

TESIS DOCTORAL

**ANALISIS DE LA ACTIVIDAD CITOLITICA NATURAL Y LAS  
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LAS LEUCEMIAS  
AGUDAS: EFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA INTERLEUCINA-2**

ANTONIO PARRADO GONZALEZ  
SERVICIO DE HEMATOLOGIA Y HEMOTERAPIA  
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCIO  
SEVILLA

1994

27.340



**Servicio Andaluz de Salud**

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

**JUNTA DE ANDALUCIA**

Consejería de Salud

D. JUAN MANUEL RODRIGUEZ FERNANDEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA,  
PROFESOR ASOCIADO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y JEFE DEL SERVICIO  
DE HEMATOLOGIA Y HEMOTERAPIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN  
DEL ROCIO DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la  
Universidad de Sevilla D. Antonio Parrado González, sobre el tema: "ANALISIS DE LA  
ACTIVIDAD CITOLITICA NATURAL Y LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN  
LAS LEUCEMIAS AGUDAS: EFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA INTERLEUCINA-2",  
ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa  
de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor al Grado de Doctor en  
Biología, siempre que así lo considere el citado Tribunal.



Prof. Dr. D. Juan Manuel Rodríguez Fernández

D. Antonio Parrado González

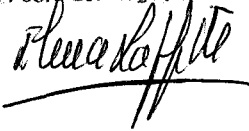
Sevilla, 13 de junio de 1994

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

---

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 181 número 120 del libro  
correspondiente. 27 JUN. 1994  
Sevilla, \_\_\_\_\_

El Jefe del Negociado de Tesis,



**ANALISIS DE LA ACTIVIDAD CITOLITICA NATURAL Y LAS  
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LAS LEUCEMIAS  
AGUDAS: EFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA INTERLEUCINA-2**

Tesis presentada por ANTONIO PARRADO GONZALEZ para optar al Grado de Doctor en  
Biología por la Universidad de Sevilla.

Este trabajo ha sido realizado desde el año 1989 en los Servicios de Hematología y Hemoterapia y de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Servicio Andaluz de Salud. Avda. Manuel Siurot s/n. 41013 Sevilla.



Parte del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral ha dado origen a diversas comunicaciones y simposios en congresos nacionales e internacionales y a las publicaciones:

- **Parrado A, Rodríguez JM, Casares S, Noguero P, Plaza E, Parody R, Espigado I, de Blas JM, Garcia-Solís D.** Generation of LAK cells in vitro in patients with acute leukemia. **Leukemia** 1993; 7: 1344-1348.
  
- **Parrado A, Casares S, Rodríguez JM.** Natural killer cytotoxicity and lymphocyte subpopulations in patients with acute leukemia. **Leukemia Research** 1994; 18: 191-197.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. Dr. Juan Manuel Rodríguez Fernández, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por su magnífica orientación y apoyo en la dirección de este proyecto.

A la Prof. Dra. Carmen Osuna, Directora del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla, por su generosa contribución en la tutoría de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Sofía Casares, por su extraordinaria colaboración, asesoramiento y estímulo en la realización de este trabajo.

Al Dr. José Ramón Rodríguez, Jefe del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por dar su aprobación a la realización de parte de este trabajo en las instalaciones de este Servicio, y al Dr. David García Solís por supervisarlos.

A los Drs. Magdalena Carmona, Antonio Martín Noya y Ricardo Parody, del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por su estrecha cooperación y asesoramiento.

A los Dres. Leandro Picabea, Miguel Angel Elorza, Manuel Ruíz e Ildefonso Espigado por su compañerismo y colaboración.

A la totalidad de los Servicios de Hematología y Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen del Rocío y muy especialmente a Rafael Guzmán, Encarnación Blanco y Gloria de la Concha por su generosa aportación a la realización de este trabajo.

*A mis padres*

*A Nines*

# INDICE

Glosario .....	V
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Células de la respuesta inmunitaria .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Linfocitos .....	2
1.1.1.1. Linfocitos T .....	2
1.1.1.1.1. Desarrollo de los linfocitos T en el timo .....	2
1.1.1.1.2. Reconocimiento de antígenos por los linfocitos T .....	3
1.1.1.1.3. Función de las células T en la respuesta inmunitaria .....	4
1.1.1.1.3.1. Células T citotóxicas-supresoras .....	4
1.1.1.1.3.2. Células T de ayuda .....	4
1.1.1.2. Linfocitos B .....	5
1.1.1.3. Células NK .....	6
1.1.1.3.1. Características fenotípicas de las células NK .....	6
1.1.1.3.2. Función de las células NK .....	6
1.1.1.3.3. Activación de las células NK por citocinas .....	7
1.1.2. Monocitos y macrófagos .....	8
<b>1.2. Citocinas .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Interleucina-2 .....	11
1.2.1.1. Receptores para la IL-2 .....	11
1.2.1.2. Papel de la IL-2 en la activación de las células T .....	12
1.2.1.3. Papel de la IL-2 en la activación de las células NK .....	12
1.2.1.4. Papel de la IL-2 en la activación de las células B .....	13
1.2.1.5. Papel de la IL-2 en la activación de los monocitos .....	13
<b>1.3. Clasificación de las hemopatías malignas .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. Leucemias linfoblásticas agudas .....	15
1.3.1.1. Clasificación morfológica de las LLA .....	15
1.3.1.1. Clasificación inmunológica de las LLA .....	16
1.3.2. Leucemias mieloides agudas .....	16
<b>1.4. Terapia de la leucemia aguda .....</b>	<b>18</b>
1.4.1. Quimioterapia .....	18
1.4.2. Trasplante de médula ósea .....	18

<b>1.5. Inmunoterapia del cáncer</b> .....	<b>20</b>
1.5.1. Inmunización con células tumorales o antígenos purificados .....	20
1.5.2. Administración de anticuerpos monoclonales .....	20
1.5.3. Inmunoterapia celular adoptiva .....	20
1.5.3.1. Efectos <i>in vivo</i> de la IL-2 .....	22
1.5.3.2. Inmunoterapia en la leucemia aguda .....	22
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Material</b> .....	<b>26</b>
3.1.1. Material clínico .....	26
3.1.2. Líneas celulares .....	28
3.1.2.1. Línea celular K562 .....	28
3.1.2.2. Línea celular Raji .....	28
3.1.3. Reactivos y soluciones .....	29
3.1.3.1. Reactivos .....	29
3.1.3.2. Soluciones .....	30
<b>3.2. Métodos</b> .....	<b>35</b>
3.2.1. Obtención de las muestras .....	35
3.2.2. Obtención de la fracción mononuclear .....	35
3.2.3. Congelación de los blastos leucémicos y de las CMN .....	36
3.2.4. Descongelación de los blastos leucémicos y de las CMN .....	37
3.2.5. Cultivo de las líneas celulares K562 y Raji .....	37
3.2.6. Cultivo de las CMN con IL-2 .....	38
3.2.7. Marcaje de las líneas celulares K562 y Raji con <sup>51</sup> Cr .....	39
3.2.8. Marcaje de los blastos leucémicos con <sup>51</sup> Cr .....	40
3.2.9. Ensayo de citotoxicidad .....	40
3.2.10. Marcaje de las CMN con anticuerpos monoclonales (AcMo) fluorescentes .....	42
3.2.11. Marcadores empleados en el análisis fenotípico de las subpoblaciones linfocitarias .....	42
3.2.12. Adquisición de las muestras por el citómetro de flujo .....	43

3.2.13. Análisis de las subpoblaciones celulares .....	44
3.2.14. Análisis estadístico .....	49
<b>4. Resultados .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. Estudio de las actividades citolíticas "natural killer" (NK) y "lymphokine-activated killer" (LAK) en la sangre periférica (SP) sobre las líneas celulares K562 y Raji .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2. Actividades líticas de las células LAK sobre los blastos leucémicos .....</b>	<b>57</b>
4.2.1. Relación entre la actividad lítica sobre los blastos leucémicos y la actividad lítica sobre las líneas celulares K562 y Raji .....	60
<b>4.3. Relación entre las actividades NK y LAK espontánea y las subpoblaciones linfocitarias en la SP .....</b>	<b>63</b>
4.3.1. Relación entre la actividad NK y las subpoblaciones linfocitarias .....	63
4.3.2. Relación entre la actividad LAK espontánea y las subpoblaciones linfocitarias .....	64
<b>4.4. Subpoblaciones linfocitarias en los cultivos con IL-2 .....</b>	<b>74</b>
<b>4.5. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias en la recuperación hematológica post-TAMO .....</b>	<b>80</b>
4.5.1. Valores relativos de las subpoblaciones linfocitarias .....	80
4.5.1.1. Evolución de la serie linfoide T .....	80
4.5.1.2. Evolución de la serie linfoide B .....	81
4.5.1.3. Evolución de los marcadores asociados a las células NK .....	81
4.5.1.4. Evolución de los marcadores de activación linfocitaria .....	83
4.5.2. Valores absolutos de las subpoblaciones linfocitarias .....	83
4.5.3. Relación entre la evolución de las subpoblaciones linfocitarias y la evolución clínica de los pacientes .....	85
<b>4.6. Subpoblaciones linfocitarias y actividad citolítica antitumoral en los pacientes tratados con IL-2 .....</b>	<b>94</b>
4.6.1. Tratamiento de un paciente con IL-2 y células LAK alogénicas .....	94
4.6.2. Tratamiento de pacientes con IL-2 .....	97
4.6.2.1. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias y de la actividad NK y LAK espontánea en los pacientes tratados con IL-2 .....	97
4.6.2.2. Análisis cualitativo de las subpoblaciones generadas en función	

de la intensidad del marcaje fluorescente .....	101
4.6.2.3. Evolución de los pacientes tratados con IL-2 .....	102
<b>4.7. Estudio de las actividades NK y LAK y de las subpoblaciones</b>	
<b>linfocitarias en la MO .....</b>	<b>107</b>
4.7.1. Actividades citolíticas en la MO sobre las líneas celulares K562 y Raji ..	107
4.7.2. Subpoblaciones linfocitarias en la MO .....	110
4.7.2.1. Comparación entre las subpoblaciones linfocitarias de la MO en los pacientes y en los individuos sanos .....	110
4.7.2.2. Comparación entre las subpoblaciones linfocitarias en la SP y en la MO .....	110
4.7.2.3. Relación entre la actividad NK y las subpoblaciones linfocitarias en la MO .....	111
4.7.2.3. Subpoblaciones linfocitarias en la MO de los pacientes cultivada con IL-2 .....	111
<b>5. Discusión .....</b>	<b>117</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>137</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>139</b>

## GLOSARIO

- AcMo:** anticuerpo(s) monoclonal(es).
- ADCC:** "antibody-dependent cellular cytotoxicity", citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- APC:** "antigen-presenting cell", célula(s) presentadora(s) de antígeno.
- CD:** "cluster of differentiation", grupo de diferenciación leucocitario.
- CFU-GM:** "colony-forming unit granulocyte-macrophage", unidad formadora de colonias granulocítico-macrofágicas.
- CMN:** células mononucleares (linfocitos y monocitos).
- d:** dalton.
- DMSO:** dimetilsulfóxido.
- E:D:** efector:diana (proporción).
- EICH:** enfermedad del injerto contra huésped.
- FITC:** "fluorescein-isothiocyanate", isotiocianato de fluoresceína.
- FSC:** "forward scatter", dispersión luminosa frontal.
- G-CSF:** "granulocyte colony-stimulating factor", factor estimulante de colonias granulocíticas.
- GM-CSF:** "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas.
- HLA:** "human lymphocyte antigen"; representa una nomenclatura alternativa para las moléculas MHC. Dentro de las moléculas MHC o HLA de clase I están las subclases HLA-A, -B y -C y dentro de las moléculas MHC o HLA de clase II están las subclases HLA-DR, -DQ y -DP.
- IFN:** interferón (- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ).
- Ig:** inmunoglobulina.
- IL:** interleucina (-1 hasta -12, hasta la redacción de esta Tesis).
- LAK:** "lymphokine-activated killer", células asesinas activadas por IL-2, o la actividad citolítica de estas células.
- LLA:** leucemia(s) linfoblástica(s) aguda(s).
- LMA:** leucemia(s) mieloide(s) aguda(s).
- M-CSF:** "macrophagic colony-stimulating factor", factor estimulante de colonias macrofágicas.
- MHC:** "major histocompatibility complex", complejo principal de histocompatibilidad.



<b>MO:</b>	médula ósea.
<b>NK:</b>	"natural killer", células asesinas naturales (o la actividad citolítica de estas células).
<b>PE:</b>	"phycoerythrin", ficoeritrina.
<b>QT:</b>	quimioterapia.
<b>RC:</b>	remisión completa.
<b>RT:</b>	radioterapia.
<b>sIg:</b>	inmunoglobulina de superficie.
<b>SP:</b>	sangre periférica.
<b>SSC:</b>	"side scatter", dispersión luminosa lateral.
<b>TCR:</b>	"T-cell receptor", receptor antigénico de las células T.
<b>TAMO:</b>	trasplante autólogo de médula ósea.
<b>TIL:</b>	"tumor-infiltrating lymphocytes", linfocitos infiltrantes de tumores.
<b>TMO:</b>	trasplante de médula ósea.
<b>U.I:</b>	unidades internacionales.

# 1. INTRODUCCION

La evidencia creciente en las últimas décadas de que el sistema inmunitario juega un papel en el reconocimiento y en la destrucción de las células tumorales ha permitido abrir un camino esperanzador en la terapéutica anticancerosa que se orienta hacia las posibilidades de manipular y amplificar las respuestas normales del sistema inmunitario para promover la erradicación tumoral.

La Teoría de la Vigilancia Inmunitaria, definida por F. M. Burnett (1), sostiene que el sistema inmunitario vigila el cuerpo para identificar y eliminar tanto microorganismos extraños como células somáticas propias que han sufrido una transformación neoplásica y, como consecuencia de ello, han experimentado alteraciones que las hacen inmunogénicas.

La identificación de antígenos específicos de tumor, de la existencia de respuesta inmunitaria antitumoral en individuos cancerosos, aunque insuficiente para impedir su desarrollo, y un mayor entendimiento de los mecanismos tumorales que eluden el ataque inmunitario, constituyen las bases sobre las que se apoya el desarrollo primordial de la inmunoterapia antitumoral.

Recientes avances técnicos, tales como la purificación de los antígenos tumorales, la fabricación de complejos anticuerpo-toxina dirigidos contra los tumores, la separación de las distintas subpoblaciones de linfocitos, la expansión clonal de células T específicas de antígenos y la amplificación de las respuestas inmunitarias con citocinas han abierto un amplio abanico de posibilidades para la aplicación de la inmunoterapia en las enfermedades malignas.

## **1.1. CELULAS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA**

Los leucocitos o glóbulos blancos son un grupo heterogéneo de células que median respuestas inmunitarias. Los leucocitos se encuentran predominantemente en la sangre periférica (SP), en la médula ósea (MO) y en los órganos linfoides. La clasificación de los leucocitos se basa en primer lugar en criterios morfológicos, como el tamaño y la forma nuclear y las características histoquímicas del citoplasma. Se distinguen tres tipos principales de leucocitos: granulocitos, linfocitos y monocitos.

### **1.1.1. Linfocitos**

Se han identificado tres linajes distintos de linfocitos: las células T, las células B y las células asesinas naturales (células "natural killer" o NK), caracterizados mediante anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos de la superficie celular. Se ha establecido una nomenclatura unificada para los antígenos de la superficie celular más comunmente estudiados (2) (Tabla I).

Las células T reconocen antígenos mediante una estructura de su membrana denominada complejo CD3/Receptor antigénico de la célula T (CD3/TCR), mientras que las células B reconocen antígenos mediante moléculas de inmunoglobulina (Ig) existentes en su superficie. La estructura de reconocimiento antigénico de las células NK no ha sido identificada.

#### **1.1.1.1. Linfocitos T**

##### **1.1.1.1.1. Desarrollo de los linfocitos T en el timo**

Las células T son generadas en el timo por maduración de células progenitoras hematopoyéticas procedentes de la MO. Una compleja serie de cambios en el genotipo y en el fenotipo acompañan a la maduración de las células T (Figura I).

El timocito más temprano, llamado célula pro-T, identificado por la presencia de los

antígenos CD2 y CD7 en su superficie y de CD3 $\epsilon$  en el citoplasma (pero no en la superficie), se diferencia en células pre-T mediante reordenamientos de los genes del TCR- $\delta$ , - $\gamma$  y - $\beta$  (3). Primero, las células portadoras del TCR $\gamma\delta$  derivan de las células pre-T que productivamente reordenan y expresan los genes TCR- $\gamma$  y - $\delta$ . Las células pre-T destinadas a generar las células T portadoras del TCR $\alpha\beta$  reordenan entonces los genes del TCR- $\alpha$ , delecionando por tanto los genes TCR- $\delta$  entre los genes V $\alpha$  y C $\alpha$  en el cromosoma (4).

Los timocitos portadores de CD3/TCR son seleccionados para reconocer péptidos antigénicos asociados con proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La mayoría de los timocitos fracasan en este proceso de selección por autorreactividad y son eliminados; sólo una minoría se diferencian con éxito hasta linfocitos T maduros, los cuales migran a los órganos linfoides periféricos y a la SP (5).

#### 1.1.1.1.2. Reconocimiento de antígenos por los linfocitos T

Los linfocitos T maduros pueden subdividirse sobre la base de la expresión de los antígenos CD4 y CD8 en la superficie celular. La mayoría de la población T en la SP y en los tejidos linfoides periféricos son CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> o CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Pequeñas proporciones de los linfocitos T poseen fenotipos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> o CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (6).

Los antígenos CD4 y CD8 son glicoproteínas de membrana capaces de interactuar con antígenos del MHC de clase II y de clase I, respectivamente (7, 8).

Las células T no reaccionan normalmente con moléculas intactas de los antígenos, sino con pequeños fragmentos en que éstos son degradados y presentados en asociación con moléculas MHC expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) o de las células dianas. Las APC pueden ser monocitos, macrófagos, células B, células dendríticas y algunas células T. Son células capaces de ingerir los antígenos proteicos, degradarlos en pequeños péptidos y presentarlos ligados con antígenos propios del MHC (9).

El complejo CD3/TCR en la superficie de la célula T se une al complejo péptido/MHC en la APC. Esta interacción genera una señal intracelular de activación para

la célula T. Normalmente es necesaria una segunda señal que consiste en la secreción de determinadas citocinas por la APC, por ejemplo la interleucina-1 (IL-1) por los monocitos (10). Como consecuencia se produce una proliferación y expansión clonal de las células T que reaccionan específicamente con el antígeno.

### **1.1.1.1.3. Función de las células T en la respuesta inmunitaria**

#### **1.1.1.1.3.1. Células T citotóxicas-supresoras**

Las células T  $CD4^+CD8^+$  realizan la mayor parte de la citotoxicidad mediada por células o capacidad de lisar directamente células que son reconocidas como extrañas: células infectadas por virus, células alogénicas introducidas en el organismo receptor de un trasplante y células tumorales antigénicas. Como consecuencia de su activación, las células T  $CD4^+CD8^+$  liberan linfocinas (por ejemplo, interleucina 2 (IL-2) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )) (11), las cuales pueden aumentar las respuestas inmunitarias de los linfocitos T, B y NK y de los monocitos.

Las células T  $CD4^+CD8^+$  también pueden suprimir respuestas inmunitarias, posiblemente por la liberación de factores solubles que interfieran con la función de otras células del sistema inmunitario (12). Hasta el momento no se ha aislado un subtipo fenotípicamente único de célula T supresora.

Debido a estas funciones, la población T  $CD4^+CD8^+$  se denomina a menudo subtipo T citotóxico-supresor.

#### **1.1.1.1.3.2. Células T de ayuda**

Los linfocitos T  $CD4^+CD8^-$  constituyen el subtipo denominado ayudante o cooperador debido a que mayoritariamente favorecen la activación y diferenciación de las células B y de los linfocitos T citotóxicos. Reconocen a los péptidos antigénicos ligados a los antígenos del MHC de clase II presentes en la superficie de las APC, y tras esta interacción se activan

y proliferan.

Las células T cooperadoras activadas secretan factores solubles, como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, factor estimulante de colonia granulocito-macrofágica (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF)  $-\alpha$ ,  $-\beta$ , IFN- $\gamma$  y otros, que ejercen su efecto sobre las funciones de otros leucocitos (13).

#### 1.1.1.2. Linfocitos B

Las células B expresan moléculas de Ig, también denominadas anticuerpos, como receptor antigénico de superficie. A diferencia del TCR, la Ig en las células B es capaz de unirse directamente y con alta afinidad a antígenos intactos.

Las Ig son glicoproteínas compuestas de dos cadenas pesadas idénticas, unidas entre sí mediante puentes disulfuro, y a su vez, a dos cadenas ligeras idénticas. Existen en humanos cinco clases de cadenas pesadas ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) y dos clases de cadenas ligeras ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ).

Los linfocitos B surgen a partir de células progenitoras en la MO. Las células B reordenan los genes de las Ig durante fases tempranas de la maduración (Figura I). Las células pre-B reordenan primero los genes de la cadena pesada y después los de la cadena ligera (14). Cuando ambas cadenas son sintetizadas la Ig se expresa en la superficie del linfocito B. En este momento en que poseen Ig competente en su membrana citoplasmática pero aún no han interactuado con el antígeno, se denominan células B vírgenes, las cuales migran hacia la SP y los tejidos linfoides.

Una vez se ha producido la interacción del antígeno con la Ig, la mayoría de estas células B se activan y maduran dando lugar a las células plasmáticas, las cuales son responsables de la producción y secreción de grandes cantidades de Ig. Una segunda señal de activación es proporcionada por factores solubles liberados por las células T, tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ . El resto de la células B activadas se diferencian en células B de memoria (15).

Las células B pueden desarrollar dos mecanismos efectores de lisis tumoral: mediante la liberación de anticuerpos reactivos fijadores de complemento capaces de formar poros en la membrana de las células tumorales (16) y mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), mecanismo que consiste en que moléculas de Ig (normalmente IgG) forman un puente entre el antígeno de la célula tumoral y el receptor  $F_c$  de la superficie de células efectoras tales como macrófagos, granulocitos o células NK (17).

Además, las células B pueden desempeñar un papel en el procesamiento y presentación de los antígenos tumorales (18) y producir linfocinas tales como la IL-1, el TNF- $\alpha$  y otras.

### **1.1.1.3. Células NK**

#### **1.1.1.3.1. Características fenotípicas de las células NK**

Las células NK son un subtipo de linfocitos que surgen de una célula precursora en la MO. Las células NK maduras se encuentran en la SP, en la MO y en el bazo, pero son raras en los ganglios linfáticos y en el timo.

Las células NK no reordenan los genes de las Ig ni del TCR (19, 20) y pueden ser identificadas por la presencia de ciertos antígenos de diferenciación (Figura I). Las células NK expresan CD56, péptido homólogo de la molécula de adhesión celular neural (N-CAM) (21), y CD16, identificada como una molécula receptora para complejos IgG de baja afinidad (FcR $\gamma$ III) que capacita a las células NK para hacer ADCC (22, 23), pero carecen de expresión del complejo CD3/TCR (24).

#### **1.1.1.3.2. Función de las células NK**

Las células NK se definieron originalmente por su capacidad de lisar a ciertas células tumorales (nombrada actividad NK) (25, 26).

Las células NK reconocen y lisan tanto células tumorales autólogas como alogénicas sin restricción del MHC. Esta citotoxicidad no restringida por el MHC no es exclusiva de las células NK, puesto que también la ejerce un pequeño subgrupo de linfocitos T citotóxicos con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (27).

Se ha sugerido que la actividad NK puede representar una primera línea de defensa contra el crecimiento de tumores primarios y metástasis. También puede jugar un papel importante en la defensa contra la infección vírica (28). Las células NK lisan células infectadas por virus pero no células normales (29). Las células NK podrían constituir un mecanismo antivírico inicial durante el periodo de latencia previo al desarrollo de anticuerpos y de linfocitos T citotóxicos específicos.

El mecanismo de reconocimiento de las células NK no ha sido definido. En su unión a la célula diana, la célula NK podría utilizar moléculas de adhesión superficial inespecíficas, tales como CD2 y CD11a/CD18, cuyos ligandos son CD58 y CD54 respectivamente, como se ha descrito en la literatura (30).

#### 1.1.1.3.3. Activación de las células NK por citocinas

Las células NK aisladas de individuos normales lisan sólo un rango limitado de tumores (la línea celular eritroleucémica K562 es el prototipo de tumor sensible). Sin embargo, las células NK pueden ser activadas por ciertas citocinas, tales como IL-2, IFN- $\alpha$  y  $\beta$  y, en menor grado, IFN- $\gamma$ , que aumentan su actividad citotóxica y las hacen proliferar (31, 32). De este modo, las respuestas inmunitarias de las células T amplifican la actividad NK.

La estimulación de linfocitos *in vitro* con IL-2 genera células con capacidad aumentada para lisar una gran variedad de células tumorales autólogas y alogénicas *in vitro* (33, 34). Este fenómeno es denominado citotoxicidad activada por linfocina (actividad LAK). Aunque algunos linfocitos T pueden realizarla, las células NK son responsables de la mayoría de la actividad LAK (35-37).



Aparte de incrementar la actividad citotóxica, la IL-2 actúa como un factor de crecimiento, e induce directamente la proliferación de las células NK y la producción de linfocinas, incluyendo IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  y la propia IL-2. Los pacientes tratados con IL-2 poseen niveles elevados de células NK circulantes capaces de lisar un amplio espectro de células tumorales (38).

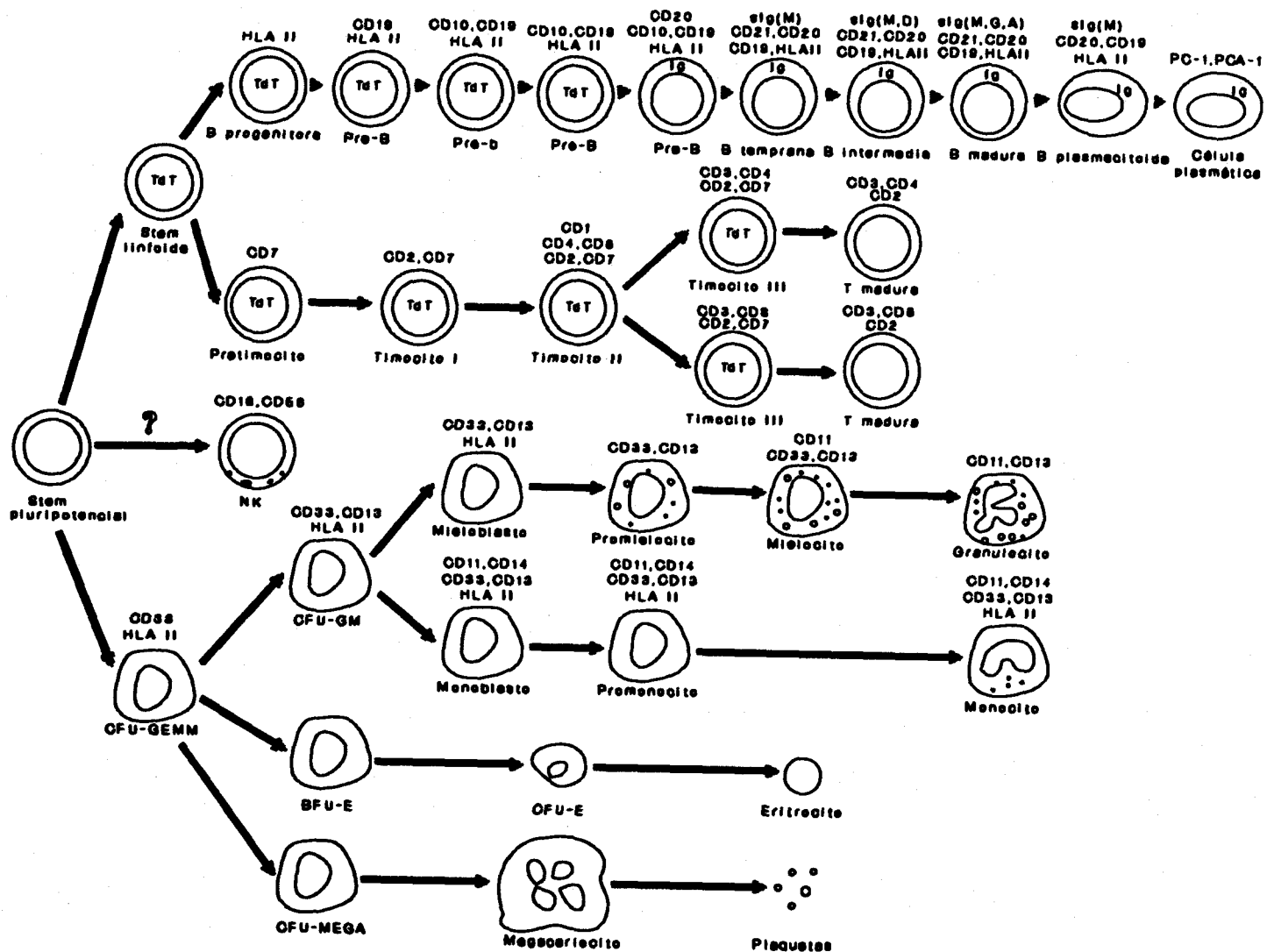
### **1.1.2. Monocitos y macrófagos**

Los monocitos se desarrollan en la MO. Sus células progenitoras o CFU-GEMM dan lugar también a los eritrocitos, granulocitos y megacariocitos (Figura I). Los monocitos maduros entran en la circulación, y una proporción de ellos sale de la SP y da lugar por desarrollo a los macrófagos residentes en el bazo, ganglios linfáticos, hígado, pulmón, timo, peritoneo, sistema nervioso, piel y otros tejidos.

Los monocitos y los macrófagos pueden servir como APC para los linfocitos T (39). La IL-1 secretada por ambos tipos celulares actúa como una potente co-señal junto con el antígeno para conseguir la activación y proliferación de los linfocitos T. Por ello, son de central importancia en la iniciación y regulación de las respuestas inmunitarias.

Los monocitos y macrófagos actúan contra la infección mediante el proceso de fagocitosis. También pueden tener un potencial efector en la lisis tumoral (probablemente mediada por secreción de TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  (40)), sugerido por el hecho de que los macrófagos aislados en tumores que sufren regresión exhiben actividad tumoricida mientras que los macrófagos aislados en tumores progresivos generalmente no exhiben actividad citolítica (41).

Figura I. Esquema de la diferenciación hematopoyética.



## TABLA I

### ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LEUCOCITARIOS

<u>Grupo de diferenciación</u>	<u>Tipo celular</u>
CD1	Timocitos
CD2	Timocitos, células T y NK
CD3	Timocitos maduros, células T
CD4	Subpoblación timocitos y células T
CD5	Timocitos maduros, células T
CD7	Timocitos, células T
CD8	Subpoblación timocitos y células T
CD13	Panmieloide
CD14	Monocitos y macrófagos
CD15	Granulocitos
CD16	Granulocitos, células NK
CD19	Células B
CD20	Células B
CD25	Linfocitos activados (cadena $\alpha$ del receptor para la IL-2)
CD33	Mieloide
CD34	Mieloide y precursores pluripotenciales hematopoyéticos
CD45	Panleucocitario
CD56	Células NK
CD57	Células T y NK
CD69	Linfocitos activados
CD71	Células proliferantes (receptor para la transferrina)

## 1.2. CITOCINAS

Son un grupo de péptidos mediadores intercelulares que funcionan como reguladores (estimuladores o inhibidores) de las respuestas inmunitarias.

Según su origen reciben 2 denominaciones: linfocinas, que son producidas por los linfocitos, y monocinas, que son producidas por los monocitos o macrófagos.

Generalmente actúan de manera paracrina (localmente cerca de las células productoras) o autocrina (directamente sobre las células productoras).

Son extremadamente potentes: actúan a  $10^{-10}$ - $10^{-15}$  M para estimular funciones en las células diana siguiendo a las interacciones específicas ligando-receptor (Tabla II).

### 1.2.1. Interleucina-2

La IL-2 es una glicoproteína compuesta por 133 aminoácidos. La presencia de cantidades variables de carbohidratos hacen oscilar su peso molecular entre 15.000-15.400 dalton (d). Estos carbohidratos no parecen ser totalmente necesarios para su actividad, pues la IL-2 recombinante libre de carbohidratos, según algunos estudios, tiene tanta actividad biológica como la IL-2 natural (42).

La IL-2 estimula la proliferación y la producción de linfocinas de las células T, B, NK y monocitos. La IL-2 es codificada por un gen único localizado en el cromosoma 4 (43).

#### 1.2.1.1. Receptores para la IL-2

La señal inicial de activación, el antígeno, es presentado a las células T por las APC. Este paso es requerido para que las células T respondan máximamente a la IL-2, pues induce la formación del receptor para la IL-2 de alta afinidad.

El receptor para la IL-2 de alta afinidad ( $K_d=10^{-12}$  M) es un heterotrímico compuesto

de una cadena  $\alpha$  (CD25) con un peso molecular aproximado de 55 kd, reconocida por el AcMo anti-Tac, una cadena  $\beta$  de aproximadamente 75 kd y una cadena  $\gamma$  de aproximadamente 64 kd, que aparece asociada a la cadena  $\beta$ . Si las células expresan sólo la cadena  $\alpha$ , la IL-2 se une con baja afinidad ( $K_d=10^{-8}$  M). Si en cambio expresan sólo el complejo  $\beta\gamma$ , la unión tiene una afinidad intermedia ( $K_d=10^{-9}$  M) pero puede ya generar una señal intracelular. La única función de la cadena  $\alpha$  parece ser la formación del receptor de alta afinidad (44-47).

La estimulación de los linfocitos con activadores policlonales como la fitohemaglutinina produce ARN mensajeros (ARNm) para la IL-2 detectables a las 4 horas, con un máximo a las 12 horas y un rápido descenso a partir de ese momento. Dichos ARNm tienen una vida media de 1-2 horas, de modo que la producción de IL-2 es muy transitoria (48).

#### **1.2.1.2. Papel de la IL-2 en la activación de las células T**

La activación de las células T implica 2 pasos: primero, la inducción de competencia de la célula T quiescente iniciada por la señal exógena (antígeno o mitógeno), que conduce a un aumento de tamaño de la célula T, al tránsito de la fase  $G_0$  a  $G_1$  en el ciclo celular y a la formación de receptor para la IL-2 de alta afinidad, y segundo, la unión de la IL-2 a su receptor de alta afinidad, señal endógena necesaria para la transición a la fase S y la división celular.

Las células T citotóxicas activadas exhiben una citotoxicidad potenciada. Parece ser que la IL-2 aumenta la expresión de los genes que codifican las moléculas líticas responsables de la citolisis: las perforinas (49).

#### **1.2.1.3. Papel de la IL-2 en la activación de las células NK**

Las células NK son siempre reactivas a la IL-2. El 10% de las células NK expresan constitutivamente el receptor de alta afinidad y responden a bajas concentraciones de IL-2.

El 90% restante expresan el receptor de afinidad intermedia, carecen de la cadena  $\alpha$  y responden a concentraciones más altas de IL-2 (50-52). Después de la incubación *in vitro* con IL-2, todas expresan el receptor de alta afinidad y son estimuladas para proliferar y potenciar la actividad NK.

#### **1.2.1.4. Papel de la IL-2 en la activación de las células B**

Las células B en reposo no expresan el receptor para la IL-2. Los linfoblastos B y las células B activadas expresan un 30% de receptor de baja afinidad para la IL-2 que las células T activadas. Por ello, requieren 2-3 veces más dosis de IL-2 para incrementar la producción y secreción de anticuerpos y la proliferación (53).

#### **1.2.1.5. Papel de la IL-2 en la activación de los monocitos**

La adición de IL-2 a los monocitos aumenta directamente su actividad tumoricida (54). Los monocitos expresan la cadena  $\alpha$  del receptor para la IL-2 con baja densidad.

## TABLA II

### PROPIEDADES DE LAS CITOCINAS

<u>Citocina</u>	<u>Fuentes principales</u>	<u>Efectos principales</u>
IL-1	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, etc	Inflamación, estimulación células T, etc
IL-2	Células T y NK	Activación células T, B, NK y monocitos
IL-3	Células T	Hematopoyesis
IL-4	Células T cooperadoras, mastocitos	Estimulación células T, B y mastocitos
IL-5	Células T cooperadoras	Estimulación células B y eosinófilos
IL-6	Fibroblastos, células T y B, células endoteliales, etc	Secreción Ig por células B activadas, hematopoyesis
IL-7	Células del estroma	Proliferación células progenitoras T y B
IL-8	Macrófagos, etc	Quimiotaxis células T y neutrófilos
IL-9	Células T	Proliferación células precursoras linfoides, etc
IL-10	Células B	Inhibición producción IL-2, estimulación mastocitos
IL-11	Células del estroma	Secreción Ig por células B activadas, hematopoyesis
IL-12	Macrófagos, células B	Estimulación células T y NK
G-CSF	Monocitos, etc	Proliferación neutrófilos
M-CSF	Monocitos, etc	Proliferación macrófagos
GM-CSF	Células T, NK, etc	Mielopoyesis
IFN- $\alpha$ IFN- $\beta$ IFN- $\gamma$	Leucocitos, fibroblastos, células T y NK	Estimulación macrófagos y células NK, inducción moléculas MHC
TNF- $\alpha$	Macrófagos, células T y NK	Necrosis tumoral, trombosis vascular
TNF- $\beta$	Células T	Necrosis tumoral, trombosis vascular

### **1.3. CLASIFICACION DE LAS HEMOPATIAS MALIGNAS**

Estas neoplasias malignas, desde un enfoque clínico-morfológico, fueron divididas inicialmente en dos grandes grupos:

- Leucemias, que presentan una expresión primaria en la SP, al margen de su expresión tisular concomitante (MO, ganglios, bazo, hígado, etc), y

- Linfomas, que presentan al principio masa(s) tumorales -ganglionares y extraganglionares- formadas por elementos neoplásicos de origen linfoide. Una parte de los linfomas puede evolucionar hacia cuadros leucémicos secundarios.

Considerando conjuntamente datos diagnósticos y evolutivos, las leucemias se dividen en:

- Leucemias agudas, caracterizadas por una acumulación en la MO, SP y en ocasiones otros tejidos de elementos hematopoyéticos muy inmaduros o blastos, y

- Leucemias crónicas, que se caracterizan por el bloqueo en la maduración celular en una fase más tardía y, como consecuencia, se produce una acumulación de células más diferenciadas.

Las leucemias agudas tienen una evolución natural mortal en pocas semanas, mientras que las leucemias crónicas tienen una evolución natural mortal incluso de varios años.

#### **1.3.1. Leucemias linfoblásticas agudas (LLA)**

Las LLA son originadas por la expansión clonal maligna de progenitores hemopoyéticos linfoides.

##### **1.3.1.1. Clasificación morfológica de las LLA**

Según el grupo cooperativo FAB (Franco-Americano-Británico, 55) las LLA pueden



dividirse en 3 tipos :

**L1:** linfoblastos pequeños monomorfos.

**L2:** linfoblastos heterogéneos.

**L3:** linfoblastos grandes, tipo Burkitt.

### 1.3.1.2. Clasificación inmunológica de las LLA

El empleo de AcMo que reconocen distintos antígenos de diferenciación linfoide ha permitido dividir las LLA en 3 grupos:

**LLA de célula pre-B:** son las LLA más frecuentes, ya que constituyen el 70-85% de las LLA en niños y el 50-60% en adultos. Los linfoblastos pre-B no expresan antígenos de línea T ni Ig de superficie (sIg). Se subdividen en 5 grupos en función de la expresión ontogénica de los marcadores de línea B: HLA-DR, CD19, CD10, CD20 y cadenas  $\mu$  intracitoplásmicas (56, 57) (Figura I).

**LLA de célula B:** constituyen el 3-5% de las LLA. Los linfoblastos B expresan marcadores de línea B y sIg. Morfológicamente se corresponden con las LLA-L3 tipo Burkitt.

**LLA de célula T:** constituyen el 15-25% de las LLA. Se subdividen en 5 estadios atendiendo a la expresión ontogénica de los marcadores de línea T: CD7, CD2, CD1, CD4 ó CD8, CD3 (58, 59).

### 1.3.2. Leucemias mieloides agudas (LMA)

Representan expansiones clonales malignas de precursores hemopoyéticos de la línea de diferenciación mieloide.

Los subtipos de LMA son clasificados de acuerdo al parecido morfológico e histoquímico de la población celular leucémica con los precursores mieloides normales (60-



63):

- M0:** LMA mínimamente diferenciadas
- M1:** LMA mieloblásticas.
- M2:** LMA mieloblástico-promielocíticas.
- M3:** LMA promielocíticas.
- M4:** LMA mielomonocíticas.
- M5:** LMA monocíticas.
- M6:** Eritroleucemias.
- M7:** LMA megacarioblásticas.

La distinción entre LLA y LMA es importante desde un punto de vista pronóstico y terapéutico. Sin embargo, las técnicas morfohistoquímicas e inmunofenotípicas no conducen siempre a un diagnóstico en las variantes más inmaduras de las LLA y LMA. A veces se manifiestan fenómenos de infidelidad o de promiscuidad de línea, como la expresión de marcadores linfoides en LMA evidentes desde un punto de vista morfológico (64, 65). Además, la ausencia de positividad de antígenos mieloides no excluye absolutamente el diagnóstico de LMA. En otros casos no existe evidencia de un compromiso hacia ninguna línea de diferenciación, lo que conduce a la denominación de leucemia aguda indiferenciada, o fenotipos multilínea confusos sin datos morfohistoquímicos convincentes, englobados bajo la denominación de leucemia aguda híbrida o de línea mixta (66). El análisis genético de estos blastos contribuye al esclarecimiento de la línea hematopoyética de estas leucemias agudas indeterminadas o inmaduras (67).

## **1.4. TERAPIA DE LA LEUCEMIA AGUDA**

### **1.4.1. Quimioterapia (QT)**

El objetivo primordial del tratamiento antileucémico es la obtención de una remisión completa (RC), entendida como la normalidad clínica y celularidad normal en SP y MO, con menos de un 5% de blastos en ésta.

Puesto que la velocidad de división de la célula leucémica es menor que la de las células progenitoras hematopoyéticas, la estrategia terapéutica está basada en la administración de ciclos de fármacos que actúan sobre células en división (citostáticos) con intervalos suficientes para que las células normales se recuperen, pero no así las leucémicas.

