo apropiado de acuerdo al protocolo estandarizado por Hernández y col., utilizando tinciones dobles.

Tabla III. Variables que se incluyeron en la investigación

VARIABLE	CONCEPTO	MEDICIÓN	ESCALA	FUENTE
Dependiente: Reconstitución inmune celular	Reconstitución de células del sistema inmune	Medición de poblaciones linfocitarias CD3+, CD19+ Y CD16+ mediante citometría de flujo	Númerica continua que se categoriza en células T, B, NK y al mismo tiempo se categoriza Dicotómicamente en 1=bajo 2=normal	Reporte del citómetro de flujo
Independiente: Tipo de Ca infantil en vigilancia	Enfermedades que pueden originarse en diferentes tejidos	Biopsia de tejido	Catégorica nominal 1=Hematológico 2=Tumor sólido	Reporte Oncología HIES
COVARIABLE:				
Edad	Tiempo cronológico de un sujeto desde su nacimiento hasta el momento de inclusión en el estudio (Dorland, 2007)	Años cumplidos de vida	Continua misma que servirá para agrupar a los individuos en dos categorías: 1= <15 años 2= > 16 años	Historia clínica
Sexo	proceso de combinación y mezcla de rasgos genéticos a menudo dando por resultado la especialización de organismos en variedades femenina y masculina	Género	Catégorica nominal 1= masculino 2=femenino	Historia clínica
Quimioterapia antineoplásica	Tratamiento citotóxico vs cáncer bajo el protocolo HIES	Días/meses de Tx	Continua	Protocolo de manejo HIES
BH	Cifra de GB,, linfocitos, Hb, Hto, GR, diferencial leuc.	Citómetro hemático @	Continua que se categoriza dicotómicamente 1=bajo 2=normal	Reporte de Laboratorio Clínico

Se cuantificaron las poblaciones linfocitarias de células T (CD3⁺), células B (CD19⁺) y NK (CD3⁻/CD16⁺) por citometría de flujo. A cada tubo se le colocó una alícuota de 50 µL de sangre total y se le añadió una cantidad apropiada de anticuerpo monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE). Todos los anticuerpos monoclonales se titularon y usaron en concentración conveniente.

Para la tinción doble se usaron las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales antihumanos de ratón: CD3⁺ FITC (Beckton-Dickinson) con CD19⁺ PE (Beckton-Dickinson); CD3⁺ FITC con CD16⁺ PE (Beckton-Dickinson). Se dispuso, además, un tubo control con sangre sin teñir y un tubo control de isotipo para cada muestra tanto de niño caso como de niño de control. Se incubaron a temperatura ambiente por 20 min en oscuridad. Posteriormente, se lisaron los glóbulos rojos y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugó durante 5 min a 25°C a 448 g, para decantar el sobrenadante. Posteriormente se lavó con 4ml de solución de fosfatos (PBS), se centrifugó durante 5 min a 448 g. Se decantó y fijó con 200 ml de paraformaldehído al 2%, se mezcló y filtró el contenido de cada tubo para ser adquiridos en el citómetro de flujo FACScanto de Becton and Dickinson mediante el software DIVA (Hernandez J. y cols., 2010). Se verificó previamente el funcionamiento del equipo y la adecuada discriminación de las diferentes fluorescencias (compensación). Se analizaron 10,000 células en cada evento.

Análisis citométrico. La sangre periférica se analizó por citometría de flujo delimitándose la región de los linfocitos (P1), según los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) tal como se muestra en la Figura 9A.

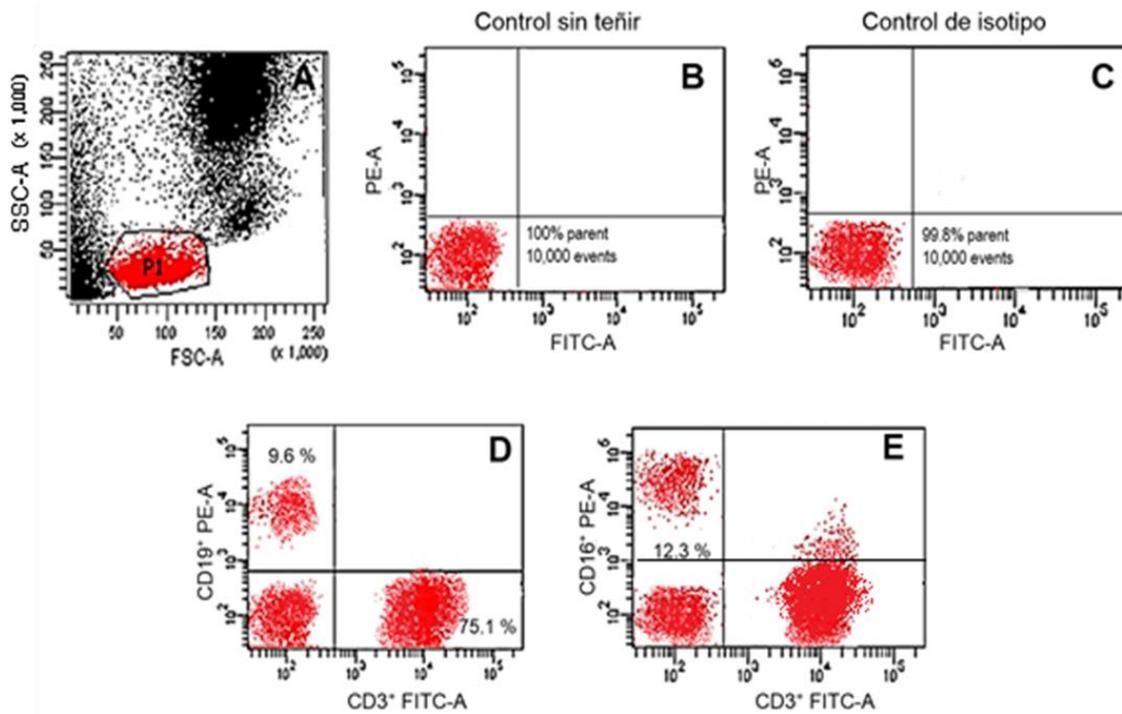


Figura 9. Representación del establecimiento de las regiones de las subpoblaciones linfocitarias CD3+, CD19+ y CD16+ para su estimación por citometría de flujo.

A partir de esta región (P1) se analizaron en gráfico de puntos dividido en cuatro cuadrantes con base en el uso de sangre sin teñir de un control positivo como se observa en la Figura 9B, así como el uso de un control de isotipo apropiado compuesto por una IgG de ratón marcada con PE o FITC, como se observa en la Figura 9C. Se observó expresión conjunta de CD3⁺ en el eje X contra CD19⁺ que se observó en el eje Y, donde el cuadrante superior izquierdo correspondió a los LB y el cuadrante inferior derecho a los LT, como se muestra en la Figura 9D. Por otro lado, se observó la expresión conjunta de CD3⁺, en el eje X contra CD16⁺ que se observó en el eje Y. El cuadrante superior izquierdo CD3⁺CD16⁺ correspondió a los LNK, tal como se muestra en la Figura 9E.

La cantidad absoluta de cada subpoblación linfocitaria se calculó por la siguiente fórmula: (porcentaje de células marcadas positivamente de cada subpoblación por cuenta absoluta de linfocitos en sangre periférica determinada, usando un contador hematológico celular descrito previamente) y el resultado se expresó como número de células positivas x10³/μL.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente con el software IBM® SPSS ver.19. Todas las variables se presentaron como medianas y se analizaron con pruebas no paramétricas. Se usó la prueba U de Mann Whitney para evaluar diferencia estadística entre grupo de casos y grupo control. Se usó la prueba de Friedman para determinar si existieron diferencias entre mediciones correlacionadas. El nivel de significancia se determinó como $p < 0.05$.

RESULTADOS

Al presente estudio se captaron 28 pacientes del Servicio de Oncología (n=13), Servicio de Medicina Interna (n=13), y del Servicio de Alergología (n=2). Los cuales se clasificaron de la siguiente manera: 13 casos y 15 controles.

Los 13 niños caso fueron diagnosticados con diferentes tipos de cáncer: 10 con tumor hematológico [6/13 niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA), 3/13 con linfoma de Hodgkin (LH) y 1/13 con Histiocitosis de células de Langerhans (HCL)], 3/13 con tumor sólido [uno con meduloblastoma (MB), uno con tumor de células germinales (TCG) y una con tumor de Wilms (TW)].

Los 15 niños control, sin cáncer, estaban bajo tratamiento inmunosupresor por enfermedad crónica adyacente: 9/15 con enfermedad de Crohn (EC), 3/15 con enfermedad inflamatoria crónica, 2/15 con enfermedad alérgica (EA) y 1/15 con Diabetes mellitus (DM). Los niños presentaron una mediana de edad para el grupo de casos de 9 (3-18 años de edad) y para el grupo control de 8 (3-17 años de edad). Por cada 6 niños caso se registraron 7 niñas caso; Por otro lado, por cada niño control se registraron 8 niñas control. La mayoría residentes de Hermosillo: 8/13 casos y 9/15 controles, el resto fue foráneo, residente de Nogales, Ciudad Obregón, Altar, Caborca, Guaymas, Esqueda y Naco. El diagnóstico más común de cáncer para los niños caso fue tumor hematológico en particular Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y para los controles enfermedad de Crohn (EC).

Se debe considerar que de los 13 niños caso, se eliminaron 6 por las siguientes causas: 3/6 niños se les eliminó por criterio de exclusión (recaída de la enfermedad), 1/6 niños por deserción, 1/6 por datos incompletos y 1/6 niños por pareo incompleto. Así mismo, se eliminaron 8 pacientes control: 5/8 por eliminación de su caso correspondiente, 1/8 por deserción y 2/8 por pareo incompleto.

Finalmente, para el análisis estadístico se consideraron 7 niños caso y 7 niños control pareados por edad y género, con todos sus datos completos de las mediciones en los tres tiempos manejados que a continuación se detallan y se incluyeron en el presente estudio.