El tratamiento consta de distintas fases (inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento de la misma), en las que se utilizan diversos fármacos citostáticos, normalmente en pautas poliquimioterápicas, y a veces en combinación con la radioterapia (RT). La limitación de las dosis la impone la toxicidad sobre tejidos de dinámica proliferativa rápida, como la MO y las mucosas.

El índice de supervivencia prolongada con QT oscila entre el 20-30% para las leucemias del adulto, pero es sensiblemente más elevado en las LLA infantiles (68, 69).

### **1.4.2. Trasplante de médula ósea (TMO)**

El TMO permite aumentar al máximo las dosis de QT y/o RT prescindiendo de la toxicidad sobre la MO. Sólo se ve limitado por la aparición de una toxicidad inaceptable sobre las mucosas, miocardio, hígado, pulmón, etc. En general permite aumentar las dosis entre 2-5 veces.

Existen 3 modalidades de realización de TMO:

**Singénico:** la MO de rescate hematopoyético procede de un gemelo univitelino.

**Alogénico:** la MO procede de un donante sano histocompatible para los antígenos HLA-A, -B y -DR y con cultivo mixto linfocitario negativo.

**Autólogo (TAMO):** la MO procede del propio paciente, obtenida y congelada durante la RC.

El TMO alogénico se ha mostrado como la modalidad con mayor capacidad de evitar recidivas en las leucemias agudas (40-50% de remisiones duraderas). Las razones para ello son, además del poder erradicativo del tratamiento de acondicionamiento, la actividad antileucémica desarrollada por la celularidad inmunocompetente del injerto (70). Como contrapartidas, sólo puede ser aplicado a una proporción minoritaria de pacientes que tienen un donante histocompatible y su mortalidad peritrasplante es elevada debido al desarrollo de la enfermedad del injerto contra huésped (EICH).

El TAMO tiene una aplicación generalizada, pero presenta un índice de remisiones duraderas menor (30-40%). En ello puede influir la administración de blastos residuales durante el trasplante y la ausencia de reactividad del injerto contra la leucemia. El valor terapéutico similar que tienen el TAMO y el TMO singénico indica que las pautas de acondicionamiento no erradican la leucemia en el receptor de la MO (71).

El elevado índice de recidivas después del TAMO ha llevado a su perfeccionamiento a través del tratamiento *ex vivo* de la MO, con citostáticos (mafosfamida, 4-hidroperoxiciclofosfamida) o con AcMo. La inmunoterapia con citocinas en la purificación antileucémica de la MO *ex vivo* se encuentra en fase de estudios preclínicos (72).

## **1.5. INMUNOTERAPIA DEL CANCER**

### **1.5.1. Inmunización con células tumorales o antígenos purificados**

La inmunización de portadores de tumores establecidos ha sido generalmente ineficaz, incluso en aquellos pacientes cuyos tumores tienen propiedades inmunogénicas. Ello parece deberse a la respuesta T supresora, que inhibe la reactividad antitumoral.

El empleo de pretratamientos con agentes que desenmascaran determinantes antigénicos tumorales en las células leucémicas, como la neuroaminidasa, han tenido un éxito limitado (73).

### **1.5.2. Administración de anticuerpos monoclonales**

La administración de AcMo preparados contra antígenos tumorales tiene como objetivo producir lisis celular por fijación de complemento y la ADCC, mecanismos expuestos en el apartado 1.1.1.2. Sin embargo, su eficacia es limitada, ya que los anticuerpos y las células efectoras de ADCC no penetran amplias masas tumorales. Además, fenómenos de modulación antigénica y de selección de variantes tumorales negativas para el antígeno diana interfieren frecuentemente con la terapia de AcMo.

Para intentar superar estos obstáculos se han desarrollado una serie de alternativas con el objetivo de librar un golpe letal al tumor, como la conjugación de los AcMo con drogas citotóxicas, toxinas o radioisótopos. En cualquier caso, este tipo de terapias encuentran un hándicap importante en el desconocimiento en la mayoría de tumores de antígenos únicos tumorales (74). El uso de AcMo dirigidos contra antígenos asociados al tumor en lugar de contra antígenos únicos tiene como contrapartida una toxicidad no despreciable hacia los tejidos normales que expresan dichos antígenos.

### **1.5.3. Inmunoterapia celular adoptiva**

Esta terapia antitumoral tuvo como prototipo los modelos animales con tumores

avanzados tratados con la transferencia de células T específicas de tumor singénicas, procedentes de donantes inmunizados frente al tumor (75). Pronto se observó que la presencia en el animal portador del tumor de células T supresoras específicas dificultaba la regresión tumoral. Estas debían ser eliminadas previamente a la transferencia celular.

La eliminación total de un tumor requiere largo tiempo, en el que las células transferidas deben permanecer efectivas en el receptor. En estos modelos los efectos antitumorales están protagonizados por células T cooperadoras y citotóxicas específicas que han sido expandidas *in vitro* mediante cultivo con IL-2. Su eficacia aumenta si tras la transferencia celular se infunde IL-2 para promover la proliferación y supervivencia *in vivo* de aquellas.

Variantes de estos modelos se han aplicado al tratamiento del cáncer en el hombre. Una de ellas es el empleo de linfocitos reactivos específicos que infiltran tumores sólidos (TIL), que pueden aislarse y expandirse *in vitro* con IL-2 y ser posteriormente infundidos junto con IL-2 (76). Se ha observado que los TIL se dirigen hacia el tumor. Son muy potentes en la terapia de las micrometástasis, pero no tienen una actividad antitumoral detectable frente a grandes masas tumorales a menos que agentes quimiorreductores como la ciclofosfamida se sumen al régimen inmunoterapéutico. Los resultados iniciales han mostrado un efecto terapéutico en un 40% de los casos en pacientes con melanoma maligno (77).

Otra modalidad de inmunoterapia celular adoptiva es el empleo de células LAK. Estas se generan en presencia de dosis excepcionalmente altas de IL-2, muy superiores a las fisiológicas. Parece ser que las células LAK carecen de especificidad por antígenos, aunque tienen una marcada preferencia hacia las células transformadas (33). Aunque son fenotípicamente heterogéneas, la principal célula efectora LAK parece ser una célula NK activada. La administración de células LAK y dosis altas de IL-2 ha demostrado una actividad antitumoral potencialmente curativa en el hombre, fundamentalmente en melanomas malignos y carcinomas renales, con un 5% de regresiones completas y un 15% de regresiones parciales en pacientes refractarios a otras terapias (78).

### 1.5.3.1. Efectos *in vivo* de la IL-2

La IL-2 recombinante administrada intravenosamente (IV) tiene un tiempo medio de distribución en el volumen corporal total de 13-24 minutos. Los riñones son la vía principal de aclaramiento, con una vida media estimada en la circulación sanguínea de 4,5 horas (79).

La dosis máxima tolerada de IL-2 es de  $40 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup>/día. Las dosis altas de IL-2 (superiores a  $6 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup>/día) tienen diversos efectos tóxicos, tales como el síndrome de permeabilidad vascular, consistente en una rápida acumulación de fluidos que conduce a ascitis y edema pulmonar, hipotensión o eritema cutáneo, probablemente debidos a la producción concomitante de TNF. La interrupción de la infusión de IL-2 produce una linfocitosis de células NK dentro de un plazo de 48 horas (38).

Dosis inferiores a 15000 U/m<sup>2</sup>/día IV no consiguen producir cambios en el sistema inmunitario, mientras que dosis superiores a  $5 \times 10^5$  producen una linfocitosis de células NK equivalente a la conseguida mediante altas dosis de IL-2 (80).

La infusión continua da como resultado unos niveles sostenidos de IL-2 y la administración subcutánea prolonga la permanencia de niveles altos de IL-2 en el suero. Estas modalidades permiten el empleo de dosis más bajas de IL-2 y por tanto, menores efectos tóxicos (81, 82).

### 1.5.3.2. Inmunoterapia en la leucemia aguda

Una hipótesis ampliamente aceptada para explicar el efecto antileucémico que se asocia a la EICH en el TMO alogénico es la activación endógena de las células NK. Según este modelo, la presencia de antígenos menores de histocompatibilidad produce una activación de las células T del injerto que, mediante liberación de IL-2 y otras citocinas, activarían secundariamente a la población NK, la cual, como expusimos en el punto 1.2.1.3, expresa constitutivamente el receptor para la IL-2. Hasta ahora, los esfuerzos terapéuticos para producir un efecto antileucémico similar se han centrado en la administración de IL-2 exógena. Este planteamiento puede ser válido puesto que no se ha demostrado que la IL-2

pueda tener un efecto estimulador del crecimiento de los blastos leucémicos (83).

Estudios *in vitro* indican el potencial clínico de la inmunoterapia con IL-2 en la lucha contra la leucemia residual en el hombre (84-89). Por otro lado, la experimentación en animales ha mostrado que la transferencia adoptiva de células NK confiere resistencia en animales susceptibles de contraer leucemia (90) y que la administración de linfocitos alogénicos e IL-2 después TMO alogénico puede erradicar la leucemia residual en modelos murinos (91). Estudios clínicos preliminares con infusión de IL-2 muestran mejores respuestas en aquellos casos en que la invasión blástica es menor (92) y una mayor supervivencia en pacientes tratados con IL-2 respecto de individuos no tratados después de TAMO (93). Una terapia con IL-2 y células LAK alogénicas ha sido descrita mostrando una gran reducción de la población tumoral en un caso de LLA después de TMO alogénico (94).



## 2. OBJETIVOS

La experiencia con modificadores de la respuesta inmunitaria en ensayos clínicos con pacientes cancerosos es limitada en la actualidad. Nuestro entendimiento del complejo papel que desempeñan tales agentes es aún incompleto y, en consecuencia, el diseño de los estudios clínicos representa en la actualidad un desafío. Por ello pretendemos comprobar, mediante análisis de la funcionalidad del sistema inmunitario, la posibilidad de aplicar tratamientos *in vivo* con interleucina-2 (IL-2), en los enfermos de leucemia aguda en fase de remisión completa (RC), para erradicar la leucemia residual responsable de las recaídas leucémicas de estos enfermos.

Los objetivos de este trabajo son:

1) Evaluar en los enfermos de leucemia aguda en las distintas fases de tratamiento el grado de inmunocompetencia asesina natural ("natural killer" o NK), la reactividad inmunitaria frente a su propio tumor y el efecto que la IL-2 *in vitro* produce sobre dichas actividades. La inmunocompetencia NK se valorará mediante ensayo de citotoxicidad de linfocitos aislados de la sangre periférica de estos enfermos en cocultivo con células diana K562, Raji y blastos cancerosos autólogos, con y sin IL-2. Paralelamente se estudiará la actividad NK de linfocitos procedentes de donantes sanos como controles de referencia. Si en estos enfermos existe una capacidad inmunitaria NK que es incrementada o un compromiso NK que es reestablecido por la IL-2 sería posible diseñar estrategias de tratamiento *in vivo* con esta linfocina con objeto de erradicar la leucemia mínima residual.

2) Obtención de correlación(es) entre el fenotipo inmunológico de las subpoblaciones linfocitarias y la actividad NK en enfermos de leucemia aguda y controles sanos. La caracterización de los fenotipos de superficie se realizará mediante el empleo de anticuerpos monoclonales. Para correlacionar ambos parámetros se utilizará un análisis de regresión lineal simple. La caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias con actividad NK nos permitiría determinar si el inmunocompromiso de estos enfermos es debido a defectos de la funcionalidad o en el número de células. Este conocimiento nos permitiría también realizar seguimientos precisos de la recuperación hematológica de estas subpoblaciones linfocitarias en los enfermos de leucemia aguda con fines de tratamiento con IL-2.

3) Estudiar los posibles cambios que la IL-2 *in vitro* produce sobre el crecimiento y fenotipo de las subpoblaciones linfocitarias de enfermos con leucemia aguda y personas sanas. Para ello se caracterizarán los fenotipos de las subpoblaciones linfocitarias en cultivo previo y posterior a la adición de IL-2. Este estudio proporcionará información sobre los mecanismos de actuación de la IL-2 sobre las subpoblaciones linfocitarias.

4) Realizar un seguimiento longitudinal de la recuperación de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de los enfermos de leucemia aguda sometidos a trasplante autólogo de médula ósea (TAMO). El seguimiento se realizará durante un periodo de dos años posterior al TAMO. Este estudio nos permitirá evaluar en qué periodo de tiempo las subpoblaciones linfocitarias con actividad NK se encuentran en valores máximos para realizar una terapia de tratamiento *in vivo* con IL-2.

5) Realizar un ensayo clínico de tratamiento con IL-2 intravenosa en enfermos de leucemia aguda en periodo de post-TAMO. Con este ensayo clínico se pretende producir una estimulación de las subpoblaciones linfocitarias con actividad NK para reducir la leucemia residual. En estos enfermos se realizará un seguimiento de las subpoblaciones linfocitarias y se aplicará la terapia cuando las subpoblaciones NK alcancen los valores máximos sobre la base de los resultados obtenidos en el anterior objetivo de este trabajo. Antes, durante y después del tratamiento con IL-2 se valorarán las subpoblaciones linfocitarias así como los valores de actividad citolítica.

6) Analizar en las muestras de médula ósea de los enfermos de leucemia aguda los niveles de actividades NK basales e inducidos por la IL-2, así como de las subpoblaciones linfocitarias. Este estudio nos permitirá evaluar la potencialidad citolítica de la médula ósea y su posible empleo en la purificación antileucémica *ex vivo* como intervención terapéutica previa al TAMO.

## **3. MATERIAL Y METODOS**

### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1. Material clínico**

La metodología que se expondrá a continuación se realizó en muestras de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) de pacientes afectos de leucemia aguda, diagnosticados y tratados en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío o procedentes de otros hospitales de la Seguridad Social de Cádiz, Huelva, Málaga y Sevilla que ingresaban para recibir un trasplante autólogo de médula ósea (TAMO); en SP de individuos sanos voluntarios que acudían para la realización de plaquetoféresis; y en MO de individuos sanos voluntarios para trasplante de médula ósea (TMO) alogénico:

1) El estudio de las actividades "natural killer" (NK) y "lymphokine-activated killer" (LAK) de la SP sobre las líneas celulares K562 y Raji se realizó en una muestra de 56 pacientes después de tratamiento de quimioterapia (grupo post-QT), 1-14 meses (mediana 4 meses) después de finalizado el tratamiento de inducción, incluyendo 25 LLA y 31 LMA; 26 pacientes entre 1-38 meses (mediana 8 meses) después de recibir un TAMO (grupo post-TAMO), incluyendo 15 leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y 11 leucemias mieloides agudas (LMA); y 60 individuos sanos como grupo de control.

2) El estudio de la actividad citolítica sobre los blastos leucémicos autólogos se realizó utilizando SP de 46 pacientes post-QT (19 LLA y 27 LMA). Como control, se midió la susceptibilidad de los blastos leucémicos a ser lisados por individuos sanos: blastos procedentes de 50 pacientes (20 LLA y 30 LMA) fueron ensayados en un sólo experimento frente a muestras de SP de 20 individuos sanos (cada individuo sano se enfrentó a 2-6 muestras de blastos).

3) El estudio de la relación entre las subpoblaciones linfocitarias y las actividades NK y LAK se realizó en muestras de SP de 31 pacientes del grupo post-QT (14 LLA y 17 LMA), 1-26 meses (mediana 5 meses) desde el final de la terapia de inducción; 68 pacientes (33 LLA y 25 LMA), 1-38 meses (mediana 8 meses) post-TAMO; y 18 individuos sanos como control.

4) El estudio de las subpoblaciones linfocitarias en cultivo *in vitro* con IL-2 se realizó en la SP de 29 pacientes del grupo post-QT (13 LLA y 16 LMA) y en 9 individuos sanos.

5) El estudio de la evolución de los niveles de las subpoblaciones linfocitarias relacionadas con las actividades NK y LAK en el post-TAMO se realizó en muestras de SP obtenidas en 20 pacientes (12 LLA y 8 LMA), que eran citados mensualmente en el primer año y trimestralmente en el segundo año del trasplante. Sufrieron recidiva durante este periodo 5 pacientes, 3 LLA a los 4, 5 y 7 meses y 2 LMA a los 5 y 12 meses, siendo excluidos a partir de este momento del seguimiento.

6) Un niño de 8 años afecto de LMA-M5 recibió un tratamiento con IL-2 y células LAK alogénicas obtenidas de su padre 2 meses después de recibir un segundo TAMO practicado en recaída (23% de blastos en MO) con la fracción de reserva de MO del primer TAMO. Después del segundo TAMO entró en remisión completa (RC) pero con una trombocitopenia severa (menos de  $20 \times 10^9$  plaquetas/l) que contraindicó la realización de leucoféresis para una terapia con células LAK autólogas. Durante la inmunoterapia se midieron las subpoblaciones linfocitarias y la actividad citolítica en la SP del paciente. Al padre se le practicaron 3 leucoféresis con el separador celular CS-3000 plus (95, 96) y las células mononucleares (CMN) obtenidas fueron cultivadas en bolsas de poliolefino a  $1.5 \times 10^6$  células/ml con 500 U.I. IL-2/ml durante 4 días (97). El paciente recibió dos ciclos de 6 días de infusión continua de IL-2 ( $3 \times 10^6$  U.I./m<sup>2</sup>/día) con un intervalo de 33 días entre ambos (desde el inicio al día +6 y desde el día +39 al +44). Un total de  $15.6 \times 10^9$  células LAK alogénicas paternas fueron infundidas en 3 dosis de  $5.3 \times 10^9$ ,  $8.6 \times 10^9$  y  $1.7 \times 10^9$ , las dos primeras durante el primer ciclo de IL-2 (días +1 y +5) y la tercera después del segundo ciclo (día +46).

Cinco pacientes afectados de LLA (una mujer de 18 años con LLA-L2 pre-B y 4 varones de 3, 8, 15 y 21 años, respectivamente, el primero afecto de LLA-L3, el segundo de LLA-L1 pre-B y los dos restantes de LLA-L2 Pre-B) recibieron una terapia con IL-2 sola en el post-TAMO (en los meses 4º, 2º, 3º, 4º y 2º), consistente en 3 ciclos (los 3 pacientes primeramente nombrados) o 4 ciclos (los 2 últimos pacientes) de 5 días de duración de infusión continua con 3 MU/m<sup>2</sup>/día IL-2 intravenosa, con periodos de 2 días de descanso, aunque en algunos casos éstos se ampliaron debido a la aparición de complicaciones clínicas.

En estos pacientes se estudiaron las actividades citolíticas NK y LAK y las subpoblaciones linfocitarias generadas durante el tratamiento y su evolución, tomando las muestras al principio y a la mitad de cada ciclo, 2 días después de finalizar el último ciclo y al mes y a los 2 meses.

7) Los estudios de las actividades NK y LAK en la MO sobre las líneas celulares K562 y Raji se realizaron en un total de 29 pacientes (16 LLA y 13 LMA) y en 10 individuos sanos. En 23 de estos pacientes y en 8 individuos sanos se realizó paralelamente un estudio de las subpoblaciones linfocitarias en la MO.

### **3.1.2. Líneas celulares**

#### **3.1.2.1. Línea celular K562**

Línea eritroleucémica establecida en 1975 a partir de la efusión pleural de una mujer de 53 años con leucemia mieloide crónica en crisis blástica terminal. Son células muy indiferenciadas y con aspecto de linfoblastos (98). La línea celular K562 es ampliamente utilizada como una diana altamente sensible *in vitro* para el ensayo de actividad NK.

#### **3.1.2.2. Línea celular Raji**

Línea establecida en 1963 a partir de la mandíbula de un niño de raza negra de 11 años con linfoma de Burkitt. Son células con aspecto de linfoblastos que crecen en cultivo formando agregados visibles macroscópicamente que contienen cientos de células (98). La línea celular Raji es utilizada como una diana relativamente resistente *in vitro* para el ensayo de actividad NK. La actividad citolítica ejercida por los linfocitos sobre Raji es denominada ampliamente actividad LAK.

Dispusimos de ambas líneas celulares por cortesía del Dr. F. Martí. Unitat de Recerca Biomédica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

### 3.1.3. Reactivos y soluciones

#### 3.1.3.1. Reactivos

Acido acético (*Merck*).

Acido clorhídrico (HCl), 37% en solución acuosa (*Merck*).

Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Sigma*).

Agua bidestilada, estéril y apirógena (*Grifols*).

Albúmina bovina (BSA), fracción V (*Sigma*).

Anfotericina B, 50mg (Fungizona endovenosa, *Squibb*).

Azida sódica (*Sigma*).

Azul de metileno (*Merck*).

Azul tripán (*Merck*).

Bicarbonato amónico ( $\text{HCO}_3\text{NH}_4$ ) (*Sigma*).

Bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) (*Sigma*).

Cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (*Sigma*).

Cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) (*Sigma*).

Cromo radiactivo ( $^{51}\text{Cr}$ ), 2mCi/ml (*Cis*).

Dimetilsulfóxico (DMSO) (*Merck*).

Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (*Carburos metálicos*).

Dodecilsulfato de sodio (SDS, *Sigma*).

Estreptomina sulfato, 1g (*Normon*).

Ficoll 400 (*Pharmacia*).

Fosfato potásico monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (*Sigma*).

Heparina sódica sin conservante, 1.000 U.I./ml (*Rovi*).

Hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ) (*Sigma*).

Interleucina-2 humana,  $2,5 \times 10^6$  U.I./ml (*Biotest*).

L-Glutamina (*Sigma*).

Nitrógeno líquido (*Carburos metálicos*).

Penicilina G sódica,  $10^6$  U.I. (*Penilevel, Level*).

Piruvato sódico (*Sigma*).

Plenigraf (*Juste*)

RPMI-1640 (1x) (*Biochrom*).

RPMI-1640 (10x) (*Biochrom*).

Tampón fosfato (PBS) pH 7,2 (*Biomerieux*).

Suero humano AB (*Flow*).

Suero bovino fetal (FCS) (*Biochrom*).

### 3.1.3.2. Soluciones

#### **Acido clorhídrico 1N**

8,28ml HCl.

Enrasar hasta 100ml con H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Filtrar por 0,22µm.

Almacenar a temperatura ambiente.

#### **Anfotericina B 5mg/ml (2.000x)**

Reconstituir el vial con 10ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Conservar hasta 10 días a 4°C.

#### **Azida sódica 1mg/ml**

Preparar stock 50x disolviendo 5g de azida sódica en PBS y enrasando hasta 100ml.

Mezclar 10ml de stock 50x de azida sódica con PBS hasta 500ml.

Almacenar a 4°C.

#### **Azul tripán**

0,4g azul tripán.

0,81g NaCl.

0,66g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Enrasar hasta 100ml con H<sub>2</sub>O bidestilada, calentar hasta ebullición, dejar enfriar, filtrar, ajustar pH 7,2 con NaOH 1N y almacenar a temperatura ambiente.

#### **Bicarbonato amónico 1M**

39,5g HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> en 500ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.

Filtrar por 0,22 $\mu$ m y almacenar a temperatura ambiente.

**Bicarbonato sódico 1M**

42g NaHCO<sub>3</sub> en 500ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Filtrar por 0,22 $\mu$ m y conservar a 4°C.

**BSA 10mg/ml**

Preparar stock 4x disolviendo 4g BSA en 100ml de PBS.

Filtrar por 0,45 $\mu$ m y almacenar a 4°C.

Tomar 25ml del stock y añadir 75ml de PBS filtrado por 0,22 $\mu$ m.

Almacenar a 4°C.

**Cloruro amónico 1M**

53,49g NH<sub>4</sub>Cl en 1l de H<sub>2</sub>O bidestilada.

Filtrar por 0,22 $\mu$ m y almacenar a temperatura ambiente.

**EDTA 0,5M**

93g EDTA

Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada con agitación añadiendo lentejas de NaOH.

Enrasar a 500ml, ajustar a pH 8.0 y almacenar a temperatura ambiente.

**Estreptomicina sulfato 250mg/ml (5.000x)**

Reconstituir el vial con 4ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Conservar hasta 30 días a 4°C.

**Ficoll-Plenigraf (d=1,077g/ml)**

200g Ficoll 400.

Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada con agitación y calor (60°) y enrasar hasta 2l.

Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Mezclar volúmenes de Ficoll y Plenigraf en proporción 2:1.

Ajustar la densidad a 1,077 añadiendo más Ficoll (disminuye la densidad) o Plenigraf (la aumenta).

Autoclavar en botellas con tapón de rosca protegidas de la luz.



Almacenar a 4°C.

**Glutamina 0,2M (100x)**

14,6g L-glutamina.

Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena y enrasar hasta 1l.

Filtrar por 0,22µm.

Alicuotar en fracciones de 5ml en tubos de de plástico de 10ml estériles y congelar a -20°C.

**Hidróxido sódico 1N**

20g NaOH en 500ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Filtrar por 0,22µm y almacenar a temperatura ambiente.

**Líquido de Turck**

10g azul de metileno.

10ml ácido acético.

Enrasar hasta 1l con H<sub>2</sub>O bidestilada.

**Paraformaldehido 10mg/ml**

10g en 1l de PBS.

Calentar a 70°C hasta que funda.

Enfriar a temperatura ambiente.

Ajustar el pH 7,2-7,4 y almacenar a 4°C.

**PBS (150mM)**

Cada vial contiene:

7,650g NaCl.

0,724g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

0,210g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Disolver el vial con H<sub>2</sub>O bidestilada.

Enrasar hasta 1l y conservar hasta 2 meses a 4°C.

**Penicilina G sódica 2,5x10<sup>5</sup> U.I./ml (5.000x)**

Reconstituir el vial con 4ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Conservar hasta 30 días a 4°C.

#### **Piruvato sódico 0,5M (500x)**

5,5g piruvato sódico en 100ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Alicuotar en fracciones de 1ml en criotubos de 1,8ml y congelar a -20°C.

#### **RPMI-1640**

El medio de cultivo comercial es una disolución compleja de sales y sustancias orgánicas y, además, contiene rojo fenol 10mg/l como indicador de pH y H<sub>2</sub>NaCO<sub>3</sub> 2g/l, pH= 7,2. Añadir antes de usar:

5ml Glutamina 0,2M (concentración final 2mM).

1ml Piruvato sódico 0,5M (concentración final 1mM).

250µl Anfotericina B 5mg/ml (concentración final 2,5µg/ml).

100µl Estreptomicina sulfato 250mg/ml (concentración final 50µg/ml).

100µl Penicilina G sódica 2,5x10<sup>5</sup> U.I./ml (concentración final 50 U.I./ml).

Conservar a 4°C.

#### **RPMI-1640 (10x)**

Para preparar RPMI-1640 (1x) añadir en una botella de 500ml estéril :

50ml del preparado comercial.

12ml H<sub>2</sub>NaCO<sub>3</sub> 1M (concentración final 2g/l).

438ml H<sub>2</sub>O bidestilada, estéril y apirógena.

Las mismas cantidades de glutamina, piruvato sódico y antibióticos que en el RPMI-1640 (1x) comercial.

Ajustar pH 7,2-7,4 con NaOH 1N.

Conservar a 4°C.

#### **SDS 20mg/ml**

1g SDS en 50ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.

Conservar a temperatura ambiente.

### **Solución de lisis de hematíes**

155ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1M (concentración final 155mM).

10ml de  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  1M (concentración final 10mM).

0,2ml de EDTA 0,5M pH 8,0 (concentración final 0,1mM).

Enrasar hasta 1l con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada y ajustar a pH 7,2.

Filtrar por  $0,22\mu\text{m}$  y almacenar a temperatura ambiente.

### **Sueros descomplementados**

Descongelar el suero a temperatura ambiente o en baño a  $37^\circ\text{C}$ .

Calentar 30 minutos a  $56^\circ\text{C}$  en baño con agitación continua.

Dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar por  $0,45\mu\text{m}$  de diámetro, alicuotar en tubos de plástico de 10ml o 50ml estériles y congelar a  $-20^\circ\text{C}$ .

## **3.2. METODOS**

### **3.2.1. Obtención de las muestras**

Las extracciones de SP y las punciones aspirativas de MO obtenidas de los pacientes e individuos sanos fueron recogidas en condiciones de esterilidad evitando su coagulación con 30 U/ml de heparina sódica sin conservantes.

### **3.2.2. Obtención de la fracción mononuclear**

Tanto la obtención de los blastos leucémicos, que se utilizarán como células diana en el ensayo de citotoxicidad, como de la fracción compuesta por linfocitos y monocitos (células monocleares, CMN), que se utilizarán como células efectoras, se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad, trabajando en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar de seguridad biológica:

- 1) La sangre total fue mezclada con dos volúmenes de medio de cultivo RPMI-1640.
- 2) Dos volúmenes de la mezcla se depositaron cuidadosamente sobre un volumen de un gradiente Ficoll-Plenigraf ( $d=1,077$  g/ml) en tubos de centrifuga de plástico de 50 ml y fueron centrifugados durante 20 minutos a 500g a temperatura ambiente. Una vez finalizada la centrifugación se aprecian en el tubo cuatro fases bien diferenciadas: partiendo del fondo del tubo la primera fase corresponde a una mezcla de hematíes y granulocitos, la segunda al Ficoll-Plenigraf, la tercera es una banda estrecha compuesta de las CMN y la cuarta es una mezcla de plasma y medio de cultivo.
- 3) Las CMN se extrajeron por succión con una pipeta Pasteur.
- 4) Se realizaron 3 lavados con medio de cultivo RPMI-1640 mediante centrifugaciones de 10 minutos a 500g, eliminación del sobrenadante y resuspensión del botón celular.
- 5) El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer con líquido de Turck y

la viabilidad celular con azul tripán.

6) Los blastos leucémicos obtenidos de este modo a partir de las muestras de pacientes con invasión neoplásica fueron criopreservados tras determinarse el porcentaje de blastos, y las CMN procedentes de individuos sanos o pacientes en RC fueron empleadas subsiguientemente para estudiar la actividad NK o las subpoblaciones linfocitarias o fueron cultivadas con IL-2 para generar las células LAK.

En los estudios realizados en la MO de pacientes en RC y de individuos sanos las CMN se obtuvieron mediante el separador celular CS-3000 (99), sistema cerrado estéril y automático de recolección celular para grandes volúmenes, que tiene un rendimiento equivalente a la centrifugación en gradiente de densidad en cuanto a la recuperación de los linfocitos y los monocitos aunque presenta un pequeño porcentaje de contaminación de hematíes (generalmente inferior al 5%) que no interfiere con el ensayo de citotoxicidad pero que obliga al empleo de solución de lisis de hematíes en los estudios citofluorométricos.

### **3.2.3. Congelación de los blastos leucémicos y de las CMN**

La congelación de los blastos leucémicos y de las CMN se realizó en una solución de congelación compuesta de suero humano AB descomplementado y DMSO 10% en esterilidad, a una concentración entre  $5-50 \times 10^6$  células/ml:

1) El botón celular se resuspendió en suero humano AB a una concentración entre  $10-100 \times 10^6$  células/ml y esta suspensión se repartió en fracciones de 0,5ml en criotubos de 1,8ml que se colocaron en baño de hielo picado.

2) Se preparó una solución de suero humano AB con DMSO 20%, se dejó enfriar en el baño de hielo y se añadieron 0,5ml de la misma a cada criotubo, gota a gota.

3) Inmediatamente, los criotubos se invirtieron suavemente varias veces para homogeneizar la mezcla y se introdujeron en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

4) Una vez congelados se almacenaron en el contenedor de nitrógeno líquido para su conservación prolongada.

### **3.3.4. Descongelación de los blastos leucémicos y de las CMN**

La descongelación de los blastos leucémicos, previa a la realización del ensayo de citotoxicidad, y de las CMN se realizó en esterilidad de forma rápida:

1) En tubos de centrifuga de plástico de 10ml se añadieron 9ml de una solución de descongelación compuesta de medio RPMI-1640 y suero humano AB descomplementado 10% y después se colocaron en baño a 37°C.

2) Los criotubos se transportaron en nitrógeno líquido tras ser tomados del contenedor y se sumergieron en el baño a 37°C agitando continuamente hasta el momento en que se descongelaron totalmente.

3) La suspensión celular descongelada se añadió rápidamente a la solución de descongelación, se agitó el tubo y se centrifugó inmediatamente durante 10 minutos a 500g.

4) Se eliminó el sobrenadante, se añadió nuevamente solución de descongelación y se determinó el recuento y la viabilidad. No se emplearon para el ensayo de citotoxicidad muestras de blastos leucémicos con una viabilidad inferior al 70%.

### **3.2.5. Cultivo de las líneas celulares K562 y Raji**

Las líneas celulares K562 y Raji se mantuvieron en cultivo continuado en frascos de plástico de 75cm<sup>2</sup>, ajustando a una concentración de 10<sup>5</sup> células/ml. Los frascos contenían entre 20-40ml de la suspensión celular en medio RPMI-1640 con FCS descomplementado 10%, se colocaron horizontalmente con el tapón aflojado en la estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% y humedad saturante. La concentración se duplicaba cada 2 días y se añadió medio fresco 3 veces en semana.

Las líneas celulares se podían criopreservar a una concentración entre  $10\text{-}20 \times 10^6$  células/ml en criotubos de 1,8ml utilizando la misma metodología expuesta en el apartado 3.2.3 pero utilizando una solución de congelación compuesta de FCS descomplementado y DMSO 10%.

### 3.2.6. Cultivo de las CMN con IL-2

Para obtener las células LAK se procedió a la estimulación de las CMN mediante cultivo con IL-2:

1) Se resuspendió el botón celular en medio de cultivo RPMI 1640 con suero humano AB 5%, a  $4 \times 10^6$  células/ml la fracción para ensayarse en el día sin activar y a  $1 \times 10^6$  células/ml la fracción que se cultiva con IL-2.

2) De la primera fracción se hicieron diluciones 1:32, 1:8 y 1:1 en el mismo medio de cultivo, quedando preparadas para ensayarse a proporciones efector:diana (E:D) de 2,5:1, 10:1, 40:1 y 80:1 en el ensayo de citotoxicidad.

3) A la segunda fracción se le añadió 500 U.I./ml de IL-2 y se cultivó en frascos de  $25\text{cm}^2$  ó  $75\text{cm}^2$  en posición horizontal con el tapón aflojado en la estufa a  $37^\circ\text{C}$  con  $\text{CO}_2$  5% y humedad saturante.

4) Se recolectaron generalmente después de 3 días de cultivo, aunque para la MO se hizo entre 1 y 5 días.

5) Se hizo recuento y viabilidad de las células cultivadas.

6) Se centrifugaron durante 10 minutos a 500g y se resuspendieron a  $4 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 con suero humano AB 10% y 500 U.I. IL-2/ml.

7) Se prepararon diluciones 1:32, 1:8 y 1:1 en el mismo medio. Así quedaron preparadas las células LAK para ensayarse a proporciones E:D de 2,5:1, 10:1, 40:1 y 80:1

en el ensayo de citotoxicidad.

8) Una fracción de las CMN se cultivó en paralelo y se procedió del modo expuesto en los puntos 3-7 pero sin añadir IL-2.

9) Fracciones de las muestras *sin activar, cultivadas sin IL-2 y cultivadas con IL-2* se reservaron para estudio de las subpoblaciones linfocitarias.

### 3.2.7. Marcaje de las líneas celulares K562 y Raji con $^{51}\text{Cr}$

Para ser utilizadas como diana en el ensayo de citotoxicidad, las líneas celulares K562 y Raji se marcaron radioactivamente con  $^{51}\text{Cr}$ :

1) Se hicieron los recuentos celulares y se tomaron  $5 \times 10^6$  células de cada línea celular en tubos de plástico de 25ml.

2) Se centrifugaron durante 5 minutos a 500g, se tiraron los sobrenadantes y se resuspendieron añadiendo 200 $\mu\text{l}$  de medio de cultivo RPMI-1640 con FCS descomplementado 10%.

3) Se añadió a cada tubo 100  $\mu\text{Ci}$  (50  $\mu\text{l}$ ) de  $^{51}\text{Cr}$ .

4) Se incubaron en estufa a 37°C con  $\text{CO}_2$  5% y humedad saturante durante 90 minutos en agitación horizontal continua.

5) Se lavaron 2 veces con medio de cultivo mediante centrifugaciones de 5 minutos a 500g y eliminación de los sobrenadantes.

6) Se resuspendieron los botones celulares en medio RPMI-1640 con suero humano AB descomplementado 5%, se hicieron recuentos de las células viables en azul tripán y se prepararon diluciones ajustadas a  $10^5$  células/ml.



### 3.2.8. Marcaje de los blastos leucémicos con $^{51}\text{Cr}$

Para ser empleados como células diana en el ensayo de citotoxicidad, los blastos leucémicos se marcaron utilizando el mismo procedimiento del apartado 3.2.7, con las siguientes diferencias:

- 1) Se tomaron  $10 \times 10^6$  blastos descongelados según el punto 3.3.4.
- 2) Se lavaron y se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de medio RPMI-1640 con suero humano AB descomplementado 5%.
- 3) Se añadió 400  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  (200  $\mu\text{L}$ ).
- 4) Se incubaron durante 2 horas.
- 5) Se lavaron 3 veces con el mismo medio de cultivo.
- 6) Se resuspendieron en medio de cultivo, se hicieron pasar a través de un filtro estéril de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro para eliminar los agregados celulares, se realizó el recuento de las células vivas en azul tripán y se preparó una dilución a  $10^5$  células/ml.

### 3.2.9. Ensayo de citotoxicidad

Para medir la capacidad citolítica se realizó un ensayo de citotoxicidad o test de lisis, utilizando como células efectoras las CMN sin o con estimulación por IL-2, según el apartado 3.2.6, y como células diana las líneas celulares y los blastos leucémicos marcados con  $^{51}\text{Cr}$  según los apartados 3.2.7 y 3.2.8:

- 1) En placa de cultivo de 96 pocillos con fondo curvado se pusieron por triplicado, para cada célula diana:

- a) 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo RPMI-1640 con suero humano AB

descomplementado 5% en los pocillos que se emplearán para medir la liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$  (*ESP*).

b) Se dejaron vacíos 3 pocillos que se emplearán para medir la liberación máxima de  $^{51}\text{Cr}$  (*MAX*).

c) 100  $\mu\text{l}$  de cada suspensión efectora, es decir, de cada muestra para cada proporción E:D en los pocillos que se emplearán para medir la liberación experimental debida a citotoxicidad celular (*EXP*).

d) 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión diana a todos los pocillos.

2) Se cubrió la placa y se centrifugó durante 5 minutos a 50g.

3) Se añadió 100  $\mu\text{L}$  SDS 20mg/ml a los pocillos empleados para control positivo.

4) Se incubó la placa durante 4 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% y humedad saturante.

5) Se recogieron los sobrenadantes con un sistema de filtros absorbentes Skatron.

6) Se cuantificó la radiación gamma liberada hacia los sobrenadantes por las células marcadas y se calcularon los porcentajes de lisis experimentales mediante la fórmula:

$$\% \text{ Lisis} = 100 \times (EXP - ESP) / (MAX - ESP)$$

7) Se aceptaron los resultados del ensayo de citotoxicidad cuando *ESP/MAX* fue inferior a 0,33 y *MAX* fue superior a 2.000 c.p.m.

### 3.2.10. Marcaje de las CMN con anticuerpos monoclonales (AcMo) fluorescentes

Para estudiar el fenotipo de superficie de los linfocitos sin o con estimulación en cultivo con IL-2 se marcaron las muestras de las CMN con AcMo conjugados con los compuestos fluorescentes isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE):

- 1) El botón de las CMN se resuspendió a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en PBS con BSA 10mg/ml.
- 2) En tubos de polipropileno de 12x75mm se pusieron 20 $\mu$ l de cada AcMo y 100 $\mu$ l de suspensión celular.
- 3) Tras agitar suavemente se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 4°C.
- 4) Se hizo un lavado mediante adición de azida sódica 1g/l, centrifugación durante 10 minutos a 800g y eliminación del sobrenadante.
- 5) Se resuspendieron los botones celulares añadiendo 100 $\mu$ l de azida sódica 1g/l, quedando preparados para su adquisición por el citómetro de flujo.

Si la adquisición de la muestra se deseaba posponer al día del marcaje se añadía a cada tubo 0,5ml de paraformaldehido 10mg/ml después del punto 4 y se mantenían a 4°C en oscuridad hasta un plazo máximo de una semana. Posteriormente, para la adquisición de las muestras por el citómetro se repetían los puntos 4 y 5.

### 3.2.11. Marcadores empleados en el análisis fenotípico de las subpoblaciones linfocitarias

Se emplearon los siguientes AcMo: anti-CD2 (Leu-5b), CD3 (Leu-4), CD4 (Leu-3), CD8 (Leu-2), CD11b (Leu-15), CD16 (Leu-11), CD19 (Leu-12), CD20 (Leu-16), CD25, CD56 (Leu-19), CD57 (Leu-7), CD69 (Leu-23), HLA-DR, HLA-DQ, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , todos ellos manufacturados por la compañía Becton-Dickinson. Se emplearon además los siguientes heteroantisueros: anti-sIg $\kappa$  y anti-sIg $\lambda$ , ambos manufacturados por la compañía Dakopatts y,

para el estudio inmunofenotípico de paciente tratado con células LAK alogénicas, un anti-HLA-A<sub>25</sub> cortesía del Servicio de Immunología de nuestro hospital.

Los anteriores AcMo fueron utilizados para marcajes dobles haciendo las siguientes combinaciones: CD2/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8, CD4/CD8, TCR $\alpha\beta$ /CD3, TCR $\gamma\delta$ /CD3, TCR $\alpha\beta$ /CD4, TCR $\gamma\delta$ /CD4, TCR $\alpha\beta$ /CD8, TCR $\gamma\delta$ /CD8, CD3/CD16, CD4/CD16, CD8/CD16, TCR $\alpha\beta$ /CD16, TCR $\gamma\delta$ /CD16, CD3/CD56, CD4/CD56, CD8/CD56, TCR $\alpha\beta$ /CD56, TCR $\gamma\delta$ /CD56, CD57/CD3, CD57/CD4, CD57/CD8, CD16/CD56, CD57/CD16, CD57/CD56, CD2/CD69, HLA-DR/HLA-DQ y para marcajes triples CD4+CD8/CD3, CD3+CD8/CD16 y CD3+CD8/CD56, nombrando en primer lugar los AcMo conjugados con FITC y en segundo lugar los AcMo conjugados con PE.

Junto con esta dotación de AcMo se procesó un tubo con células sin AcMo como control negativo y un tubo con células marcadas con LeucoGATE (Becton-Dickinson), que consiste en la combinación CD45/CD14, para el análisis posterior de las muestras.

### 3.2.12. Adquisición de las muestras por el citómetro de flujo

Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). El citómetro de flujo mide y analiza las propiedades ópticas de las células individualmente cuando éstas pasan a través de un rayo láser de argón. La luz incidente sufre una dispersión que los detectores fotoeléctricos del citómetro registran en 2 direcciones: la dispersión frontal o de ángulo estrecho (FSC, entre 0-10°) que se relaciona con el tamaño celular, y la dispersión lateral o de ángulo ancho (SSC, 90°) que proporciona una medida de la complejidad interna.

En adición a la dispersión, el citómetro de flujo puede medir la fluorescencia emitida por los colorantes FITC y PE, que absorben la luz azul del láser de argón (488nm) y emiten luz verde (530nm) y naranja (575nm) respectivamente. Con la ayuda de filtros ópticos el citómetro recoge separadamente estas dos señales de emisión. Cuando el citómetro adquiere células marcadas con AcMo conjugados con estos colorantes fluorescentes puede determinar la cantidad relativa de cada colorante en las células individuales.

El citómetro de flujo, previamente a la adquisición de las muestras, fue compensado automáticamente para medir leucocitos humanos mediante el programa AutoCOMP (Becton Dickinson), que requería el uso de microesferas de plástico CaliBRITE (Becton Dickinson) sin marcar y marcadas con FITC o PE, para hacer 3 ajustes: la selección de los eventos celulares sencillos (con la exclusión de dobletes celulares e impurezas en los registros), el ajuste del voltaje del tubo fotomultiplicador y la compensación de las fluorescencias (con el sombreamiento de la zona en que los espectros de emisión del FITC y la PE solapan). Una vez hecha la compensación, la memoria del sistema la retenía y la transmitía al FACScan de modo automático al encender el citómetro.

Para la adquisición y análisis de las muestras, el citómetro de flujo utilizó los sistemas informáticos CONSORT 30 con el programa LYSYS y CONSORT 32 con el programa LYSYS II (Becton Dickinson). Estos sistemas funcionaban en un ordenador Hewlet Packard 340, consistente en: CPU con 4 MB RAM, disco duro con 40MB, interfase GPIO de 16 bites en paralelo, monitor a color de alta resolución, impresora a color, teclado y ratón.

En la adquisición el citómetro aspiraba las células contenidas en cada tubo hasta registrar 3.000 puntos o eventos.

### **3.2.13. Análisis de las subpoblaciones celulares**

Los porcentajes de linfocitos definidos por los distintos antígenos de superficie fue determinado en el FASCscan utilizando también el programa LYSYS II.

Para seleccionar sólo los eventos correspondientes a la fracción linfocitaria se representaron gráficamente los datos almacenados correspondientes a las células marcadas con LeucoGATE. En la representación ortogonal de la dispersión luminosa frontal frente a la dispersión luminosa lateral (Figura A) se delineó una ventana en la población de linfocitos, que se identificaba con la nube de puntos cuyas coordenadas coincidían con el tamaño y la complejidad interna de los linfocitos y que se visualizaba diferenciadamente de los monocitos y los granulocitos (Figura B). En la misma pantalla se representó ortogonalmente la fluorescencia del FITC frente a la fluorescencia de la PE. En esta representación, dado que

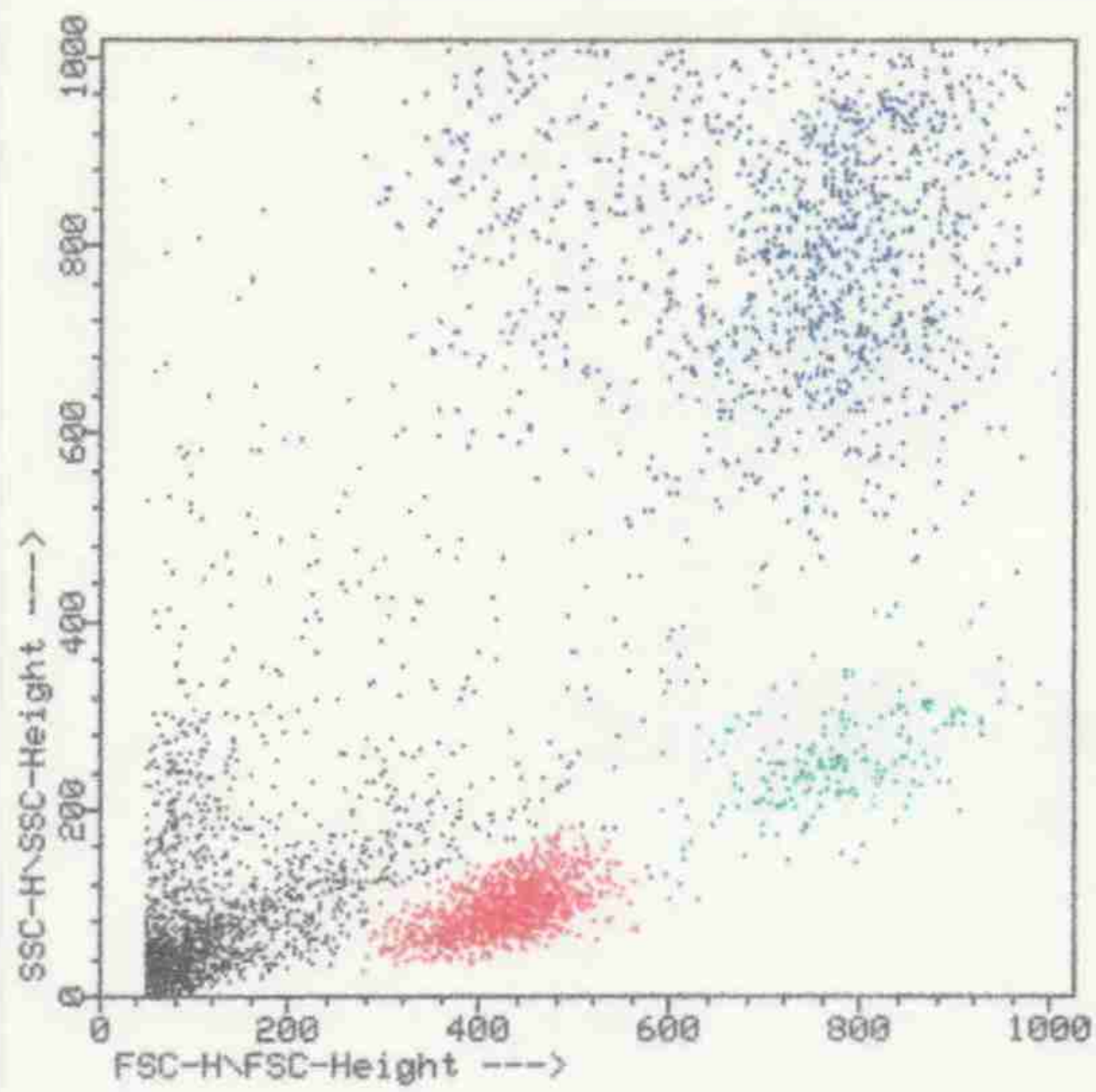
el marcador CD45 es pan-leucocitario pero se expresa con distinta intensidad en los 3 tipos leucocitarios y que el marcador CD14 sólo se expresa en los monocitos (100), aparecían las 3 poblaciones diferenciadas (Figura C). Al activar la ventana desaparecían de la representación de la fluorescencia las nubes de puntos correspondientes a los monocitos y granulocitos, y esto nos confirmaba que eran excluidos del análisis subsiguiente (Figura D).

Una vez hecha la selección de la fracción linfocitaria analizábamos la fluorescencia en el control negativo. La representación se dividió con un eje horizontal y un eje vertical en 4 cuadrantes, numerados del 1 al 4 de izquierda a derecha y de arriba a abajo. Los ejes se ajustaron por arriba y por la derecha a los eventos celulares en el control negativo, de modo que el 100% de éstos se situaban en el cuadrante 3 (Figura E).

La ventana activada y las coordenadas de los ejes se mantuvieron para el análisis subsiguiente de todos los marcadores celulares. El cuadrante 1 contenía los puntos que representaban las células marcadas sólo con PE, el cuadrante 2 las células marcadas con FITC y PE, el cuadrante 3 las células no marcadas y el cuadrante 4 las células marcadas sólo con FITC. Se determinaron los porcentajes en los cuadrantes 1, 3 y 4 respecto del total de linfocitos (Figura F).

La suma de los cuadrantes 2 y 4 representaba el porcentaje total de linfocitos marcados con FITC y la suma de los cuadrantes 1 y 2 el de linfocitos marcados con PE. Puesto que la dotación de AcMo utilizados para cada muestra incluía ciertos marcadores repetidas veces se calculó el valor medio de los resultados obtenidos para cada una de ellas.

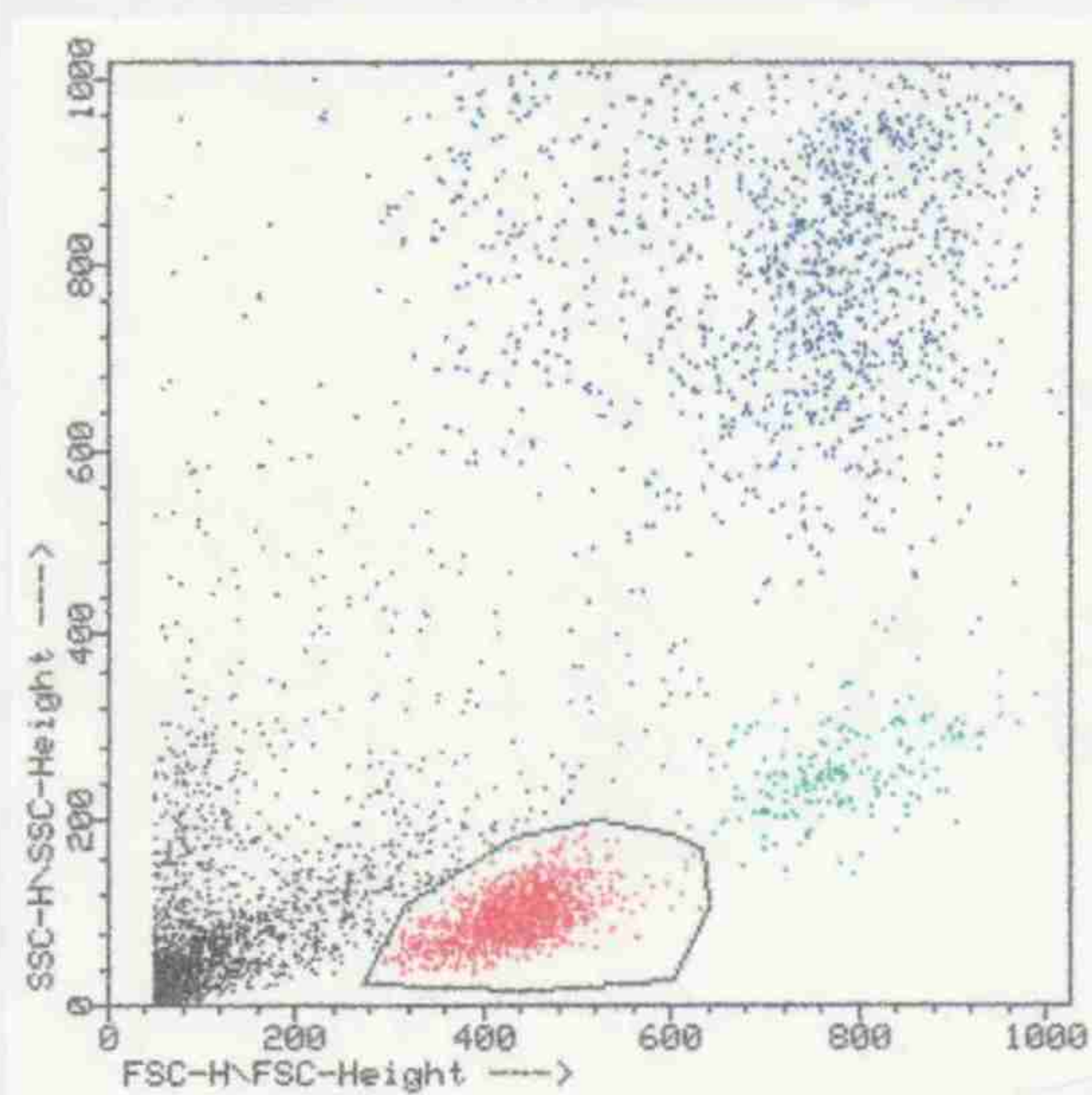
SSC



FSC

**Figura A:** Representación ortogonal de la dispersión luminosa frontal (FSC) frente a la dispersión luminosa lateral (SSC). Hemos coloreado en rojo la fracción linfocitaria, en verde la fracción monocitaria y en azul la fracción granulocitaria.

SSC

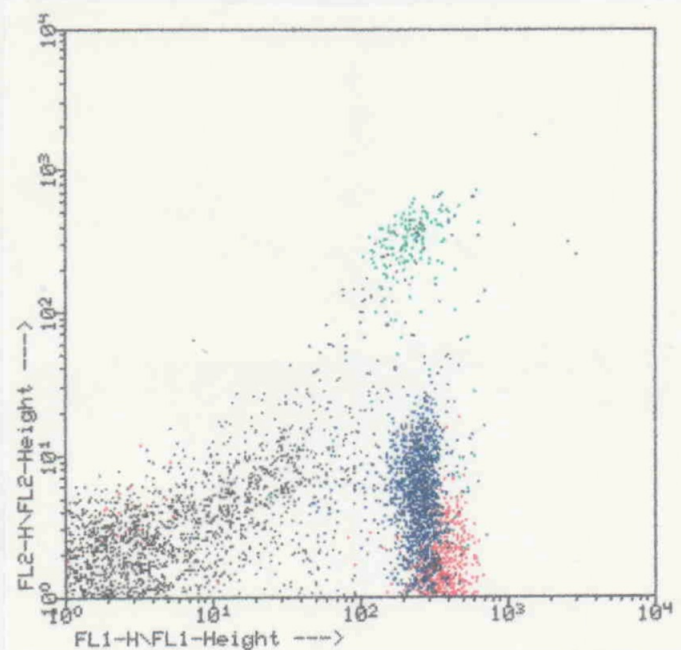


FSC

**Figura B:** Delineación de una ventana para seleccionar los linfocitos como población de estudio.



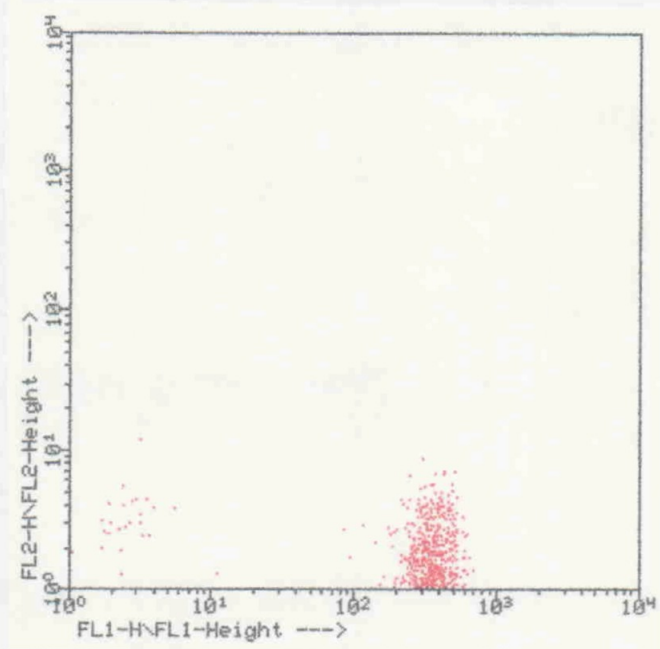
CD14 PE



CD45 FITC

**Figura C:** Representación de la fluorescencia en SP procesada con solución de lisis de hematíes y marcada con LeucoGATE.

CD14 PE

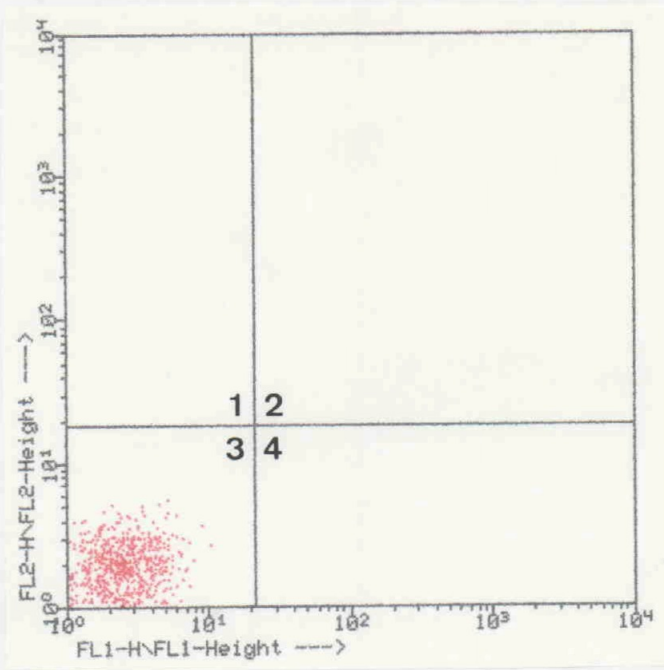


CD45 FITC

**Figura D:** Imagen de la fluorescencia en SP marcada con LeucoGATE después de activar la ventana linfocitaria.



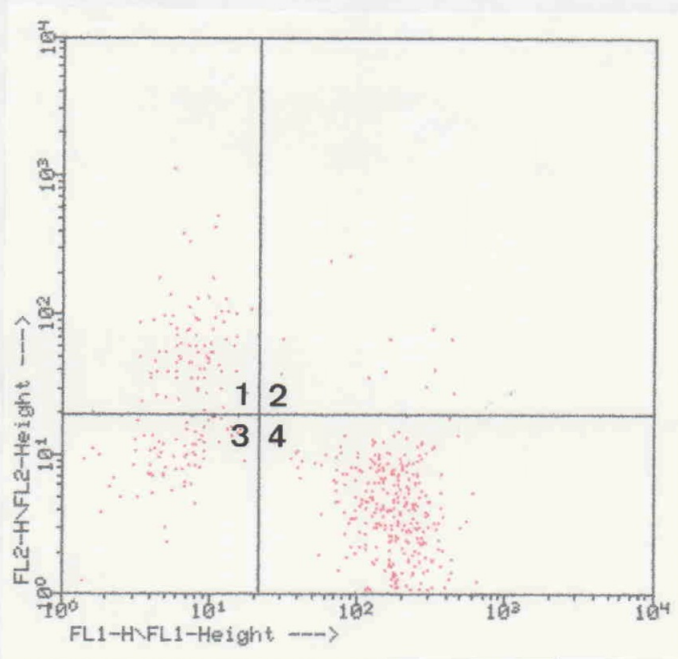
FL2



FL1

Figura E: Ajuste de los ejes en la imagen de la fluorescencia en el control negativo.

CD56 PE



CD3 FITC

Figura F: Análisis de la fluorescencia en la población linfocitaria marcada con CD3/CD56.

### 3.2.14. Análisis estadístico

Para reconocer diferencias significativas entre diferentes grupos de medidas se empleó el test de la  $t$  de Student. Todos los valores de  $p$  señalados corresponden a la realización del test con dos colas.

Para establecer relaciones entre distintos grupos de medidas se empleó el análisis de correlación lineal simple.

Para las actividades citolíticas, los valores de  $p$  y  $r$  señalados se refieren a la proporción E:D de 80:1.

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas informáticos TADPOLE 2.01 (Elsevier-BIOSOFT, 1986) y KWIKSTAT 2.00 (Microsoft Corporation, 1989).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES CITOLÍTICAS "NATURAL KILLER" (NK) Y "LYMPHOKINE-ACTIVATED KILLER" (LAK) EN LA SANGRE PERIFÉRICA (SP) SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES K562 Y RAJI

Los porcentajes medios de lisis sobre K562 y Raji por las células mononucleares (CMN) iniciales no activadas con IL-2, CMN cultivadas sin IL-2 y células LAK procedentes de pacientes en remisión completa (RC) después de quimioterapia (grupo post-QT) y de trasplante autólogo de médula ósea (grupos post-TAMO), así como de individuos sanos, a distintas proporciones efector:diana (E:D), se muestran en las tablas 1 y 2.

Las CMN iniciales de los pacientes tuvieron una actividad lítica sobre las células K562 significativamente menor que las CMN iniciales de los individuos sanos, tanto en el grupo post-QT ( $p=0,0003$ ) como en el grupo post-ABMT ( $p=0,003$ ): 28/56 pacientes (50%) en el grupo post-QT y 11/26 pacientes (42%) en el grupo post-TAMO presentaron una actividad NK inferior a la obtenida para los individuos sanos. No existieron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes para la actividad NK.

Las CMN iniciales tuvieron porcentajes medios de citólisis sobre las células Raji comparables entre los pacientes de ambos grupos y a su vez con los individuos sanos, aunque 5/56 pacientes (10%) en el grupo post-QT y 5/26 pacientes (19%) en el grupo post-TAMO tuvieron una actividad LAK espontánea superior a la obtenida para los individuos sanos.

La actividad citolítica inicial sobre las líneas K562 y Raji se correlacionó dentro de cada uno de los 3 grupos estudiados, según se refleja en la tabla 3.

Las CMN cultivadas sin IL-2 tuvieron niveles disminuidos de actividad citolítica sobre la línea celular K562 ( $p=0,01$  para el grupo post-QT y  $p=0,005$  para individuos sanos).

Las células LAK ejercieron unos porcentajes medios de actividad citolítica sobre ambas líneas celulares superiores a los obtenidos por las CMN iniciales en los pacientes de

ambos grupos y en los individuos sanos ( $p=0,0000$  para K562 y para Raji en todos).

Los porcentajes medios de lisis de las células LAK sobre las líneas celulares K562 y Raji en pacientes fueron significativamente inferiores a los obtenidos en individuos sanos ( $p=0,0001$  y  $p=0,01$ , respectivamente, para el grupo post-QT y  $p=0,0000$  y  $p=0,0009$ , respectivamente, para el grupo post-TAMO). En este aspecto no existieron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes.

En 51/56 pacientes (91%) en el grupo post-QT, en 23/26 pacientes (88%) en el grupo post-TAMO y en todos los individuos sanos se alcanzaron niveles de lisis sobre K562 superiores a los iniciales tras la incubación *in vitro* con IL-2. De modo similar, en 52/56 pacientes (93%) en el grupo post-QT, en 24/26 pacientes (92%) en el grupo post-TAMO y en todos los individuos sanos los niveles de lisis sobre Raji obtenidos tras la activación con IL-2 superaron a los niveles iniciales.

Los niveles de actividad lítica inicial y tras incubación con IL-2 sobre la línea celular K562 estuvieron correlacionados en cada grupo de pacientes, pero no en individuos sanos (tabla 3). Esta correlación no se verificó para la línea celular Raji. Asimismo, se verificó una correlación lineal significativa entre los porcentajes de lisis de las células LAK sobre las líneas celulares K562 y Raji en todos los grupos.

En las tablas 4 y 5 se muestran los porcentajes medios de lisis de las líneas K562 y Raji por las CMN iniciales, CMN cultivadas sin IL-2 y células LAK procedentes de los pacientes del grupo post-QT y del grupo post-TAMO, desglosados en LLA y LMA, a distintas proporciones E:D. No existieron diferencias significativas entre LLA y LMA, analizadas separadamente en cada grupo de pacientes.

TABLA 1

ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE K562 EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

<b>E:D</b>	<b>2.5:1</b>	<b>10:1</b>	<b>40:1</b>	<b>80:1</b>
<b>Post-QT (n=56)</b>				
CMN iniciales	1,2±1,5	2,8±3,0	6,6±6,1	10,2±8,5
CMN cultivadas	0,6±1,3	1,5±2,3	3,5±5,9	5,0±7,6
Células LAK	15,3±13,7	31,5±22,1	45,5±22,4	50,5±20,7
<b>Post-TAMO (n=26)</b>				
CMN iniciales	N.T.	N.T.	7,6±7,5	12,7±11,6
CMN cultivadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Células LAK	N.T.	N.T.	36,4±22,8	44,3±21,3
<b>Individuos sanos (n=60)</b>				
CMN iniciales	2,6±2,1	6,7±3,6	16,3±9,1	22,8±14,1
CMN cultivadas	1,2±2,3	3,4±6,7	8,6±14,5	10,9±17,2
Células LAK	24,6±14,8	47,6±15,2	63,1±11,6	66,0±8,5

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar.

E:D, proporción efector:diana; QT, quimioterapia; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer"; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea; N.T., no testado.

TABLA 2

ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE RAJI EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

<b>E:D</b>	<b>2.5:1</b>	<b>10:1</b>	<b>40:1</b>	<b>80:1</b>
<b>Post-QT (n=56)</b>				
CMN iniciales	1,8±2,5	3,0±4,5	5,3±7,5	7,9±9,6
CMN cultivadas	0,8±1,5	1,8±2,5	3,3±4,6	4,6±5,2
Células LAK	14,5±13,0	31,3±20,9	47,3±22,5	53,2±21,4
<b>Post-TAMO (n=26)</b>				
CMN iniciales	N.T.	N.T.	6,4±8,4	9,1±10,5
CMN cultivadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Células LAK	N.T.	N.T.	37,3±23,1	47,3±23,2
<b>Individuos sanos (n=39)</b>				
CMN iniciales	1,3±2,0	1,9±2,6	3,4±6,2	5,6±9,7
CMN cultivadas	0,4±1,1	1,2±2,1	2,8±3,8	3,8±5,2
Células LAK	15,5±10,9	37,0±15,5	57,2±12,6	64,0±11,4

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar.

E:D, proporción efector:diana; QT, quimioterapia; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer"; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea; N.T., no testado.

TABLA 3

CORRELACION ENTRE LAS ACTIVIDADES CITOLITICAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA A PROPORCION E:D DE 80:1

Efactor(as)	Diana(s)		Post-QT	Post-TAMO	Control
CMN iniciales	K562	<i>r</i>	0,606	0,690	0,840
	<i>versus</i>	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000
	Raji	<i>m</i>	0,67	0,81	0,55
CMN iniciales <i>versus</i> Células LAK	K562	<i>r</i>	0,510	0,382	0,055
		<i>p</i>	0,002	0,05	0,85
		<i>m</i>	1,35	0,25	-
CMN iniciales <i>versus</i> Células LAK	Raji	<i>r</i>	0,207	0,070	0,021
		<i>p</i>	0,28	0,77	0,94
		<i>m</i>	-	-	-
CMN iniciales <i>versus</i> Células LAK	Blastos	<i>r</i>	0,008	N.T.	-0,161
		<i>p</i>	0,97	-	0,57
		<i>m</i>	-	-	-
Células LAK	K562	<i>r</i>	0,846	0,808	0,612
	<i>versus</i>	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000
	Raji	<i>m</i>	0,87	0,72	0,84
Células LAK	K562	<i>r</i>	0,429	N.T.	0,346
	<i>versus</i>	<i>p</i>	0,003	-	0,004
	Blastos	<i>m</i>	0,21	-	0,81
Células LAK	Raji	<i>r</i>	0,334	N.T.	0,354
	<i>versus</i>	<i>p</i>	0,02	-	0,007
	Blastos	<i>m</i>	0,16	-	0,67

*r* = coeficiente de correlación de Pearson; *p* = significación de la correlación; *m* = pendiente de la recta de regresión; E:D, efector:diana; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer"; QT, quimioterapia; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea; N.T., no testado.

**TABLA 4**

**ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE K562 EN PACIENTES CON LLA Y LMA**

<b>E:D</b>	<b>2.5:1</b>	<b>10:1</b>	<b>40:1</b>	<b>80:1</b>
<b>Post-QT (n=56)</b>				
<b>LLA (n=25)</b>				
CMN iniciales	1,6±1,9	3,9±3,2	8,5±6,9	12,3±9,2
CMN cultivadas	0,4±0,9	1,2±1,7	2,8±5,6	3,8±7,0
Células LAK	16,9±15,0	31,9±24,3	42,5±26,7	46,4±26,0
<b>LMA (n=31)</b>				
CMN iniciales	0,8±1,1	1,9±2,5	5,0±5,1	8,5±7,8
CMN cultivadas	0,7±1,5	1,6±2,6	4,1±6,2	5,9±8,1
Células LAK	13,8±12,5	31,1±20,2	48,0±18,3	53,8±15,0
<b>Post-TAMO (n=26)</b>				
<b>LLA (n=15)</b>				
CMN iniciales	N.T.	N.T.	7,7±6,6	13,1±9,9
CMN cultivadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Células LAK	N.T.	N.T.	37,9±22,5	46,5±21,2
<b>LMA (n=11)</b>				
CMN iniciales	N.T.	N.T.	7,4±8,7	12,2±13,6
CMN cultivadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Células LAK	N.T.	N.T.	34,3±24,1	41,4±22,1

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar.

LLA, leucemias linfoblásticas agudas; LMA, leucemias mieloides agudas; E:D, proporción efector:diana; QT, quimioterapia; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer"; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea; N.T., no testado.



**TABLA 5**

**ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE RAJI EN PACIENTES CON LLA Y LMA**

<b>E:D</b>	<b>2.5:1</b>	<b>10:1</b>	<b>40:1</b>	<b>80:1</b>
<b>Post-QT (n=56)</b>				
<b>LLA (n=25)</b>				
CMN iniciales	2,1±3,5	3,8±6,3	6,4±9,8	9,4±13,0
CMN cultivadas	0,4±1,0	1,0±1,3	1,4±1,6	2,1±2,3
Células LAK	14,3±14,0	30,0±23,3	45,2±27,3	51,1±26,7
<b>LMA (n=31)</b>				
CMN iniciales	1,5±1,6	2,4±2,6	4,5±5,5	6,8±6,4
CMN cultivadas	1,1±1,8	2,4±3,1	4,8±5,7	6,6±6,0
Células LAK	14,7±12,4	32,5±18,9	49,0±18,0	54,9±16,1
<b>Post-TAMO (n=26)</b>				
<b>LLA (n=15)</b>				
CMN iniciales	N.T.	N.T.	6,1±7,2	8,3±8,3
CMN cultivadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Células LAK	N.T.	N.T.	41,5±19,4	52,9±19,1
<b>LMA (n=11)</b>				
CMN iniciales	N.T.	N.T.	6,9±9,7	10,0±12,8
CMN cultivadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Células LAK	N.T.	N.T.	31,6±27,2	39,8±27,0

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar.

LLA, leucemias linfoblásticas agudas; LMA, leucemias mieloides agudas; E:D, proporción efector:diana; QT, quimioterapia; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer"; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea; N.T., no testado.

## 4.2. ACTIVIDADES LÍTICAS DE LAS CELULAS LAK SOBRE BLASTOS LEUCEMICOS

En la tabla 6 se muestran los porcentajes medios de la lisis de blastos leucémicos ejercida por las CMN iniciales, CMN cultivadas sin IL-2 y células LAK autólogas procedentes de pacientes del grupo post-QT y alogénicas procedentes de individuos sanos, a distintas proporciones E:D.

La lisis por las CMN iniciales de los pacientes y los individuos sanos sobre blastos leucémicos, autólogos y alogénicos, respectivamente, mostró valores bajos comparables entre sí. Sólo 2/46 pacientes (4%) y ninguno de los individuos sanos mostraron porcentajes de lisis iniciales sobre los blastos cancerosos que superasen el 10% a proporción E:D de 80:1. Por esta razón este porcentaje fue marcado como el límite inferior a partir del cual consideramos positividad de lisis sobre blastos leucémicos, tanto autólogos como alogénicos.

Las CMN cultivadas sin IL-2 ejercieron una actividad lítica baja tanto en pacientes como en individuos sanos, sin diferencias significativas con las CMN iniciales, aunque en 5/50 blastos diana (10%) la lisis de células leucémicas por las CMN cultivadas de individuos sanos superó el valor de positividad del 10% a proporción E:D de 80:1.

La activación con IL-2 potenció significativamente en promedio la actividad citolítica sobre blastos leucémicos, tanto en pacientes ( $p=0,003$ ) como en individuos sanos ( $p=0,0000$ ). La actividad de las células LAK en 16/46 pacientes (35%) sobre blastos leucémicos autólogos alcanzó o superó el 10% de lisis, mientras que la actividad de las células LAK de individuos sanos lo hizo en 41/50 blastos leucémicos (82%) ensayados como diana a proporción E:D de 80:1.

Las células LAK de individuos sanos tuvieron porcentajes de lisis sobre blastos leucémicos alogénicos superiores a los obtenidos por las células LAK de pacientes sobre blastos leucémicos autólogos ( $p=0,0000$ ).

En la tabla 7 se presentan los promedios de lisis sobre los blastos de LLA y LMA ejercidos por las CMN iniciales, las CMN cultivadas sin IL-2 y las células LAK en los pacientes del grupo post-QT y en individuos sanos, a distintas proporciones E:D. No se aprecian diferencias significativas entre LLA y LMA.

TABLA 6

ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE BLASTOS LEUCEMICOS AUTOLOGOS EN  
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA EN FASE DE POST-QT

E:D	2.5:1	10:1	40:1	80:1
<b>Pacientes (n=46)</b>				
CMN iniciales	0,7±2,7	0,8±2,7	1,2±3,3	1,5±3,3
CMN cultivadas	0,5±1,2	0,9±2,0	1,4±2,4	1,7±2,6
Células LAK	1,9±5,5	3,4±6,7	6,2±9,6	8,5±10,8
<b>Controles (n=50)</b>				
CMN iniciales	1,2±1,6	1,9±2,4	2,3±2,6	2,8±2,9
CMN cultivadas	0,8±1,4	1,4±2,2	3,3±6,1	5,2±8,2
Células LAK	6,0±7,1	11,1±10,4	18,6±14,2	23,4±15,5

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar. Los controles fueron 20 individuos sanos sobre 50 blastos leucémicos alogénicos (cada control se enfrentó de 2 a 6 blastos).

QT, quimioterapia; E:D, proporción efector:diana; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer".



TABLA 7

ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE BLASTOS LEUCEMICOS AUTOLOGOS EN PACIENTES CON LLA Y LMA EN FASE DE POST-QT

<b>E:D</b>	<b>2.5:1</b>	<b>10:1</b>	<b>40:1</b>	<b>80:1</b>
<b>Pacientes (n=46)</b>				
<b>LLA (n=19)</b>				
CMN iniciales	2,1±4,5	2,1±4,5	2,7±5,5	3,2±5,4
CMN cultivadas	0,5±1,4	1,1±1,6	1,6±3,1	1,7±3,0
Células LAK	1,4±2,9	2,3±3,4	4,1±5,0	7,0±7,5
<b>LMA (n=27)</b>				
CMN iniciales	0,1±0,2	0,2±0,4	0,5±0,7	0,6±0,8
CMN cultivadas	0,5±1,1	0,7±1,4	1,3±2,0	1,7±2,3
Células LAK	2,2±6,8	4,2±8,2	7,6±11,6	9,5±12,7
<b>Controles (n=50)</b>				
<b>LLA (n=20)</b>				
CMN iniciales	0,2±0,4	1,0±2,2	1,0±2,2	1,0±2,2
CMN cultivadas	1,3±1,9	2,5±3,1	6,2±8,8	8,7±11,2
Células LAK	5,8±6,9	10,9±9,0	20,05±13,1	26,1±14,1
<b>LMA (n=50)</b>				
CMN iniciales	1,7±1,7	2,3±2,4	2,9±2,7	3,6±2,8
CMN cultivadas	0,4±0,7	0,6±1,5	1,5±2,0	2,9±4,2
Células LAK	6,1±7,3	11,2±11,4	17,7±15,0	21,7±16,3

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar. Los controles fueron 20 individuos sanos sobre 50 blastos leucémicos alogénicos (cada control se enfrentó de 2 a 6 blastos).

LLA, leucemias linfoblásticas agudas; LMA, leucemias mieloides agudas; QT, quimioterapia; E:D, proporción efector:diana; CMN, células mononucleares; LAK, "lymphokine-activated killer".

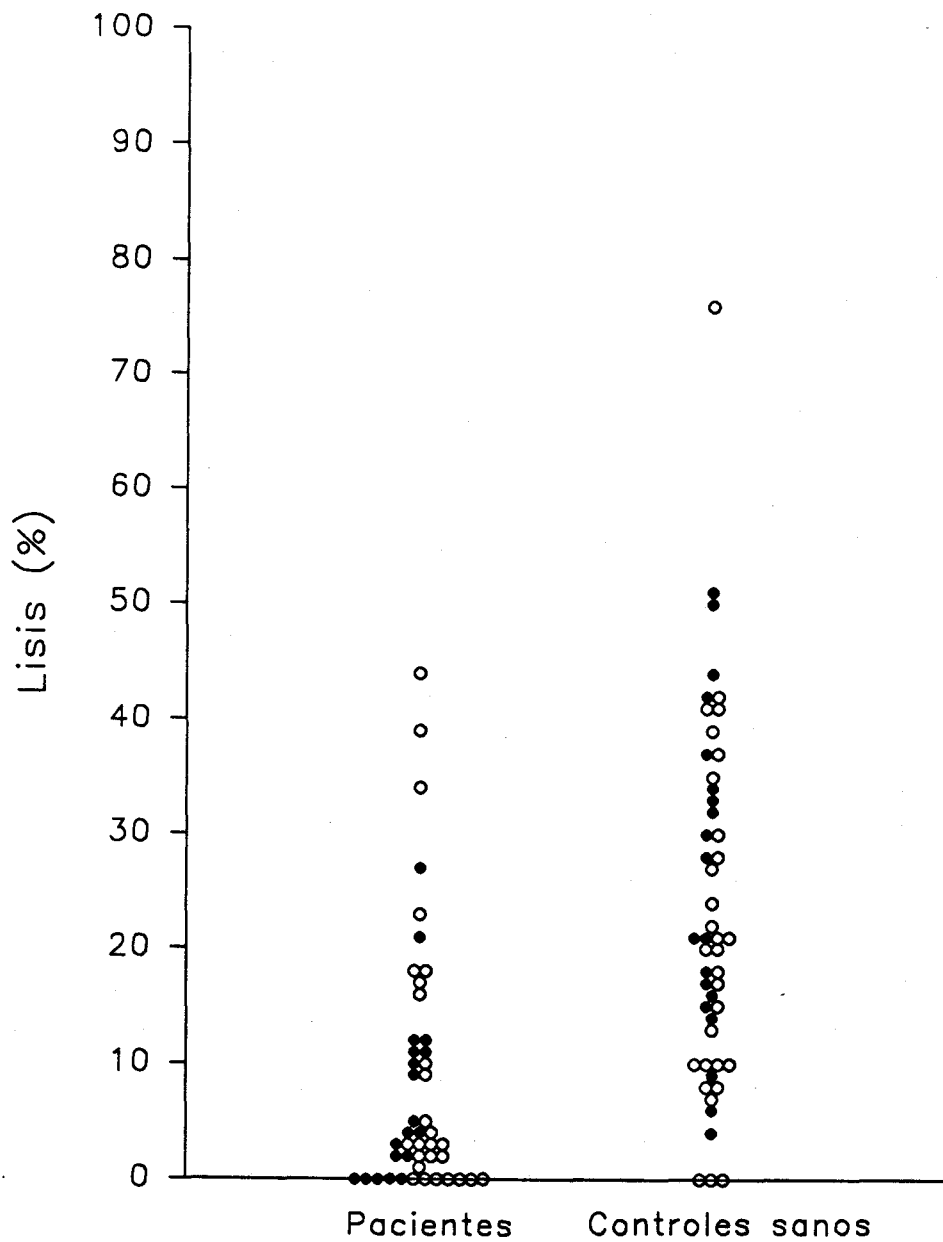
#### **4.2.1. Relación entre la actividad lítica sobre blastos leucémicos y la actividad lítica sobre las líneas celulares K562 y Raji**

En promedio, la lisis de los blastos leucémicos fue baja comparada con la lisis de las líneas celulares. En las figuras 1 y 2 se representan los porcentajes de lisis de las diferentes células diana obtenidos por las células LAK de los pacientes del grupo post-QT y de individuos sanos, a proporción E:D de 80:1.

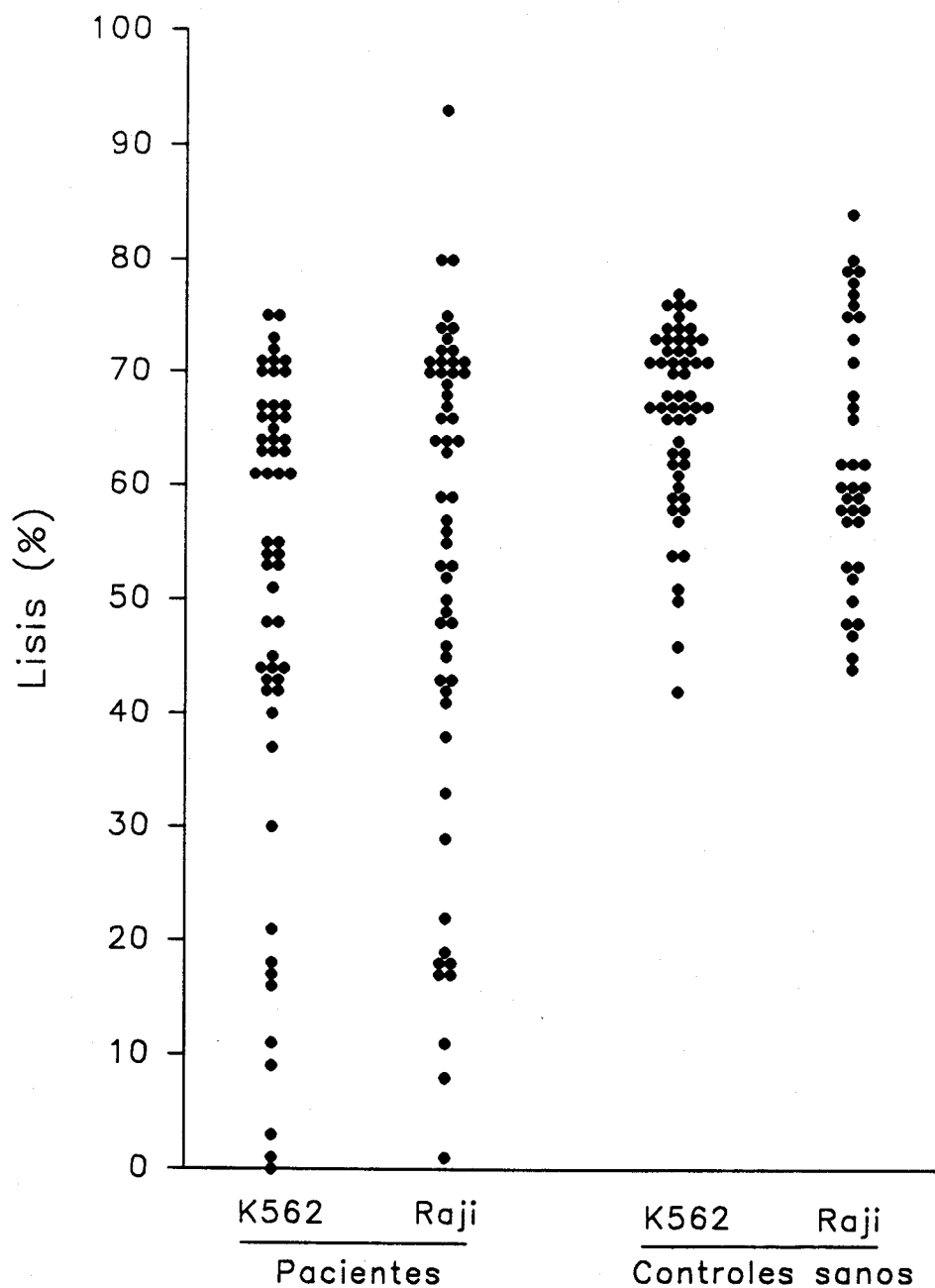
Las células LAK en 11/46 pacientes (24%), incluyendo 7 LLA y 4 LMA, lisaron menos del 40% de las células diana K562 y Raji a proporción E:D de 80:1. Ninguno de estos pacientes lisó los blastos leucémicos autólogos con valores superiores al 10%. En los restantes 35 pacientes (76%), incluyendo 12 LLA y 23 LMA, las células LAK lisaron más del 40% de las células diana K562 y Raji. 16 de éstos (46%), incluyendo 7 LLA y 9 LMA, excedieron el valor de positividad del 10% de lisis sobre blastos leucémicos autólogos.