Características de los Pacientes Caso

Para los resultados del presente estudio se consideraron 7 niños con cáncer que completaron su esquema de tratamiento y entraron a fase de vigilancia. Los niños caso fueron diagnosticados con diferentes tipos de cáncer: 4/7 niños con tumor hematológico clasificado como leucemia linfoblástica aguda (LLA), 2/7 niños como linfoma de Hodgkin (LH) y 1/7 con tumor sólido clasificado como Meduloblastoma (MB). Los niños de este grupo presentaron intervalo de edad de 4 a 18 años con una mediana de 8 (4-18 años de edad). Por cada 4 hombres se presentaron 3 mujeres. La mayoría residentes de Hermosillo: 6/7 casos y 1 foráneo residente de Nogales. El diagnóstico más común de cáncer para los niños fue tumor hematológico en particular LLA. Las características de los 7 pacientes caso que constituyen el presente estudio se presentan en la Tabla IV.

Características de los Pacientes Control

Para la comparación de los casos se consideraron 7 niños control sin cáncer pero con enfermedad crónica por la cual estuvieron sometidos a inmunosupresores. Los niños control fueron diagnosticados de la siguiente manera: 5/7 niños con enfermedad de Crohn y 2/7 con alergia controlada. Los niños del grupo control presentaron intervalo de edad de 3 a 16 años con una mediana de 8. Por cada 4 hombres se presentaron 3 mujeres. La mayoría residentes de Hermosillo: 4/7 casos y 3 foráneos, uno de Guaymas, una de Esqueda y uno de Naco. Las características de los 7 pacientes control que constituyen el presente estudio se presentan en la Tabla V.

Tabla IV. Características de los niños del grupo de casos para el estudio de recuperación inmune en fase de vigilancia.

TIPO DE CÁNCER	EDAD (Años)	SEXO	ORIGEN
Tumor Hematológico			
Leucemia Linfoblástica Aguda	4	M	Nogales
	5	F	Hermosillo
	7	F	Hermosillo
	14	F	Hermosillo
Linfoma de Hodgkin	9	M	Hermosillo
	18	M	Hermosillo
Tumor Sólido			
Meduloblastoma	8	M	Hermosillo

Pacientes Caso (n= 7) del Hospital Infantil del Estado de Sonora. M: Masculino; F: Femenino

Tabla V. Características de los niños del grupo control para el estudio de recuperación inmune celular.

ENFERMEDAD ADYACENTE	EDAD (Años)	SEXO	ORIGEN
Enfermedad de Crohn	3	M	Guaymas
	5	F	Esqueda
	8	F	Hermosillo
	12	F	Hermosillo
	16	M	Naco
Alergia	8	M	Hermosillo
	9	M	Hermosillo

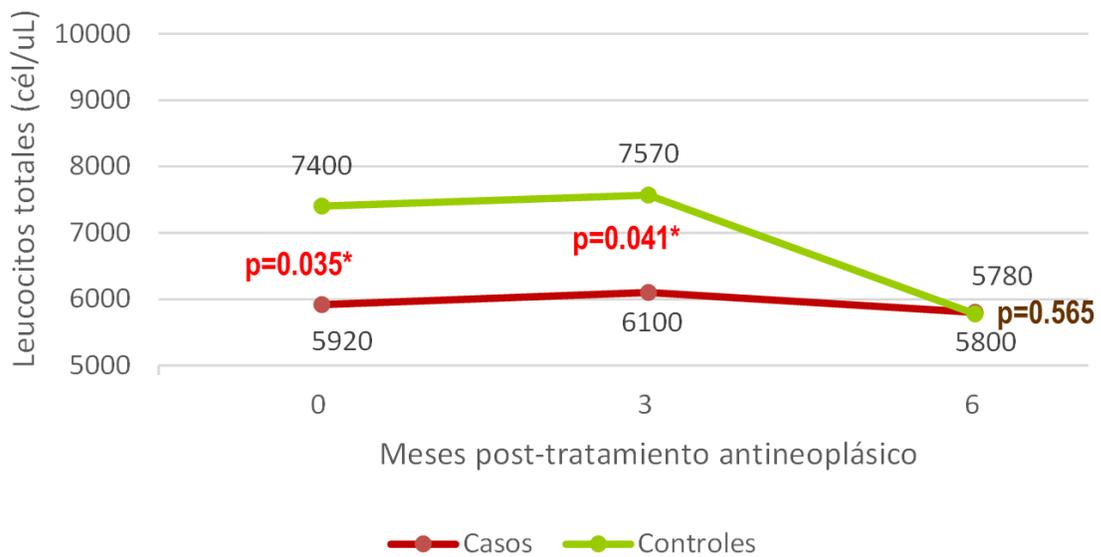
Pacientes Control (n= 7) del Hospital Infantil del Estado de Sonora. M: Masculino; F: Femenino

Cuantificación Celular

De las células que componen al sistema inmune, cuantificamos leucocitos totales, linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica, de las cuales, los LT fue la subpoblación linfocitaria más afectada.

La cantidad de leucocitos totales en el grupo de casos se mostró dentro de los valores de referencia establecidos (Santoscoy y col., 2014), excepto en un caso que inició la fase de vigilancia con valor subnormal pero que se recuperó rápidamente a los tres meses después, a diferencia del grupo control que iniciaron con valores elevados que se normalizaron en las mediciones subsecuentes. La mediana de la cuenta absoluta de leucocitos totales presentó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al tiempo 0 y a los tres meses de iniciada la fase de vigilancia ($p = 0.035$ y $p = 0.041$ respectivamente) igualando los valores entre ambos grupos al finalizar el semestre de estudio, tal como se observa en la Figura 10. La Tabla VI muestra la comparación de las medianas con diferencia estadística de los marcadores inmunológicos evaluados al inicio, a los 3 meses y al final del primer semestre de la fase de vigilancia, obtenidos de los pacientes caso comparados con los de los pacientes control. Se indican aquellos que mostraron diferencia significativa. Todos los valores están representados por la mediana en cada momento evaluado.

Los linfocitos totales absolutos en algunos niños caso, mostraron valores subnormales al inicio de la fase de vigilancia, que se recuperaron rápidamente tres meses después, excepto en un niño caso que se recuperó a los 6 meses en fase de vigilancia.



*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba U de Mann Whitney; Casos (n=7) Vs Controles (n=7) del HIES.

Figura 10. Recuperación inmune de leucocitos totales en el primer semestre de la fase de vigilancia de casos vs controles

Tabla VI. Evaluación estadística del conteo de glóbulos blancos, leucocitos totales y subpoblaciones linfocitarias: CD3+, CD19+ y CD16+ tanto de casos como de controles.

TIPO DE CÉLULA	Mediana (intervalo cél/ μ L)			p (≤ 0.05)
	MESES EN FASE DE VIGILANCIA			
	0	3	6	
Leucocitos totales				
Casos	5920 (970-6900)	6100 (5630-8950)	5800 (5110-9580)	0.857
Controles	7400 (5300-13770)	7570 (6100-13910)	5780(3700-9800)	0.066
p (≤ 0.05)	0.035*	0.041*	0.565	
Linfocitos totales				
Casos	1782 (360-3174)	2130 (1340-3360)	2290 (1440-2870)	0.018*
Controles	2150 (1200-4450)	2760 (2160-8040)	2560 (1900-4018)	0.618
p (≤ 0.05)	0.11	0.085	0.141	
Subpoblaciones linfocitarias				
células CD3+				
Casos	884 (304-1993)	1193 (739-2258)	1158 (1058-2082)	0.066
Controles	1782 (1002-2901)	1893 (1560-5162)	2016 (1307-3038)	0.651
p (≤ 0.05)	0.048*	0.035*	0.025*	
células CD19+				
Casos	205 (5-644)	411 (79-810)	385 (144-1062)	0.05*
Controles	427 (107-576)	352 (138-1769)	350 (272-530)	0.565
p (≤ 0.05)	0.11	0.565	0.949	
células CD16+				
Casos	264 (25-791)	298 (77-773)	191 (93-664)	0.867
Controles	155 (17-988)	257 (64-981)	257 (30-373)	0.565
p (≤ 0.05)	0.949	0.654	0.655	

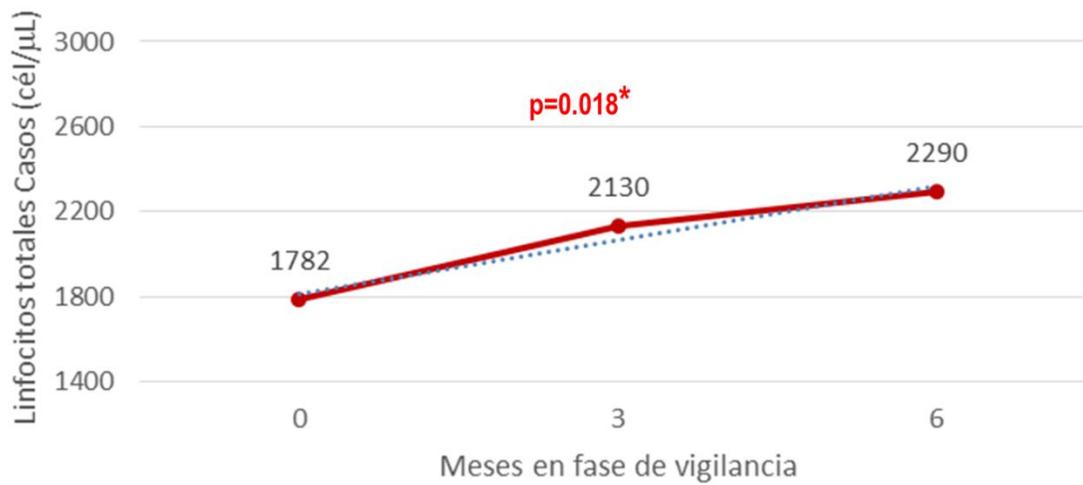
*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba U de Mann Whitney para diferencias entre Casos ($n=7$) Vs Controles ($n=7$) del HIES; uso de la prueba de Friedman para diferencias entre grupos correlacionados; cél/ μ L = células por microlitro

Aunque no se demostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, sí se demostró recuperación de linfocitos totales en el grupo de casos dado por una $p < 0.05$ ($p = 0.018$), tal como se observa en la Figura 11.