No encontramos correlación entre los niveles iniciales de actividad sobre blastos leucémicos y los generados por el cultivo con IL-2. En cambio, sí encontramos correlaciones lineales significativas entre la actividad LAK generada sobre las líneas celulares K562 y Raji y la generada sobre blastos leucémicos en pacientes y en individuos sanos (tabla 3).

Por otra parte, no observamos ninguna relación entre el tiempo transcurrido desde que los pacientes alcanzaron la RC hasta la obtención de CMN y las actividades líticas registradas sobre ninguna de las dianas celulares.



**Figura 1.** Actividades citolíticas de las células LAK de los pacientes del grupo post-quimioterapia sobre los blastos leucémicos autólogos y de las células LAK de los individuos sanos sobre los blastos leucémicos alogénicos, a proporción efector:diana de 80:1. ●, leucemias linfoblásticas agudas; ○, leucemias mieloides agudas. LAK, "lymphokine-activated killer".



**Figura 2.** Actividades citolíticas de las células LAK de los pacientes del grupo post-quimioterapia y de los individuos sanos sobre las líneas celulares K562 y Raji, a proporción efector:diana de 80:1. LAK, "lymphokine-activated killer".

### 4.3. RELACIÓN ENTRE LAS ACTIVIDADES NK Y LAK ESPONTÁNEA Y LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN SP

Los porcentajes medios obtenidos para las diferentes subpoblaciones linfocitarias, incluidas aquellas con fenotipo complejo deducido, estudiadas en los pacientes de los grupos post-QT y post-TAMO y en individuos sanos se muestran en la tabla 8.

Hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos post-QT y control para las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> ( $p=0,003$ ), TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD69<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,003$ ), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,0006$ ), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ) y TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ).

Hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos post-TAMO y control para las subpoblaciones CD3<sup>+</sup> ( $p=0,0006$ ), CD4<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD8<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> ( $p=0,001$ ), CD2<sup>+</sup> ( $p=0,0006$ ), CD57<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD69<sup>+</sup> ( $p=0,001$ ), HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), HLA-DQ<sup>+</sup> ( $p=0,0007$ ), sIg $\kappa$ <sup>+</sup> ( $p=0,0004$ ), sIg $\lambda$ <sup>+</sup> ( $p=0,0002$ ), CD19<sup>+</sup> ( $p=0,002$ ), CD20<sup>+</sup> ( $p=0,004$ ), CD56<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,0001$ ) y la población de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ).

Finalmente, hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos post-QT y post-TAMO para las subpoblaciones CD3<sup>+</sup> ( $p=0,0001$ ), CD4<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $p=0,0002$ ), TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> ( $p=0,001$ ), TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD2<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD56<sup>+</sup> ( $p=0,004$ ), CD69<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), HLA-DQ<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), sIg $\kappa$ <sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), sIg $\lambda$ <sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD19<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD20<sup>+</sup> ( $p=0,0002$ ), CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,003$ ), TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,007$ ), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ), CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD56<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ) y las subpoblaciones de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ).

#### 4.3.1. Relación entre la actividad NK y las subpoblaciones linfocitarias

Hemos encontrado correlaciones lineales significativas entre la actividad NK medida



sobre la línea celular K562 y las siguientes subpoblaciones linfocitarias en los 3 grupos estudiados: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (figura 3), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (figura 4), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (figura 5) y las subpoblaciones de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (tabla 9). Las pendientes de las rectas de regresión fueron mayores en el grupo control que en los dos grupos de pacientes.

Hemos encontrado correlaciones lineales significativas entre los porcentajes de actividad NK y de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> en los dos grupos de pacientes pero no en el grupo control y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> en los grupos post-TAMO y control pero no en el grupo post-QT.

Otras correlaciones que se obtuvieron para sólo uno de los grupos estudiados se han señalado en la tabla 9 especificando el valor de la pendiente de la recta de regresión.

#### **4.3.2. Relación entre la actividad LAK espontánea y las subpoblaciones linfocitarias**

No hemos encontrado ninguna correlación entre los porcentajes de actividad LAK espontánea medidos sobre la línea celular Raji y los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas que se cumpliera para los pacientes de ambos grupos y los individuos sanos (tabla 10).

Sin embargo, hemos encontrado correlaciones lineales significativas entre dichos parámetros para CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> en los dos grupos de pacientes.

Otras correlaciones que se cumplieron sólo en un grupo se han señalado mediante el valor de la pendiente de la recta de regresión en la tabla 10.

TABLA 8

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN SP DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

SUBPOBLACIONES	POST-QT	POST-TAMO	CONTROL
CD3 <sup>+</sup>	75,3±13,6	61,5±17,8	76,4±9,4
CD4 <sup>+</sup>	34,8±12,3	22,6±13,4	45,6±10,3
CD8 <sup>+</sup>	31,4±12,2	35,3±14,5	27,0±9,1
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,40±1,15	0,77±0,73	1,95±1,00
TCRαβ <sup>+</sup>	67,8±15,1	56,2±18,3	70,8±9,4
TCRγδ <sup>+</sup>	8,5±7,7	4,4±3,0	3,6±2,4
CD2 <sup>+</sup>	84,8±10,1	69,8±17,7	84,7±7,5
CD16 <sup>+</sup>	21,0±11,6	18,7±10,5	16,2±6,2
CD56 <sup>+</sup>	30,7±12,6	23,3±12,4	24,2±7,9
CD57 <sup>+</sup>	24,2±15,1	26,8±12,9	19,3±9,7
CD25 <sup>+</sup>	7,6±3,7	7,5±9,2	7,9±2,7
CD69 <sup>+</sup>	16,9±10,9	3,3±6,5	9,4±6,5
HLA-DR <sup>+</sup>	26,9±13,8	45,4±17,6	16,1±6,5
HLA-DQ <sup>+</sup>	6,1±4,6	15,6±12,1	5,6±3,6
CD19 <sup>+</sup>	6,0±6,0	14,7±10,2	7,1±4,2
CD20 <sup>+</sup>	6,4±4,9	12,5±8,5	6,5±2,5
sIgκ <sup>+</sup>	2,7±3,4	9,2±6,6	3,5±1,9
sIgλ <sup>+</sup>	1,4±2,1	6,8±5,0	2,3±1,4
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	26,4±12,6	27,9±15,0	20,9±7,8
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	4,8±4,5	7,5±6,3	5,9±3,3
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	11,3±8,6	6,7±7,3	6,1±4,3
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	9,8±7,7	12,0±9,4	10,1±5,5
CD4 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,8±2,4	1,6±2,9	1,6±1,4
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	7,2±7,8	6,5±4,9	5,7±2,4
TCRαβ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	8,0±4,2	5,6±6,0	4,0±2,7
TCRγδ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	3,9±6,8	1,7±3,2	1,3±1,0
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	18,4±8,9	9,0±8,4	12,1±6,9
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	12,2±9,1	14,3±11,0	12,1±6,4
CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	5,1±4,8	1,9±2,8	3,3±2,3

TABLA 8 (CONTINUACION)

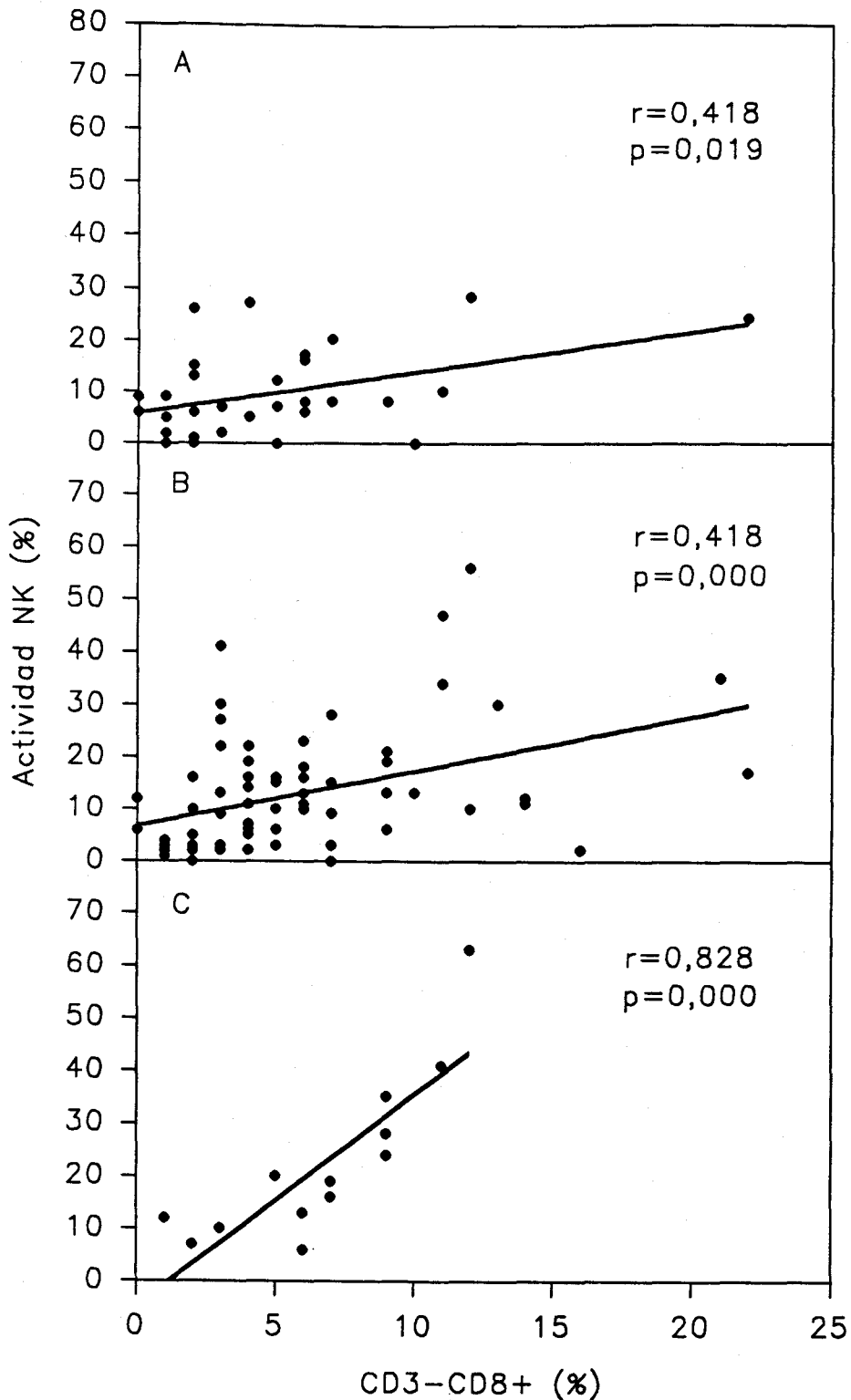
SUBPOBLACIONES	POST-QT	POST-TAMO	CONTROL
CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	11,2±7,9	8,1±5,3	8,8±4,2
TCRαβ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	14,1±7,9	7,4±7,5	9,6±5,4
TCRγδ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	4,9±6,0	1,6±2,3	2,1±1,4
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	18,7±14,1	22,0±13,2	13,0±9,0
CD3 <sup>-</sup> CD57 <sup>+</sup>	5,5±5,3	5,2±4,8	6,3±4,3
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	3,3±2,6	2,7±2,3	2,7±2,5
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	13,2±9,8	18,3±12,2	12,4±8,5
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	14,2±10,1	12,1±8,7	12,9±5,2
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	8,8±8,6	6,4±4,8	8,3±4,5
CD56 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	10,9±8,2	6,2±4,2	10,5±5,0
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	15,9±10,1	12,1±8,3	11,1±9,3
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	2,3±2,7	0,9±2,1	1,8±2,6
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	6,7±6,3	7,6±6,4	5,5±3,3
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,0±6,9	8,7±7,3	6,8±4,0

SUBPOBLACIONES DEDUCIDAS

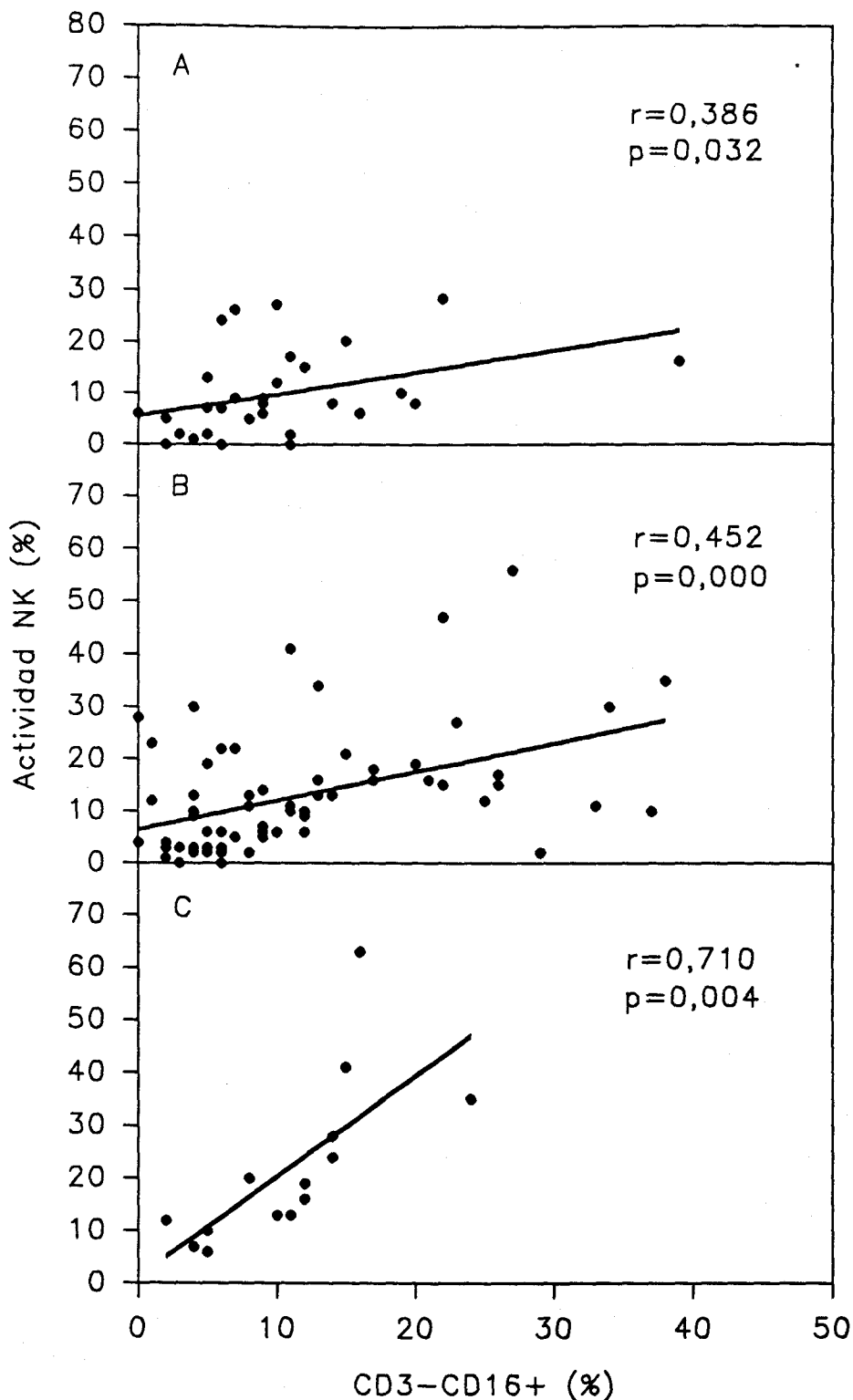
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,7±2,3	1,5±2,9	1,6±1,4
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	3,8±7,8	2,1±3,9	1,1±1,7
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	3,1±2,1	4,4±4,1	4,6±2,5
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	6,7±6,3	7,6±6,4	5,5±3,3
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	4,8±3,3	3,1±3,8	3,5±2,7
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	4,7±3,6	1,8±2,8	3,3±2,3
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,8±7,6	2,5±3,8	3,5±4,2
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	4,3±3,8	5,6±5,0	5,3±2,9
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,0±6,9	8,7±7,3	6,8±4,0
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,9±5,9	4,7±5,5	5,3±4,5

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar. Post-QT (n=31); post-TAMO (n=68); control (n=18).

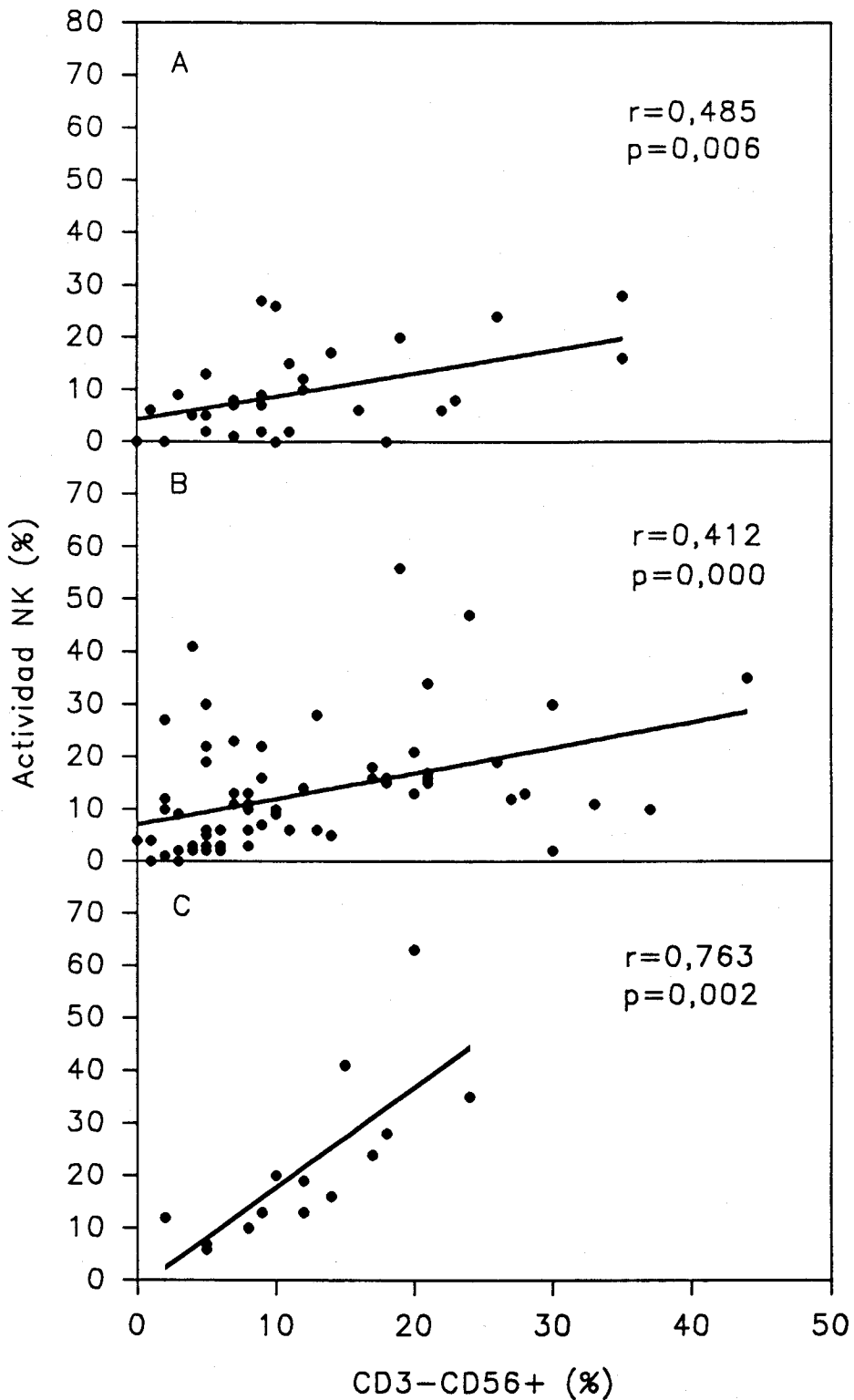
SP, sangre periférica; QT, quimioterapia; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea.



**Figura 3.** Relación entre los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y de actividad NK a proporción efector:diana de 80:1 en la sangre periférica de los pacientes de los grupos post-quimioterapia (A), post-trasplante autólogo de médula ósea (B) y de los individuos sanos (C);  $r$  = coeficiente de correlación de Pearson;  $p$  = significación de la correlación. NK: "natural killer".



**Figura 4.** Relación entre los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y de actividad NK a proporción efector:diana de 80:1 en la sangre periférica de los pacientes de los grupos post-quimioterapia (A), post-trasplante autólogo de médula ósea (B) y de los individuos sanos (C);  $r$  = coeficiente de correlación de Pearson;  $p$  = significación de la correlación. NK: "natural killer".



**Figura 5.** Relación entre los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y de actividad NK a proporción efector:diana de 80:1 en la sangre periférica de los pacientes de los grupos post-quimioterapia (A), post-trasplante autólogo de médula ósea (B) y de los individuos sanos (C);  $r$  = coeficiente de correlación de Pearson;  $p$  = significación de la correlación. NK: "natural killer".

**TABLA 9**

**CORRELACION ENTRE LOS PORCENTAJES DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN SP Y LA ACTIVIDAD NK SOBRE K562 A PROPORCION E:D DE 80:1**

SUBPOBLACIONES	POST-QT			POST-TAMO			CONTROL		
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>
CD3 <sup>+</sup>	-0,307	0,09	-	-0,174	0,16	-	-0,414	0,14	-
CD4 <sup>+</sup>	0,078	0,67	-	0,109	0,38	-	0,083	0,78	-
CD8 <sup>+</sup>	0,047	0,80	-	-0,186	0,13	-	0,302	0,29	-
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	-0,012	0,95	-	0,084	0,49	-	-0,267	0,36	-
TCRαβ <sup>+</sup>	-0,128	0,49	-	-0,183	0,13	-	-0,297	0,30	-
TCR γδ <sup>+</sup>	-0,163	0,38	-	-0,015	0,90	-	-0,429	0,12	-
CD2 <sup>+</sup>	0,014	0,94	-	0,081	0,51	-	0,178	0,54	-
CD16 <sup>+</sup>	0,176	0,34	-	0,336	0,005	-	0,437	0,12	-
CD56 <sup>+</sup>	0,152	0,41	-	0,338	0,005	-	0,072	0,81	-
CD57 <sup>+</sup>	0,055	0,77	-	-0,045	0,71	-	-0,044	0,88	-
CD25 <sup>+</sup>	0,200	0,28	-	-0,015	0,93	-	-0,422	0,13	-
CD69 <sup>+</sup>	-0,043	0,82	-	0,015	0,92	-	-0,287	0,32	-
HLA-DR <sup>+</sup>	-0,051	0,78	-	-0,122	0,32	-	-0,123	0,67	-
HLA-DQ <sup>+</sup>	0,102	0,59	-	-0,067	0,59	-	-0,624	0,02	-2,56
CD19 <sup>+</sup>	0,068	0,72	-	-	-	-	-0,370	0,19	-
CD20 <sup>+</sup>	-0,124	0,51	-	-0,130	0,29	-	-0,571	0,03	-3,37
sIgκ <sup>+</sup>	-0,084	0,65	-	-0,050	0,69	-	-0,353	0,21	-
sIgλ <sup>+</sup>	-0,017	0,93	-	-0,007	0,95	-	-0,296	0,30	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,130	0,49	-	-0,288	0,02	-0,21	-0,042	0,89	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,418	0,02	0,77	0,418	0,000	1,05	0,828	0,000	4,02
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,098	0,60	-	-0,062	0,62	-	-0,359	0,21	-
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,386	0,03	0,42	0,452	0,000	0,55	0,710	0,004	1,91
CD4 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,022	0,91	-	0,188	0,12	-	-0,222	0,44	-
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,012	0,95	-	0,079	0,52	-	0,418	0,14	-
TCRαβ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,073	0,69	-	-0,072	0,56	-	-0,369	0,19	-
TCR γδ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,072	0,70	-	-0,088	0,48	-	-0,348	0,22	-
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,281	0,13	-	0,038	0,76	-	-0,602	0,02	-1,31
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,485	0,006	0,45	0,412	0,000	0,49	0,763	0,002	1,91
CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,011	0,95	-	0,047	0,70	-	-0,264	0,36	-
CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,063	0,74	-	0,254	0,04	0,61	-0,018	0,95	-

**TABLA 9 (CONTINUACION)**

SUBPOBLACIONES	POST-QT			POST-TAMO			CONTROL		
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>
TCRαβ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,177	0,34	-	-0,008	0,95	-	-0,614	0,02	-1,76
TCR γδ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,054	0,77	-	0,215	0,08	-	-0,537	0,05	-
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	-0,115	0,54	-	-0,137	0,27	-	-0,305	0,29	-
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,461	0,009	0,73	0,242	0,05	0,53	0,512	0,06	-
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,120	0,52	-	0,061	0,62	-	-0,119	0,69	-
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	-0,007	0,97	-	-0,154	0,21	-	-0,072	0,81	-
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,207	0,26	-	0,240	0,05	0,33	0,528	0,05	-
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,246	0,18	-	0,176	0,15	-	0,421	0,13	-
CD56 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,150	0,42	-	0,231	0,06	-	0,233	0,45	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,321	0,08	-	0,076	0,54	-	-0,351	0,22	-
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,344	0,06	-	0,111	0,37	-	0,230	0,43	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,331	0,07	-	0,433	0,000	0,70	0,678	0,008	2,99
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,377	0,04	0,46	0,338	0,005	0,56	0,727	0,003	3,21
SUBPOBLACIONES DEDUCIDAS									
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,060	0,76	-	0,108	0,38	-	-0,222	0,44	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,082	0,66	-	-0,203	0,10	-	-0,426	0,13	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,434	0,01	1,73	0,368	0,002	1,35	0,675	0,008	4,32
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,331	0,07	-	0,433	0,000	0,70	0,678	0,008	2,99
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,071	0,70	-	0,016	0,90	-	-0,158	0,59	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,109	0,56	-	0,036	0,77	-	-0,264	0,36	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,161	0,34	-	-0,106	0,39	-	-0,509	0,06	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,457	0,01	1,00	0,458	0,000	1,46	0,773	0,003	3,98
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,377	0,04	0,46	0,338	0,005	0,58	0,727	0,003	3,21
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,281	0,13	-	0,110	0,37	-	-0,323	0,26	-

*r* = coeficiente de correlación de Pearson; *p* = significación de la correlación; *m* = pendiente de la recta de regresión. Post-QT (n=31); post-TAMO (n=68); control, n=14.

NK, "natural killer"; E:D, efector:diana; QT, quimioterapia; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea.



**TABLA 10**

CORRELACION ENTRE LOS PORCENTAJES DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN SP Y LA ACTIVIDAD LAK ESPONTANEA SOBRE RAJI A PROPORCIÓN E:D DE 80:1

SUBPOBLACIONES	POST-QT			POST-TAMO			CONTROL		
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>
CD3 <sup>+</sup>	-0,307	0,09	-	-0,296	0,03	-0,50	-0,259	0,371	-
CD4 <sup>+</sup>	-0,169	0,36	-	-0,007	0,96	-	0,126	0,667	-
CD8 <sup>+</sup>	0,167	0,37	-	-0,185	0,18	-	0,235	0,419	-
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	-0,196	0,29	-	0,066	0,64	-	-0,101	0,730	-
TCRαβ <sup>+</sup>	-0,330	0,07	-	-0,336	0,01	-0,59	-0,080	0,785	-
TCR γδ <sup>+</sup>	-0,025	0,89	-	-0,110	0,44	-	-0,258	0,374	-
CD2 <sup>+</sup>	0,022	0,91	-	0,024	0,82	-	0,177	0,544	-
CD16 <sup>+</sup>	0,190	0,30	-	0,442	0,001	0,52	0,140	0,632	-
CD56 <sup>+</sup>	0,359	0,05	0,28	0,424	0,002	0,55	-0,028	0,924	-
CD57 <sup>+</sup>	0,179	0,33	-	0,083	0,56	-	-0,214	0,462	-
CD25 <sup>+</sup>	-0,056	0,76	-	0,061	0,66	-	-0,420	0,135	-
CD69 <sup>+</sup>	0,173	0,35	-	0,015	0,92	-	-0,321	0,263	-
HLA-DR <sup>+</sup>	0,071	0,70	-	0,017	0,90	-	-0,208	0,475	-
HLA-DQ <sup>+</sup>	0,046	0,80	-	0,061	0,66	-	-0,612	0,019	-0,24
CD19 <sup>+</sup>	-0,009	0,96	-	0,001	0,99	-	-0,472	0,088	-
CD20 <sup>+</sup>	-0,004	0,98	-	-0,041	0,77	-	-0,666	0,009	-0,18
sIgκ <sup>+</sup>	-0,089	0,63	-	0,068	0,63	-	-0,404	0,152	-
sIgλ <sup>+</sup>	-0,126	0,50	-	0,006	0,97	-	-0,348	0,223	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,059	0,75	-	-0,287	0,04	-0,46	-0,026	0,931	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,620	0,000	1,36	0,377	0,005	0,18	0,531	0,051	-
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,010	0,96	-	0,034	0,81	-	-0,329	0,251	-
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,270	0,14	-	0,497	0,000	0,49	0,391	0,167	-
CD4 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,093	0,62	-	0,122	0,38	-	-0,178	0,543	-
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,178	0,34	-	0,167	0,23	-	0,083	0,778	-
TCRαβ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,003	0,99	-	-0,134	0,34	-	-0,283	0,326	-
TCR γδ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,046	0,80	-	-0,073	0,61	-	-0,290	0,314	-
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,119	0,52	-	0,105	0,45	-	-0,430	0,125	-
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,614	0,000	0,67	0,441	0,001	0,43	0,469	0,09	-
CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,184	0,32	-	-0,033	0,81	-	-0,062	0,83	-
CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,297	0,10	-	0,321	0,02	0,14	-0,044	0,88	-

**TABLA 10 (CONTINUACION)**

SUBPOBLACIONES	POST-QT			POST-TAMO			CONTROL		
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>
TCRαβ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,174	0,35	-	-0,100	0,47	-	-0,444	0,11	-
TCR γδ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,027	0,89	-	0,151	0,28	-	-0,214	0,44	-
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,017	0,93	-	-0,069	0,63	-	-0,288	0,32	-
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,466	0,008	0,87	0,412	0,002	0,22	0,131	0,66	-
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	-0,011	0,95	-	0,286	0,04	-	0,058	0,84	-
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,096	0,61	-	-0,120	0,39	-	-0,071	0,56	-
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,149	0,42	-	0,358	0,009	0,31	0,281	0,33	-
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,198	0,28	-	0,367	0,007	0,26	0,097	0,74	-
CD56 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,277	0,13	-	0,423	0,002	0,23	-0,036	0,90	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,165	0,37	-	0,046	0,74	-	-0,312	0,28	-
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,209	0,26	-	0,268	0,05	-	0,290	0,31	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,174	0,35	-	0,468	0,000	0,35	0,417	0,15	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,468	0,008	0,67	0,398	0,003	0,27	0,495	0,07	-
SUBPOBLACIONES DEDUCIDAS									
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,073	0,70	-	-0,062	0,66	-	-0,178	0,54	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,033	0,86	-	0,157	0,26	-	-0,031	0,25	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,448	0,01	2,12	0,430	0,001	0,14	0,309	0,28	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,174	0,35	-	0,468	0,000	0,35	0,417	0,14	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,002	0,99	-	0,147	0,29	-	-0,228	0,44	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,134	0,47	-	-0,075	0,59	-	-0,062	0,83	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,003	0,98	-	-0,038	0,78	-	-0,303	0,29	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,607	0,000	1,57	0,427	0,001	0,16	0,394	0,16	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,468	0,008	0,67	0,398	0,003	0,27	0,495	0,07	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,267	0,15	-	0,206	0,14	-	-0,340	0,23	-

*r* = coeficiente de correlación de Pearson; *p* = significación de la correlación; *m* = pendiente de la recta de regresión. Post-QT (n=31); post-TAMO (n=53); control (n=14).

LAK, "lymphokine-activated killer"; E:D, efector:diana; QT, quimioterapia; TAMO, trasplante autólogo de médula ósea.

#### 4.4. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LOS CULTIVOS CON IL-2

Las CMN de SP fueron cultivadas a una concentración de  $10^6 \text{ ml}^{-1}$  sin o con IL-2. Tras 3 días de cultivo, los recuentos celulares registrados fueron ( $\times 10^6 \text{ ml}$ ):  $0,63 \pm 0,21$  en el cultivo sin IL-2 y  $0,64 \pm 0,23$  en el cultivo con IL-2 para el grupo post-QT,  $0,85 \pm 0,28$  y  $0,77 \pm 0,29$ , respectivamente, para el grupo control, y  $0,90 \pm 0,62$  en el cultivo con IL-2 para el grupo post-TAMO.

En los grupos post-QT y control se midieron los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias después de los cultivos (tabla 11). No se observó ninguna correlación entre los porcentajes de las subpoblaciones en los cultivos y los porcentajes de actividad lítica sobre las líneas celulares K562 y Raji.

Parte de la fracción linfocitaria estaba desplazada hacia un aumento de tamaño (FSC) y complejidad intracelular (SSC) después del cultivo con IL-2 (figura 6).

Se observaron incrementos porcentuales significativos en los cultivos sin IL-2 respecto de los valores iniciales (tabla 8) para las subpoblaciones  $\text{CD3}^+$  ( $p=0,0005$ ),  $\text{CD4}^+$  ( $p=0,0006$ ) y  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  ( $p=0,02$ ) en el grupo post-QT y  $\text{CD3}^+$  ( $p=0,008$ ),  $\text{CD4}^+$  ( $p=0,0003$ ),  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  ( $p=0,01$ ),  $\text{CD69}^+$  ( $p=0,04$ ),  $\text{HLA-DR}^+$  ( $p=0,01$ ),  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  ( $p=0,008$ ) y las subpoblaciones deducidas  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-\text{CD56}^+$  ( $p=0,03$ ) y  $\text{CD3}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^+\text{CD56}^+$  ( $p=0,05$ ) en el grupo control.

Se observaron reducciones porcentuales significativas en los cultivos sin IL-2 para las subpoblaciones  $\text{CD16}^+$  ( $p=0,05$ ),  $\text{HLA-DR}^+$  ( $p=0,004$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD16}^+$  ( $p=0,003$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$  ( $p=0,002$ ),  $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  ( $p=0,01$ ) y las subpoblaciones con fenotipo deducido  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^+\text{CD16}^+$  ( $p=0,03$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD16}^+$  ( $p=0,004$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^+\text{CD56}^+$  ( $p=0,02$ ) y  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD56}^+$  ( $p=0,002$ ) en el grupo post-QT, y para  $\text{CD3}^-\text{CD8}^+$  ( $p=0,0009$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD16}^+$  ( $p=0,03$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$  ( $p=0,01$ ) y las subpoblaciones deducidas  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^+\text{CD16}^+$  ( $p=0,006$ ),  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^+\text{CD56}^+$  ( $p=0,003$ ) y  $\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD56}^+$  ( $p=0,04$ ) en el grupo control.

Se observaron incrementos porcentuales significativos en los cultivos con IL-2 respecto

de los valores iniciales para las siguientes subpoblaciones en los grupos post-QT y control: CD3<sup>+</sup> ( $p=0,0003$  y  $p=0,0000$ , respectivamente), CD4<sup>+</sup> ( $p=0,007$  y  $p=0,0000$ ), CD8<sup>+</sup> ( $p=0,004$  y  $p=0,0001$ ), TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> ( $p=0,003$  y  $p=0,004$ ), CD2<sup>+</sup> ( $p=0,0002$  y  $p=0,03$ ), CD25<sup>+</sup> ( $p=0,0001$  y  $p=0,004$ ), CD69<sup>+</sup> ( $p=0,0000$  y  $p=0,0001$ ), HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,003$  y  $p=0,0006$ ), HLA-DQ<sup>+</sup> ( $p=0,0000$  y  $p=0,002$ ), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,005$  y  $p=0,003$ ), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,002$  y  $p=0,05$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,02$  y  $p=0,02$ ). Además, en el grupo control fueron significativos los aumentos de las subpoblaciones deducidas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ).

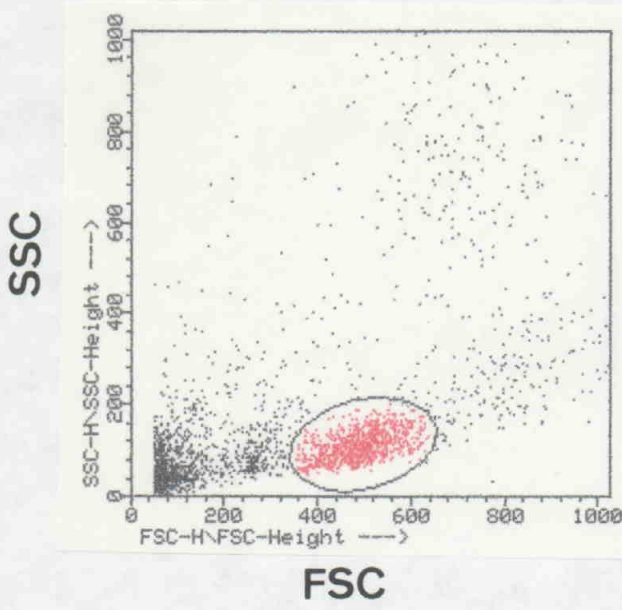
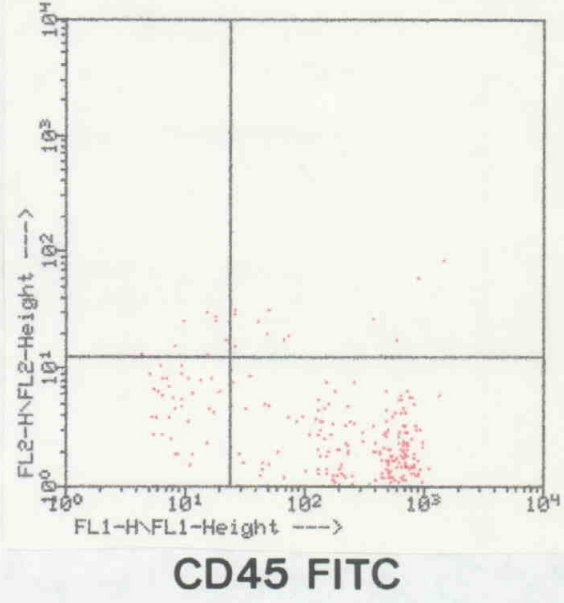
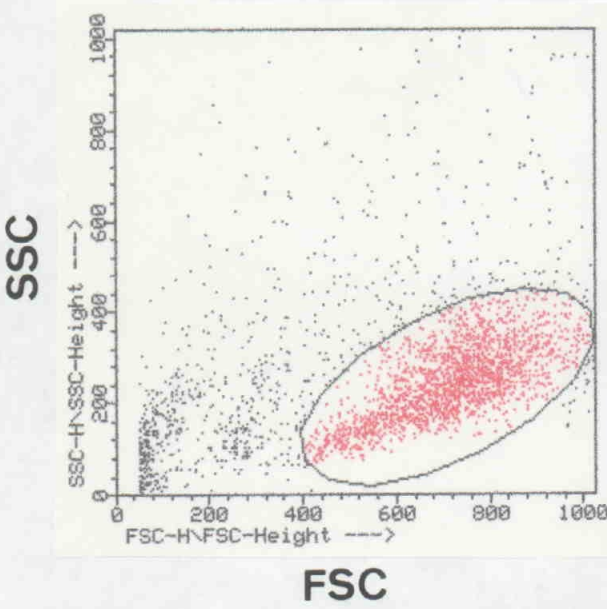
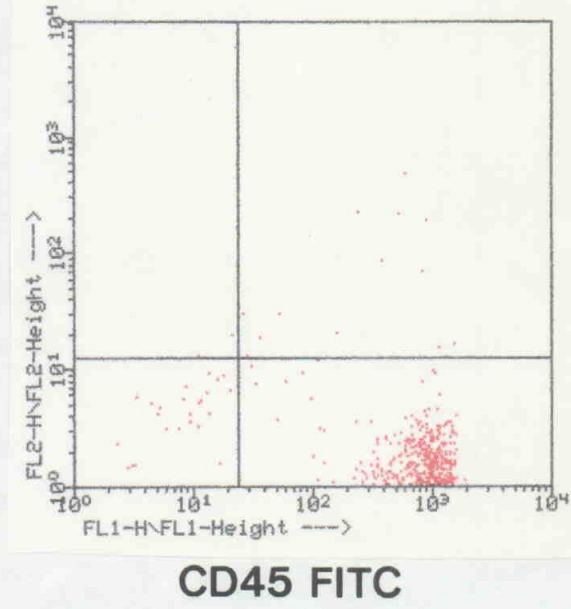
Se observaron reducciones porcentuales significativas en los cultivos con IL-2 para las subpoblaciones CD16<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,009$ ), CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,008$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ) en el grupo post-QT, y para CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,005$ ), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,002$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,001$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ) en el grupo control.