En cuanto a subpoblaciones linfocitarias, la cuenta de linfocitos T (CD3+) resultó subnormal en el grupo de casos y algunos niños no mostraron recuperación al final del estudio. La mediana resultó con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al inicio, a los 3 meses y al final del primer semestre de la fase de vigilancia ($p = 0.048$, $p = 0.035$ y $p = 0.025$ respectivamente) en comparación con el grupo control, tal como se muestra en la Figura 12. A pesar de que se observó que los valores de linfocitos T fueron aumentando en los niños caso a lo largo del estudio, no se demostró estadísticamente al final de la evaluación, denotando que no se recuperaron significativamente (Tabla VI).

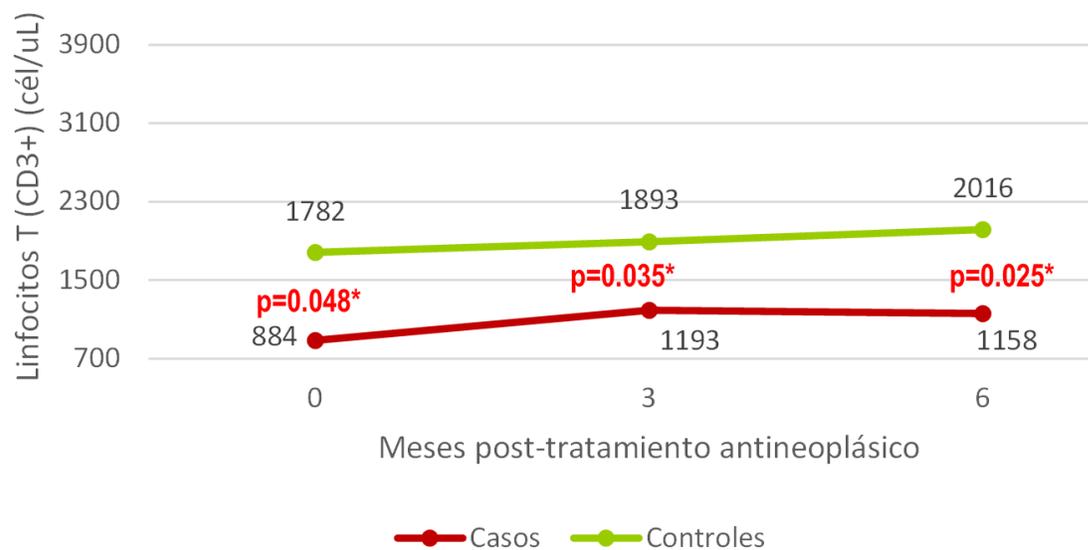
La cantidad de linfocitos B (CD19+) mostró valor subnormal en algunos de los niños caso pero se recuperaron rápidamente a los tres meses en fase de vigilancia, excepto en uno de ellos que quedó subnormal al término del estudio sin mostrar diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (Tabla VI). Por otro lado, como se observa en la Figura 13, se demostró recuperación de linfocitos B en el grupo de casos dado por una $p = 0.05$.

Finalmente, como se muestra en la Figura 14, los linfocitos NK (CD16+) no mostraron diferencia significativa en alguna de las mediciones ni mostraron recuperación estadísticamente significativa a lo largo del estudio, sin embargo, se observó ligera depresión en cantidad al final del primer semestre de la fase de vigilancia, tal como se observa en la Figura 15, aunque dentro del intervalo de referencia establecido.



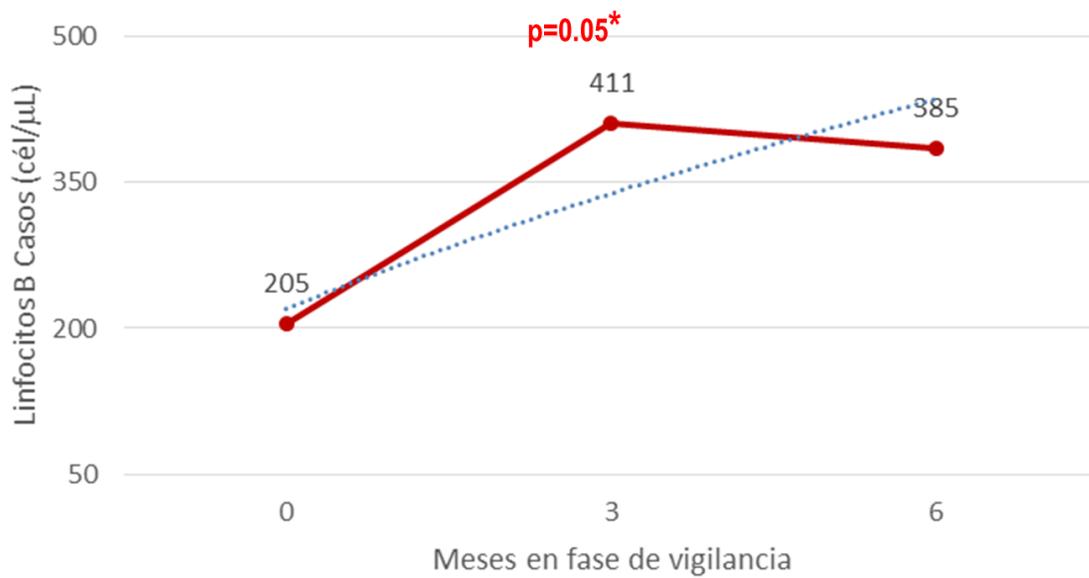
*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba de Friedman para diferencias entre grupos correlacionados; Casos ($n=7$) del HIES; $\text{cél}/\mu\text{L}$ = células por microlitro.

Figura 11. Recuperación inmune en el grupo de casos con base en la cuenta de linfocitos totales en el primer semestre de la fase de vigilancia.



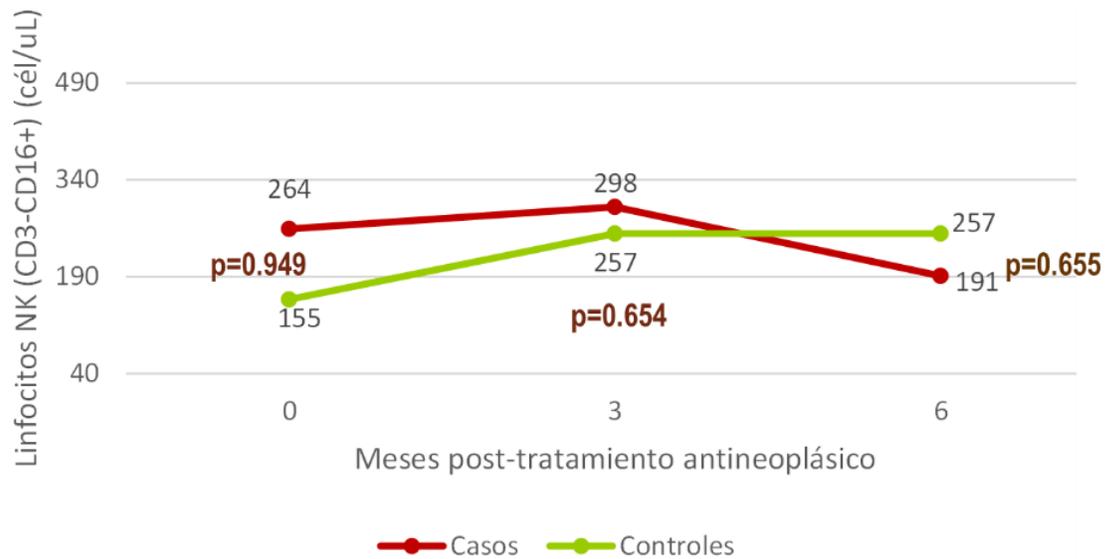
*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba U de Mann Whitney para diferencias entre Casos ($n=7$) Vs Controles ($n=7$) del HIES; $\text{cél}/\mu\text{L}$ = células por microlitro

Figura 12. Recuperación inmune de casos vs controles con base en la cuenta de linfocitos T (CD3+) en el primer semestre de la fase de vigilancia.



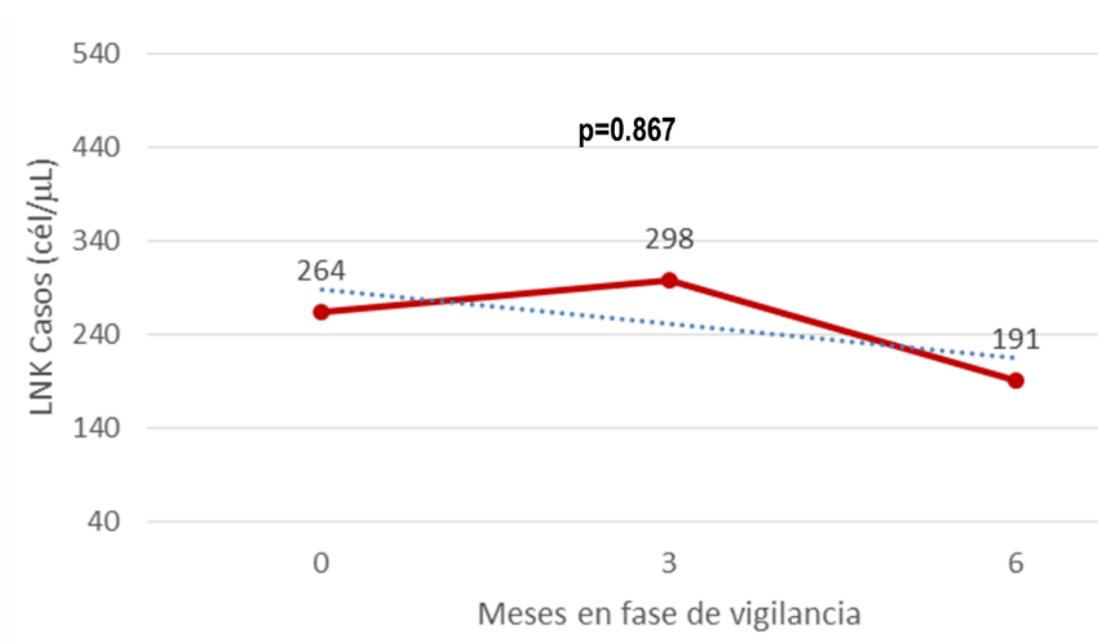
*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba de Friedman para diferencias entre grupos correlacionados; Casos ($n=7$) del HIES; $\text{cél}/\mu\text{L}$ = células por microlitro

Figura 13. Recuperación inmune en el grupo de casos con base en la cuenta de linfocitos B durante el primer semestre de la fase de vigilancia.