El análisis conjunto de estos resultados nos muestra la existencia de aumentos porcentuales de las subpoblaciones CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, HLA-DQ<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en los cultivos con IL-2 respecto de los valores iniciales y de los obtenidos tras cultivo sin IL-2. Hemos analizado si existían diferencias en los porcentajes de estas subpoblaciones en los pacientes del grupo post-QT en relación a los niveles de citotoxicidad sobre las líneas celulares K562 y Raji. Para este análisis, dividimos el grupo post-QT en dos subgrupos:

A) 10 pacientes que consiguieron niveles inferiores o iguales al 40% de lisis sobre K562 y Raji a proporción E:D de 80:1.

B) 19 pacientes que superaron el 40% de lisis.

En el grupo A los niveles estuvieron disminuidos respecto del grupo B para los marcadores CD25<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD69<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ) y HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ) (figura 7).

**A****CD14 PE****B****CD14 PE**

**Figura 6.** Representación ortogonal del tamaño (FSC) frente a la complejidad intracelular (SSC) antes (A) y después (B) de cultivar con IL-2.

TABLA 11

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LOS CULTIVOS SIN Y CON IL-2 DE LAS  
CMN DE SP EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA POST-QT

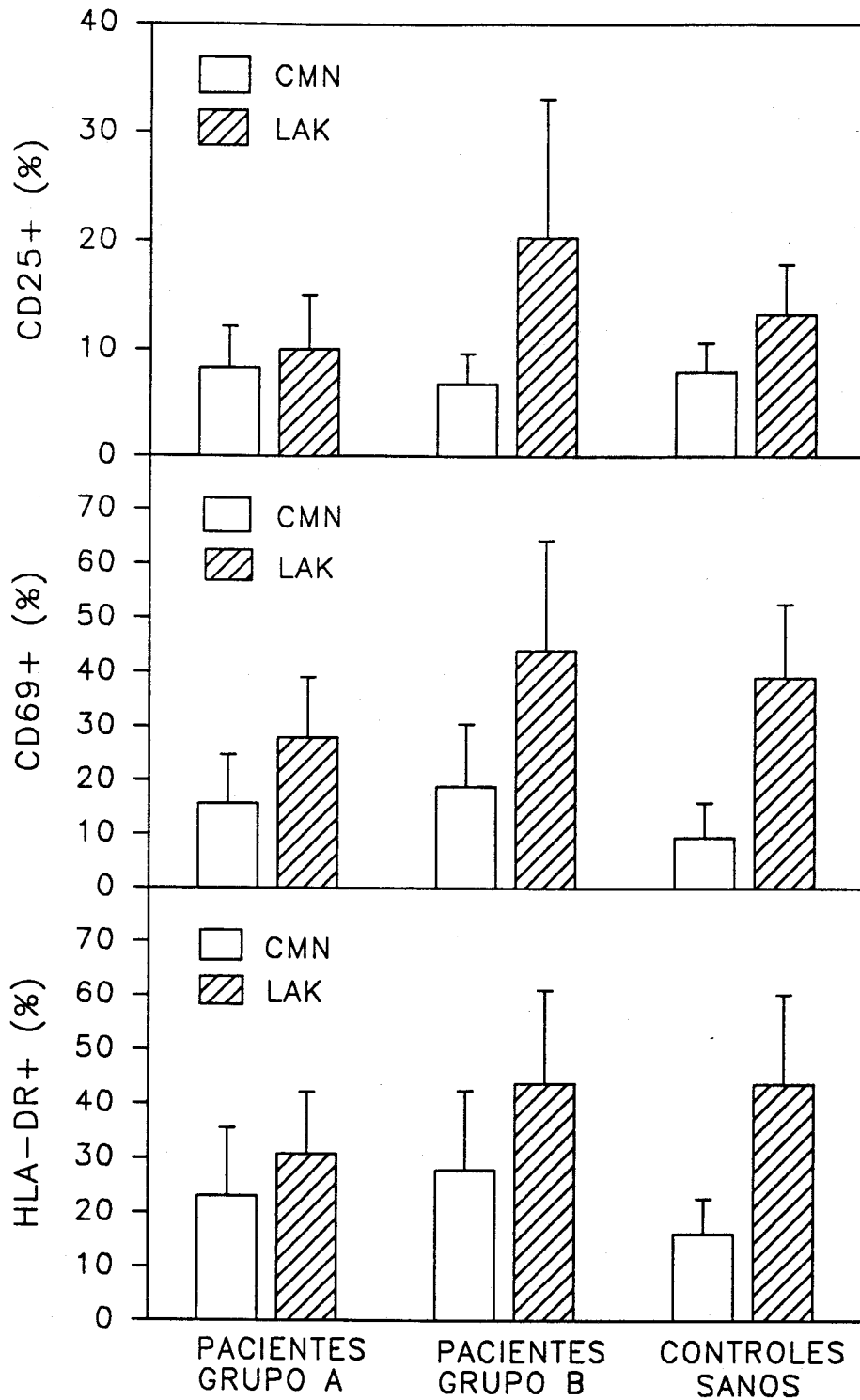
SUBPOBLACIONES	PACIENTES		CONTROLES	
	-IL-2	+IL-2	-IL-2	+IL-2
CD3 <sup>+</sup>	87,5±10,5	87,3±10,5	86,4±10,2	86,1±5,1
CD4 <sup>+</sup>	48,3±15,5	45,1±14,9	49,3±4,4	51,6±7,4
CD8 <sup>+</sup>	32,7±13,4	41,5±14,3	36,1±6,5	39,8±8,7
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,94±1,59	1,38±1,13	1,41±0,29	1,37±0,41
TCRαβ <sup>+</sup>	77,2±13,5	78,1±11,3	79,7±10,6	78,7±6,0
TCRγδ <sup>+</sup>	10,1±9,7	12,3±6,3	5,2±3,1	5,6±2,5
CD2 <sup>+</sup>	88,7±11,1	93,2±5,3	88,8±7,0	89,6±4,8
CD16 <sup>+</sup>	15,1±9,9	17,1±8,8	18,3±7,6	19,4±8,2
CD56 <sup>+</sup>	24,6±11,1	30,9±13,3	29,1±11,6	29,4±10,2
CD57 <sup>+</sup>	19,8±12,8	26,1±13,3	21,7±9,3	22,8±10,7
CD25 <sup>+</sup>	6,6±4,2	16,8±11,8	7,4±3,1	13,3±4,6
CD69 <sup>+</sup>	16,1±8,8	38,4±19,2	21,1±12,2	38,9±13,6
HLA-DR <sup>+</sup>	19,7±10,0	39,3±16,5	28,2±7,6	43,7±16,5
HLA-DQ <sup>+</sup>	5,7±4,0	16,3±11,5	7,7±3,6	13,8±4,9
CD19 <sup>+</sup>	3,5±3,9	3,9±2,9	5,6±3,1	6,0±2,7
CD20 <sup>+</sup>	5,0±3,9	4,8±3,9	6,8±2,8	6,3±2,9
sIgκ <sup>+</sup>	1,1±1,7	1,2±1,5	1,7±1,7	1,9±1,9
sIgλ <sup>+</sup>	0,6±1,1	0,6±0,9	1,1±0,9	1,8±1,4
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	29,5±13,6	37,1±14,9	32,7±6,2	34,9±7,0
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	3,2±4,3	4,2±4,1	3,4±2,6	4,9±2,7
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	10,9±9,1	12,0±7,2	11,6±9,2	12,6±7,2
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	4,6±3,8	5,1±5,4	6,8±5,6	6,9±2,6
CD4 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	4,1±2,8	4,1±2,9	4,1±3,1	4,6±3,1
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	5,5±3,9	7,3±4,6	6,9±2,5	8,2±4,1
TCRαβ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	8,4±5,1	10,2±6,9	9,0±7,7	10,0±6,7
TCRγδ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	4,2±7,8	4,0±3,1	1,8±1,6	2,6±0,9
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	17,8±8,3	22,7±12,2	22,8±14,9	21,8±10,7
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>	5,4±5,1	8,3±7,2	6,3±5,6	7,7±3,5
CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,5±3,2	8,4±5,4	8,9±7,4	8,1±5,6

**TABLA 11 (CONTINUACION)**

SUBPOBLACIONES	PACIENTES		CONTROLES	
	-IL-2	+IL-2	-IL-2	+IL-2
CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	10,8±7,3	15,3±10,1	12,0±3,3	13,8±4,5
TCRαβ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	15,9±7,9	19,9±11,2	19,8±13,3	18,2±10,2
TCRγδ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	4,8±4,9	6,1±4,5	2,4±1,9	3,1±1,6
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	16,4±12,6	21,9±12,4	16,1±9,1	18,2±11,4
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	3,4±4,4	4,2±5,1	5,6±4,7	4,6±1,3
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	4,0±2,8	6,0±4,6	3,1±1,4	5,0±2,5
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	11,2±8,7	16,9±11,9	16,2±8,5	18,3±11,1
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,4±5,0	12,4±7,5	13,7±5,8	13,1±5,6
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	5,6±7,2	7,7±6,0	8,3±4,0	7,9±3,3
CD56 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	7,6±5,2	11,6±8,4	10,1±3,9	11,2±3,0
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	11,8±5,3	10,7±7,5	6,9±5,8	5,6±3,0
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	2,6±3,0	5,7±4,9	2,0±1,5	3,4±2,6
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,7±2,0	3,3±3,7	3,9±3,8	3,7±1,4
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	3,2±2,8	4,9±4,5	3,4±3,8	4,2±2,2
<b>SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS</b>				
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	4,0±2,8	3,9±2,8	4,1±3,1	4,6±3,1
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	3,6±3,5	5,3±4,9	4,1±3,0	5,0±3,9
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	1,8±2,3	1,9±1,8	2,9±2,6	3,2±1,6
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,7±2,0	3,3±3,7	3,9±3,8	3,7±1,4
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,8±6,0	2,6±2,7	3,3±3,7	2,8±2,6
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,5±3,2	7,1±4,3	8,9±7,4	8,1±5,6
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,2±7,0	10,8±9,5	9,2±5,4	10,3±4,4
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,2±2,7	3,3±3,2	2,9±2,7	3,4±1,5
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	3,2±2,8	4,9±4,5	3,4±3,8	4,2±2,2
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	4,1±3,9	3,6±4,4	4,7±4,4	3,4±2,8

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar. Pacientes (n=29); controles (n=9).

CMN, células mononucleares; SP, sangre periférica; QT, quimioterapia; -IL-2, subpoblaciones en cultivo de las CMN sin interleucina-2; +IL-2, subpoblaciones en cultivo de las CMN con interleucina-2.



**Figura 7.** Porcentajes medios y desviación estándar de las subpoblaciones linfocitarias CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup> en los pacientes del grupo post-quimioterapia que consiguieron actividad LAK baja (grupo A) o normal (grupo B) y en los individuos sanos antes y después de cultivar con IL-2. CMN, células mononucleares; LAK, CMN cultivadas durante 3 días con IL-2.



## 4.5. EVOLUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LA RECUPERACIÓN HEMATOLÓGICA POST-TAMO

### 4.5.1. Valores relativos de las subpoblaciones linfocitarias

#### 4.5.1.1. Evolución de la serie linfoide T

La subpoblación CD3<sup>+</sup> recuperó los porcentajes pre-TAMO y normales (tabla 8) en el primer mes post-TAMO (77,0±16,8). Los porcentajes medios disminuyeron a partir del segundo mes (65,8±19,0; significativamente menor que los normales con  $p=0,04$ ) y evolucionó con porcentajes bajos durante los dos años del seguimiento, alcanzando un mínimo en el mes undécimo (40,5±8,1;  $p=0,0000$ ). En el cuarto trimestre del segundo año (63,7±8,2;  $p=0,007$ ) inició un ascenso hacia porcentajes normales (figura 8).

La subpoblación CD4<sup>+</sup> sufrió una evolución parecida: alcanzó los porcentajes pretransplante, aunque no los normales, en el primer mes post-TAMO (32,7±22,4), disminuyó a partir del segundo mes (16,9±8,9;  $p=0,04$ ) y registró porcentajes bajos durante los dos años, alcanzando un mínimo el octavo mes (12,3±3,5;  $p=0,0000$ ). En el cuarto trimestre del segundo año (31,1±10,0;  $p=0,003$ ) inició un ascenso hacia los porcentajes pretransplante, aunque no alcanzó porcentajes normales en todo el periodo de estudio (figura 8).

La subpoblación CD8<sup>+</sup> estuvo por encima de los porcentajes normales y pre-TAMO en el primer mes post-TAMO (42,2±21,4;  $p=0,01$ ) y continuó elevada durante los siete primeros meses post-TAMO. Posteriormente registró porcentajes normales (figura 8).

El cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> estuvo invertido (<1,00) desde el segundo mes post-TAMO (0,49±0,43;  $p=0,0000$ ) hasta el tercer trimestre del segundo año (1,87±2,34), alcanzando un mínimo al sexto mes (0,45±0,19;  $p=0,0000$ ).

La subpoblación TCRαβ<sup>+</sup> alcanzó los porcentajes pretransplante y normales en el primer mes post-TAMO (67,3±18,0). Sufrió una disminución gradual y tuvo porcentajes bajos desde el tercer mes (52,3±19,1;  $p=0,001$ ) los dos años, alcanzando un mínimo en el noveno mes (35,0±21,0;  $p=0,0000$ ). En el cuarto trimestre del segundo año (61,2±11,3;  $p=0,03$ ) inició un ascenso hacia porcentajes normales. La subpoblación TCRγδ<sup>+</sup> no experimentó cambios

notables durante la recuperación hematológica.

La subpoblación CD2<sup>+</sup> registró porcentajes normales el primer mes post-TAMO (87,1±13,8) y sufrió una progresiva disminución significativa desde el tercer mes (70,0±14,7;  $p=0,0008$ ) hasta alcanzar un mínimo el octavo mes (55,0±18,4;  $p=0,0001$ ). En el cuarto trimestre del segundo año experimentaron un ascenso aunque sin alcanzar porcentajes normales (69,2±6,0;  $p=0,0000$ ).

Las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no exhibieron diferencias significativas respecto de los valores normales durante el post-TAMO.

#### 4.5.1.2. Evolución de la serie linfocítica B

En el primer mes post-TAMO estuvieron significativamente bajos los porcentajes de los marcadores CD20<sup>+</sup> (3,4±3,4;  $p=0,004$ ) y sIgκ<sup>+</sup> (1,5±2,7;  $p=0,02$ ).

A partir del segundo mes todos los marcadores asociados a la serie B sufrieron un incremento gradual que los situó por encima de los porcentajes normales desde el tercer mes post-TAMO para sIgκ<sup>+</sup> (7,1±5,8;  $p=0,02$ ) y sIgλ<sup>+</sup> (4,4±3,6;  $p=0,03$ ) y desde el cuarto mes para CD19<sup>+</sup> (13,4±9,2;  $p=0,02$ ) y CD20<sup>+</sup> (13,6±6,9;  $p=0,0006$ ). Esta elevación continuó hasta alcanzar sus porcentajes máximos: CD19<sup>+</sup> (26,7±11,1;  $p=0,0000$ ) y sIgκ<sup>+</sup> (21,0±13,97;  $p=0,0000$ ) en el tercer trimestre del segundo año, CD20<sup>+</sup> (20,6±13,4;  $p=0,0002$ ) en el segundo trimestre del segundo año y sIgλ<sup>+</sup> (14,6±3,5;  $p=0,0000$ ) en el cuarto trimestre del segundo año (figura 9).

#### 4.5.1.3. Evolución de los marcadores asociados a las células NK

La subpoblación CD16<sup>+</sup> tuvo porcentajes moderadamente elevados desde el segundo mes post-TAMO (23,2±8,9;  $p=0,01$ ) hasta el primer trimestre del segundo año post-TAMO (24,8±12,5;  $p=0,02$ ) y a partir de aquí se normalizó (15,1±9,7). Obtuvo su máximo el tercer mes post-TAMO (28,1±15,5;  $p=0,005$ ) (figura 10).

La subpoblación CD56<sup>+</sup> alcanzó porcentajes normales el primer mes post-TAMO (28,6±16,8) y continuó normal durante la mayor parte del seguimiento, aunque sufrió una elevación significativa a los 3 meses (34,7±16,2;  $p=0,02$ ) (figura 10).

La subpoblación CD57<sup>+</sup> tuvo porcentajes aumentados desde el segundo mes (39,0±19,3;  $p=0,0008$ ) en que registró un máximo hasta el primer trimestre del segundo año post-TAMO (36,4±19,2;  $p=0,004$ ) (figura 10).

Nosotros hemos correlacionado la actividad NK con las subpoblaciones linfocitarias CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> en el post-TAMO, según expusimos en el apartado 4.3. Los porcentajes de la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no difirieron de los normales, alcanzando un máximo el quinto mes (10,3±8,3). La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> estuvo con porcentajes normales salvo el sexto mes en que alcanzó un máximo significativo (16,2±9,8;  $p=0,04$ ) (figura 11). La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> también estuvo con porcentajes normales salvo el tercer mes en que alcanzó un máximo (19,7±13,9;  $p=0,05$ ) (figura 11). La subpoblación CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sufrió una evolución paralela a la anterior con un máximo al tercer mes (20,9±14,1;  $p=0,03$ ) (figura 11). La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> mantuvo porcentajes normales durante todo el post-TAMO.

Dentro de las subpoblaciones anteriores, hemos analizado la evolución de las subpoblaciones con fenotipo deducido que habíamos correlacionado con la actividad NK. La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> no sufrió cambios significativos en sus porcentajes durante la recuperación hematológica. La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> estuvo ligeramente elevada desde el sexto mes (11,8±9,0;  $p=0,01$ ) hasta el primer trimestre del segundo año (11,3±11,2;  $p=0,02$ ), normalizándose después (6,6±5,5), y alcanzó un máximo el mes décimosegundo (12,4±8,6;  $p=0,005$ ) (figura 12). La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> no experimentó cambios significativos, y sus porcentajes más altos se registraron el tercer mes post-TAMO (8,6±8,2) (figura 12). La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> estuvo elevada los meses tercero (11,1±7,2;  $p=0,04$ ), sexto (12,9±8,5;  $p=0,01$ ), noveno (13,6±11,6;  $p=0,04$ ), undécimo (12,7±5,8;  $p=0,02$ ) y duodécimo (13,8±10,8;  $p=0,03$ ), en que alcanzaron sus máximos porcentajes, normalizándose después (10,7±11,1) (figura 12).

#### 4.5.1.4. Evolución de los marcadores de activación linfocitaria

Las subpoblaciones CD25<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup> no experimentaron variaciones porcentuales significativas. En cambio, las subpoblaciones que expresan HLA de clase II estuvieron muy elevadas durante todo el periodo de seguimiento. La subpoblación HLA-DR<sup>+</sup> registró el primer mes un porcentaje medio de  $31,0 \pm 22,2$  ( $p=0,01$ ) y el último trimestre del segundo año de  $34,5 \pm 6,4$  ( $p=0,0000$ ), alcanzando un máximo el quinto mes ( $56,8 \pm 12,2$ ;  $p=0,0000$ ). La subpoblación HLA-DQ<sup>+</sup> registró el segundo mes post-TAMO un porcentaje medio de  $12,5 \pm 10,5$  ( $p=0,01$ ) y el último trimestre del segundo año de  $17,5 \pm 8,0$  ( $p=0,0000$ ), alcanzando su máximo el undécimo mes ( $28,0 \pm 7,3$ ;  $p=0,0000$ ) (figura 13).

#### 4.5.2. Valores absolutos de las subpoblaciones linfocitarias

Los recuentos linfocitarios ( $\times 10^6$  ml) estuvieron descendidos entre el primer mes ( $0,59 \pm 0,67$ ,  $p=0,0000$ ) y el cuarto mes post-TAMO ( $1,10 \pm 0,57$ ,  $p=0,005$ ). A partir del quinto mes ( $1,94 \pm 1,11$ ) los recuentos fueron normales en promedio ( $2,30 \pm 1,10$ ) (figura 14A).

La subpoblación CD3<sup>+</sup> estuvo descendida respecto de los recuentos pretrasplante ( $1,03 \pm 0,62$ ) durante los meses 1-4, 6 y 9-11, y sólo se aproximaron a los recuentos normales ( $1,6 \pm 0,2$ ) el tercer trimestre del segundo año ( $1,34 \pm 0,72$ ). La subpoblación CD4<sup>+</sup> estuvo muy descendida durante todo el post-TAMO; recuperó los recuentos pretrasplante ( $0,43 \pm 0,35$ ) el segundo trimestre del segundo año ( $0,47 \pm 0,25$ ) pero no los normales ( $0,96 \pm 0,22$ ). La subpoblación CD8<sup>+</sup> alcanzó recuentos normales ( $0,57 \pm 0,19$ ) y pre-TAMO ( $0,47 \pm 0,30$ ) a partir del cuarto mes ( $0,43 \pm 0,39$ ) y registró un máximo al quinto mes ( $0,91 \pm 0,72$ ,  $p=0,08$ ) (figura 14B).

Las subpoblaciones CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, sIgκ<sup>+</sup> y sIgλ<sup>+</sup> alcanzaron los recuentos normales ( $0,15 \pm 0,09$ ,  $0,14 \pm 0,05$ ,  $0,07 \pm 0,04$  y  $0,05 \pm 0,03$ , respectivamente) y pretrasplante ( $0,15 \pm 0,15$ ,  $0,12 \pm 0,10$ ,  $0,09 \pm 0,08$  y  $0,05 \pm 0,04$ , respectivamente) al tercer mes post-TAMO ( $0,14 \pm 0,24$ ,  $0,12 \pm 0,19$ ,  $0,08 \pm 0,11$  y  $0,05 \pm 0,07$ , respectivamente). Sufrieron un incremento progresivo a partir del quinto mes ( $0,34 \pm 0,32$ ,  $p=0,03$ ;  $0,32 \pm 0,31$ ,  $p=0,02$ ;  $0,19 \pm 0,16$ ,  $p=0,005$ ;  $0,14 \pm 0,14$ ,  $p=0,01$ , respectivamente) hasta alcanzar máximos al tercer trimestre (CD19<sup>+</sup>,  $0,69 \pm 0,49$ ,

$p=0,0001$ ;  $CD20^+$ ,  $0,56\pm 0,25$ ,  $p=0,0000$ ;  $sIg\kappa^+$ ,  $0,53\pm 0,52$ ,  $p=0,0008$ ) o al cuarto trimestre del segundo año ( $sIg\lambda^+$ ,  $0,26\pm 0,21$ ,  $p=0,0003$ ) (figura 14C).

La subpoblación  $CD16^+$  alcanzó los recuentos normales ( $0,37\pm 0,14$ ) al tercer mes ( $0,31\pm 0,34$ ) y obtuvo un máximo al noveno mes ( $0,51\pm 0,42$ ). La subpoblación  $CD56^+$  superó los recuentos pretrasplante ( $0,29\pm 0,15$ ) al tercer mes ( $0,35\pm 0,32$ ) y registró recuentos próximos a los normales ( $0,55\pm 0,18$ ) a partir del quinto mes ( $0,37\pm 0,17$ ,  $p=0,02$ ), alcanzando un máximo al mes duodécimo ( $0,45\pm 0,17$ ). La subpoblación  $CD57^+$  recuperó rápidamente recuentos normales ( $0,44\pm 0,22$ ): el segundo mes registró  $0,35\pm 0,28$  y obtuvo un máximo el quinto mes ( $0,65\pm 0,55$ ) (figura 15A).

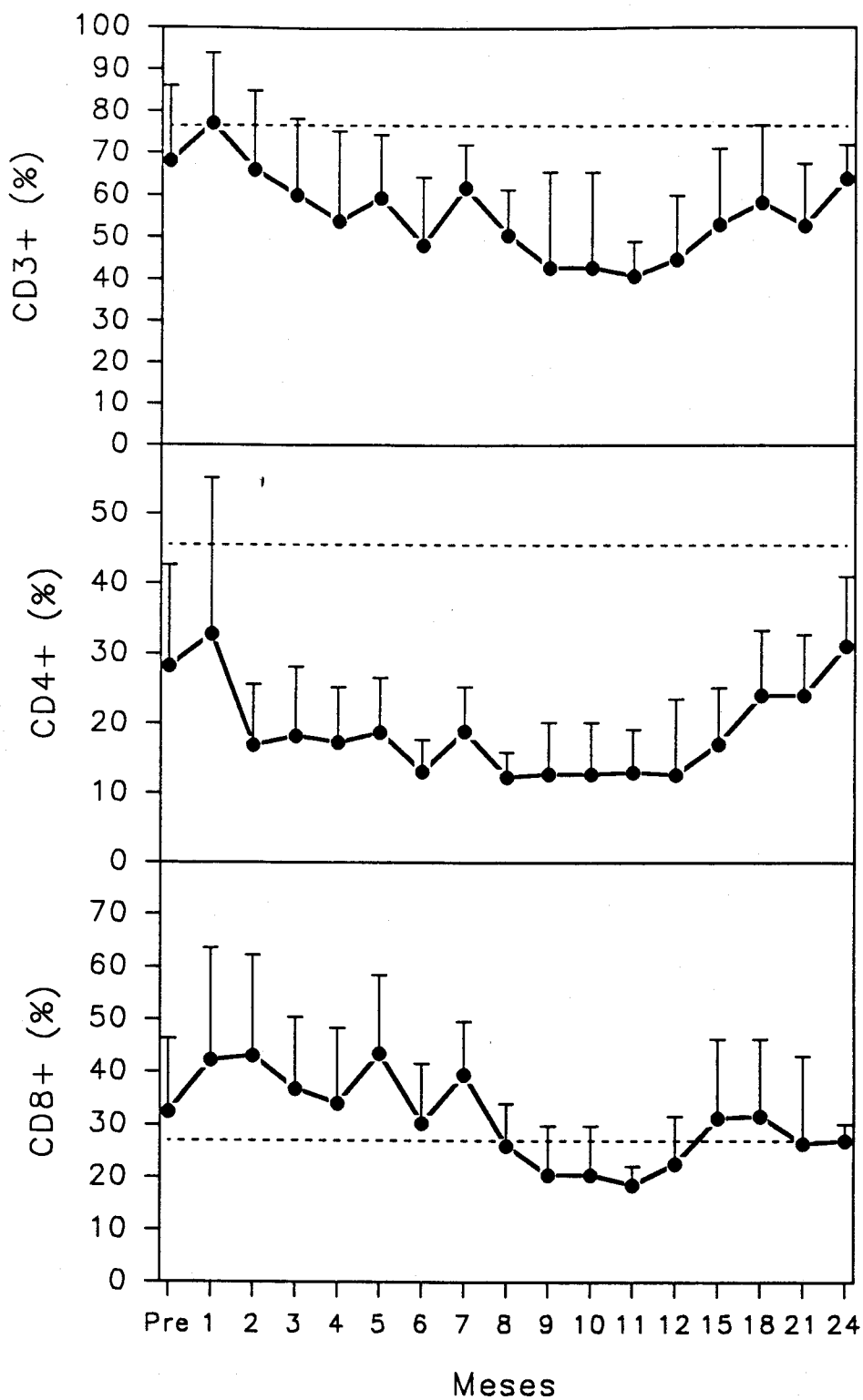
Las subpoblaciones  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD56^+$  y  $CD16^+CD56^+$  alcanzaron recuentos similares a los pretrasplante ( $0,06\pm 0,05$ ,  $0,10\pm 0,06$ ,  $0,13\pm 0,08$ , respectivamente) al segundo mes post-TAMO ( $0,08\pm 0,09$ ,  $0,12\pm 0,12$ ,  $0,13\pm 0,12$  y  $0,13\pm 0,11$ , respectivamente), y se elevaron progresivamente hasta alcanzar recuentos normales ( $0,14\pm 0,07$ ,  $0,23\pm 0,13$ ,  $0,28\pm 0,15$  y  $0,30\pm 0,12$ , respectivamente) al quinto mes ( $0,19\pm 0,12$ , máximo recuento intermensual para  $CD3^+CD8^+$ ,  $0,26\pm 0,18$ ,  $0,27\pm 0,20$  y  $0,24\pm 0,16$ , respectivamente), y máximos al noveno ( $CD3^+CD16^+$ ,  $0,34\pm 0,44$  y  $CD3^+CD56^+$ ,  $0,36\pm 0,42$ ) o al duodécimo mes ( $CD16^+CD56^+$ ,  $0,33\pm 0,19$ ) (figura 15B).

La subpoblaciones deducidas  $CD3^+CD4^+CD8^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD8^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$  y  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$  experimentaron una evolución similar: alcanzaron los recuentos pretrasplante hacia el segundo mes y los normales ( $0,11\pm 0,06$ ,  $0,13\pm 0,08$ ,  $0,12\pm 0,07$  y  $0,16\pm 0,09$ , respectivamente) hacia el quinto mes ( $0,11\pm 0,08$ , máximo intermensual,  $0,15\pm 0,11$ ,  $0,14\pm 0,11$ , máximo intermensual, y  $0,13\pm 0,10$ , respectivamente). La subpoblación  $CD3^+CD4^+CD8^+CD16^+$  y  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$  alcanzaron máximos al noveno mes ( $0,27\pm 0,36$  y  $0,27\pm 0,32$ , respectivamente).

Las subpoblaciones  $HLA-DR^+$  y  $HLA-DQ^+$  tuvieron recuentos incrementados respecto de los valores normales ( $0,37\pm 0,15$  y  $0,13\pm 0,08$ , respectivamente) durante todo el post-TAMO a partir del segundo ( $HLA-DR^+$ ,  $0,44\pm 0,36$ ) y el cuarto mes ( $HLA-DQ^+$ ,  $0,19\pm 0,10$ ), alcanzando máximos el tercer trimestre del segundo año ( $HLA-DR^+$ ,  $1,36\pm 0,79$ ,  $p=0,0000$ ) y el duodécimo mes ( $HLA-DQ^+$ ,  $0,58\pm 0,67$ ,  $p=0,007$ ) (figura 15C).

#### **4.5.3. Relación entre la evolución de las subpoblaciones linfocitarias y la evolución clínica de los pacientes**

De los 5 pacientes que sufrieron recidiva, los 3 que recayeron a los 4 y 5 meses (2 LLA y 1 LMA) registraron porcentajes bajos de las subpoblaciones que hemos correlacionado con la actividad NK durante todo el post-TAMO. El paciente con LMA que recayó a los 12 meses tuvo estas subpoblaciones altas durante la mayor parte de su evolución, pero el estudio realizado 15 días antes de observarse la recaída mostró un descenso de las mismas por debajo de los valores normales. La paciente con LLA que recayó a los 7 meses tuvo elevadas estas subpoblaciones en porcentajes durante los 3 primeros meses, descendieron en el sexto mes pero estuvieron elevadas nuevamente 10 días antes de observarse la recaída; sin embargo, esta paciente tuvo recuentos linfocitarios disminuidos durante toda su evolución, y en valores absolutos las subpoblaciones NK estuvieron disminuidas durante todo el post-TAMO.



**Figura 8.** Evolución relativa de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes post-trasplante autólogo de médula ósea. La línea horizontal discontinua indica el porcentaje medio para individuos sanos.

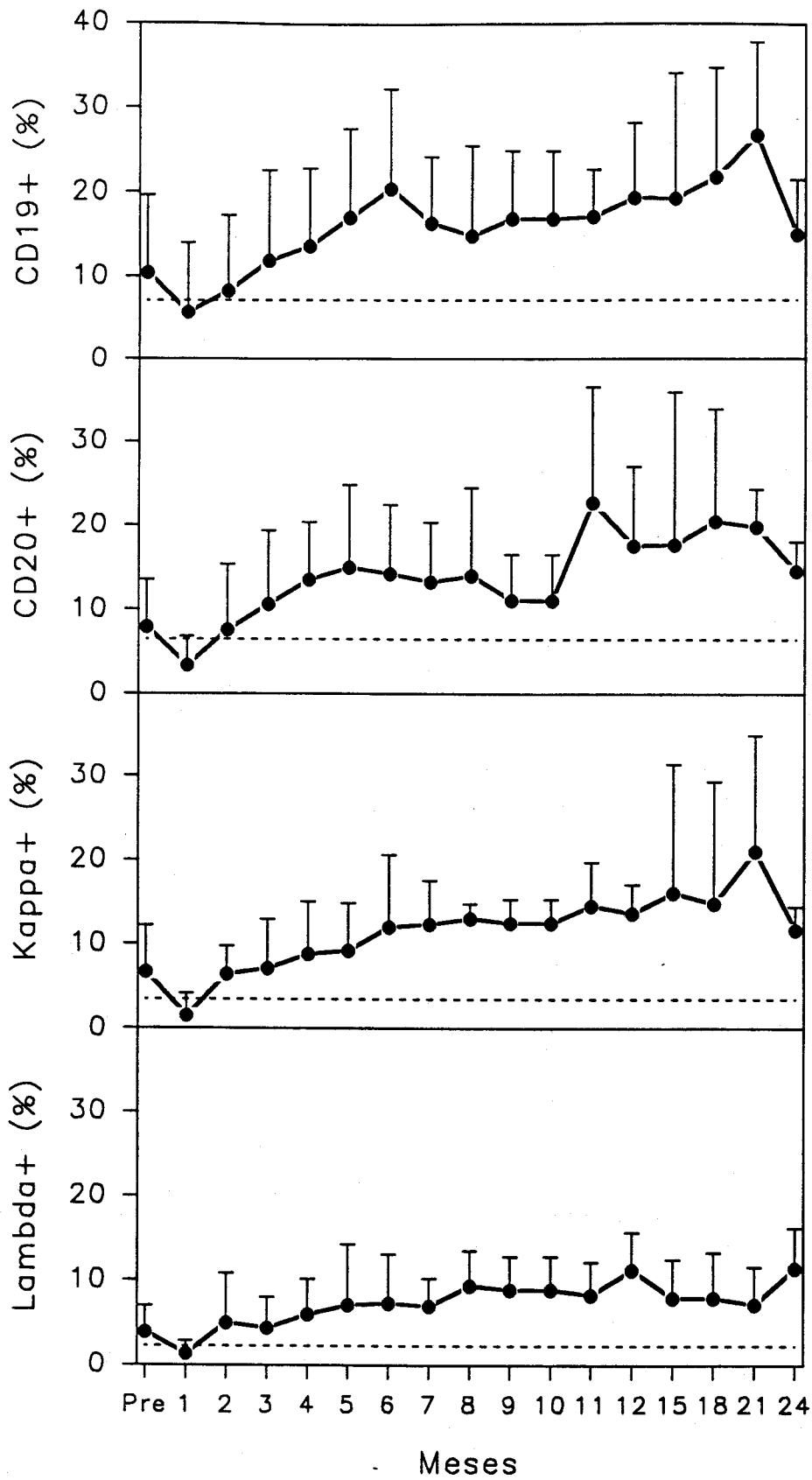
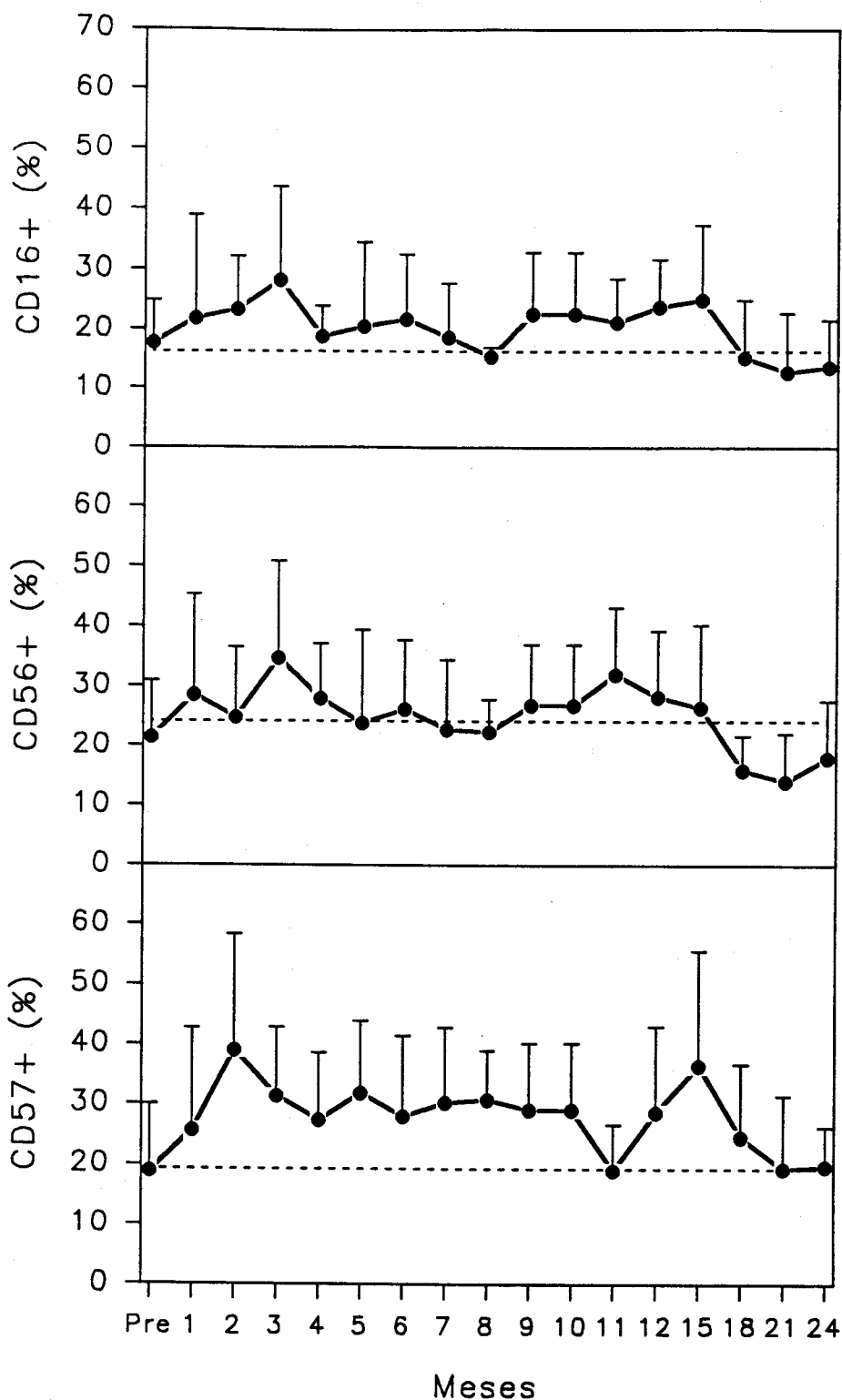
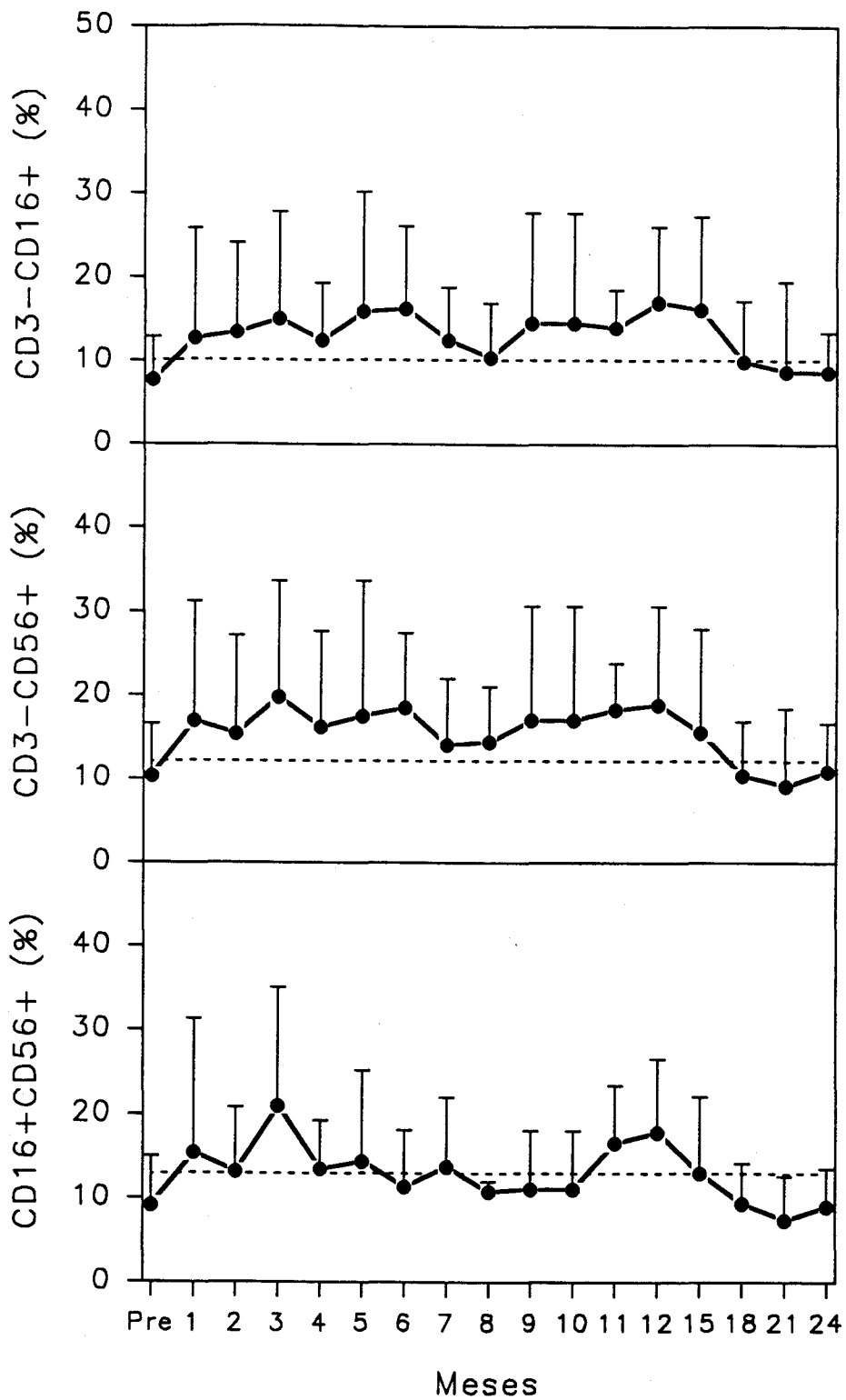


Figura 9. Evolución relativa de las subpoblaciones CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, sIgκ<sup>+</sup> y sIgλ<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes post-trasplante autólogo de médula ósea. Línea discontinua: porcentaje medio para individuos sanos.