*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba U de Mann Whitney para diferencias entre Casos ($n=7$) Vs Controles ($n=7$) del HIES; $\text{cél}/\mu\text{L}$ = células por microlitro

Figura 14. Recuperación inmune de casos vs controles con base en la cuenta de linfocitos NK en el primer semestre de la fase de vigilancia.



*=valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$); Se presenta la mediana de los valores de cada una de las tres mediciones; mediante la prueba de Friedman para diferencias entre grupos correlacionados; Casos ($n=7$) del HIES; $\text{cél}/\mu\text{L}$ = células por microlitro

Figura 15. Recuperación inmune en el grupo de casos, con base en la cuenta de linfocitos NK durante el primer semestre de la fase de vigilancia.

DISCUSIÓN

La recuperación inmune es el proceso de reconstitución de las células que se perdieron después de administrar tratamiento inmunosupresor, como lo es el tratamiento antineoplásico. Mustafá y col., refieren que varios estudios han investigado la recuperación inmune post-quimioterapia pero que la mayoría de ellos se han efectuado en los 70's y 80's, cuando la metodología para investigar inmunidad era diferente a la usada en la actualidad. En nuestro estudio, el grado de inmunodeficiencia y la evolución clínica de los pacientes, como resultado de la depleción de linfocitos que induce la quimioterapia antineoplásica, fue diferente a lo publicado por. Hitzig y col., y Layward y col., quienes refieren que después de completar un tratamiento contra LLA, continúan inmunosuprimidos por periodos variados y a largo plazo respectivamente. Se ha investigado que, post-tratamiento antineoplásico, el periodo de un año es suficiente para recuperación del sistema inmune en estas condiciones (Kovacs y col., 2008). A diferencia de otros autores, como Alanko y col., que establecieron un funcionamiento suficiente del sistema inmune 6 meses post-quimioterapia en LLA como para administrar antibióticos profilácticos e iniciar inmunizaciones. Por lo tanto, la extensión y duración de la inmunidad celular en niños que han completado su esquema de tratamiento antineoplásico no está bien definida y para ello se han cuantificado subpoblaciones linfocitarias que se han vuelto de interés durante el tratamiento antineoplásico debido a su participación frente a células tumorales. En nuestro estudio establecimos como tiempo de recuperación inmune celular un periodo de 3 a 6 meses post-quimioterapia para niños con neoplasias que completaron su esquema de tratamiento y entraron en fase de vigilancia en el HIES. Después de la exposición a tratamiento citotóxico, la recuperación inmune celular y humoral está en dependencia predominantemente de la reconstitución de los elementos linfoides (Jaime y col., 2006).

Nuestro estudio reportó deficiente cantidad de linfocitos totales absolutos de los casos, que se recuperaron rápidamente en el primer trimestre del estudio mostrando diferencia significativa de recuperación. Otros autores han evidenciado en su

población de estudio que el recuento de linfocitos absolutos se disminuyó post-quimioterapia cuando se comparó con controles sanos y que permanecieron con defecto cuantitativo hasta un año post-quimioterapia (Katz y col., 1987; Ek y col., 2005; Mazur y col., 2006 y Jarosz y col., 2009).

La recuperación de células NK (CD16+), en nuestro estudio, mostraron diferencia de medianas de 264 a 191 células/ μ L en el primer semestre de la fase de vigilancia. Aunque se denotó una sutil disminución, no resultó estadísticamente significativa. Toubert y col., han reportado que las primeras células que se recuperan son las de respuesta inmune innata tal como granulocitos, monocitos, macrófagos y células NK en contraste con las células T y B que permanecen severamente reducidas. Mazur y col., señalaron que el número de células NK resultó mayor que lo normal post-quimioterapia. Otros autores han establecido que la recuperación de células NK ocurre rápidamente, ya que no requiere un timo funcional, en las primeras semanas del periodo postrasplante de células hematopoyéticas (Jaime y col., 2006). Sin embargo, algunos autores han encontrado que la recuperación de células NK ocurre en 6 meses o hasta 18 meses post-quimioterapia antineoplásica (Katz y col., 1987; Ek y col., 2005; Kosmidis y col., 2007; Jarosz y col., 2009). Tales diferencias pudieran deberse a los tiempos de punto final de la observación de la recuperación inmune (Jarosz y col., 2009).

Los linfocitos B (CD19+) en nuestros pacientes se recuperaron en cantidad significativa estadísticamente (dado por la mediana) de 205 a 385 en el primer semestre de la fase de vigilancia, tal como lo reporta Alanko y col., así como McCall y col., donde los LB de sus pacientes mostraron valores comparables con su grupo control de sanos, reflejando recuperación de esta población celular rápidamente post-quimioterapia. Eyrich y col., mostraron que en sus pacientes las células B fueron las más afectadas por la quimioterapia pero después del cese del tratamiento su cantidad se normalizó rápidamente. Algunos autores han demostrado linfopenia profunda de células B, sugiriendo periodos más largos del proceso de recuperación inmune (Hitzig y col., 1976; Caver y col., 1998; Kostaridou y col., 2004; Ek y col., 2005). En nuestro estudio un niño caso persistió con deficiencia de células B, aunque la cantidad de estas células fue aumentando con respecto al tiempo,

mostraron número disminuido de ellos, todavía al final del estudio. Se ha documentado depleción de LB y se ha supuesto que la deficiencia selectiva de LB resulta de la enfermedad por sí misma relacionada con la quimioterapia dirigida hacia estas células (Caver y col., 1998).

La recuperación de linfocitos T (CD3+) de los casos de nuestro estudio, mantuvieron la mediana por debajo de 1200 células/ mm³. A pesar de que se observó en algunos pacientes recuperación cuantitativa de células T, no se demostró significancia estadística. Sería recomendable un análisis más profundo con mayor tamaño muestral que permitiera analizar si este valor alcanzado pudiera ser ya un valor en intervalo normal. Algunos autores como Hitzig y col., Caver y col., Alanko y col., y Kostaridou y col., han descrito recuperación inmune rápida a favor de linfocitos T en 3 a 6 meses post-quimioterapia, aunque la mayoría de los autores han evidenciado recuperación lenta de esta subpoblación linfocitaria. Las variaciones en los resultados pueden denotarse por diferentes factores como son el tipo de cáncer (si es tumor sólido o hematológico), el grupo de riesgo en que se clasifica al paciente al ingresar al área de oncología (alto, medio o bajo riesgo), la intensidad del tratamiento (Ek y col., 2005), tiempo de aplicación del tratamiento antineoplásico, la fase en que se efectúa la evaluación (Jarosz y col., 2009), la edad del paciente (Mustafá y col., 1998), entre otros factores.

La evaluación de la recuperación inmune registró un hallazgo durante nuestro estudio: observamos que 3 niños caso que no mostraron recuperación a los tres meses en fase de vigilancia, principalmente en la cuenta de linfocitos totales en conjunto con la cuenta de linfocitos T (CD3+), presentaron recaída de la enfermedad a pesar de que recibieron tratamiento intensivo desde el inicio, su inmunidad se vio mermada tal vez por el tipo de cáncer que presentaron (Histiocitosis de células de Langerhans, Leucemia linfoblástica aguda) cuya parte genética es importante así como el aspecto de inmunovigilancia deficiente. A diferencia de otros casos que mostraron LT o LB disminuidos persistentemente durante el semestre de estudio, pero no de linfocitos totales y no mostraron recaída. Alanko y col., declararon que son posibles defectos inmunológicos persistentes a largo plazo basados en la recuperación lenta de linfocitos post-quimioterapia. Varios estudios han mostrado

una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con mayores recuentos de linfocitos después de la quimioterapia antineoplásica, aunque en realidad se desconoce si la depleción de linfocitos inducida por la quimioterapia aumenta el riesgo de recurrencia del tumor. En nuestro estudio se observó lenta recuperación de LT comparado con recuperación rápida de células B y de NK de 0 a 3 meses post-quimioterapia. Así, se ha observado que el grado de recuperación inmune varía de acuerdo a varios factores y al tipo de célula que se esté determinando. Varios autores han mostrado que los pacientes más jóvenes están predispuestos a trastornos inmunológicos persistentes después de terminar el tratamiento contra el cáncer en diferentes fases (Katz y col., 1987; Alanko y col., 1994; Mustafá y col., 1998; Mazur y col., 2006; Kosmidis y col., 2008; Kovacs y col., 2008; Azburg y col., 2009). Por otro lado, Ek y col., declararon que los niños más pequeños podrían experimentar periodos más cortos de inmunosupresión de células CD3⁺ asociada a quimioterapia, que adolescentes, debido a que todavía muestran evidencia de timopoyesis mientras que el resto ha perdido el timo.

La recuperación inmune ha sido más estudiada en los pacientes con cáncer que han recibido un trasplante progenitor hematopoyético en estos estudios la fase final de la recuperación inmune celular está dada por la emergencia de nuevas células T generadas de precursores pre-tímicos. Los niños y pacientes jóvenes tienen un timo más funcional y por lo tanto una mayor recuperación del número de células T en los primeros dos años pos-trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, a diferencia de la reconstitución de las células NK que no requiere un timo funcional y ocurre rápidamente en las primeras semanas del periodo pos-trasplante (Jaime y col., 2006).

El paso de la recuperación inmune después de completar quimioterapia permanece pobremente cuantificada y es multifactorial al estar relacionada con la malignidad subyacente, la intensidad del tratamiento y la edad del paciente (Feusner y col., 2015). Debido a que es difícil predecir cómo un régimen inmunosupresor en particular será para un paciente individual, la cuantificación de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo puede ser útil para estimar el nivel de

inmunosupresión inducido por quimioterapia (Couston-Smith y col. 2006) y con ello poder detectar anomalías y recaídas tempranas y tratarlos con mayor eficacia.

CONCLUSIONES

La recuperación inmune celular de linfocitos T resultó más afectada que la de las células B y NK en niños con cáncer tratados con antineoplásicos en el primer semestre de la fase de vigilancia.

La inmunidad celular se deprimió al inicio, lográndose la recuperación de linfocitos B (CD19+) y NK (CD16+) en el primer trimestre en fase de vigilancia,.