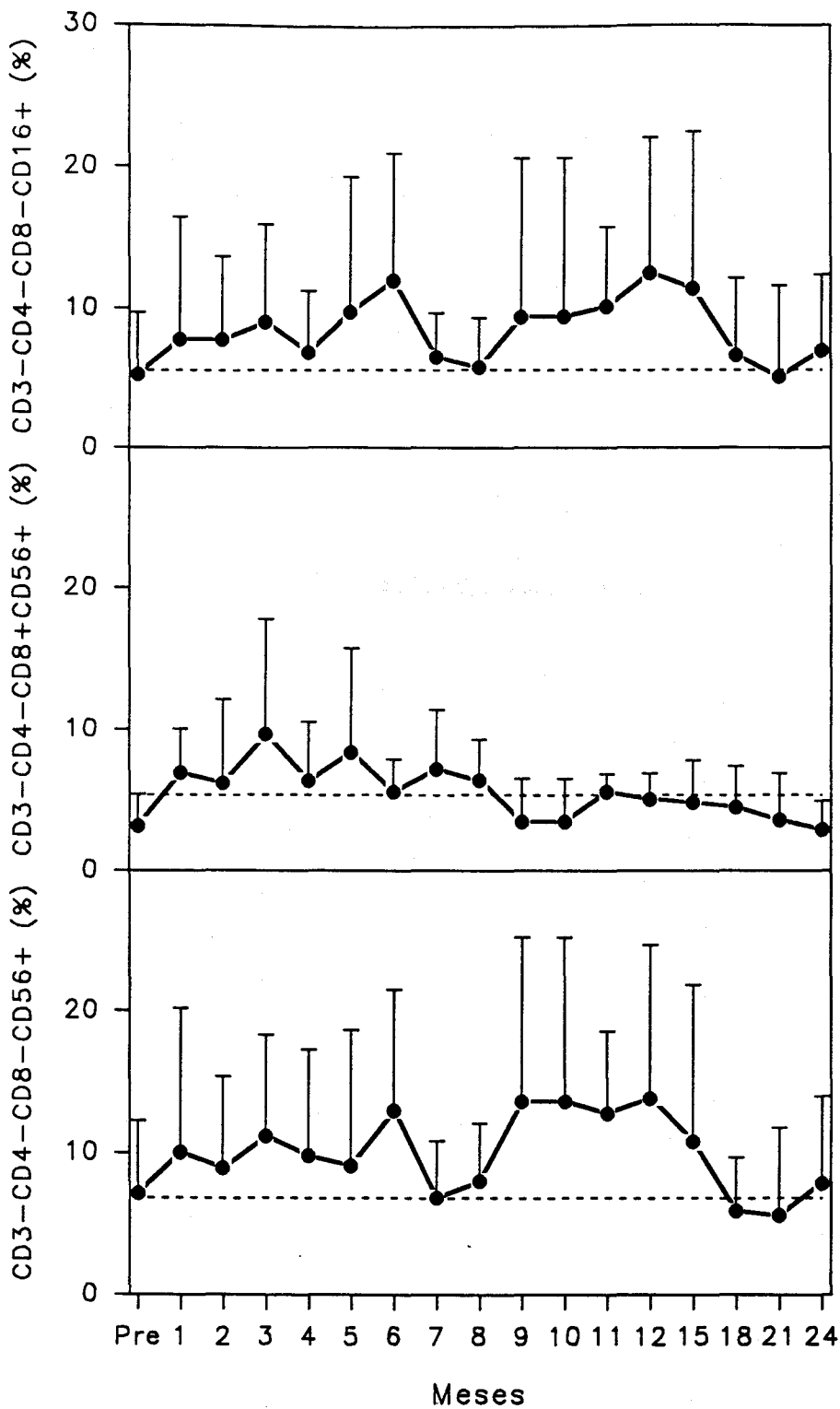




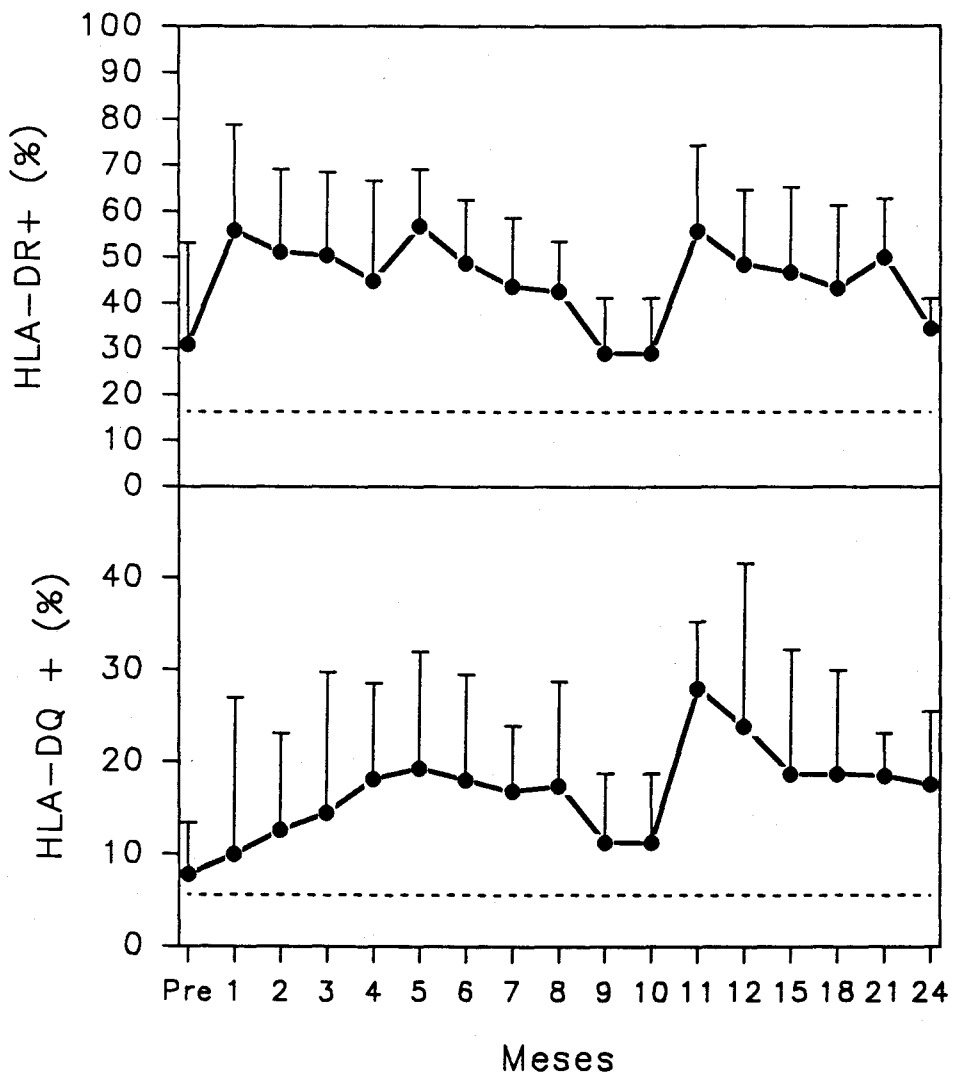
**Figura 10.** Evolución relativa de las subpoblaciones CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> y CD57<sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes en el post-trasplante autólogo de médula ósea. La línea horizontal discontinua indica el porcentaje medio para individuos sanos.



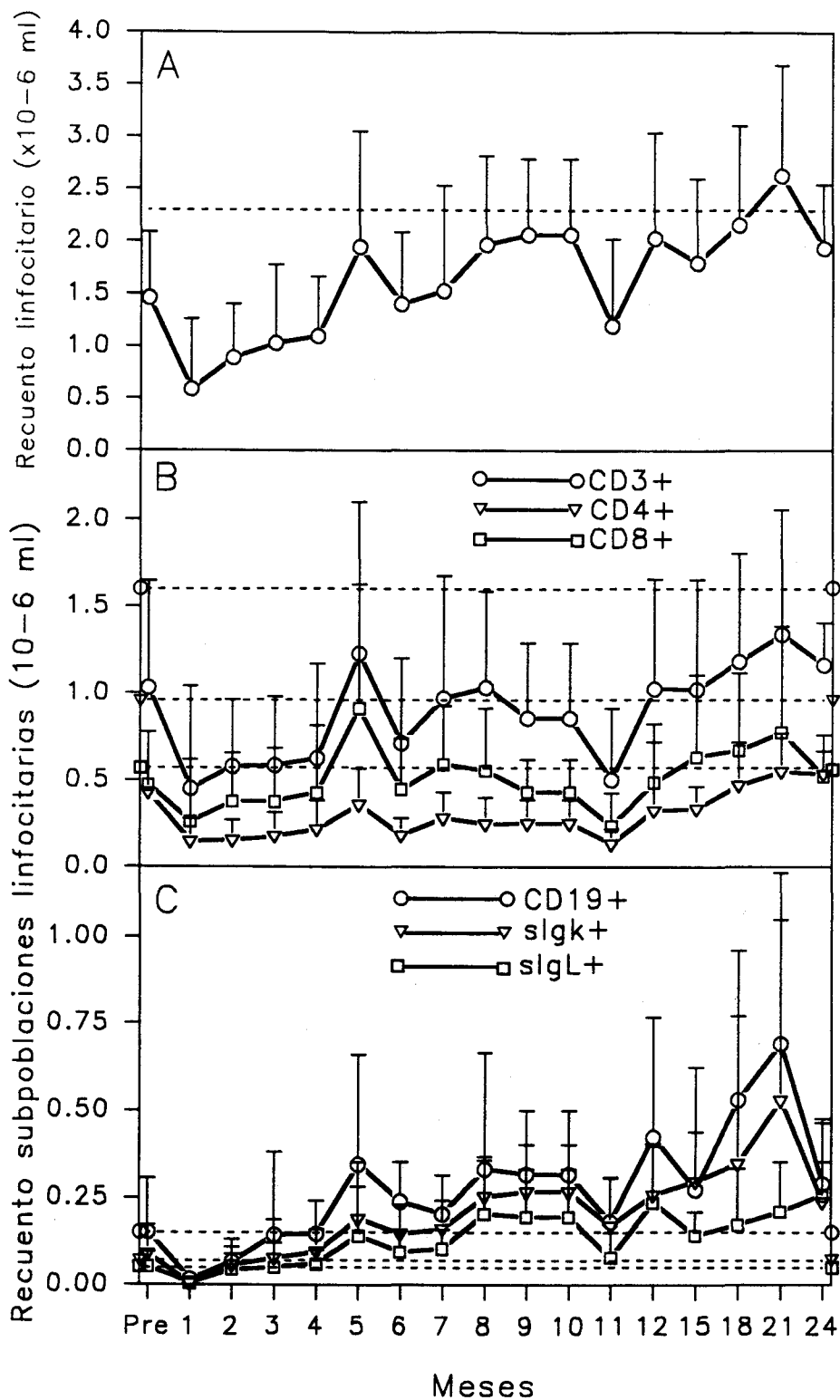
**Figura 11.** Evolución relativa de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes en post-trasplante autólogo de médula ósea. La línea horizontal discontinua indica el porcentaje medio para individuos sanos.



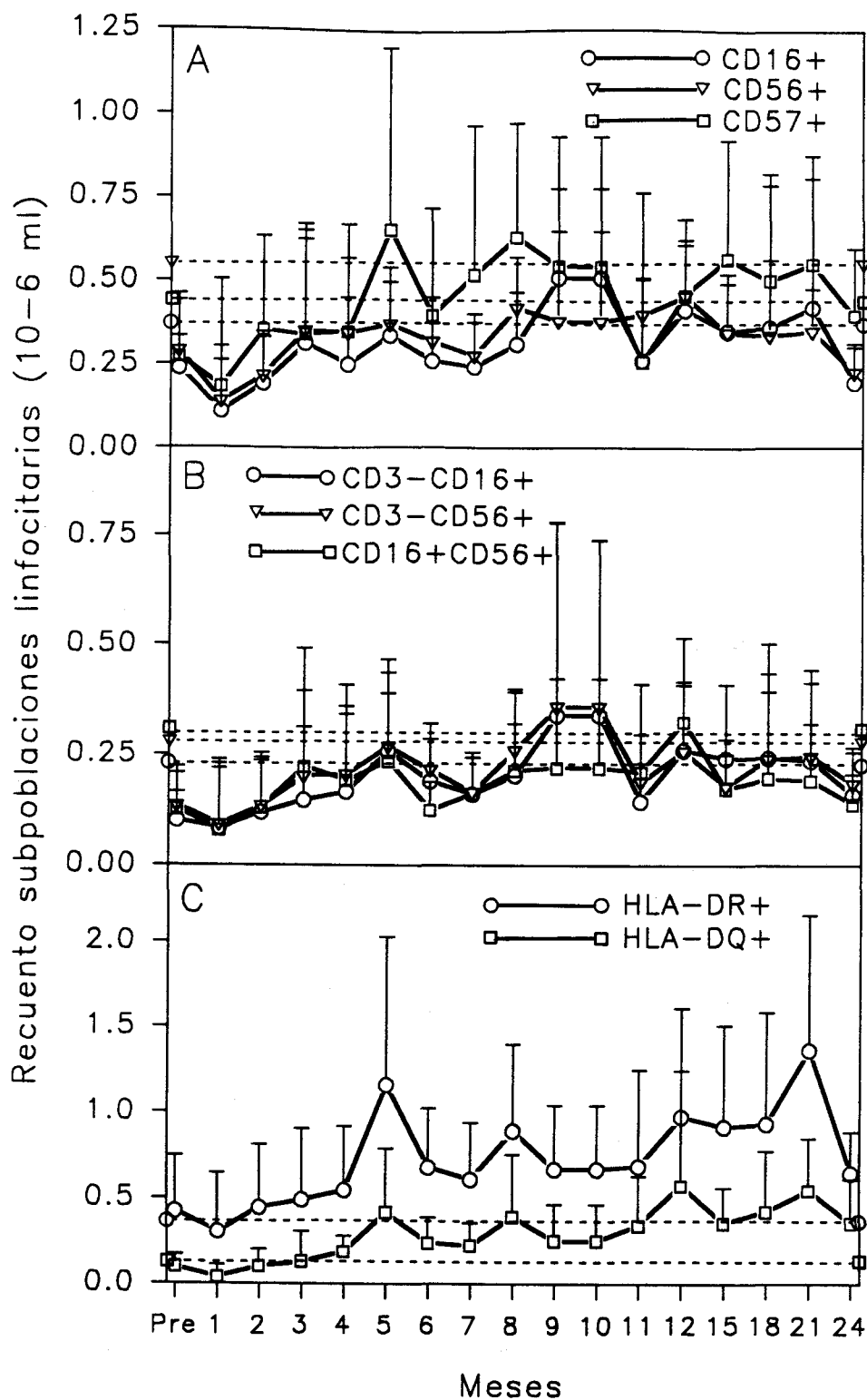
**Figura 12.** Evolución relativa de las subpoblaciones de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes en post-trasplante autólogo de médula ósea. Línea discontinua: porcentaje medio en sanos.



**Figura 13.** Evolución relativa de las subpoblaciones HLA-DR<sup>+</sup> y HLA-DQ<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes en post-trasplante autólogo de médula ósea. La línea horizontal discontinua indica el valor medio para individuos sanos.



**Figura 14.** Evolución en valor absoluto de los recuentos linfocitarios totales (A), de las subpoblaciones T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (B) y de las subpoblaciones B CD19<sup>+</sup>, sIgκ<sup>+</sup> y sIgλ<sup>+</sup> (C) en la sangre periférica de los pacientes post-trasplante autólogo de médula ósea. Las líneas horizontales discontinuas representan los promedios en los recuentos normales.



**Figura 15.** Evolución en valor absoluto de los recuentos de las subpoblaciones CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> y CD57<sup>+</sup> (A), de las subpoblaciones CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (B) y HLA-DR<sup>+</sup> y HLA-DQ<sup>+</sup> (C) en la sangre periférica de pacientes post-trasplante autólogo de médula ósea. Las líneas horizontales representan los promedios en los recuentos normales.

## 4.6. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y ACTIVIDAD CITOLÍTICA ANTITUMORAL EN LOS PACIENTES TRATADOS CON IL-2

### 4.6.1. Tratamiento de un paciente con IL-2 y células LAK alogénicas paternas

El fenotipo HLA del paciente era  $A_{30}/A_{31}$ ,  $B_{14}/B_{45}$ ,  $DR_{10}/DR_{10}$  y el del padre  $A_{30}/A_{25}$ ,  $B_{14}/B_{45}$ ,  $DR_2/DR_{10}$ . En el análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente los días +13, +43, +49 and +88 no fueron detectadas células HLA- $A_{25}^+$  de procedencia paterna.

Los recuentos linfocitarios se elevaron sobre 15.000 células/ml dentro de 36 horas después de finalizar cada ciclo de IL-2 y permanecieron por encima de los niveles previos a la iniciación de la terapia durante 2 meses después del fin de la misma.

Después del primer ciclo hubo una disminución en los porcentajes de la población  $CD3^+$ , que bajó desde un valor inicial del 61% hasta el 10% en el día +49.

Las subpoblaciones  $CD16^+$ ,  $CD56^+$  y  $CD16^+CD56^+$ , que registraron valores iniciales del 27%, 54% y 24% respectivamente, aumentaron hasta el 50%, 76% y 44% el día +6. Estas poblaciones tuvieron valores mínimos del 12%, 21% y 2% en mitad del segundo ciclo de IL-2 (día +41). Después del segundo ciclo alcanzaron nuevos valores máximos del 69%, 86% y 65% en el día +49.

Durante el tratamiento se produjo una disminución en los porcentajes de las subpoblaciones  $CD3^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD56^+$  y  $CD3^+CD8^+$  y un aumento de  $CD3^-CD16^+$ ,  $CD3^-CD56^+$  y  $CD3^-CD8^+$  las cuales se hicieron predominantes sobre todas las demás durante el resto del tratamiento, aunque alcanzaron un mínimo hacia la mitad del segundo ciclo de IL-2 (día +41) (figura 16A). Dentro de ellas, en el primer ciclo fueron mayoritarias las subpoblaciones con fenotipo deducido  $CD3^-CD4^-CD8^-CD16^+$  o  $CD56^+$  y durante el segundo ciclo aquellas  $CD3^-CD4^-CD8^+CD16^+$  o  $CD56^+$ . Todas ellas disminuyeron progresivamente hasta que alcanzaron valores inferiores a los normales a partir del noveno mes después de finalizado el tratamiento (figura 16B).

El porcentaje de linfocitos HLA-DR<sup>+</sup> se mantuvo elevado durante todo el proceso, con un valor inicial del 20% y un valor máximo del 82% en el día +4. Se produjo una disminución de las subpoblaciones CD69<sup>+</sup> (valor inicial del 25% y mínimo del 0% en el día +47). El valor para las subpoblaciones CD25<sup>+</sup> osciló entre 0% and 12%. La subpoblación linfocitaria CD57<sup>+</sup> disminuyó como resultado del tratamiento (valor inicial del 17% y valor mínimo del 8% en el día +11).

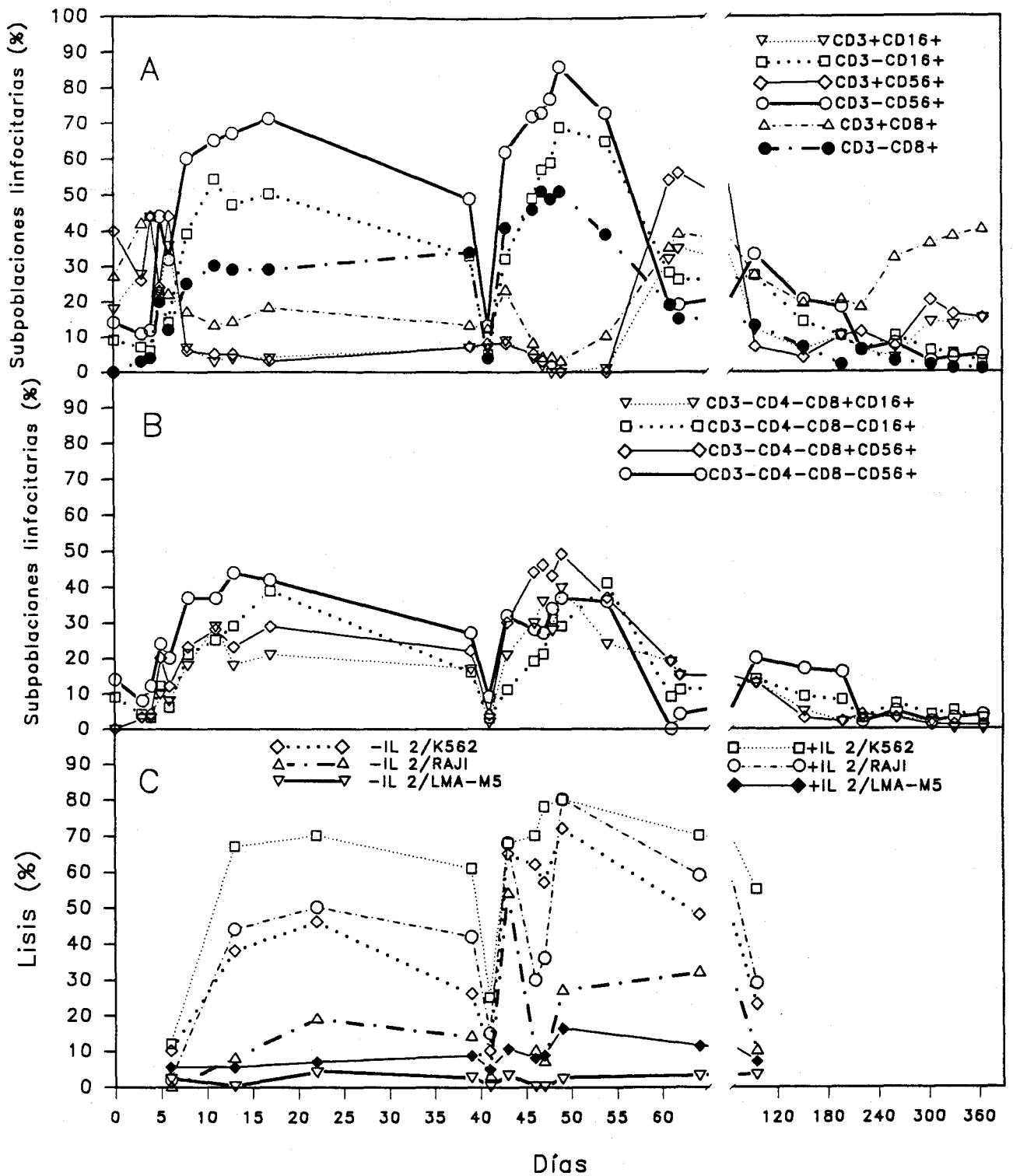
Paralelamente se estudió la actividad lítica sobre las líneas celulares K562 y Raji y sobre 4 blastos alogénicos (LMA-M5) durante el tratamiento. Antes del segundo TAMO, células LAK del paciente generadas *in vitro* habían presentado una actividad citolítica sobre sus blastos (17% de lisis a proporciones E:D de 40:1 y 80:1). Sin embargo la actividad citolítica sobre los blastos autólogos no pudo ser determinada durante el tratamiento.

Los porcentajes máximos y mínimos de lisis coincidieron cronológicamente con los porcentajes máximos y mínimos de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. Las actividades sobre K562 y Raji fueron muy elevadas, pero frente a los blastos alogénicos LMA-M5 no superaron la lisis obtenida por CMN sin estimular de individuos sanos sobre blastos LMA. Los porcentajes de lisis de las CMN del paciente en presencia de IL-2 fueron superiores a los observados en ausencia de IL-2 frente a todas las células diana ensayadas (figura 16C).

Se encontró una correlación lineal significativa entre los porcentajes de actividad lítica sobre K562 y los porcentajes de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r=0,800$ ,  $p=0,003$ ), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $r=0,758$ ,  $p=0,007$ ) y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $r=0,847$ ,  $p=0,001$ ). Las correlaciones fueron mejores para las subpoblaciones deducidas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r=0,878$ ,  $p=0,000$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $r=0,868$ ,  $p=0,001$ ) que para CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r=0,507$ ,  $p=0,1$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $r=0,442$ ,  $p=0,2$ ). Sin embargo, no se encontró correlación entre la lisis sobre Raji o los blastos alogénicos y las anteriores subpoblaciones.

No se observaron síntomas de EICH. El paciente estuvo en RC después de esta terapia durante 12 meses y falleció a causa de una oclusión intestinal coincidiendo con la detección del inicio de una recaída parcial (6% de blastos en MO).





**Figura 16.** Porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente tratado con interleucina-2 (IL-2) y células LAK alogénicas con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (A) y deducido CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (B) y actividad lítica sobre K562, Raji y 4 blastos alogénicos de leucemias mieloides agudas (porcentajes medios), sin (-IL-2) o con (+IL-2) estimulación *in vitro* con IL-2, a proporción efector:diana de 80:1 (C). LAK, "lymphokine-activated killer".

#### 4.6.2. Tratamiento de pacientes con IL-2

##### 4.6.2.1. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias y de la actividad NK y LAK espontánea en los pacientes tratados con IL-2

La subpoblación CD3<sup>+</sup> disminuyó globalmente durante el tratamiento. Su porcentaje inicial (valor medio  $\pm$  desviación estándar) fue  $46,6 \pm 26,5$ . Alcanzó un mínimo de  $32,6 \pm 20,5$  al final del tercer ciclo de infusión de IL-2. Dos meses después de finalizado el tratamiento mostró niveles superiores a los iniciales ( $54,3 \pm 17,1$ ). Paralelamente disminuyó la población TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, con un porcentaje inicial de  $39,4 \pm 23,0$  y un mínimo de  $26,4 \pm 17,6$  al final del tercer ciclo.

La subpoblación CD4<sup>+</sup> no mostró variaciones durante todo el tratamiento, con valores muy próximos al 10%.

La subpoblación CD8<sup>+</sup> aumentó durante la administración del tratamiento. Su porcentaje inicial fue  $34,8 \pm 22,7$ . Alcanzó un máximo de  $57,8 \pm 12,7$  al final del primer ciclo. Dos meses después de finalizado el tratamiento mantenía unos niveles elevados ( $55,7 \pm 4,7$ ).

El cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> disminuyó durante el tratamiento desde un valor inicial de  $0,34 \pm 0,17$  hasta un valor mínimo de  $0,16 \pm 0,06$  al final del segundo ciclo. Dos meses después de finalizado el tratamiento mantenía unos niveles muy bajos ( $0,19 \pm 0,08$ ).

La subpoblación CD2<sup>+</sup> estuvo aumentada como consecuencia de la administración de IL-2. Empezó con un porcentaje inicial de  $57,8 \pm 33,6$  y alcanzó pronto un máximo de  $87,6 \pm 12,1$  al final del primer ciclo.

La expresión de HLA-DR aumentó rápidamente, con un valor inicial de  $56,8 \pm 29,3$  y un máximo de  $72,2 \pm 16,7$  en mitad del primer ciclo. La subpoblación HLA-DR<sup>+</sup> se mantuvo elevada durante todo el tratamiento. La expresión de CD25 y CD69 no sufrió cambios notables: la subpoblación CD25<sup>+</sup> osciló entre  $3,6 \pm 1,9$  y  $14,2 \pm 13,9$  y la subpoblación CD69<sup>+</sup> entre  $4,8 \pm 2,2$  y  $14,0 \pm 8,0$ .

Los marcadores de serie B sufrieron una disminución global durante el tratamiento. Inicialmente sus porcentajes fueron: CD19<sup>+</sup>, 18,8±19,9; CD20<sup>+</sup>, 16,0±16,3; sIgκ<sup>+</sup>, 15,0±15,7; sIgλ<sup>+</sup> 10,6±9,6. Los mínimos alcanzados fueron: CD19<sup>+</sup>, 4,4±4,4, al final del segundo ciclo; CD20<sup>+</sup>, 4,8±4,0; sIgκ<sup>+</sup>, 2,2±2,7; sIgλ<sup>+</sup> 1,6±0,9, los tres últimos al final del primer ciclo.

Observamos un aumento significativo de los marcadores asociados a la serie NK CD16 y CD56, y una disminución del marcador CD57. La subpoblación CD16<sup>+</sup> tuvo un valor inicial de 20,6±15,2 y alcanzó un máximo de 41,6±9,8 ( $p=0,03$ ) al final del segundo ciclo. La subpoblación CD56<sup>+</sup> tuvo un valor inicial de 19,4±10,8 y alcanzó un máximo de 57,0±20,9 ( $p=0,007$ ) al final del tercer ciclo. La subpoblación CD57<sup>+</sup> tuvo un valor inicial de 31,4±20,2 y alcanzó un mínimo de 18,8±16,4 al final del tercer ciclo, aunque se recuperó dos meses después (37,3±20,5).

La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> experimentó un aumento desde un porcentaje inicial del 7,8±3,6 hasta un máximo de 38,0±18,2 ( $p=0,007$ ) al final del tercer ciclo (figura 17A). La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> disminuyó desde un porcentaje inicial del 28,4±23,4 hasta un mínimo de 16,0±14,4 al final del tercer ciclo.

La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> aumentó desde un porcentaje inicial del 12,0±10,8 hasta un máximo de 37,0±9,9 ( $p=0,005$ ) a la mitad del tercer ciclo (figura 17A). Concomitantemente aumentó la subpoblación CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, desde un porcentaje inicial del 8,0±7,6 hasta un máximo de 23,0±4,9 ( $p=0,006$ ) al final del tercer ciclo.

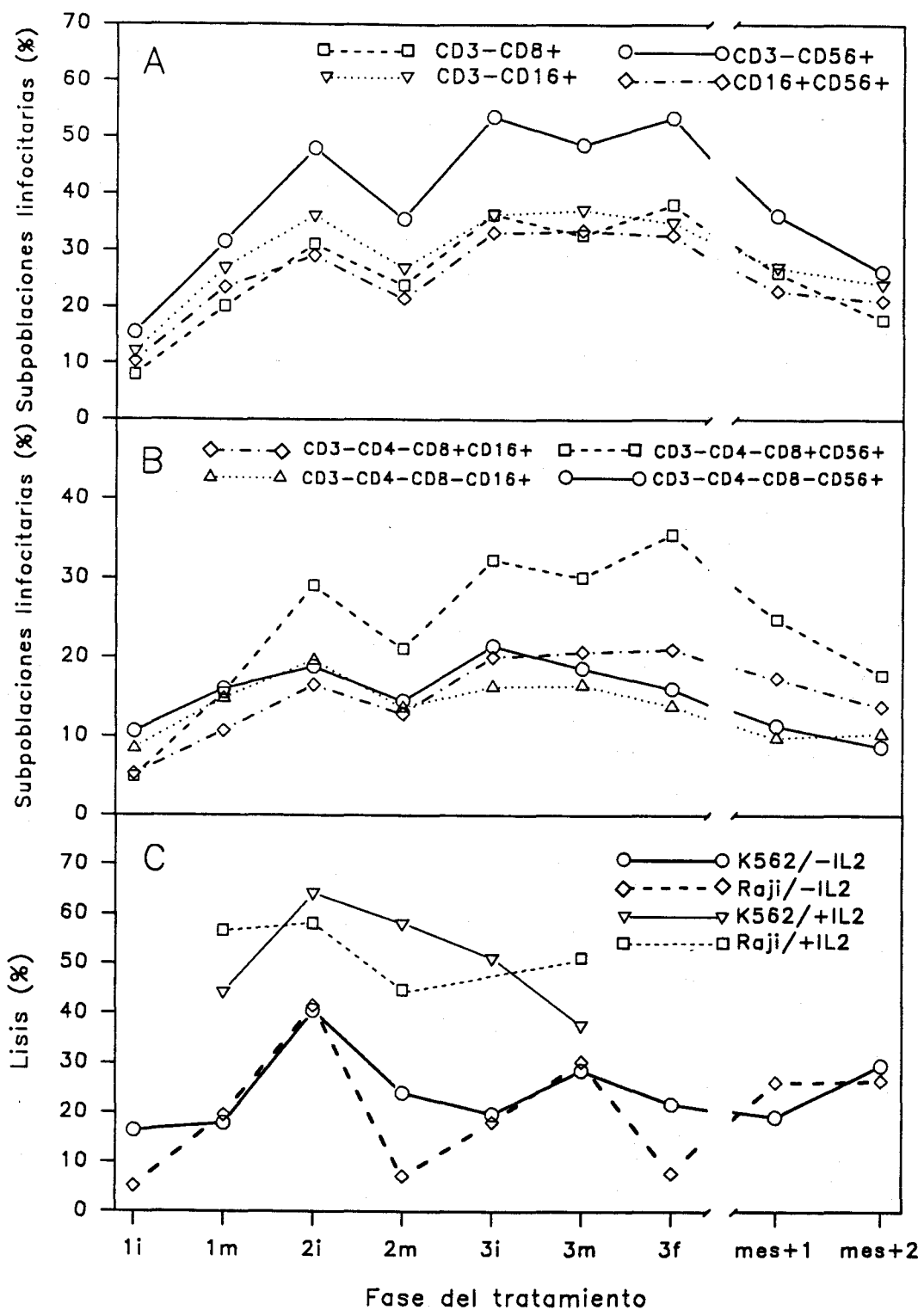
La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> aumentó desde un porcentaje inicial del 15,4±8,9 hasta un máximo de 53,6±24,6 ( $p=0,01$ ) al final del segundo ciclo (figura 17A). La subpoblación CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> aumentó concomitantemente desde un 6,6±3,8 hasta un 35,8±15,8 ( $p=0,004$ ) al final del tercer ciclo.

La subpoblación CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> aumentó desde un porcentaje inicial del 10,2±9,0 hasta un máximo de 33,4±12,2 ( $p=0,009$ ) a la mitad del tercer ciclo (figura 17A).

Las subpoblaciones de fenotipo deducido que experimentaron aumentos fueron aquellas que habíamos correlacionado con la actividad NK: la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> varió desde un porcentaje inicial del 5,2±2,9 hasta un máximo de 21,0±8,2 ( $p=0,004$ ) al final del tercer ciclo; la subpoblación CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> varió desde un porcentaje inicial del 8,4±6,5 hasta un máximo de 19,6±8,6 ( $p=0,05$ ) al final del primer ciclo; la subpoblación CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> varió desde un porcentaje inicial del 4,8±3,5 hasta un máximo de 35,4±15,7 ( $p=0,003$ ) al final del tercer ciclo; y la subpoblación CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> varió desde un porcentaje inicial del 10,6±5,9 hasta un máximo de 21,4±8,8 ( $p=0,05$ ) al final del segundo ciclo (figura 17B).

La actividad NK estuvo en niveles muy aumentados durante todo el tratamiento, con porcentajes de lisis iniciales de 13,8±12,9 (proporción E:D de 40:1) y 16,4±14,2 (proporción E:D de 80:1) y porcentajes máximos de 30,8±19,4 y 40,4±15,7 ( $p=0,03$ ), respectivamente. La actividad LAK espontánea aumentó paralelamente a la actividad NK, con porcentajes de lisis iniciales de 3,3±4,0 (proporción E:D de 40:1) y 5,0±6,4 (proporción E:D de 80:1) y porcentajes máximos de 38,0±21,6 ( $p=0,008$ ) y 41,3±22,7 ( $p=0,009$ ), respectivamente. Durante la infusión de IL-2 los niveles de actividad lítica en presencia de IL-2 fueron superiores a los observados en ausencia de IL-2 frente a K562 y Raji. Las actividades citolíticas permanecían elevadas 2 meses después de finalizada la terapia (figura 17C).



**Figura 17.** Porcentajes medios de las subpoblaciones linfocitarias CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (A), de aquellas con fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> (B) y de la actividad sobre K562 y Raji a proporción efector:diana de 80:1 en los tratamientos con interleucina-2, sin (-IL-2) o con (+IL-2) estimulación ulterior *in vitro* con IL-2 (C); i, inicio de ciclo; m, mitad de ciclo; f, final de ciclo. Los porcentajes iniciales no difirieron significativamente de los controles sanos.

#### 4.6.2.2. Análisis cualitativo de las subpoblaciones generadas en función de la intensidad del marcaje fluorescente

El análisis cualitativo de las subpoblaciones generadas durante los tratamientos con IL-2 nos mostró que las subpoblaciones CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup> exhibían dos intensidades de marcaje fluorescente: una población más intensa o *brillante* y una más débil o *mate*.

Las células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> eran CD8<sup>brillante+</sup>, mientras que las CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> eran CD8<sup>mate+</sup> (figura 18). Las células CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> eran CD16<sup>mate+</sup> y CD56<sup>mate+</sup>, respectivamente (figuras 19 y 20).

Las células CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> podían ser CD16<sup>mate+</sup> o CD16<sup>brillante+</sup> y CD56<sup>mate+</sup> o CD56<sup>brillante+</sup>, respectivamente (figuras 19 y 20).

Las células CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> podían ser de dos tipos: CD16<sup>brillante+</sup>CD56<sup>mate+</sup> y CD16<sup>mate+</sup>CD56<sup>brillante+</sup> (figura 21).

Las células CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> eran CD8<sup>mate+</sup> pero podían ser CD16<sup>brillante+</sup> o CD16<sup>mate+</sup> y CD56<sup>brillante+</sup> o CD56<sup>mate+</sup>. También existieron poblaciones CD8<sup>-</sup> que podían ser CD16<sup>brillante+</sup> o CD16<sup>mate+</sup> y CD56<sup>brillante+</sup> o CD56<sup>mate+</sup> (figuras 22 y 23).

Las subpoblaciones que experimentaron aumentos más significativos como consecuencia del empleo *in vivo* de la IL-2 fueron las subpoblaciones CD3<sup>-</sup>CD16<sup>mate+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD56<sup>brillante+</sup> (figura 24). La relación entre CD3<sup>-</sup>CD16<sup>mate+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD16<sup>brillante+</sup> fue inicialmente de 0,24 y al final del tercer ciclo de 1,72. La relación entre CD3<sup>-</sup>CD56<sup>brillante+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD56<sup>mate+</sup> fue inicialmente de 0,51 y al final del tercer ciclo de 4,80.

A su vez, dentro de las CD3<sup>-</sup>CD16<sup>mate+</sup> experimentaron mayores aumentos las subpoblaciones CD8<sup>mate+</sup> (figura 24). El porcentaje de CD8<sup>mate+</sup>CD16<sup>mate+</sup> dentro de las CD16<sup>+</sup> fue inicialmente del 10% y al final del tercer ciclo del 47%.

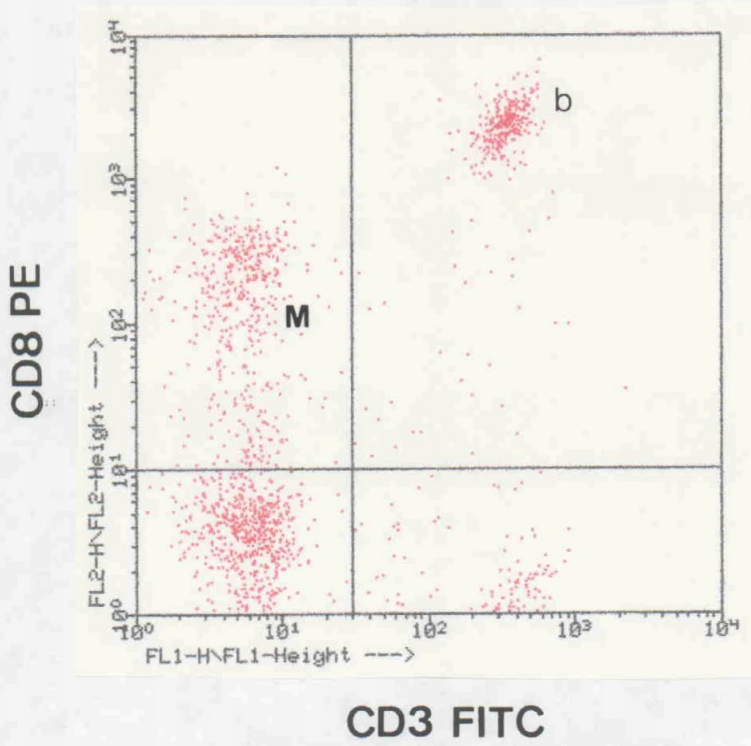
Igualmente, dentro de las CD3<sup>-</sup>CD56<sup>brillante+</sup> experimentaron mayores aumentos las subpoblaciones CD8<sup>mate+</sup> (figura 24). El porcentaje de CD8<sup>mate+</sup>CD16<sup>brillante+</sup> dentro de las

CD56<sup>+</sup> fue inicialmente del 12% y al final del tercer ciclo del 57%.

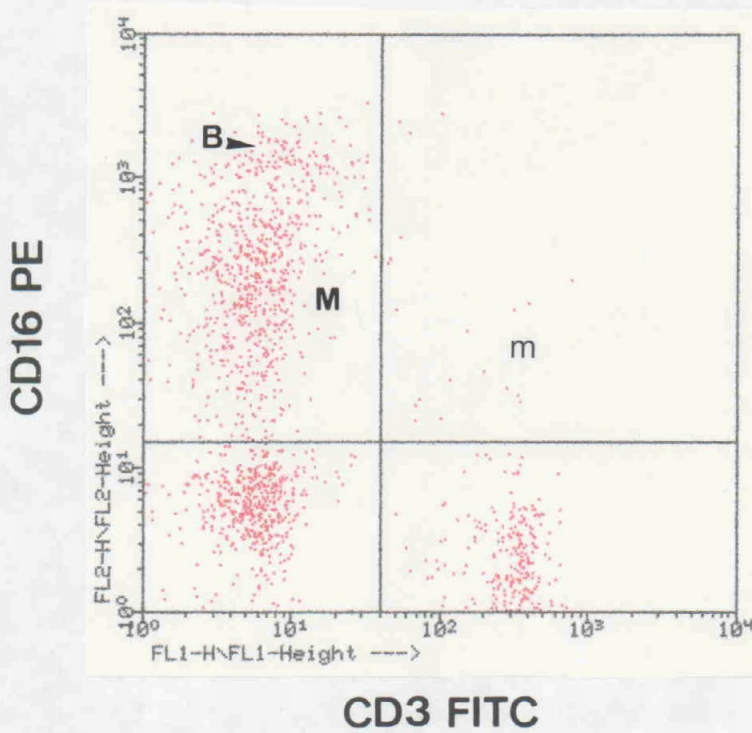
Las poblaciones CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>brillante+</sup> experimentaron aumentos comparables a las CD3<sup>+</sup>CD16<sup>mate+</sup>CD56<sup>brillante+</sup> (figura 24).

#### 4.6.2.3. Evolución de los pacientes tratados con IL-2

De los cinco pacientes tratados con IL-2, el paciente afecto de LLA-L3 recayó a los dos meses de finalizar el tratamiento, y un paciente con LLA-L2 diez días después del último ciclo de IL-2. Los tres restantes permanecen en RC (mediana 11 meses). El paciente con LLA-L3 que recayó fue el único que no consiguió elevar las subpoblaciones linfocitarias relacionadas con la actividad NK por encima de los porcentajes normales y, aunque al final del primer ciclo las actividades NK y LAK espontánea se elevaron hasta el 56% y 57% a proporción E:D de 80:1, durante el resto del tratamiento se mantuvieron con valores normales y desapareció sólo 15 días después de finalizar la terapia. En cambio, el paciente con LLA-L2 que recayó rápidamente tras el tratamiento, tuvo valores muy elevados de las subpoblaciones NK y de la actividad NK y LAK espontánea en el último estudio realizado una semana antes de la recidiva.

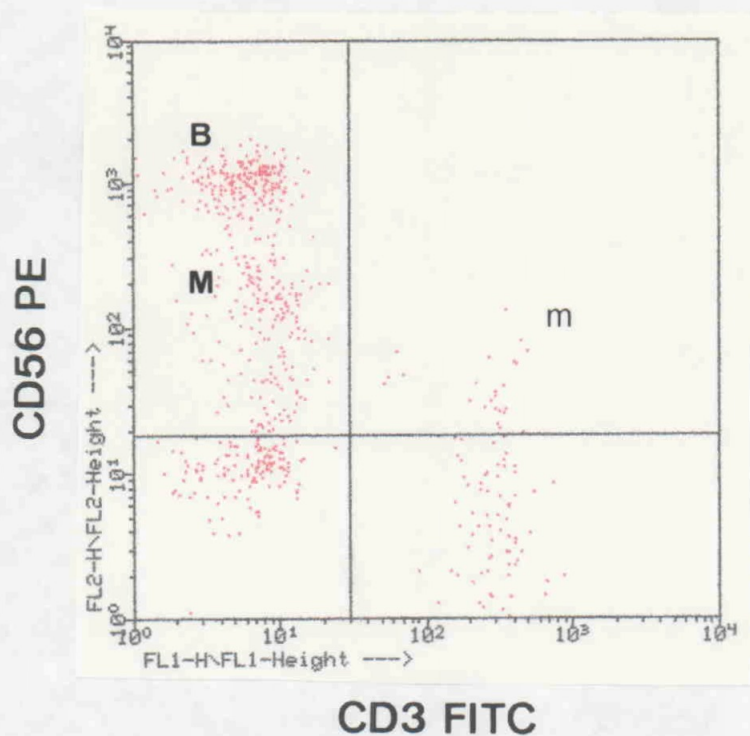


**Figura 18.** Representación de la fluorescencia de la fracción linfocitaria marcada con CD3/CD8; **b**, subpoblación CD3<sup>+</sup>CD8<sup>brillante+</sup>; **M**, subpoblación CD3<sup>+</sup>CD8<sup>mate+</sup>. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina (figuras 18-23).

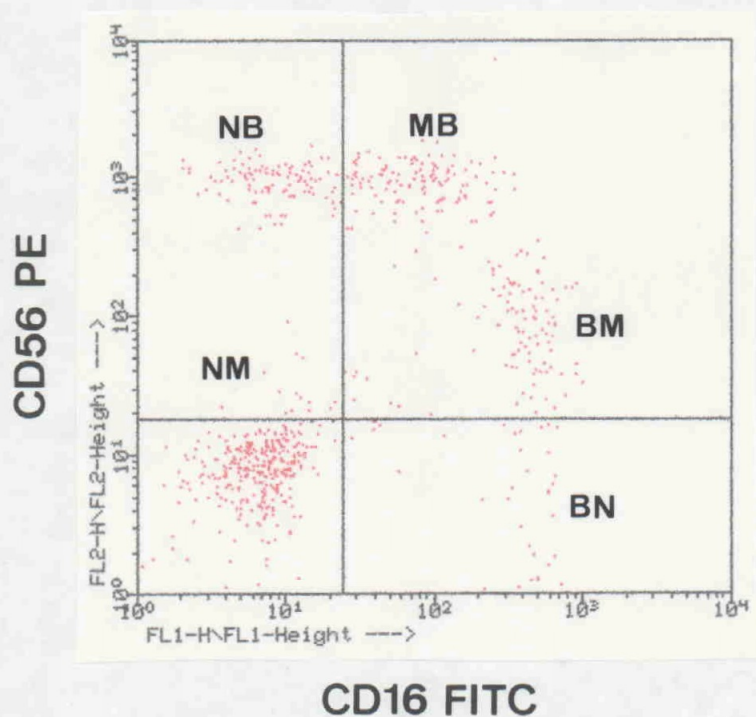


**Figura 19.** Representación de la fluorescencia de la fracción linfocitaria marcada con CD3/CD16; **m**, subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>mate+</sup>; **B**, subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>brillante+</sup>; **M**, subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>mate+</sup>.

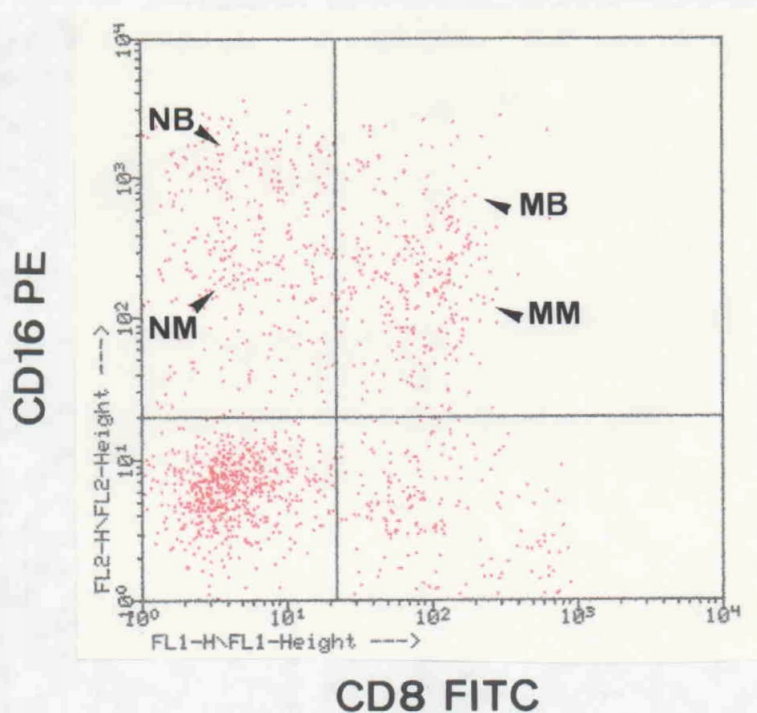




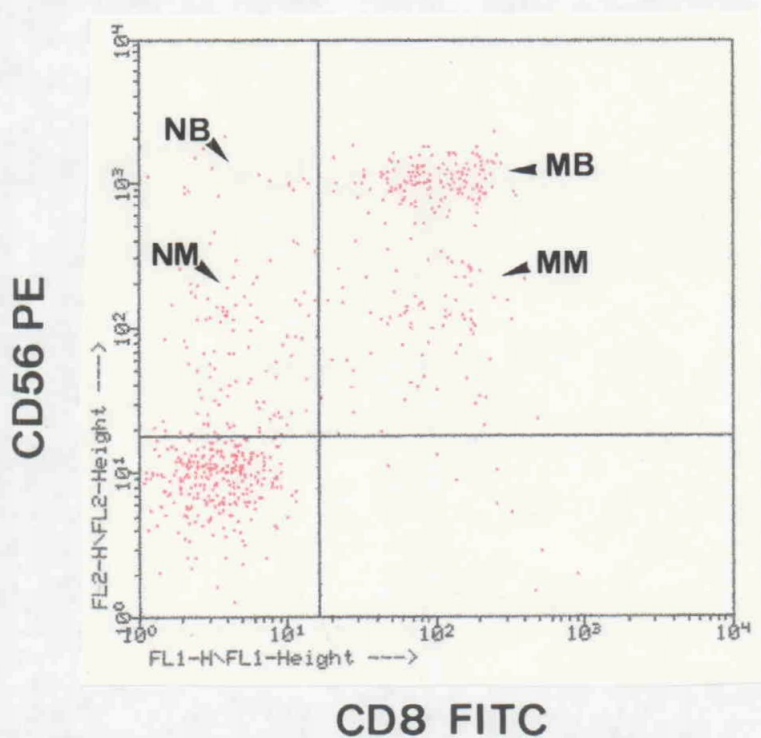
**Figura 20.** Representación de la fluorescencia de la fracción linfocitaria marcada con CD3/CD56; **m**, subpoblación  $CD3^+CD56^{mate+}$ ; **B**, subpoblación  $CD3^+CD56^{brillante+}$ ; **M**, subpoblación  $CD3^+CD56^{mate+}$ .



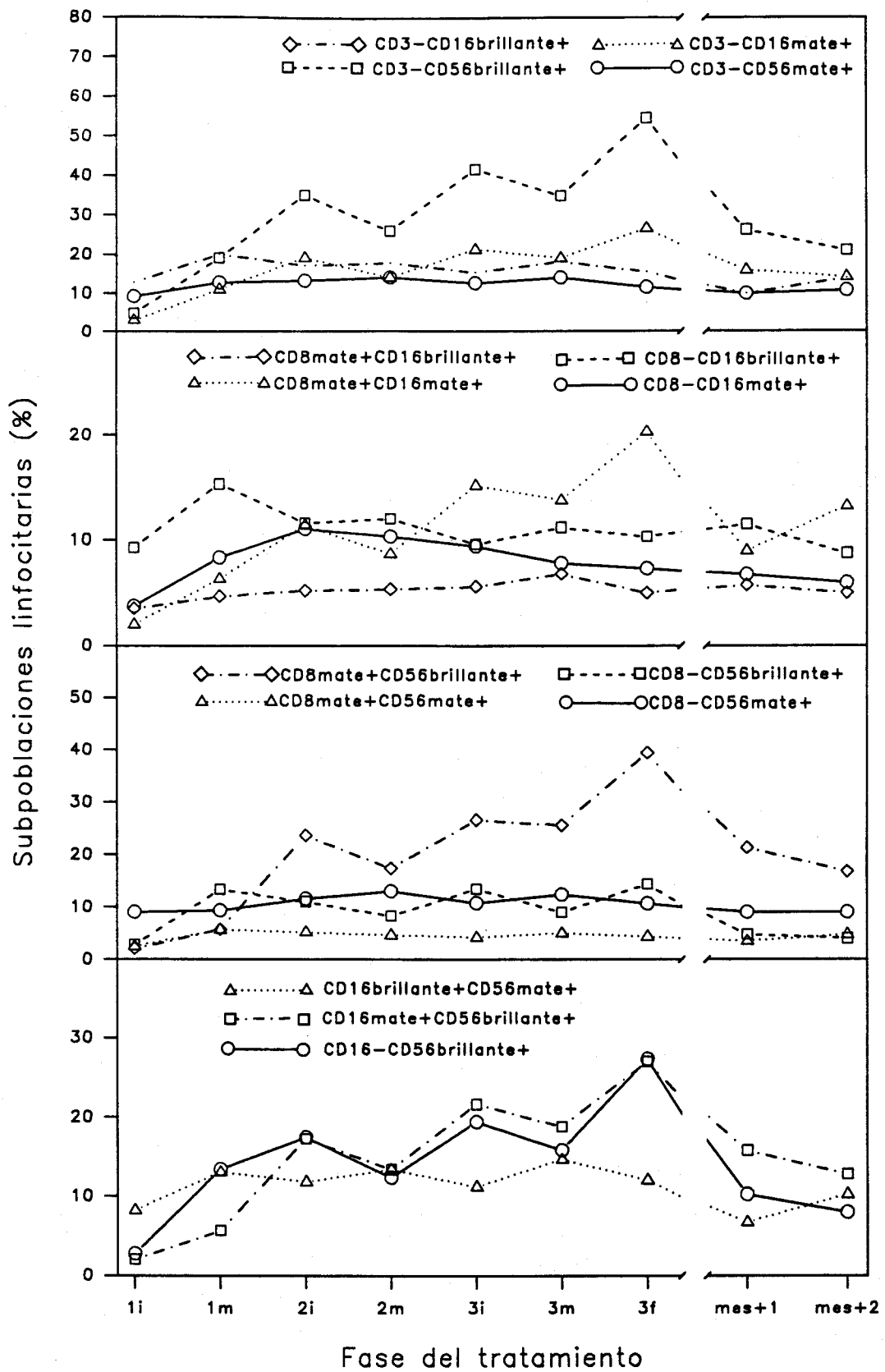
**Figura 21.** Representación de la fluorescencia de la fracción linfocitaria marcada con CD16/CD56; **BN**, subpoblación  $CD16^{brillante+}CD56^+$ ; **BM**, subpoblación  $CD16^{brillante+}CD56^{mate+}$ ; **MB**, subpoblación  $CD16^{mate+}CD56^{brillante+}$ ; **NB**, subpoblación  $CD16^+CD56^{brillante+}$ ; **NM**, subpoblación  $CD16^+CD56^{mate+}$ .



**Figura 22.** Representación de la fluorescencia de la fracción linfocitaria marcada con CD8/CD16; **MB**, subpoblación  $CD8^{mate+}CD16^{brillante+}$ ; **MM**, subpoblación  $CD8^{mate+}CD16^{mate+}$ ; **NB**, subpoblación  $CD8^{-}CD16^{brillante+}$ ; **NM**, subpoblación  $CD8^{-}CD16^{mate+}$ .



**Figura 23.** Representación de la fluorescencia de la fracción linfocitaria marcada con CD8/CD56; **MB**, subpoblación  $CD8^{mate+}CD56^{brillante+}$ ; **MM**, subpoblación  $CD8^{mate+}CD56^{mate+}$ ; **NB**, subpoblación  $CD8^{-}CD56^{brillante+}$ ; **NM**, subpoblación  $CD8^{-}CD56^{mate+}$ .



**Figura 24.** Porcentajes medios de las subpoblaciones relacionadas con la actividad "natural killer" en la sangre periférica de los pacientes tratados con interleucina-2 en función de la intensidad de marcaje fluorescente; **i**, inicio de ciclo; **m**, mitad de ciclo; **f**, final de ciclo.

## 4.7. ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES NK Y LAK Y DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LA MO

### 4.7.1. Actividades citolíticas en la MO sobre las líneas celulares K562 y Raji

Los porcentajes medios de la lisis de las líneas K562 y Raji ejercida por las CMN iniciales y las células LAK producidas mediante incubación *in vitro* de las CMN de MO con IL-2 durante un día, un día más criopreservación o cinco días en los pacientes y en los individuos sanos, a proporciones E:D de 40:1 y 80:1, se muestran en la tabla 12.

Las actividades citolíticas iniciales sobre la línea K562 y Raji se correlacionaron en los pacientes ( $r=0,674$ ;  $p=0,000$ ).

Las células LAK ejercieron unos porcentajes medios de actividad citolítica sobre ambas líneas celulares superiores a las CMN iniciales en los pacientes y en los individuos sanos para un día de cultivo ( $p=0,0000$  para K562 y para Raji en los pacientes y  $p=0,002$  y  $p=0,003$ , respectivamente, en los individuos sanos) y para 5 días de cultivo ( $p=0,0000$  en todos los casos). Entre los días +1 y +5 hemos encontrado un aumento significativo de la actividad citolítica sobre la línea K562 en los pacientes ( $p=0,02$ ) y sobre Raji en los pacientes ( $p=0,002$ ) y en los individuos sanos ( $p=0,0007$ ).

En 28/29 pacientes (97%) y en todos los individuos sanos se alcanzaron niveles de lisis sobre K562 y Raji superiores a los iniciales tras la incubación *in vitro* con IL-2.

Los niveles de actividad lítica inicial y tras incubación con IL-2 sobre la línea celular K562 estuvieron correlacionados en los pacientes ( $r=0,427$ ;  $p=0,02$ ). Esta correlación no se verificó para la línea celular Raji. Asimismo, se verificó una correlación lineal significativa entre los porcentajes de lisis ejercido por las células LAK sobre las líneas celulares K562 y Raji en los pacientes ( $r=0,904$ ;  $p=0,000$ ).

Hemos encontrado disminuciones significativas en los porcentajes de actividad citolítica inicial sobre la línea celular K562 en la MO respecto de la SP de los individuos sanos ( $p=0,0003$ ) y próximo al nivel de significación establecido en los pacientes ( $p=0,08$ ),

así como en los porcentajes de actividad citolítica generados en el cultivo de la MO con IL-2 sobre las líneas K562 y Raji en los individuos sanos respecto de los generados en la SP ( $p=0,0000$  y  $p=0,0003$ , respectivamente) (tablas 1, 2 y 12; hay que recordar además que el cultivo con IL-2 en SP fue de 3 días y en MO de 5 días).

La criopreservación de los cultivos del día +1 redujo significativamente las actividades citolíticas sobre K562 y Raji hasta niveles comparables a los iniciales en los pacientes ( $p=0,0005$  y  $p=0,004$ , respectivamente) y en los individuos sanos ( $p=0,008$  y  $p=0,04$ , respectivamente).

Entre el día inicial y el día +5 de cultivo, los recuentos celulares disminuyeron gradualmente ( $\times 10^{-6}$  ml):  $0,82 \pm 0,13$  en el día +1 y  $0,78 \pm 0,32$  en el día +5 para los pacientes y  $0,76 \pm 0,17$  y  $0,52 \pm 0,15$ , respectivamente, para los donantes sanos. La congelación el día +1 supuso una pérdida celular adicional al cultivo de un día, pues se recuperaron  $0,57 \pm 0,17$  para los pacientes y  $0,52 \pm 0,11$  para los individuos sanos.

TABLA 12

ACTIVIDADES CITOLITICAS SOBRE K562 Y RAJI EN LA MO DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

DIANA	K562		RAJI	
	40:1	80:1	40:1	80:1
<b>Pacientes (n=29)</b>				
CMN iniciales	4,6±5,9	6,4±7,9	3,4±5,6	5,5±9,0
Células LAK d+1	25,3±19,8	31,5±22,0	21,2±19,1	27,5±20,9
LAK d+1 post-descongelación	4,2±5,1	6,8±8,2	6,1±5,2	8,2±8,5
Células LAK d+5	41,5±20,9	45,9±20,6	39,7±24,1	47,7±21,5
<b>Controles (n=10)</b>				
CMN iniciales	2,1±2,8	3,3±3,3	1,3±1,6	1,7±1,7
Células LAK d+1	16,9±12,4	22,3±15,9	13,1±9,9	17,3±14,3
LAK d+1 post-descongelación	2,7±2,4	3,4±2,4	4,5±2,9	4,7±2,6
Células LAK+5	29,0±14,9	37,1±19,9	33,5±17,1	45,7±15,7

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar. E:D, proporción efector:diana; CMN, células mononucleadas; LAK d+1, CMN cultivadas durante 1 día con interleucina-2 (IL-2); LAK d+5, CMN cultivadas durante 5 días con IL-2; N.T., no testado.

## 4.7.2. Subpoblaciones linfocitarias en la MO

### 4.7.2.1. Comparación entre las subpoblaciones linfocitarias de la MO en los pacientes y en los individuos sanos

Los porcentajes medios obtenidos para las diferentes subpoblaciones linfocitarias estudiadas, incluyendo aquellas con fenotipo deducido, en los pacientes y en los individuos sanos se muestran en la tabla 13.

Hemos encontrado aumentos significativos en la MO de los pacientes respecto de los individuos sanos para las subpoblaciones HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,002$ ), CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ), CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ) y para las de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ). Hemos encontrado disminuciones significativas para CD4<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ) y el cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ).

### 4.7.2.2. Comparación entre las subpoblaciones linfocitarias en la SP y en la MO

Hemos encontrado porcentajes aumentados significativamente en la MO respecto de la SP en los pacientes para las subpoblaciones HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), HLA-DQ<sup>+</sup> ( $p=0,0002$ ), CD19<sup>+</sup> ( $p=0,0001$ ), CD20<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), sIgκ<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ) y sIgλ<sup>+</sup> ( $p=0,004$ ) (tablas 8 y 13).

Hemos encontrado porcentajes disminuidos significativamente en la MO respecto de la SP en los pacientes para las subpoblaciones CD3<sup>+</sup> ( $p=0,004$ ), CD4<sup>+</sup> ( $p=0,0003$ ), cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $p=0,008$ ), TCRαβ<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD2<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD16<sup>+</sup> ( $p=0,007$ ), CD56<sup>+</sup> ( $p=0,0006$ ), CD57<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), TCRαβ<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ), CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ), CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), TCRαβ<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,009$ ), CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD56<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,002$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> ( $p=0,0002$ ) y para las poblaciones de fenotipo deducido CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,0004$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ) y CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,007$ ).

Hemos encontrado porcentajes aumentados significativamente en la MO respecto de la SP en los individuos sanos para las subpoblaciones HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), HLA-DQ<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD19<sup>+</sup> ( $p=0,0003$ ), CD20<sup>+</sup> ( $p=0,0003$ ), sIgκ<sup>+</sup> ( $p=0,003$ ) y sIgλ<sup>+</sup> ( $p=0,0001$ ).

Hemos encontrado porcentajes disminuidos significativamente en la MO respecto de la SP en los individuos sanos para las subpoblaciones CD3<sup>+</sup> ( $p=0,001$ ), CD4<sup>+</sup> ( $p=0,006$ ), cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ), TCRαβ<sup>+</sup> ( $p=0,06$ ), CD2<sup>+</sup> ( $p=0,0000$ ), CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD56<sup>+</sup> ( $p=0,002$ ), CD57<sup>+</sup> ( $p=0,007$ ), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), TCRαβ<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,005$ ), CD56<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,007$ ) y para las poblaciones de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ).

#### 4.7.2.3. Relación entre la actividad NK y las subpoblaciones linfocitarias en la MO

Hemos encontrado correlaciones lineales significativas entre la actividad NK medida sobre la línea celular K562 y las siguientes subpoblaciones linfocitarias en la MO de los pacientes: CD16<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y aquellas de fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (tabla 14).

No hemos encontrado correlaciones significativas entre la actividad LAK espontánea medida sobre la línea celular Raji y ninguna de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

#### 4.7.2.4. Subpoblaciones linfocitarias en la MO de los pacientes cultivada con IL-2

En los pacientes se midieron los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias después de 5 días de cultivo con IL-2 (tabla 13).

No se observó ninguna correlación entre los porcentajes de las subpoblaciones en los cultivos y los porcentajes de actividad lítica sobre las líneas celulares K562 y Raji.



Se observaron incrementos porcentuales significativos en los cultivos respecto de los valores iniciales para las subpoblaciones CD8<sup>+</sup> ( $p=0,001$ ), CD2<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ), CD25<sup>+</sup> ( $p=0,004$ ), CD69<sup>+</sup> ( $p=0,0005$ ), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ) y CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ). Se observaron reducciones porcentuales significativas en los cultivos respecto de los valores iniciales para las subpoblaciones CD19<sup>+</sup> ( $p=0,0002$ ), CD20<sup>+</sup> ( $p=0,001$ ) y sIgλ<sup>+</sup> ( $p=0,03$ ).

TABLA 13

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS INICIALES Y DESPUES DE 5 DIAS DE CULTIVO CON IL-2 EN LA MO DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

SUBPOBLACIONES	Controles	Pacientes	
	CMN iniciales	CMN iniciales	Células LAK
CD3 <sup>+</sup>	60,0±13,6	61,7±19,2	75,1±19,5
CD4 <sup>+</sup>	32,5±10,0	22,6±10,3	26,3±12,9
CD8 <sup>+</sup>	28,0±8,8	35,3±14,5	49,5±13,7
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,20±0,35	0,71±0,34	0,57±0,29
TCRαβ <sup>+</sup>	56,7±13,9	56,0±18,6	67,5±21,2
TCRγδ <sup>+</sup>	5,9±3,2	6,1±6,0	12,9±10,4
CD2 <sup>+</sup>	60,0±13,4	62,6±20,7	79,5±14,2
CD16 <sup>+</sup>	10,2±4,0	12,6±9,7	17,4±11,2
CD56 <sup>+</sup>	13,9±3,3	18,9±10,5	31,9±20,1
CD57 <sup>+</sup>	8,1±6,9	15,4±11,1	20,1±10,5
CD25 <sup>+</sup>	5,7±4,9	6,6±5,5	17,1±9,0
CD69 <sup>+</sup>	13,2±6,8	20,7±12,5	46,5±15,1
HLA-DR <sup>+</sup>	32,9±9,1	53,6±16,3	59,5±14,0
HLA-DQ <sup>+</sup>	16,0±7,3	15,5±12,0	26,8±19,5
CD19 <sup>+</sup>	18,1±9,1	19,3±15,9	7,2±9,1
CD20 <sup>+</sup>	19,7±13,0	19,0±12,6	7,8±5,8
sIgκ <sup>+</sup>	6,5±2,6	5,2±4,8	3,1±4,4
sIgλ <sup>+</sup>	5,7±3,6	4,0±4,1	1,6±1,9
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25,2±7,6	32,3±13,8	43,1±15,4
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	2,7±1,7	3,0±2,1	6,5±9,2
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	3,6±4,3	5,8±7,8	8,5±6,7
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	6,6±2,8	6,8±4,8	8,8±12,2
CD4 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	1,6±2,7	2,1±4,7	2,4±2,7
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	3,5±2,3	3,8±3,7	6,9±4,6
TCRγδ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,5±4,8	3,0±6,2	2,9±3,3
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	5,1±4,0	11,0±11,5	18,4±12,4
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,7±3,1	7,8±5,6	13,5±20,2
CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,2±2,7	2,4±3,8	5,1±5,3
TCRαβ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,9±3,2	4,6±7,2	7,8±7,9

TABLA 13 (CONTINUACION)

SUBPOBLACIONES	Controles	Pacientes	
	CMN iniciales	CMN iniciales	Células LAK
CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	4,2±2,7	6,6±5,2	13,8±9,2
TCRαβ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	5,0±4,1	8,6±9,2	14,9±11,3
TCRγδ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,4±3,6	3,1±4,7	6,2±5,7
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	4,7±4,2	13,0±9,6	17,8±10,5
CD3 <sup>-</sup> CD57 <sup>+</sup>	3,4±2,9	2,4±2,7	2,2±1,6
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	1,9±1,8	2,3±2,7	5,1±6,1
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	4,4±4,8	11,2±8,4	15,0±8,4
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	7,5±2,5	7,8±5,8	11,5±8,7
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	3,1±1,8	3,9±5,1	5,5±3,7
CD56 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	3,2±2,6	4,6±5,2	6,9±4,2
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	5,5±6,2	7,9±6,7	11,0±6,3
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	2,2±3,6	1,4±1,7	4,4±5,6
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	4,2±2,2	4,9±4,2	6,1±8,8
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,0±4,2	5,6±4,3	8,1±12,6
<b>SUBPOBLACIONES DEDUCIDAS</b>			
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	1,5±2,3	2,0±4,3	2,2±2,3
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,9±1,8	1,9±3,5	4,0±4,1
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	2,2±1,2	1,9±1,6	2,8±3,6
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	4,2±2,2	4,9±4,2	6,1±8,9
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	1,1±2,0	1,9±1,9	2,1±2,1
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,2±2,7	2,4±3,8	4,8±5,1
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	1,7±2,1	4,3±5,7	8,5±6,9
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,7±1,7	2,2±1,9	5,4±8,7
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,0±4,2	5,6±4,3	8,1±12,6
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	1,1±1,5	4,3±3,8	4,4±3,8

Los resultados expresan la media (%) ± desviación estándar. Controles (n=8); pacientes (n=23).

MO, médula ósea; CMN, células mononucleares; LAK, CMN cultivadas durante 5 días con interleucina-2 (IL-2).

TABLA 14

CORRELACION ENTRE LOS PORCENTAJES DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y LA ACTIVIDAD NK SOBRE K562 A PROPORCIÓN E:D DE 80:1 EN LA MO DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

SUBPOBLACIONES	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>
CD3 <sup>+</sup>	0,051	0,82	-
CD4 <sup>+</sup>	-0,154	0,48	-
CD8 <sup>+</sup>	0,301	0,16	-
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	-0,339	0,11	-
TCRαβ <sup>+</sup>	-0,001	0,99	-
TCRγδ <sup>+</sup>	0,138	0,53	-
CD2 <sup>+</sup>	0,233	0,28	-
CD16 <sup>+</sup>	0,480	0,02	0,64
CD56 <sup>+</sup>	0,398	0,06	-
CD57 <sup>+</sup>	0,417	0,05	0,64
CD25 <sup>+</sup>	0,089	0,69	-
CD69 <sup>+</sup>	-0,014	0,95	-
HLA-DR <sup>+</sup>	0,362	0,09	-
HLA-DQ <sup>+</sup>	-0,199	0,36	-
CD19 <sup>+</sup>	-0,307	0,15	-
CD20 <sup>+</sup>	-0,370	0,08	-
sIgκ <sup>+</sup>	-0,198	0,37	-
sIgλ <sup>+</sup>	-0,281	0,19	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,243	0,27	-
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,489	0,02	0,14
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,152	0,49	-
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,727	0,000	0,48
CD4 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,182	0,41	-
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,248	0,26	-
TCRαβ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,148	0,50	-
TCRγδ <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,188	0,39	-
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,128	0,56	-
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,482	0,02	0,37
CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,169	0,44	-
CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,383	0,07	-

TABLA 14 (CONTINUACION)

SUBPOBLACIONES	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>m</i>
TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,124	0,57	-
TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,177	0,42	-
CD3 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,420	0,05	0,55
CD3 <sup>-</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,215	0,32	-
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,094	0,67	-
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,426	0,04	0,49
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,360	0,09	-
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,100	0,65	-
CD56 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,162	0,46	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	-0,069	0,75	-
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,022	0,92	-
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,692	0,000	0,40
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,516	0,06	-

SUBPOBLACIONES DEDUCIDAS

CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,186	0,39	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,092	0,68	-
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,341	0,11	-
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,692	0,000	0,40
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	-0,003	0,99	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,169	0,44	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,146	0,51	-
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,516	0,01	0,14
CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,397	0,06	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,020	0,93	-

*r* = coeficiente de correlación de Pearson; *p* = significación de la correlación; *m* = pendiente de la recta de regresión. Pacientes en post-quimioterapia (n=23).

NK, "natural killer"; E:D, efector:diana; MO, médula ósea.

## 5. DISCUSION

La posibilidad de obtener *in vitro* células "lymphokine-activated killer" (LAK) con capacidad tumoricida podría tener un valor predictivo acerca del beneficio de un tratamiento *in vivo* con células LAK o simplemente con interleucina-2 (IL-2). Existen una serie de estudios que demuestran que las células LAK de individuos sanos son capaces de lisar blastos leucémicos (86, 101-108) y que las células LAK de pacientes con leucemia aguda son capaces de lisar sus propios blastos cancerosos (85, 86, 101, 104, 105, 107-109). Estos estudios se han realizado principalmente en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y/o con enfermedad activa. Algunos ensayos clínicos con IL-2 en la leucemia aguda (92, 110, 111) demuestran que las respuestas antitumorales ocurren en pacientes con masa tumoral reducida. Por ello, es previsible obtener resultados óptimos en pacientes que, bien después de QT o bien de TAMO, se encuentren en estado de remisión completa (RC).

En este estudio hemos observado que el 96% de nuestros pacientes afectados de leucemia aguda en RC no poseen actividad lítica sobre sus propios blastos. Este estado de compromiso inmunitario también se manifiesta por la falta de reactividad en un alto porcentaje de ellos frente a las células de la línea celular K562, sensible a la actividad "natural killer" (NK). Esta reactividad en algunos casos es restablecida por el cultivo de las células mononucleares (CMN) con IL-2.

Algunos estudios apuntan hacia la existencia de células LAK espontáneas generadas en pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula ósea alogénico (TMO) y, con menor frecuencia, en pacientes sometidos a trasplante autólogo de médula ósea (TAMO), pero no en pacientes sometidos solamente a quimioterapia (QT) (112, 113), así como a la existencia de una asociación entre la eficacia terapéutica de la IL-2 y la presencia de niveles aumentados de células NK circulantes que ocurre después de TAMO (114). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre los pacientes sometidos a QT o a TAMO para las actividades NK y LAK. Además, encontramos una proporción de pacientes con actividad LAK espontánea tanto en pacientes sometidos a QT (10%) como en aquellos sometidos a TAMO (19%). Teniendo en cuenta nuestros resultados, las terapias de tratamiento con células LAK e IL-2, en un intento de incrementar la actividad citolítica antitumoral de estos pacientes en la defensa contra la enfermedad mínima residual, podrían realizarse en ambas fases.

Desde un punto de vista inmunológico la actividad lítica sobre las líneas celulares K562 y Raji refleja un estado de capacidad inmunitaria inespecífica o generalizada, mientras que la actividad lítica sobre los blastos leucémicos refleja un estado de capacidad inmunitaria específica respecto de la enfermedad. Puesto que no siempre es posible disponer de blastos leucémicos para conocer los niveles de reactividad específica, es esencial encontrar una relación entre la actividad de las células LAK sobre las líneas celulares K562 y Raji, y sobre los blastos leucémicos autólogos. Nosotros hemos observado que en aquellos pacientes en los cuales la actividad de las células LAK generadas *in vitro* sobre K562 y/o Raji fue menor o igual al 40% de lisis no se desarrolló actividad lítica sobre blastos autólogos (menor del 10% de lisis). Este dato refleja la existencia de un grupo de pacientes en los cuales se da un compromiso inmunitario mayor debido probablemente a un defecto en la generación de células LAK. Este fenómeno podría estar en relación con la menor duración de la RC en enfermos con actividad LAK baja sobre diferentes células diana (107). En aquellos pacientes en los cuales la actividad de las células LAK generadas *in vitro* sobre K562 y/o Raji fue mayor del 40% de lisis se generó una actividad lítica sobre los blastos autólogos (mayor o igual al 10% de lisis) en el 46% de estos casos, mientras que en el restante 54% los niveles no variaron por efecto de la IL-2. De este modo, en este grupo de pacientes, en que es posible generar una reactividad inespecífica, podemos diferenciar a su vez dos estados de compromiso inmunitario: primero, un estado en el que se puede potenciar la respuesta específica frente a la enfermedad; y segundo, un estado en el que, o bien existe un defecto en el mecanismo de reconocimiento autólogo o bien hay una resistencia de los blastos a la lisis (102). Las células LAK generadas en individuos sanos son capaces de lisar a un 82% de las muestras de blastos leucémicos según nuestros resultados, demostrando que estos blastos son sensibles a la lisis.

En el primer grupo de pacientes con baja actividad lítica sobre K562 y Raji generada por la IL-2 podríamos inducir que el tratamiento con IL-2 no sería efectivo. No obstante, los resultados obtenidos *in vitro* pudieran no reflejar la verdadera respuesta que se generase *in vivo* mediante el tratamiento con esta interleucina, ya que los mecanismos que determinan la ausencia de reactividad y/o tolerancia inmunológica a las células transformadas malignamente son muy numerosos y variados (115). Sin embargo, los ensayos clínicos realizados (116, 117) apuntan, en líneas generales, a la existencia de un valor predictivo de la actividad generada *in vitro* y la respuesta a la terapia con IL-2 en estos pacientes.

La observación de una mayor actividad citolítica sobre los blastos leucémicos por las células LAK alogénicas de individuos sanos que por las células LAK autólogas ofrece apoyo a la hipótesis de que células NK activadas podrían funcionar como efectores en el efecto del injerto contra la leucemia observado en el TMO alogénico.

La capacidad potencial de generar actividad citolítica *in vitro* mediante el empleo de IL-2, apoya la realización de tratamientos con IL-2 sola o combinada con células LAK en la lucha frente a la enfermedad mínima residual en los pacientes afectados de leucemia aguda linfoblástica (LLA) y LMA tanto en la fase de post-QT como en la de post-TAMO.

En el estudio sobre el estado de las subpoblaciones linfocitarias en estos pacientes hemos encontrado correlaciones lineales positivas entre los porcentajes de aquellas con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y los porcentajes de actividad NK obtenidos para las CMN de la sangre periférica (SP) en los pacientes con leucemia aguda en RC después de QT y de TAMO y en los individuos sanos. Las subpoblaciones con fenotipo deducido cuyos porcentajes se correlacionaron linealmente con los porcentajes de actividad NK fueron CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (aunque en el grupo post-QT no alcanzó el valor de significación estadística), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. aunque los valores medios de estas subpoblaciones no difirieron significativamente en los tres grupos estudiados.

Nuestras observaciones y las de otros autores (84, 85, 87, 107, 118) indican que la actividad NK está disminuida en los pacientes con leucemia aguda en RC. El estudio de regresión lineal nos demuestra que esta disminución de la actividad NK, patente en que las rectas de regresión tuvieron pendientes menores para los dos grupos de pacientes que para el grupo control, no se debe a descensos en los porcentajes de las subpoblaciones correlacionadas con la actividad NK, que no difieren significativamente en los tres grupos estudiados, y por tanto debe imputarse a defectos en la funcionalidad de las células NK en los pacientes. El grado de compromiso inmunitario varía de unos enfermos a otros dentro de cada grupo estudiado, ya que los coeficientes de correlación fueron inferiores respecto del grupo control. Además el grado de compromiso inmunitario no parece estar en relación con el tipo de leucemia aguda que padecen estos enfermos (LLA o LMA) ni con la fase de tratamiento (post-QT o post-TAMO).





Subpoblaciones linfocitarias con los fenotipos CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> han sido purificadas de la SP y desarrollan actividad NK (22, 119). Dentro de este grupo se han separado dos tipos de subpoblaciones por la expresión de moléculas CD8: CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>-</sup>, ambas con actividad NK (120, 121). La correlación entre la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y la actividad NK que hemos observado revela que esta subpoblación posee actividad NK y probablemente exprese mayoritariamente moléculas CD56 y/o CD16, como sugiere el hecho de que los porcentajes medios de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ofrecen un alto grado de coincidencia con los porcentajes de las subpoblaciones deducidas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> en todos los grupos estudiados.

Ensayos de purificación de las subpoblaciones celulares y de establecimiento de líneas celulares han demostrado que las subpoblaciones con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> también desarrollan actividad NK aunque en niveles inferiores a las CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (122-125). Nosotros no hemos encontrado correlación entre los porcentajes de las subpoblaciones globales CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y de actividad NK. La falta de correlación podría ser debida a que la actividad NK detectada por los anteriores autores sea desarrollada por uno o varios subgrupos linfocitarios, en función de la expresión diferencial de otros marcadores inmunológicos, dentro las poblaciones CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. Igualmente no hemos encontrado una correlación entre la población CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y la actividad NK en todos los grupos estudiados. Esta población comprendió el 64,7-79,6% de la población CD16<sup>+</sup> global y el 46,3-53,3% de la población CD56<sup>+</sup>. La ausencia de correlación entre esta población y la actividad NK, asimismo, podría ser debido a la posible heterogeneidad de las subpoblaciones linfocitarias con este fenotipo.

Existió correlación entre la actividad NK y las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> en los pacientes, aunque en el grupo post-TAMO el coeficiente de correlación fue bajo. Se conoce que la mayor parte de la subpoblación CD57<sup>+</sup> forma parte de la población T CD3<sup>+</sup> (126) y sólo una fracción comparte los antígenos CD16 (según nuestros resultados entre 23,9-43,0% para los distintos grupos) y CD56 (entre 23,1-54,0%).

La valoración de los niveles de las subpoblaciones linfocitarias con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, así como de aquellas con fenotipo deducido CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>

representa un parámetro aproximativo del nivel de la actividad NK tanto en los individuos sanos como en los pacientes con leucemia aguda. En consecuencia este análisis puede permitirnos, mediante una técnica sencilla y segura, conocer el grado de compromiso inmunitario en estos pacientes, así como valorar el nivel potencial de precursores de la actividad LAK en los casos en que se desee administrar una terapia con IL-2.

La actividad LAK representa una forma de citotoxicidad generada en cultivo a corto plazo con IL-2 a partir de CMN no sensibilizadas previamente que es independiente de los mecanismos de reconocimiento a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Esta actividad se pone de manifiesto sobre dianas resistentes a la actividad NK, como es la línea celular Raji. En nuestro estudio, los porcentajes de actividad citolítica en CMN no estimuladas con IL-2 sobre células Raji o actividad LAK espontánea no se correlacionaron significativamente con los porcentajes de ninguna de las subpoblaciones linfocitarias en los tres grupos estudiados. Sin embargo, en los dos grupos de pacientes, post-QT y post-TAMO, la actividad LAK espontánea se correlacionó con las subpoblaciones de fenotipo  $CD56^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD56^+$  y  $CD3^+CD57^+$ , así como con aquellas con fenotipo deducido  $CD3^+CD4^+CD8^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$  y  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$ . Estos resultados sugieren que las mismas subpoblaciones son responsables de la actividad NK y de la actividad LAK. En el grupo post-TAMO los porcentajes de la subpoblación  $CD3^+CD16^+$  también se correlacionaron con los porcentajes de actividad LAK espontánea y en el grupo control las subpoblaciones  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD56^+$  y  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$  se correlacionaron con una significación de  $p < 0,1$ .

Esta identificación entre las subpoblaciones responsables de la actividad NK y la actividad LAK espontánea podría sugerir que frente a una y otra diana tumoral se desarrollan los mismos mecanismos líticos aunque con distinta eficiencia. En apoyo de esta hipótesis está el dato de que los porcentajes de actividad lítica sobre K562 y Raji estuvieron correlacionados en los dos grupos de pacientes y en los individuos sanos antes y después de incubarse con IL-2. Como ocurría para la actividad NK, en nuestro estudio la actividad LAK espontánea podía ser desarrollada por subpoblaciones  $CD8^+$ , y se ha sugerido que su mecanismo de reconocimiento es también independiente de la expresión de antígenos del MHC de clase I en la diana tumoral (113).