En contraste, la inmunidad de células T (CD3+) permaneció afectada en número, todavía al finalizar el estudio.

Niños que no recuperaron linfocitos totales en conjunto con LT, presentaron recaída de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

La recuperación inmune celular durante la fase de vigilancia en niños con cáncer permanece como área inexplorada a nivel nacional. Se necesita una mayor cantidad de la población de estudio y se recomienda mayor tiempo de seguimiento con intervalos más pequeños de evaluación para poder identificar deficiencias inmunes con mayor precisión.

Se recomienda hacer seguimiento con la evaluación de la funcionalidad de las células implicadas en recuperación celular post-quimioterapia.

LIMITACIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio resultaron de casos captados en un periodo de inclusión de 12 meses, lo cual fue limitante para obtener mayor tamaño muestral. Sin embargo, es evidente la recuperación indicada previamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H., Pober, J.S. 2004. Cellular and Molecular Immunology. 5ta. Edition. Elsevier Science Editorial.
- Alanko, S.; Tarja-Terttu, P.; Toivo, T. S. 1992. Recovery of blood B-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 69.6: 1481-1486.
- Alanko, S.; Toivo, T. S.; Tarja-Terttu, P. 1994. Recovery of Blood T-Cell Subsets After Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Hematology-Oncology* 11.3: 281-292.
- Alanko, S.; Toivo, T. S.; Tarja-Terttu, P.1995. Recovery of natural killer cells after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia and solid tumors. *Medical and pediatric oncology* 24.6: 373-378.
- Álvaro Naranjo, T.; Lejane, M.; De San José, S. 2005. Respuesta inmune en linfomas. Congreso de anatomía patológica. España. www.conganat.org
- Azburg, M. J. 2009. Vaccination in the immunocompromised child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28(3), 233-236.
- Beers, M.H.; Jones, T.V.; Berkwits, M.; Kaplan, J.L.; Porter, R. 2005. .The Merck manual of health & aging [Internet]. Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories; Available in Spanish from: <http://manualmerck.tripod.com/>
- Burnett, D.; Crocker J. 2005. La ciencia del diagnóstico de laboratorio. 2da Ed. Ed McGraw Hill. Cap 47:455-56.
- Calderón Pascacio R.V. 2007. Curso de métodos fisicoquímicos en biotecnología inmunoquímica. Universidad Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Carrión, A.F.; Figueroa, F.; Rodríguez, C. 2000. La Inmunología clínica actual: una perspectiva genética y molecular. *Rev. Med. Chile* v.128 n.6 Santiago
- Caver, T.E.; Slobod, K.S.; Flynn, P.M.; et al. 1998 Profound abnormality of the B/T lymphocyte ratio during chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia*; 12: 619–622.

- CDC. Trends in childhood cancer mortality-United States 1990-2004. 2007. *Morb Mortal WklyRep* 56, 1257-1261
- CeNSIA, 2010. Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. México. Disponible en http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/nivel_mundial.html
- Coustan-Smith, E.; Ribeiro, R.; Stow, P.; Zhou, Y.; Pui, Ch.-H.; Rivera, G.; Pedrosa, F.; Campana, D. 2006. A simplified flow cytometric assay identifies children with ALL who have a superior clinical outcome. *Blood*. julio; 108 (1):97-102.
- Dunn, G.; Bruce, A.; Ikeda, H.; Old, L.; Schreiber, R. 2001. Cancer Immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol* 3: 991-998
- Ek, T.; Mellander, L.; Andersson, B.; Abrahamsson, J. 2005. Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group. *Pediatr Blood Cancer*. May;44(5):461-8.
- Eyrich, M.; Wiegering, V.; Lim, A.; Schrauder, A.; Winkler, B.; Schiegel, P. 2009. Immune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukaemia a prospective study of 20 paediatric patients. Blackwell Publishing Ltd. *British Journal of Haematology*, 147, 360-370.
- Fajardo-Gutiérrez, A.; Mejía-Aranguré, J. M.; Hernández-Cruz, L.; Mendoza-Sánchez, H. F.; Garduño-Espinosa, J. y Martínez-García, M. C. 1999. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud Publica* vol.6 n.2 Washington Aug. 1999
- Feusner, J.H.; Hastings, C.A; Agrawal, A.K. 2015. Supportive care in pediatric oncology: a practical evidence-based approach. Immune recovery after chemotherapy completion. Págs.. 264-268. Ed. Springer.
- Garcia, C.A.; Robinson, J.; Madrigal, J.; Marsh, S.G.E. 2003. Natural Killer Cell Receptors:Functional Roles. *Inmunología* Vol. 22 / Núm 2/ Abril-Junio: 190-202.
- Hernandez, J.; Velazquez, C.; Valenzuela, O.; Robles, R.; Ruiz, E.; Navarro, M.; Garibay, A. 2010. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological investigations* 39:197-205.
- Hitzig, W.H.; Pluss, H.J.; Joller, P.; et al. 1976 Studies on the immune status of children with acute lymphocytic leukaemia-II. In remission with and without cytostatic treatment. *Clin Explimmunol*; 26:414-418

- Jaime Fagardo, J. C.; Dorticós Balea, E.; Pavón Morán, Valia Jauma Rojo, A. J.; Cortina Rosales, L. 2006. Aspectos Inmunológicos del Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Med Transf* 22(3).
- James, M.; Kelley, M.D. 2007. Inmunología, Biología molecular y la enfermedad. Presentado como parte del Simposio Internacional de Biología Molecular el 3 de agosto, en Clínica Las Condes, Santiago, Chile.
- Jarosz, M.; Hak, L.; Wiêckiewicz, J.; Balcerska, A.; Yoeliwska, J. 2009. Clinical immunology NK cells in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after cessation of intensive chemotherapy. Poland. *Clinical Immunology Central European Journal of Immunology*; 34(2):94-99
- Katz, J.; Walter, B. N.; Bennetts, G. A.; Cairo, M. S. 1987. Abnormal cellular and humoral immunity in childhood acute lymphoblastic leukemia in long-term remission. *WestJMed* Feb 146:179-187 Orange, California
- Kelley, J.M. 2007. Inmunología, biología molecular y la enfermedad. Division of Clinical Immunology and Rheumatology. Universidad de Alabama, USA. *Rev.Med.Clin.CONDES*;18(4)287-297]
- Kosmidis, S.; Baka, M.; Bouhoutsou, D.; Doganis, D.; Kallergi, C.; Douladiris, N.; Pourtsidis, A.; Varvoutsi, M.; Saxoni-Papageorgiou, F.; Vasilatou-Kosmidis, H. 2008. Longitudinal assessment of immunological status and rate of immune recovery following treatment in children with ALL. *Pediatr Blood Cancer*. Mar;50(3):528–532 Atenas, Grecia.
- Kostaridou, S.; Polychronopoulou, S.; Psarra, K.; et al. 2004. Decrease of CD4 and B-lymphocyte populations is not associated with severe infectious complications in children with acute lymphoblastic leukaemia during maintenance. *Int J Hematol*; 80(4): 354– 360.
- Kovacs, G.T.; Barany, O.; Schlick, B.; Csoka, M. J.; Gado, P. A.; Müller, N. J.; Hauser, P.; Erdelyi, D.J. 2008. Late immune recovery in children treated for malignant diseases. *Pathol Oncol Res*. 14 (4) :391-7. Budapest, Hungría.
- Layward, L.; Levinsky, R. J.; Butler, M. 1981. Long-term abnormalities in T and B lymphocyte function in children following treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*; 49, 251-258.

- Longo, D. L.; Fauci, A.S.; Kasper D.L.; Braunwald E.; Hauser, S.L.; Jameson, J.L.; Loscalzo J. 2013. Harrison Hematología y Oncología. 1ra ed en español. Ed Mc Graw Hill. México, D.F.
- MacKall, C.L.; Fleisher, T.A.; Brown, M.R.; Mary, P.; Andrich, C.C.; Feuerstein, I.M.; Magrath, I.T.; Wexler, L.H.; Dimitrov, D.S.; Gress, R.E. 1997. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*; 89:3700-3707.
- Maglioco, A. F. 2011. Terapias combinadas contra tumores malignos: inmunoterapia y quimiotratamiento. Relación de la eficacia del tratamiento con el estado inmunológico del portador. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Mazur, B.; Szczepanski, T.; Karpe, J.; Jakimezyk, D.S.; Bubala, H.; Torbus, M. 2006. Decreased numbers of CD4 T-lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia Research*; 30(1): 33–36.
- Mendoza Rincón, J.F. 2004. Células NK: nuevos roles en su función inmunológica. *Vertientes, Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 7(1-2):44-53, 2004.
- Miller, R. E. 2010. Disponible en kidshealth.org/parent/en_español/medicos/cancer_esp.html?tracking=p_relatedarticle#
- Moretta, A.; Marcenaro, E.; Parolini, S.; Ferlazzo, T.; Moretta, L. 2008. Células NK en la interfaz entre la inmunidad innata y adaptativa. *Cell Death Differ*.15 (2):226-33.
- Murphy, K.M.; Travers, P.; Walport M. 2008. *Inmunobiología de Janeway*. 7ma ed. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F.
- Mustafá, M.M.; Buchanan, G.R.; Winick, N.J.; et al. 1998. Immune recovery in children with malignancy after cessation of chemotherapy. *J Pediatric Hematology Oncology*; 20(5): 451–457
- Olkinuora, H.; Rahiala, J.; Anttila, V.J.; Koskenvuo, M.; Vettenranta, K. 2013. Immune deficiency and infections in children having cáncer. *Abstract of papers. Duodecim* 129(12):1233-41
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OCF, 2013. Oral Cancer Foundation <http://oralcancerfoundation.org/>

- Pizzo, P.A.; Poplack, D.G. 2004. Principles and practice of pediatric oncology. 6ta ed. Ed.Lippincott Williams and Wilkins.
- Resino, S. 2013. Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas. <http://epidemiologia molecular.com/celulas-sistema-inmunitario/>
- Ricevuto, E.; Bruera, G.; Marchetti, P. 2010. General principles of chemotherapy. European Review for Medical and Pharmacological Sciences; 14: 269-271 Italia
- Roshni, Mitra; Sarvjeet, Singh; Ashok, Khar. 2003 Antitumour immune responses. Exp. Rev. Mol. Med. Vol. 5 India.
- SAC, Sociedad Americana del Cáncer. 2011. Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre Hispanos/Latinos 2009-2011. Cap. El Cáncer en los niños y Adolescentes pág 14-16.
- Santoscoy Tovar, G.J.; Santoscoy Tovar, F.A.; Santoscoy Tovar, L.A.; Santoscoy A. G. y cols. 2014. Unidad de Patología Clínica. Servicio de Referencia a Laboratorios de todo México. <http://www.upc.com.mx>
- SEOM Sociedad Española de Oncología. 2013. Efectos secundarios de la quimioterapia.<http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/guia-actualizada/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia>
- Sepúlveda, C.; Puente, J. 2000. Células NK y el SI innato en la patología infecciosa. Rev. méd. Chile v.128 n.12 Santiago
- Toubert, A. 2008. Haematopoietic stem cell transplantation. CAP 15. The EBMT HANDBOOK Revised edition.
- Unidad de Patología Clínica. 2014. Servicio de referencia, Guadalajara, Jalisco, México. www.upc.com.mx
- Vargas, P. L. 2000. Cáncer en pediatría. Aspectos generales. Rev.Chil.Pediatr. vol 71 n.4 Santiago.
- Workman, M.L. 1989. Immunologic late effects in children and adults. Semin Oncol Nurs. Feb; 5(1): 36-42

ANEXO I

Consentimiento Informado Para Paciente Caso

Consentimiento informado para participar como CASO en la investigación para obtener el grado de Maestría titulado: "Evaluación de la Recuperación Inmune Celular en Niños Post-Tratados con Antineoplásicos en Fase de Vigilancia que Asisten al Hospital Infantil del Estado de Sonora"

Investigador: Q.B. Ana Gloria Andrade Arteaga

Director de Tesis: Dr. Gilberto Covarrubias Espinoza

A través del Hospital Infantil del Estado de Sonora y de la Universidad de Sonora

Nombre del paciente: _____ A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación clínica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La evaluación del sistema inmune en pacientes sometidos a quimioterapia es de gran importancia debido a que infecciones de severidad variable se presentan post-tratamiento o posibles recaídas pueden estar relacionadas con defectos inmunes persistentes. El tratamiento con quimioterapia es necesario para eliminar las células malignas que producen la enfermedad de su hijo (a), sin embargo, su uso predispone a efectos tóxicos en células sanas también, produciendo influencia negativa en el sistema inmunológico afectando su calidad y función. Por ello es importante evaluar el grado de reconstitución inmune, que permitirá evidenciar la condición inmunológica de los niños una vez que se encuentren en su fase de curación para controlar la enfermedad residual maligna y deficiencias inmunes secundarias.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como Objetivo General: Evaluar la reconstitución inmune, por citometría de flujo, de células T, B

y NK en niños con cáncer tratados con antineoplásicos del Hospital Infantil del Estado de Sonora en el primer semestre de la fase de vigilancia.

Objetivos Particulares:

1. Evaluar células del sistema inmune por citometría hemática completa y por citometría de flujo identificando, en sangre periférica, Linfocitos T, B y NK por marcadores celulares CD3⁺, CD19⁺ y CD3⁻ CD16⁺ respectivamente, al inicio y al término del primer semestre de la fase de vigilancia.
2. Determinar el grado de reconstitución inmune mediante un comparativo de las poblaciones celulares evaluadas en los dos tiempos diferentes.
3. Integrar una población control, efectuándole los mismos procedimientos que a la población de casos para garantizar la validez interna del estudio
4. Realizar un análisis descriptivo y multivariado tanto de casos como de controles.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente por investigadores en otras partes del mundo, se ha observado que la inmunosupresión es un efecto secundario importante del tratamiento antineoplásico. El proceso de reconstitución inmune puede ser diferente según la naturaleza de la enfermedad, el tipo y dosis de los fármacos y la edad de los pacientes (El-Chennawi y cols, 2008). Este estudio será un valioso apoyo de factor pronóstico para determinar el componente celular que controlará la enfermedad residual maligna y deficiencias inmunes secundarias.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos y análisis de seguimiento de la enfermedad así como de laboratorio de rutina y especiales para los cuales se le tomará una muestra de sangre de la vena.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

El estudio consiste en la obtención de una toma de muestra de sangre venosa, durante la cual se puede sentir un ligero dolor por la punción o ardor por el alcohol y puede llegar a formarse un morete en la zona puncionada. La muestra, una vez obtenida, se tratará especialmente y se cuantificarán células del sistema inmunológico.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

Este protocolo se ha sometido y ha sido aprobado por el comité de Ética del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

ANEXO II

Consentimiento Informado Para Paciente Control

Consentimiento informado para participar como CONTROL en la investigación para obtener el grado de Maestría titulado: "Evaluación de la Recuperación Inmune Celular en Niños Post-Tratados con Antineoplásicos en Fase de Vigilancia que Asisten al Hospital Infantil del Estado de Sonora"

Investigador: Q.B. Ana Gloria Andrade Arteaga

Director de Tesis: Dr. Gilberto Covarrubias Espinoza

A través del Hospital Infantil del Estado de Sonora y de la Universidad de Sonora

Nombre del paciente: _____ A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación clínica para formar un grupo CONTROL. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La evaluación del sistema inmune es de gran importancia debido a que infecciones de severidad variable pueden presentarse después del tratamiento farmacológico inmunosupresor que se le administra a su hijo. Este tratamiento es necesario para la enfermedad de su hijo (a), sin embargo, su uso predispone a efectos adversos produciendo influencia negativa en el sistema inmunológico afectando su calidad y función. Por ello es importante evaluar el grado de reconstitución inmune, que permitirá evidenciar la condición inmunológica de los niños una vez que se encuentren en su fase de curación para controlar deficiencias inmunes secundarias.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como Objetivo General: Evaluar la reconstitución inmune, por citometría de flujo, de células T, B y NK en niños con cáncer tratados con antineoplásicos del Hospital Infantil del Estado de Sonora en el primer semestre de la fase de vigilancia.

Objetivos Particulares:

1. Evaluar células del sistema inmune por citometría hemática completa y por citometría de flujo identificando, en sangre periférica, Linfocitos T, B y NK por marcadores celulares CD3⁺, CD19⁺ y CD3⁻ CD16⁺ respectivamente, al inicio y al término del primer semestre de la fase de vigilancia.
2. Determinar el grado de reconstitución inmune mediante un comparativo de las poblaciones celulares evaluadas en los dos tiempos diferentes.
3. Integrar una población control, efectuándole los mismos procedimientos que a la población de casos para garantizar la validez interna del estudio
4. Realizar un análisis descriptivo y multivariado tanto de casos como de controles.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente por investigadores en otras partes del mundo, se ha observado que la inmunosupresión es un efecto secundario importante del tratamiento antineoplásico. El proceso de reconstitución inmune puede ser diferente según la naturaleza de la enfermedad, el tipo y dosis de los fármacos y la edad de los pacientes (El-Chennawi y cols, 2008). Este estudio será un valioso apoyo de factor pronóstico para determinar el componente celular que controlará la enfermedad residual maligna y deficiencias inmunes secundarias.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos y análisis de seguimiento de la enfermedad así como de laboratorio de rutina y especiales para los cuales se le tomará una muestra de sangre de la vena.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

El estudio consiste en la obtención de una toma de muestra de sangre venosa, durante la cual se puede sentir un ligero dolor por la punción o ardor por el alcohol y puede llegar a formarse un morete en la zona puncionada. La muestra, una vez obtenida, se tratará especialmente y se cuantificarán células del sistema inmunológico.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

_____	_____
Firma del participante	Fecha
_____	_____
Testigo 1	Fecha
_____	_____
Testigo 2	Fecha

Este protocolo se ha sometido y ha sido aprobado por el comité de Ética del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

ANEXO III

Abreviaturas

A	Alergia
APC	Célula presentadora de antígeno
BHC	Biometría hemática completa
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
CD	“Cluster of Differentiation”/ designación de agrupamiento
CeNSIA.	Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia
CTL	Linfocito T citolítico
EC	Enfermedad de Crohn
EIIC	Enfermedad intestinal inflamatoria crónica
Fab	Extremo de unión a antígenos variables de la inmunoglobulina
Fc	Extremo constante de la inmunoglobulina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	Detector de dispersión frontal, en el citómetro de flujo
HIES	Hospital Infantil del Estado de Sonora
IL	Interleucina
INF	Interferón
LB	Linfocitos B o células B
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LNH	Linfoma no Hodgkin
LNK	Linfocitos NK

LT Linfocito T o célula T

LTc Linfocito T cooperador

MHC Complejo principal de histocompatibilidad

OMS Organización Mundial de la Salud

PE Ficoeritrina

SAC Sociedad Americana del Cáncer

SNC Sistema Nervioso Central

SSC Detector de dispersión lateral, en el citómetro de flujo

TCR Receptor de célula T

TH Tumor hematológico

TNF "Tumoral necrosis factor/Factor de necrosis tumoral

TS Tumor sólidoCF

TW Tumor de Wilms

Pediatric Blood & Cancer

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Pediatric Blood & Cancer

Manuscript ID

PBC-15-1266

Title

"Immune Cell Reconstitution in Children Post-treated With Antineoplastics in Surveillance Phase"

Authors

Andrade, Ana

Covarrubias, Gilberto

Garibay, Adriana

Valenzuela, Olivia

Rendón, Homero

Date Submitted

13-Dec-2015

[Author Dashboard](#)

Immune Cell Reconstitution in Children Post-treated With Antineoplastics in Surveillance Phase

Ana Gloria Andrade Arteaga, QB¹, Gilberto Covarrubias Espinoza, MD², Adriana Garibay Escobar, MD¹, Homero Rendón García, MD², Olivia Valenzuela Antelo, MD¹.

¹ Department of Chemical and Biological Sciences of the University of Sonora.

² Oncology Service at Children's Hospital of the State of Sonora.

* Correspondence to:

Ana Gloria Andrade Arteaga, Q.B. Department of Chemical and Biological Sciences of the University of Sonora. Regional Center Unit. Building 5A, 2nd floor, Blvd. Colosio y Reforma. C.P. 83000, Colonia Centro, Hermosillo, Sonora, México. Tel. (662) 259-21-63, Email: aandrade@guayacan.uson.mx.

Text word count 2326;

Abstract word count: 211;

Brief running title: Immune reconstitution in Children in Surveillance

Key words: cellular immune reconstitution, children with cancer, surveillance phase

Tables: 3

Figures: 1

Abbreviations	
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter detector in the flow cytometer
HIES	Children's Hospital of the State of Sonora
LB	Lymphocytes B or B cells
LNK	Lymphocytes Natural Killer

LT	Lymphocytes T o T cells
PE	Phycoerythrin
SSC	Side scatter detector in the flow cytometer

ABSTRACT

Introduction. Immune recovery is the process of reconstitution of lost cells following administration of immunosuppressive therapy, such as the antineoplastic treatment stage in which increased susceptibility to opportunistic infections or further complications, so it is very important to determine how progresses recovery antineoplastic immune cell after treatment in children and is predominantly a function of lymphoid elements.

Methodology. Case-control study of non-experimental, descriptive, with no probability sampling of children attending the Children's Hospital of the State of Sonora, prior informed consent. Immune recovery of leukocytes and lymphocyte subpopulations of T cells (CD3⁺), B (CD19⁺) and NK (CD16⁺) investigated by flow cytometry, in children case with cancer who completed scheme antineoplastic treatment and entered phase surveillance matched by age and gender with control children without cancer, chronic disease treated with immunosuppressants.

Results. At the beginning of the surveillance phase, most patients showed total leukocytes, lymphocytes and lymphocyte subpopulations total number affected whose recovery is quickly evident except T cell. As reported finding, that patients without lymphocyte immune recovery Total or T lymphocytes (CD3 +) in the first quarter in surveillance, disease relapsed.

Conclusions. Cellular immune T cell recovery more affected than that of B and NK cells in children with cancer treated with antineoplastic in the first half of the surveillance phase.

Keywords: cellular immune reconstitution, children with cancer, surveillance phase

INTRODUCCIÓN

The mechanism of action of most anticancer drugs affect vital macromolecules for malignant cells but also on healthy cells. However, the cancer chemotherapy has a critical role in the treatment of childhood cancer (1). Immune recovery is a process that occurs after administration of immunosuppressive treatment such as the antineoplastic treatment, it carried out gradually and the spectrum of infections suffered by the patient reflects the different stages of restoration of the immune (2). Cellular and humoral immune recovery after exposure to high doses of cytotoxic therapy is predominantly dependent reconstitution of lymphoid elements (3). Immunosuppression associated with underlying malignancy and chemotherapy affects the quantity, quality and function of T lymphocytes (LT), B lymphocytes (LB) and lymphocytes "Natural Killer" (LNK) (4,5). At follow-up, it is essential to monitor the recovery of the immune system and immunosuppression may predispose patients to infection or malignant sometimes- fatal secondary complications (6). Although it has been shown in several reports the negative influence of chemotherapy on immune function in cancer patients at different stages of treatment: remission induction , consolidation and maintenance (7-12), it seems to be no evidence documented information regarding immune recovery during the monitoring in our country. The most reliable resource to define and quantify cells is flow cytometry, which enables to detect specifically the principles of size, complexity and fluorescencia cell (13). Therefore our aim was to

determining immune cell recovery, by flow cytometry, of LT, LB and LNK cells in children with cancer treated with antineoplastic in Children's Hospital of the State of Sonora (HIES).

METHODS

The sample was composed of patients they admitted capturing both of Oncology, to form the group of cases, such as the Department of Internal Medicine and Allergy Service of the HIES, to form the control group. Each case and control included under oral informed written consent approved by the Ethics Committee of the HIES (Children's Hospital of the State of Sonora), and signed by a parent of each participant. Inclusion criteria for cases, as follow: boys or girls, under 18 years of age, diagnosed with hematological tumor or solid tumor, exposed to cancer chemotherapy, who completed treatment schedule and came under surveillance, taking consecutively the area of Oncology HIES. Inclusion criteria for controls were as follow: children matched for age and gender with cases without cancer, who visited the HIES of chronic disease than cancer but requiring immunosuppressive therapy. For both groups considered as exclusion criteria: patients receiving immunosuppressive therapy during the study or a history of radiation treatment. As elimination criteria: patients who had complications (serious systemic infection such as septicemia, bacteremia or pneumonia, hemorrhage), and/or relapsed.

Blood samples obtained by venipuncture using vacuum tube system "Vacutainer" with EDTA as anticoagulant at baseline, three months and six months of his capture. Cells were quantified in whole blood including an automated differential counting in an automated hematology analyzer XE-2100 Sysmex Co. Japón, to diagnostic "in vitro" in the clinical laboratory of HIES , whose calibration procedure was performed following the reference methodology according to protocol standardization in the field of clinical hematology laboratory HIES. For flow cytometry, the whole blood sample stained with the monoclonal

antibody conjugated with appropriate fluorochrome fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE), according to protocol standardized (14). Todos los anticuerpos monoclonales se titularon y usaron en concentración conveniente. Double staining performed with the following combinations of monoclonal mouse anti-human antibodies: CD3⁺ FITC (Beckton-Dickinson) with CD19⁺ PE (Beckton-Dickinson) y CD3⁺ FITC with CD16⁺ PE (Beckton-Dickinson). Is further arranged to control blood unstained and isotype control tube consisting mouse IgG labeled with FITC or PE to adjust acquisition quadrants in the flow cytometer for each sample both child case and child control. To each tube, it was placed an aliquot of 50 µL de whole blood. They incubated at room temperature for 20 min in darkness. Later, red cells lysed and further incubated for 5 min at room temperature in the dark. It centrifuged for 5 min at 25°C a 448 g, for decanting the supernatant. Subsequently washed with 4 ml phosphate solution (PBS), it centrifuged for 5 min a 448 g. It decanted and set with 200 ml de paraformaldehído 2%, mixed and filtered prior contents of each tube to be acquired in the flow cytometer FACScanto de Becton and Dickinson by software DIVA. For cytometric analysis, equipment operation and proper discrimination of different fluorescence (compensation) previously verified . We analyzed 10,000 cells per eventAs shown in Figure 1, for cytometric analysis, the lymphocyte region (P1) has been defined, the parameters of size (FSC) and granularity (SSC). The absolute amount of each lymphocyte subpopulation calculated by the following formula: (percentage of labeled cells positively each subpopulation absolute lymphocyte count determined peripheral blood using a cell hematology analyzer described above) and the result expressed as number of cells positive x10³/µL.

Data analyzed statistically with the IBM® SPSS software ver.19. All variables presented as medians and analyzed with nonparametric tests. The Mann Whitney U test used to assess statistical difference between case group and control group. Friedman test used to

determine whether there were differences between correlated measurements. The significance level was determined as $p < 0.05$.

RESULTS

In our study, 28 patients of Oncology ($n = 13$), Internal Medicine ($n = 13$), and Allergy Service ($n = 2$) were collected and classified as follows: 13 cases and 15 controls. Consider that if the 13 children were removed six for the following reasons: 3/6 children were removed by exclusion criteria (relapse), children 1/6 failure to attend appointments, 1/6 by incomplete data 1/6 children and incomplete sarong. However, eight control patients were eliminated: 5/8 by removing your particular case, 1/8 failure to attend appointments and 2/8 for incomplete sarong. Finally, for statistical analysis case 7 children whose characteristics are shown in Table I, and 7 control children matched for age and gender, whose characteristics are shown in Table II, with all its complete measurement data were considered in three times evaluated. The cells that make up the immune system, we estimate total leukocytes, total lymphocytes and lymphocyte subpopulations in peripheral blood, of which the LT was more affected lymphocyte subpopulation.

The Table III it shows the comparison of mean statistical difference initially estimated at 3 months and at the end of the first half of the surveillance phase of the case and control patients cells. They indicate those that showed significant difference. All values represented by the median at all times evaluated. In the case group showed total leukocytes within reference values (15), but one who initiated the monitoring phase with subnormal value recovered quickly during the first quarter of study, unlike the control group where some started with high values of total leukocytes, which normalized in subsequent measurements. The median absolute total leukocyte counts showed statistically significant difference ($p < 0.05$) in the first quarter equaling the values between the two groups in the second quarter of study. The total absolute lymphocyte in some cases children had subnormal levels

at the beginning, which recovered quickly during the first quarter of study, except in a case that recovered at 6 months under surveillance. Statistically significant recovery of total lymphocytes was demonstrated in the case group given by a $p=0.018$.

As for recovery of lymphocyte subpopulations, LT (CD3+) was subnormal at the beginning and some child at the end of the study. The median difference was statistically significant with ($p<0.05$) in the three measurements compared to the control group. Although it observed that LT values increased in the case children throughout the study, this increase was not enough to prove statistically.

Table III also shows recovery of LB (CD19+), whose amount was subnormal value in some of the case children but except for one at the end of the study recovered quickly with statistical significance in the first trimester.

LNK recovery (CD16+) showed no statistically significant difference in any of the measurements, however, mild depression observed at study amount although within the reference range established without statistical significance.

DISCUSSION

The determination of immune cell recovery post-antineoplastic treatment in children is of interest, given the increased susceptibility to opportunistic infections or secondary immune deficiencies that may occur in the surveillance phase. In our study we established as cellular immune recovery period of 3 to 6 months, post-chemotherapy for children with malignancies who completed treatment scheme and entered the surveillance phase in HIES. Some researchers report that after completing a treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), continue immunosuppressed by variables (16) periods and / or long-term up to 5 years (17). It established that, after treatment antineoplastic, a period of one year is enough for the recovery of the immune system in these conditions (18). Furthermore, it has been reported sufficient immune function post-chemotherapy in LLA six months for prophylactic

antibiotics and initiate immunizations (19-21). In our study, we show statistically significant faster recovery of the amount of total lymphocytes in children, having completed cancer treatment scheme, under surveillance, while others authors have shown in the population studied, the lymphocyte count absolute post- chemotherapy was decreased when compared to healthy controls and remained with quantitative defect up to one year post-chemotherapy (6,10-12).

As for the recovery of NK cells (CD16⁺), our patients showed median difference of 264 at 191 cells/ μ l in the first half of the surveillance phase. Although denoted a subtle decrease was not statistically significant. Toubert et al, have reported that the first recovered cells are innate immune response: granulocytes, monocytes, macrophages and NK cells (5). However, other authors indicate that the recovery of NK cells occurs in six months or up to 18 months post- antineoplastic chemotherapy (6,10,22). In addition, Jarosz et al, showed persistent quantitative defect of NK cells after one year of intensive treatment and concluded that such differences could be due to time endpoint of observation in the case of therapy maintenance (12).

B lymphocytes (CD19⁺) in our patients recovered statistically significant amount (given by the median) of 205 at 385 cells/ μ l in the first half of the surveillance phase, as reported by Alanko et al. (19) as well as McKall et al. (23), where LB patients showed recovery of this cell population quickly post- chemotherapy. In contrast, other authors demonstrated profound lymphopenia B cells, suggesting longer periods of immune recovery process (7,9,10,16). In our study, in a child case persisted deficient B cells, although the amount of these cells was increasing with time, showed reduced number of them, yet at endpoint. Depletion documented and LB assumed that selective LB deficiency disease is itself related to chemotherapy directed towards these cells (7).

In recovery of LT (CD3⁺) in some cases in our study, assessment during the semester, the median remained below 1200 cells/ μ l. Although some patients observed quantitative

recovery of T cells, showed no statistical significance. Some authors rapid immune recovery described for T lymphocytes in post- chemotherapy 3 to 6 months (7,9,16,20), but most have demonstrated slow recovery of this lymphocyte subpopulation. Variations in the results denoted by different factors related to the underlying malignancy, type of study population, treatment intensity, age, among other factors (24).

Evaluation of immune recovery recorded a finding during our study. We observed that 3 children case showed no recovery in the first trimester under surveillance, mainly on account of total lymphocytes in conjunction with account T lymphocytes (CD3⁺), presented disease relapse unlike two case patients showed decreased LT or LB persistently during the semester of study, but not in total lymphocytes, showing no relapse of the disease. Alanko et al. reported that persistent immunologic defects are possible long-term based on the slow recovery of lymphocytes. Several studies have shown an improvement in disease-free survival in patients with higher lymphocyte counts after cancer chemotherapy, although in reality it is unknown whether the depletion of lymphocytes induced by chemotherapy increases the risk of tumor recurrence. The immune recovery studied in cancer patients who have received hematopoietic progenitor transplant. In these studies, the final stage of immune cell recovery given by the emergence of new generated pre-thymic T cell precursors. Children and young patients have a functional thymus and therefore greater recovery of the number of LT in the first two years post- transplantation of hematopoietic progenitor cells, unlike the recovery of NK cells requires a functional thymus and it occurs rapidly in the first weeks of post-transplant period (3). Because it is difficult to predict how an immunosuppressive regimen for an individual patient will be for an individual patient, quantitation of lymphocyte populations, by flow cytometry, may be useful to estimate the level of immunosuppression induced by chemotherapy (25), and thereby to detect anomalies and early relapses for treat more efficient.

CONCLUSIONS

Cellular immune T cell recovery affected more than that of B and NK cells in children with cancer treated with antineoplastic in the first semester of the surveillance phase.

Cellular immunity is depressed at the start, achieving the recovery of B-lymphocytes (CD19⁺) and NK (CD16⁺) in the first trimester under surveillance.

In contrast, the immunity of T cells (CD3⁺) remained affected in number, yet the end of the study.

Children not total lymphocytes recovered together with LT, relapsed disease.

RECOMMENDATIONS

The cellular immune recovery during the surveillance phase in children with cancer remains unexplored area nationwide. A greater amount of the study population needed and recommended longer follow-up with smaller intervals evaluation to identify more precisely immune deficiencies. It recommended follow the assessment of the functionality of the cells involved in cell recovery post- chemotherapy. In Addition, it recommended evaluate lymphocyte subpopulations

ACKNOWLEDGMENT

Thanks at HIES Oncology Service, for assistance in the collection and sampling of case patients and HIES Internal Medicine and Allergology Services, by capturing control patients. In addition, thanks at Immunology team of Department of Chemical and Biological Sciences of the University of Sonora for the facilities provided for the technical management of the process. Big thank you to all the children who participated as case-control and their parents for allowing really make this work, because without them, it definitely would not have been possible.

REFERENCES

1. Pizzo, P.A.; Poplack, D.G. Principles and practice of pediatric oncology. 2004. 6ta ed. Ed.Lippincott Williams and Wilkins.
2. Olkinuora, H.; Rahiala, J.; Anttila, V.J.; Koskenvuo, M.; Vettenranta, K. Immune deficiency and infections in children having cáncer. 2013. *Duodecim* 129(12):1233-41. 2013
3. Jaime Fagardo, J. C.; Dorticós Balea, E.; Pavón Morán, Valia Jauma Rojo, A. J.; Cortina Rosales, L. Aspectos Inmunológicos del Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Med Transf* 2006; 22(3).
4. Azburg, M. J. Vaccination in the immunocompromised child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28(3), 233-236.
5. Toubert, A. 2008. Haematopoyetic stem cell transplantation. CAP 15. The EBMT HANDBOOK Revised edition.
6. Katz, J.; Walter, B. N.; Bennetts, G. A.; Cairo, M. S. Abnormal cellular and humoral immunity in childhood acute lymphoblastic leukemia in long-term remission. *WestJMed* Feb 1987; 146:179-187 Orange, California
7. Caver, T.E.; Slobod, K.S.; Flynn, P.M.; et al. Profound abnormality of the B/T lymphocyte ratio during chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia*; 1998;12: 619–622.
8. Mustafá, M.M.; Buchanan, G.R.; Winick, N.J.; et al. Immune recovery in children with malignancy after cessation of chemotherapy. *J Pediatric Hematology Oncology*; 1998; 20(5): 451–457
9. Kostaridou, S.; Polychronopoulou, S.; Psarra, K.; et al. Decrease of CD4 and B-lymphocyte populations is not associated with severe infectious complications in children with acute lymphoblastic leukaemia during maintenance. *Int J Hematol*; 2004; 80(4): 354– 360.

10. Ek, T.; Mellander, L.; Andersson, B.; Abrahamsson, J. Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group. *Pediatr Blood Cancer*. May; 2005: 44(5):461-8.
11. Mazur, B.; Szczepanski, T.; Karpe, J.; Jakimezyk, D.S.; Bubala, H.; Torbus, M. Decreased numbers of CD4 T-lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia Research*; 2006: 30(1): 33–36.
12. Jarosz, M.; Hak, L.; Wiêckiewicz, J.; Balcerska, A.; Yoeliwska, J. Clinical immunology NK cells in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after cessation of intensive chemotherapy. Poland. *Clinical Immunology Central European Journal of Immunology*; 2009: 34(2):94-99
13. Murphy, K.M.; Travers, P.; Walport M. *Inmunobiología de Janeway*. 2008. 7ma ed. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F.
14. Hernandez, J.; Velazquez, C.; Valenzuela, O.; Robles, R.; Ruiz, E.; Navarro, M.; Garibay, A. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological investigations* 2010: 39:197-205.
15. Santoscoy Tovar, G.J.; Santoscoy Tovar, F.A.; Santoscoy Tovar, L.A.; Santoscoy A. G. y cols. 2014. Unidad de Patología Clínica. Servicio de Referencia a Laboratorios de todo México. <http://www.upc.com.mx>
16. Hitzig, W.H.; Pluss, H.J.; Joller, P.; et al. Studies on the immune status of children with acute lymphocytic leukaemia-II. In remission with and without cytostatic treatment. *Clin Exp Immunol*; 1976: 26:414-418
17. Layward, L.; Levinsky, R. J.; Butler, M. Long-term abnormalities in T and B lymphocyte function in children following treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*; 1981: 49, 251-258.

18. Kovacs, G.T.; Barany, O.; Schlick, B.; Csoka, M. J.; Gado, P. A.; Müller, N. J.; Hauser, P.; Erdelyi, D.J. Late immune recovery in children treated for malignant diseases. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14 (4) :391-7. Budapest, Hungría.
19. Alanko, S.; Tarja-Terttu, P.; Toivo, T. S. Recovery of blood B-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1992; 69.6: 1481-1486.
20. Alanko, S.; Toivo, T. S.; Tarja-Terttu, P. Recovery of Blood T-Cell Subsets After Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Hematology-Oncology* 1994; 11.3: 281-292.
21. Alanko, S.; Toivo, T. S.; Tarja-Terttu, P. Recovery of natural killer cells after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia and solid tumors. *Medical and pediatric oncology* 1995; 24.6: 373-378.
22. Kosmidis, S.; Baka, M.; Bouhoutsou, D.; Doganis, D.; Kallergi, C.; Douladiris, N.; Pourtsidis, A.; Varvoutsi, M.; Saxoni-Papageorgiou, F.; Vasilatou-Kosmidis, H. Longitudinal assessment of immunological status and rate of immune recovery following treatment in children with ALL. *Pediatr Blood Cancer.* Mar; 2008; 50(3):528–532 Atenas, Grecia.
23. MacKall, C.L.; Fleisher, T.A.; Brown, M.R.; Mary, P.; Andrich, C.C.; Feuerstein, I.M.; Magrath, I.T.; Wexler, L.H.; Dimitrov, D.S.; Gress, R.E. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*; 1997; 89:3700-3707.
24. Feusner, J.H.; Hastings, C.A; Agrawal, A.K. Supportive care in pediatric oncology: a practical evidence-based approach. Immune recovery after chemotherapy completion. 2015. Págs.. 264-268. Ed. Springer.

25. Coustan-Smith, E.; Ribeiro, R.; Stow, P.; Zhou, Y.; Pui, Ch.-H.; Rivera, G.; Pedrosa, F.; Campana, D. A simplified flow cytometric assay identifies children with ALL who have a superior clinical outcome. *Blood*. julio; 2006: 108 (1):97-102.

FIGURE LEGEND LIST

Figure 1. Representing the selection of positive cells for each antibody combination. Data were analyzed in graphical dot plot based on fluorescence: (A) Selection of population low size and low complexity (P1) corresponding to lymphocytes; (B) blood was used undyed a positive control; (C) isotype control ; (D) in each region, they were defined as CD3⁺ T cells and CD19⁺ B cells (E) the CD3⁺CD16⁺ were defined NK cells.