La ausencia de una buena correlación entre la actividad LAK espontánea y las subpoblaciones linfocitarias en el grupo control, a diferencia de lo observado para la actividad NK, fue debida probablemente a la resistencia de las células Raji a ser lisadas por las CMN de los individuos sanos. En los dos grupos de pacientes, post-QT y post-TAMO, las correlaciones fueron más significativas. Esto pudo ser debido a que, en primer lugar, el tamaño de la muestra en ambos grupos de pacientes fue mayor que en el grupo control y, en segundo lugar, existieron fracciones de pacientes en ambos grupos que manifestaron una actividad LAK espontánea aumentada. Estos pacientes verificaron los mayores aumentos de las subpoblaciones señaladas y, en consecuencia, podrían haber contribuido a que la correlación entre ambos parámetros haya sido más significativa en ambos grupos.

En los cultivos de las CMN de SP con IL-2 hemos observado aumentos significativos en los porcentajes de las subpoblaciones de origen T  $CD8^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  y  $CD4^+CD8^+$ . Otros autores han observado aumentos en las poblaciones T  $CD5^+$  (35) y  $CD8^+$  (127, 128). Puesto que el cultivo a corto plazo con IL-2 produce una pérdida celular significativa según nuestros resultados y los de otros autores (129, 130), el aumento porcentual de dichas subpoblaciones podría ser explicado por su crecimiento o simplemente por su enriquecimiento, ya que otras subpoblaciones, como la mayoría de las que hemos relacionado con las actividades NK y LAK espontánea, sufren un descenso en el cultivo. Algunos autores han observado que el cultivo con IL-2 induce el crecimiento de la población  $CD56^+$ , pero a un plazo más largo (131, 132).

Algunos investigadores, mediante experimentos de purificación de determinadas subpoblaciones linfocitarias con AcMo y su posterior cultivo con IL-2 han mostrado que subpoblaciones linfocitarias son precursoras de la actividad LAK. La mayor capacidad generadora de actividad LAK se ha asociado con precursores con fenotipo NK (NK-LAK)  $CD3^+CD56^+$  y/o  $CD16^+$  (35, 133-135), que pueden o no expresar el marcador  $CD8$ . Una proporción menor de la actividad LAK puede ser generada por subpoblaciones con fenotipo T (T-LAK)  $CD3^+CD16^-$  (127). Nosotros hemos encontrado porcentajes medios similares de las distintas subpoblaciones precursoras NK-LAK en los dos grupos de pacientes y en el grupo control, resultado que concuerda con que en la mayoría de pacientes se pueda generar actividad LAK con alta eficiencia. Sin embargo existe una fracción de pacientes que muestran una incapacidad inmunitaria para generar actividad LAK, puesto que no alcanzan

los niveles normales de lisis sobre K562 y/o Raji (>40%), a pesar de tener porcentajes normales de las subpoblaciones precursoras NK-LAK.

Según se demuestra en experimentos de purificación de las subpoblaciones resultantes del cultivo con IL-2, las células efectoras de la actividad LAK mantienen el fenotipo inicial de células NK o T (22, 35, 36). Los efectores LAK más potentes son aquellos con fenotipo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, que proceden de subpoblaciones con el mismo fenotipo, es decir, no adquieren marcadores de serie T, aunque también existen efectores T-LAK (134-137). Sin embargo, estudios realizados en CMN murinas han mostrado una modulación en la expresión de determinados marcadores tanto a partir de precursores NK-LAK como T-LAK en correlación con la adquisición de la capacidad citolítica, como por ejemplo la expresión del marcador NK1.1 por una subpoblación con fenotipo inicial CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> (138).

Nosotros no hemos observado un crecimiento de los efectores LAK con fenotipo NK. Sin embargo, el aumento de la actividad LAK en cultivo a corto plazo con IL-2 se correlacionó con un aumento porcentual de los marcadores de activación CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup>. Se ha comprobado que la expresión de estos marcadores puede ser inducida tanto en la activación linfocitaria mediada por el MHC o independiente del MHC, incluyendo la activación NK (128, 130, 139-142).

El aumento en la expresión de moléculas CD25 podría deberse a la inducción del receptor de alta afinidad para la IL-2 en la superficie linfocitaria (143-145). Los antígenos CD69, antígeno de activación temprana, y HLA-DR podrían estar implicados en la regulación de la activación linfocitaria. Según nuestros resultados, aquellos pacientes con peor inducción de la actividad LAK *in vitro* son precisamente los que expresan dichos marcadores en porcentajes menores después del cultivo con IL-2. Ambos datos reflejan la dificultad en la respuesta linfocitaria a la IL-2 en esta fracción de pacientes.

Los distintos subtipos de células efectoras LAK son más selectivos en su repertorio lítico de lo que en principio pareció evidenciarse. Se ha observado que los efectores NK-LAK ofrecen un rango más amplio de lisis sobre dianas tumorales, incluyendo K562 y Raji, que los efectores T-LAK (37, 127, 146, 147). Esta heterogeneidad funcional parece acompañarse de una expresión morfológica. Nosotros hemos comprobado que las células

LAK manifiestan un aumento de tamaño respecto de los linfocitos quiescentes iniciales. Según un estudio reciente, los efectores NK-LAK tienen un tamaño mayor que los efectores T-LAK y ambos tipos celulares lisan con distinto rango de especificidades (148). La utilización de distintas dianas tumorales podría explicar los resultados contradictorios existentes en la literatura acerca de la contribución relativa de los efectores T y NK al fenómeno LAK (22, 36, 136), así como las discrepancias entre los índices de actividad LAK observadas por nosotros y otros autores (112, 113).

Conocer los niveles de células NK circulantes podría tener un beneficio si, tras determinar en qué momento están más elevadas, pretendemos potenciar su actividad con el empleo de IL-2 *in vivo*. Por ello, el estudio de la reconstrucción inmunitaria después del TAMO, interesante bajo diversos puntos de vista, puede tener una aproximación terapéutica. Nosotros hemos estudiado la evolución de las subpoblaciones linfocitarias en los pacientes trasplantados desde una fase de aplasia medular y periférica hasta dos años post-TAMO.

La población T evolucionó con alteraciones notables. Las subpoblaciones de fenotipo CD3<sup>+</sup>, TCRαβ<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> experimentaron profundos descensos y, aunque hacia finales del segundo año parecieron iniciar una recuperación, no consiguieron recuentos ni porcentajes normales en los dos años de seguimiento. La subpoblación CD8<sup>+</sup>, por el contrario, estuvo normal o elevada desde fases tempranas del post-TAMO. Como consecuencia, se registró una inversión del cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, que en los individuos normales y, en general, en los pacientes tratados sólo con QT, es superior a 1,0. Esta inversión se mantuvo hasta la mitad del segundo año. La inversión CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> fue inicialmente referida en el TMO alogénico, según algunos autores en asociación a la enfermedad del injerto contra huésped (EICH) (149, 150) y a la infección por citomegalovirus (151, 152). Sin embargo, otros autores no encuentran tal correlación (153-155). Estudios más recientes realizados tanto en TMO alogénico (156-159) como en el TAMO (160, 161) apoyan consistentemente que la inversión CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> es consecuencia de la regeneración normal del sistema inmunitario, en línea con los resultados obtenidos ahora por nosotros. En la fase de QT hemos observado un descenso significativo de la población CD4<sup>+</sup>, que se acentúa significativamente después del TAMO. Creemos que la terapia citorreductora más agresiva administrada en el TAMO ralentiza la recuperación posterior de la población CD4<sup>+</sup> y da lugar a la inversión prolongada del cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

El marcador CD2 es expresado por las células T y NK. Al ser la población T proporcionalmente muy superior a la población NK, su descenso implica la disminución concomitante de la subpoblación CD2<sup>+</sup>, que a los dos años post-TAMO aún no ha alcanzado los niveles normales.

La población B, analizada con los marcadores CD19, CD20 y las sIgκ y λ, recuperó porcentajes normales a partir del segundo mes, los recuentos normales a partir del tercer mes y sufrió una elevación progresiva durante todo el periodo de estudio. Este resultado en la regeneración inmunitaria tras TAMO no se ha reflejado previamente en la literatura. En cambio, algunos estudios en el TMO alogénico muestran la misma observación (157, 159). En nuestro estudio, este aumento en la población B se verifica manteniendo un equilibrio en la proporción sIgκ<sup>+</sup>:sIgλ<sup>+</sup> de aproximadamente 2:1. No sabemos si este aumento en la proporción de las células B podría ser una respuesta compensatoria a la funcionalidad defectuosa de la inmunidad humoral que se observa en los primeros años después de un trasplante de médula ósea (162).

Las subpoblaciones NK, definidas por la expresión de los marcadores CD16, CD56 y CD57, recuperaron rápidamente sus porcentajes normales y estuvieron relativamente aumentadas durante los 15 primeros meses post-TAMO. Tuvieron recuentos normales a partir de los meses tercero, quinto y segundo, respectivamente, y alcanzaron máximos, aunque no significativamente diferentes de los recuentos normales, en distintos momentos dentro del primer año post-TAMO. No obstante, estos marcadores, globalmente, no se han correlacionado con la actividad NK. Ello podría ser debido a que todos ellos tienen un componente T CD3<sup>+</sup> y un componente NK CD3<sup>-</sup>. La fracción T es mayoritaria dentro de la subpoblación CD57<sup>+</sup> tanto en los pacientes como en los individuos sanos. Dentro de las subpoblaciones CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup>, nosotros hemos observado aumentos de CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, concomitantes a aumentos de TCRαβ<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y TCRαβ<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, en los pacientes tratados con QT respecto de los pacientes sometidos a TAMO y de los individuos sanos. Entre los dos últimos no encontramos diferencias significativas. Por lo tanto, la determinación de los porcentajes de las subpoblaciones CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup> globales como subpoblaciones NK sería más aproximativa en el post-TAMO que en post-QT.

Mayor interés tiene analizar la evolución de las subpoblaciones CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>

CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, que nosotros hemos correlacionado con la actividad NK en el post-TAMO. La subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ofrece un máximo relativo transitorio al sexto mes post-TAMO, mientras que las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> obtuvieron un máximo relativo, también transitorio, al tercer mes post-TAMO, sin diferir significativamente de los niveles normales en otros momentos. En recuentos absolutos tuvieron valores normales a partir del quinto mes y alcanzaron valores máximos, aunque no significativamente diferentes de los recuentos normales, entre los meses noveno y duodécimo. En cuanto a las subpoblaciones de fenotipo deducido relacionadas con la actividad NK, la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> estuvo relativamente elevada desde el sexto mes hasta el primer trimestre del segundo año post-TAMO, con un máximo relativo en el mes décimosegundo, la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> tuvo un máximo relativo transitorio al tercer mes post-TAMO y la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> estuvo relativamente aumentada en los meses tercero, sexto, noveno, undécimo y duodécimo. En recuentos absolutos tuvieron una evolución similar a las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.

Numerosos estudios observan un aumento temprano de células con características morfológicas o fenotípicas de las células NK después de TMO alogénico (159, 163, 164) o de TAMO (113, 128, 160, 161, 165-167). Este aumento, según algunos autores, se correlaciona con una normalización de la actividad NK (113, 160), aunque según otros, estas células NK tienen una funcionalidad y una capacidad precursora de la actividad LAK disminuidas hasta al menos el tercer mes post-TAMO (112, 163). Estos últimos resultados están en consonancia con nuestras observaciones, puesto que nosotros encontramos que entre el tercero y el sexto mes post-TAMO las subpoblaciones correlacionadas con la actividad NK experimentaron máximos relativos y una normalización en recuentos absolutos.

Según algunos estudios, en el TMO alogénico existe una correlación entre la aparición de la EICH y un aumento de la actividad NK (168), aunque otros estudios contradicen que la EICH implique un aumento de la actividad NK (169). Recientemente se ha sugerido que en el TMO alogénico se produce una elevación de la actividad NK independientemente de la aparición de la EICH (112).

La expresión de moléculas HLA-DR y HLA-DQ en el post-TAMO estuvo muy aumentada durante todo el periodo de estudio. Esta elevación puede, en parte, explicarse por

la expresión característica de estos marcadores por las poblaciones B, que experimentan un fuerte aumento en el post-TAMO, aunque otros autores también la han observado en relación a una activación de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup> (161).

Hemos investigado si existía alguna relación entre la evolución de las subpoblaciones relacionadas con la actividad NK y la evolución clínica de los pacientes. En 4 de las 5 recidivas observadas en el periodo de seguimiento dichas subpoblaciones estuvieron relativamente bajas precediendo a la recidiva y un paciente tenía estas subpoblaciones con niveles normales. Sin embargo, hemos observado que algunos pacientes también han tenido una evolución con estas subpoblaciones bajas y no han recaído. Por otro lado, ningún paciente ha sufrido una recaída cuando estas subpoblaciones han estado altas. Estos resultados parecen sugerir una relación entre la existencia de porcentajes elevados de dichas subpoblaciones y la permanencia en estado de RC de estos pacientes, aunque sería necesario estudiar una muestra mayor para establecer conclusiones firmes.

Nuestros resultados sugieren que una inmunoterapia con infusión de IL-2 y/o células LAK para consolidar la RC tendría un efecto más potente si comenzara cuando las células con actividad NK, precursoras de la actividad LAK, estuvieran más elevadas, después del segundo mes post-TAMO.

Nuestra primera experiencia clínica con el empleo de IL-2 *in vivo* fue el caso de un niño con LMA M5 que había sufrido una recidiva 5 meses después de recibir un TAMO. En recaída se le realizó un 2º TAMO con la fracción de MO de reserva y entró en RC. Este paciente había mostrado *in vitro* capacidad de generar células LAK reactivas frente a sus propios blastos. Con el propósito de intensificar la remisión en este paciente con alto riesgo de recidiva, decidimos utilizar una terapia con células LAK e IL-2. Nuestros estudios *in vitro* nos habían mostrado que las células LAK generadas a partir de individuos sanos presentaban una actividad citolítica sobre los blastos y las líneas celulares K562 y Raji superior a los propios pacientes. Por otro lado, el paciente presentaba una intensa trombocitopenia que nos previno de la realización de leucoféresis para una terapia con células LAK autólogas. Por estas razones elegimos una terapia con IL-2 y células LAK alogénicas procedentes de su padre. Como resultado, obtuvimos una respuesta inmunológica muy potente con la elevación de las subpoblaciones linfocitarias que hemos correlacionado con la actividad NK y de la



actividad citolítica sobre diversas dianas tumorales incluyendo blastos LMA-M5 alogénicos. Estas subpoblaciones permanecieron elevadas durante varios meses y pudieron haber mantenido en el paciente un estado de capacidad inmunitaria frente a la leucemia residual como podría sugerir que una recaída parcial sobrevino después de que disminuyeran hasta valores inferiores a los normales. Las células LAK paternas no fueron detectadas en la SP del paciente los días del tratamiento +13 y +49. Esto sugiere que pudieron ser rechazadas por su sistema inmunitario y explica que no observásemos signos de EICH. La elevación de las actividades NK y LAK y de las subpoblaciones mencionadas parecen haber sido consecuencia fundamentalmente de la administración de IL-2, aunque no podemos excluir la posibilidad de que las células LAK alogénicas hayan contribuido al estado generalizado de activación inmunitaria y hayan aportado algún efecto antileucémico. No obstante, si fueron rechazadas, no creemos que pudieran ejercer un efecto citolítico directo. El paciente se mantuvo en RC durante un periodo más largo (12 meses) que en el primer TAMO, probablemente por la potente reacción inmunitaria producida por el tratamiento.

Posteriormente iniciamos un protocolo de tratamiento con la infusión intravenosa de IL-2 en el post-TAMO. En este trabajo hemos presentado los resultados correspondientes a los cinco primeros pacientes, todos ellos diagnosticados de LLA. Al igual que en el paciente tratado con IL-2 y células LAK alogénicas, hemos observado una profunda alteración de las subpoblaciones linfocitarias y de la actividad citolítica sobre las líneas celulares K562 y Raji.

Las subpoblaciones que hemos relacionado con la actividad NK y LAK espontánea fueron las que registraron elevaciones mayores, alcanzando máximos de hasta 85% para CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, 68% para CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y 52% para CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Gran parte de las CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, la subpoblación predominante, y de las CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> eran comunes: entre el 49,6-82,7% de las CD16<sup>+</sup> y entre el 52,6-63,0% de las CD56<sup>+</sup> eran CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.

Sólo uno de los cinco pacientes sufrió una linfocitosis moderada (hasta  $5 \times 10^6$  linfocitos/ml) al final de cada ciclo de IL-2. Las linfocitosis han sido descritas en el tratamiento con IL-2 coincidiendo con la interrupción de la administración de IL-2 (170). En este paciente la subpoblación T CD3<sup>+</sup> no experimentó cambios en valores absolutos aunque sí una disminución en porcentaje frente al avance de las subpoblaciones NK. En el resto de pacientes se produjo una disminución de la población T durante el tratamiento con IL-2.

La subpoblación CD8<sup>+</sup> aumentó significativamente durante el tratamiento, dando lugar al descenso del cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, pero estas CD8<sup>+</sup> son mayoritariamente CD3<sup>-</sup> (hasta un 70% por término medio, partiendo de un 22,4% al inicio). Otros autores también refieren una elevación dramática de la expresión de CD8 después del tratamiento con IL-2 *in vivo* (171-175). Existió una estrecha correlación entre los porcentajes de las subpoblaciones CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que sugiere una identificación de las mismas. La subpoblación CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> llegó a representar hasta un 67% de las CD56<sup>+</sup>, partiendo de un 34% inicial. La separación de las subpoblaciones CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> de las CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> generadas por infusión de IL-2 *in vivo* ha demostrado que ambas son igualmente citotóxicas (171).

En resumen, las poblaciones que registraron las mayores expansiones *in vivo* gracias a la IL-2 fueron aquellas con el fenotipo deducido CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, aunque también se generaron a menor nivel las subpoblaciones CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>.

Analizadas en función de la intensidad de su expresión observamos que la subpoblación CD56<sup>+</sup> más expandida *in vivo* es CD56<sup>brillante+</sup>, que llega a ser 4-5 veces superior que la subpoblación CD56<sup>mate+</sup>. La población CD16<sup>+</sup> más expandida es CD16<sup>mate+</sup>. En función de la expresión de CD16, las subpoblaciones CD56<sup>+</sup> más aumentadas fueron CD16<sup>mate+</sup>CD56<sup>brillante+</sup> y CD16<sup>-</sup>CD56<sup>brillante+</sup>, mientras que las CD16<sup>brillante+</sup>CD56<sup>mate+</sup>, mayoritarias antes de iniciar la terapia, permanecieron estacionarias.

Podemos apreciar que la intensidad de expresión de las moléculas CD16 y CD56 es inversa, como otros autores han observado (172, 173). Es llamativo que las dos subpoblaciones expandidas *in vivo* por el efecto de la IL-2 apenas están presentes en la SP de los individuos normales (<1%) (23), aunque se ha observado que la subpoblación CD16<sup>mate+</sup>CD56<sup>brillante+</sup> puede estar elevada en una proporción de pacientes sometidos a TAMO (166).

La expansión con niveles parecidos de las subpoblaciones CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> observada por nosotros ofrece un ligero contraste con los resultados de otros autores, que muestran bien una dominancia de las subpoblaciones CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (171, 175, 176) o bien de las CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (132) post-IL-2 *in vivo*.

La subpoblación CD8<sup>+</sup> expandida *in vivo* fue CD8<sup>mate+</sup>, que corresponde a la expresión de homodímeros CD8 $\alpha$ CD8 $\alpha$  con baja intensidad característicos de las células NK CD8<sup>+</sup> (121), mientras que la población CD8<sup>brillante+</sup>, que corresponde a la expresión de heterodímeros CD8 $\alpha$ CD8 $\beta$  propios de las células T CD8<sup>+</sup>, disminuyó relativamente. Se desconoce la función de esta proteína en la superficie de las células NK.

La terapia con IL-2 *in vivo* en nuestros pacientes produjo una elevación de las actividades NK y LAK espontánea respecto de los valores pre-infusión iniciales, como también han observado otros grupos investigadores en la terapia con IL-2 en el cáncer y, en particular, en las hemopatías malignas, tanto en fase de post-QT como de post-TAMO (38, 110, 111, 171, 173-175, 177, 178).

Ensayos de actividad citotóxica a la dilución límite han mostrado que la actividad LAK aumentada tras la infusión de IL-2 se debe no sólo a la elevada proporción de los efectores CD56<sup>brillante+</sup>, sino también a su mayor potencia (179), en contraste con la observación de una mayor actividad lítica de las CD56<sup>mate+</sup> respecto a las CD56<sup>brillante+</sup> en las CMN quiescentes en individuos sanos (22). Estas CD56<sup>brillante+</sup> quiescentes tienen mayor capacidad proliferativa y actividad lítica después de ser activadas con IL-2 *in vitro* (22, 23, 167), efecto semejante al observado con la terapia *in vivo*.

Los precursores de la actividad LAK eran rápidamente inducidos tras una breve incubación *in vitro*, como han observado también otros autores (110, 173-175, 180-183). Se ha demostrado que la actividad LAK puede ser inducida a través del receptor para la IL-2 de afinidad intermedia (50, 182). Las células CD56<sup>+</sup> expandidas *in vivo* presentan una expresión aumentada 3-4 veces de la cadena  $\beta$  del receptor para la IL-2 respecto de las CD56<sup>+</sup> quiescentes pero los ensayos de afinidad por la IL-2 muestran una reducción de los receptores de afinidad intermedia de aproximadamente 10 veces (183). Por lo tanto, se deduce que existe una gran proporción de receptores no funcionales. El cultivo de estas células con IL-2 no induce la formación de receptor de alta afinidad, pues no se induce la expresión de CD25 (182). El agudo incremento en la actividad citolítica producido en estas células por la incubación breve con IL-2 podría ser causado por una inducción de la funcionalidad de los abundantes receptores de afinidad intermedia, por un mecanismo no aclarado en el que quizás podría intervenir la cadena  $\gamma$  del receptor para la IL-2.

No existe unanimidad respecto al origen de las células CD56<sup>brillante+</sup> generadas mediante la terapia *in vivo* con IL-2. En la SP normal existe un predominio de las células NK más potentes citolíticamente, CD56<sup>mate+</sup>, que ha inducido a pensar que las CD56<sup>brillante+</sup>, menos activas pero con mayor capacidad proliferativa, son precursoras de aquellas (22). La evolución de una a otra implicaría, además de la modulación de CD56, la pérdida de expresión del receptor para la IL-2 de alta afinidad y el aumento de expresión de CD16. En contraste, el cultivo *in vitro* de células CD56<sup>mate+</sup> purificadas da lugar a un aumento en la expresión de CD56, es decir, se hacen *brillantes*, pero con una elevada efectividad citolítica y sin pérdida en la expresión de CD16 (23). Este dato apoya la hipótesis contraria. Una hipótesis alternativa a las anteriores es que la IL-2 *in vivo*, más que modular la expresión de estos marcadores, podría expandir e inducir la expresión periférica de posibles células precursoras con las mismas características fenotípicas que normalmente no se encuentran en la circulación (172).

Un paciente inició el tratamiento con IL-2 con una elevada proporción de la subpoblación CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (25%). La expresión de CD16 era *mate*. Aunque algunos autores han mostrado que esta subpoblación puede tener actividad NK (23), nosotros hemos comprobado que no se activa ni prolifera *in vivo* por efecto de la IL-2, y se mantuvo entre el 12-18% durante el tratamiento. Caligiuri *et al.* también refieren un caso similar (175). En el resto de pacientes las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sufrieron retrocesos que las llevaron prácticamente a su desaparición de la circulación.

La subpoblación CD2<sup>+</sup> aumentó considerablemente por efecto de la IL-2 *in vivo*. La molécula CD2 está implicada en fenómenos de interacción intercelular (184) y podría contribuir al proceso de activación de las células NK (185). La expansión de las subpoblaciones CD2<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> observada *in vivo* se correlaciona con los elevados niveles de citotoxicidad, como han observado algunos autores (132, 172, 175).

Nosotros no hemos observado cambios significativos en la expresión de CD25. Algunos autores refieren aumentos de este marcador dentro de la subpoblación T CD4<sup>+</sup> en la terapia con IL-2, pero estas subpoblaciones no tienen actividad NK ni proliferan con IL-2 *in vitro* (111, 176, 178, 186). En cambio, las células NK no expresan CD25 ni antes ni durante o después de la terapia, ni cultivando ulteriormente con IL-2 *in vitro* (50, 132, 183).

El estado de activación observado en los pacientes tratados con IL-2 podría haber tenido un efecto antileucémico. Dos de los cinco pacientes tratados con IL-2 sufrieron recidivas y fallecieron, uno de los cuales (paciente diagnosticado de la agresiva leucemia LLA-L3) fue aquel que menores niveles de actividad citolítica y de las subpoblaciones NK consiguió (máximo 25% de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Sin embargo, el otro paciente recayó pocos días después de finalizar el tratamiento, habiendo registrado en el estudio de subpoblaciones y actividad NK realizado tras el tratamiento unos valores de activación inmunitaria muy elevados.

Por ahora los ensayos clínicos con IL-2 en la leucemia, tanto en post-QT (187) como en post-TAMO (188) no han aportado un buen índice de remisiones duraderas, aunque un reciente ensayo clínico no aleatorio muestra una ventaja terapéutica del tratamiento con IL-2 en el post-TAMO respecto del TAMO sólo (93). Nuestro seguimiento es aún breve para obtener conclusiones en este sentido.

El TAMO es una medida terapéutica de soporte que permite salvaguardar, mediante su extracción y criopreservación, la MO del propio paciente antes de que este reciba altas dosis de QT/RT destinadas a erradicar la población tumoral residual. Sus ventajas principales respecto al TMO alogénico son una amplia aplicabilidad y la ausencia de aparición de la EICH y, por tanto, una menor morbilidad. Sus inconvenientes principales son la ausencia del efecto antileucémico asociado al TMO alogénico y la posibilidad de reinfundir al paciente una MO con una contaminación leucémica residual.

El tratamiento con IL-2 de la MO está dirigido a la eliminación de la población leucémica residual. Nosotros presentamos los resultados de una primera fase de estudio *in vitro* de tratamiento con IL-2 de muestras de concentrados de CMN de MO de pacientes obtenidos mediante el separador celular CS-3000. Esta metodología, respecto de la que empleamos en nuestro estudio de la SP (obtención de CMN mediante separación en gradiente de Ficoll), adquiere un valor más práctico en el enfoque de su aplicación clínica.

Hemos valorado la capacidad citotóxica generada en las CMN de MO sobre las líneas celulares K562 y Raji mediante el cultivo con IL-2 durante 1 y 5 días. En un principio estudiamos la actividad LAK generada en 5 días, que estimamos como el periodo máximo

sin necesidad de realizar un recambio en el medio de cultivo, el cual dificultaría enormemente la operatividad del procedimiento en caso de realizarse a gran escala. Como resultado, obtuvimos una actividad LAK potente aunque con una pérdida celular no despreciable (un promedio del 23%) y una disminución importante en la capacidad hematopoyética reflejado en un 68% de pérdida en promedio en los ensayos clonogénicos de precursores granulocito-macrofágicos (CFU-GM) (189, datos no mostrados).

Estos resultados hacen inviable su empleo clínico, pues obligaría a hacer extracciones de MO tres veces mayores. La necesidad de reducir en lo posible la pérdida celular y hematopoyética nos motivó para reducir el periodo de incubación hasta 1 día. Otros autores habían mostrado que en este breve tiempo de incubación con IL-2 la MO podía generar una buena capacidad citolítica sin afectación de la capacidad hematopoyética (190) y su aplicación en el TMO singénico en ratones permitía la recuperación hematológica sin diferencias respecto de la MO no tratada y con ventajas curativas (191). Nosotros hemos obtenido una actividad citolítica significativamente menor que la generada en 5 días pero aún muy potente, con menores pérdidas de células (18% en promedio) y de CFU-GM (37% en promedio (189, datos no mostrados)). Este periodo de incubación podría ser suficiente para la eliminación de la leucemia mínima residual, como han sugerido otros autores (192, 193).

El procesamiento de la MO para un TAMO requiere la criopreservación de la MO. Hemos observado que tras el cultivo con IL-2 durante 1 día, los procesos de criopreservación y descongelación de la MO produjeron una pérdida celular importante, de un 43% en promedio respecto de la MO cultivada. Además, las muestras de MO criopreservadas perdieron la actividad LAK que habían generado por el cultivo con IL-2. Esto sugiere que tras su reinfusión al paciente no es esperable que ejerzan *in vivo* un efecto antileucémico. Sin embargo, no se observó una pérdida adicional significativa de CFU-GM (40% en promedio respecto de la MO inicial (189, resultados no mostrados)).

El efecto de la IL-2, de las células NK y de las células LAK añadidas al cultivo de la MO ha ofrecido en la literatura resultados contradictorios sobre la hematopoyesis, estimulatorios (194, 195) e inhibitorios (196-201). Sin embargo, numerosos estudios sugieren con fuerza que no ejercen un efecto *per se* (192, 193, 202) y es la duración del cultivo el factor deletéreo determinante (190). Otros estudios también muestran que la criopreservación

de un cultivo con IL-2 da lugar a una pérdida celular y de la actividad citolítica significativas (141, 203), aunque permite el prendimiento del injerto en modelos murinos (203). Según nuestros resultados, la pérdida de capacidad hematopoyética *in vitro* en el procedimiento de cultivo de 1 día con IL-2 más criopreservación sería de aproximadamente el 50%.

El estudio de las subpoblaciones linfocitarias en la MO reflejó que en los pacientes estuvieron elevadas las subpoblaciones HLA-DR<sup>+</sup> y disminuidas las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> respecto de los individuos sanos, como habíamos observado en la SP. La comparación entre MO y SP mostró que, tanto en pacientes como en individuos sanos, las subpoblaciones T (principalmente CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, TCRαβ<sup>+</sup> y CD2<sup>+</sup>) y NK (fundamentalmente CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) estaban en proporciones menores que en la SP y las subpoblaciones B (CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, sIgκ<sup>+</sup> y sIgλ<sup>+</sup>), así como HLA-DR<sup>+</sup> y HLA-DQ<sup>+</sup>, en proporciones mayores.

Hemos correlacionado la actividad NK en la MO con prácticamente las mismas subpoblaciones que en la SP: CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, así como con CD16<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> y aquellas con fenotipo deducido complejo CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. Las proporciones de la mayoría de estas subpoblaciones estuvieron significativamente disminuidas en la MO respecto de la SP en pacientes y en individuos sanos, pudiendo esto explicar que la actividad NK inicial y la actividad inducida en cultivo con IL-2 medidas en la MO sana fuera significativamente menor que en la SP. En los pacientes la actividad NK fue menor en la MO que en la SP en valor medio, pero no alcanzó significación estadística ( $p=0,08$ ). En cualquier caso, no podemos extraer conclusiones firmes sobre la comparación entre las actividades pues los procedimientos de purificación de la SP y la MO no fueron idénticos.

Los cultivos de la MO con IL-2 mostraron un efecto sobre las subpoblaciones similar al observado para la SP, es decir, aumentos en las subpoblaciones T CD8<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, interpretables por enriquecimiento más que por crecimiento selectivo, y en la expresión de CD25<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup>. A diferencia de lo observado para la SP, en la MO no hay una elevación significativa en la expresión de HLA-DR, que es explicable teniendo en cuenta que previamente al cultivo tenía unos niveles muy elevados (54% en promedio). También se observó una disminución significativa de las subpoblaciones B, que parecen degenerar en el

cultivo con IL-2. Algunos estudios corroboran la identificación entre los efectores NK y LAK en la SP y en la MO (204-206).

En este trabajo hemos estudiado la función citotóxica natural en pacientes afectos de leucemia aguda en estado de RC desde una doble perspectiva: 1) La reactividad específica frente a los blastos leucémicos autólogos o inespecífica frente a dianas tumorales utilizadas como estándar para la actividad NK y LAK, y 2) La expresión de los antígenos de la superficie celular que identifican a las células responsables de esta función.

La determinación de los niveles que presentan ambos parámetros tiene un indudable interés clínico puesto que existen evidencias suficientes de que la función citotóxica natural es un mecanismo de defensa primordial contra el avance tumoral y puesto que actualmente disponemos de formas terapéuticas para potenciar este sistema, como la administración de IL-2.

Hemos demostrado que la IL-2 es capaz de potenciar en la mayoría de nuestros pacientes un sistema que, por lo general, está debilitado como consecuencia de la enfermedad y/o de las pautas terapéuticas que reciben, aunque sólo aproximadamente un tercio adquieren reactividad frente a sus propios blastos *in vitro*.

Hemos podido identificar qué subpoblaciones linfocitarias deberían ser monitorizadas para medir los niveles de células con actividad NK sin que sea necesario hacer un ensayo de citotoxicidad que utiliza un isótopo radiactivo, y por tanto, mediante una técnica más segura y rápida.

En el post-TAMO hemos observado que estas subpoblaciones presentaban unos niveles elevados entre los meses tercero y sexto y nuevamente al año. Puesto que cuanto menos tiempo haya transcurrido desde el TAMO teóricamente la masa tumoral residual es menor, hemos aplicado un protocolo de tratamiento con IL-2 hacia el tercer mes post-TAMO para aprovechar la recuperación de la población NK. Existen modelos animales que apoyan el empleo más temprano de IL-2 en el post-TAMO (190), pero en el hombre su aplicación no ha sido segura (93) y parece preferible esperar a una recuperación trombocitaria y de la



población NK para una administración menos arriesgada y más efectiva de IL-2 (207). En los 6 pacientes que hemos tratado con IL-2 hemos observado una potenciación de los parámetros analizados. Estos profundos cambios en el sistema inmunitario nos sugieren una acción benéfica, potencialmente curativa, en nuestros pacientes.

Hemos iniciado una serie de estudios para poder tratar la leucemia residual no sólo en el paciente, sino en la MO que se obtiene para ser trasplantada. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad terapéutica, aunque existen algunos estudios que sugieren un efecto lesivo de la IL-2 sobre células del estroma medular, como los fibroblastos (208-209), que podría impedir el prendimiento de la MO tratada con IL-2. Ulteriores estudios empleando metodologías como los cultivos a largo plazo o las técnicas moleculares para la determinación de la eliminación de la contaminación residual, deberían continuar antes de pasar a una fase clínica.

Los estudios clínicos aún han de encontrar las pautas de dosificación y duración de la administración de IL-2 y/o células LAK más efectivas. No podemos excluir la posibilidad en el futuro del empleo de otras citocinas para buscar métodos de activación antitumoral óptimos. En el TAMO se investiga actualmente la posibilidad de evitar la contaminación residual trasplantando sólo la fracción progenitora pluripotencial de la MO mediante selección con AcMo.

Nuestros resultados aportan una visión de la función citotóxica natural en los pacientes con leucemia aguda y de la evolución de ésta por la administración terapéutica de IL-2. La intención principal de estos estudios ha sido ofrecer desde el laboratorio una ayuda en las decisiones clínicas en un campo revolucionario de la terapia antitumoral.

## 6. CONCLUSIONES

1) En la mayoría de los enfermos de leucemia aguda que se someten a tratamientos de quimioterapia o trasplante autólogo de médula ósea (TAMO) existe un compromiso inmunitario en la funcionalidad citotóxica natural (NK). Mediante el empleo de interleucina-2 (IL-2) *in vitro* hemos observado un cuadro heterogéneo en la respuesta inmunitaria de estos enfermos. Una minoría de ellos presenta un compromiso NK que desde nuestro estudio consideramos "severo", ya que no son capaces de desarrollar actividad citolítica ni siquiera por el empleo *in vitro* de IL-2. En el resto de los enfermos, que representan la mayoría, la IL-2 incrementa notablemente la actividad de las células NK e incluso en una fracción de ellos induce reactividad frente a su propio tumor. Creemos, por ello, que este último grupo de enfermos es especialmente idóneo para ser tratados *in vivo* con esta linfocina en la erradicación de la leucemia residual, responsable de las recaídas y alta mortandad de estos enfermos.

2) Las subpoblaciones linfocitarias de la sangre periférica que desarrollan actividad NK poseen fenotipo inmunológico  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD16^+$  y  $CD3^+CD56^+$  y, de un modo más definido  $CD3^+CD4^+CD8^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD8^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$  y  $CD3^+CD4^+CD8^+CD56^+$ . Esta correlación ha sido establecida tanto para controles sanos como para enfermos de leucemia aguda. Las pendientes de las rectas de regresión de estas correlaciones son menores en el grupo de enfermos que en los controles sanos, revelando que el inmunocompromiso en la actividad NK observado en estos enfermos se debe a defectos en la funcionalidad de estas células.

3) La estimulación linfocitaria con IL-2 *in vitro* se manifiesta como un aumento del porcentaje de células que expresan los marcadores de activación CD25, CD69 y HLA-DR. No hemos observado proliferación de las subpoblaciones linfocitarias relacionadas con la actividad NK. Estos datos sugieren que el incremento en la actividad citolítica inducido por la IL-2 podría ser producido por inmunomodulación de las células NK.

4) Los enfermos con leucemia aguda sometidos a TAMO recuperan valores porcentuales normales de las subpoblaciones linfocitarias relacionadas con la actividad NK en el primer mes posterior al trasplante y recuentos normales en el quinto mes. Estas subpoblaciones linfocitarias experimentan un continuo crecimiento sobre los valores normales, alcanzando

dos máximos que corresponden a los meses 3-6 y 9-12. De acuerdo con estos hallazgos, diseñaremos estrategias de tratamiento *in vivo* con IL-2 durante estos periodos de tiempo.

5) En los enfermos de leucemia aguda en periodo de post-TAMO que fueron sometidos a ensayo clínico con IL-2 se produjo, por efecto de la linfocina, una marcada linfocitosis en SP debida principalmente a la proliferación de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, que previamente habíamos observado en relación con la actividad NK. Asimismo se produjo un notable incremento de la actividad NK medida por análisis citolítico. Puesto que la actividad NK es uno de los principales mecanismos, hasta ahora conocidos, de defensa antitumoral, creemos que el incremento de actividad NK, producida por la IL-2, puede conducir a periodos prolongados de remisión completa de estos enfermos. No obstante, es necesario extender este estudio en número de pacientes así como el seguimiento de los mismos para obtener datos precisos sobre la purificación antileucémica.

6) Los resultados obtenidos en la correlación de las subpoblaciones linfocitarias y la actividad NK, así como el incremento de la actividad NK inducida por el cultivo con IL-2 *in vitro* en la SP de los enfermos con leucemia aguda y los individuos sanos se reproducen también en la médula ósea (MO). Estos resultados sugieren que en el tratamiento de la MO extracorpórea con IL-2, en la realización del TAMO, podría inducir un efecto antileucémico. Sin embargo, el cultivo mantenido de la MO produce una disminución del recuento celular. Además, el proceso de la criopreservación, por razones desconocidas, produce una pérdida o inactivación de las subpoblaciones linfocitarias activadas con IL-2. Estos últimos resultados nos inducen a pensar que el tratamiento *in vivo* con IL-2 de los enfermos con leucemia aguda podría ser una terapia más efectiva que el tratamiento de la MO extracorpórea. No obstante, no excluimos la posibilidad de emplear ambos tratamientos en aquellos enfermos en los que sea posible extraer suficiente muestra de médula ósea que compense las pérdidas celulares en los procesos de cultivo y criopreservación de la misma.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. **Burnett FM.** Immunologic surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 1971; 7: 3-25.
2. **Sánchez Madrid F, Cebrián M, Landázuri MO, Serra C, Engel P, Vives J, Cabrera T, Sampalo A, Garrido F.** Report of the IV International Workshop on leukocyte differentiation antigens (Vienna, 1989). *Inmunología* 1989; 8: 35-46.
3. **Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, Schwartz RH.** Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 1987; 326: 79-81.
4. **De Villartay JP, Mossalayi D, De Chasseval R, Dalloul A, Debre P.** The differentiation of human pro-thymocytes along the TCR- $\alpha/\beta$  pathway *in vitro* is accompanied by the site specific deletion of the TCR- $\delta$  locus. *Int Immunol* 1991; 3: 1301-1305.
5. **Van Ewijk W.** T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 591-615.
6. **Shiku H, Kisielow P, Bean MA, Takahashi T, Boyse EA, Oettgen HF, Old LJ.** Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity *in vitro*. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J Exp Med* 1975; 141: 227-241.
7. **Swain SL.** Significance of Lyt phenotypes: Lyt2 antibodies block activities of T cells that recognize class I major histocompatibility complex antigens regardless of their function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7101-7105.
8. **Dialynas DP, Wilde DB, Marrack P, Pierres A, Walk KA, Havran W, Otten G, Loken MR, Pierres M, Kappler J, Fitch FW.** Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: Expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol Rev* 1983; 74: 29-56.

9. **Townsend ARM, Rothbard JM, Frances M, Gotch G, Bahadur J, Wrath D, McMichael AJ.** The epitopes of influenza nucleoproteins recognized by cytotoxic lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 1986; 44: 959-968.
10. **Mizouchi T, McKean DJ, Singer A.** IL-1 as a co-factor for lymphokine-secreting CD8+ murine T cells. *J Immunol* 1988; 141: 1571-1575.
11. **Mizuochi T, Hügin AW, Morse HC, Singer A, Buller RML.** Role of lymphokine-secreting CD8+ T cells in cytotoxic T lymphocyte responses against vaccinia virus. *J Immunol* 1989; 142: 270-273.
12. **North RJ.** Down-regulation of the antitumor immune response. *Adv Cancer Res* 1985; 45: 1-43.
13. **Mosmann TR, Coffman RL.** Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
14. **Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD.** Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987; 238: 1079-1087.
15. **Parker DC.** T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 331-360.
16. **Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Müller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH.** Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-305.
17. **Denkers EY, Badger CC, Ledbetter JA, Bernstein ID.** Influence of antibody isotype on passive serotherapy of lymphoma. *J Immunol* 1985; 135: 2183-2186.
18. **Kakiuchi T, Chesnut RW, Grey HM.** B cells as antigen-presenting cells: The requirements for B cell activation. *J Immunol* 1983; 131: 109-114.

19. **Ritz J, Campen TJ, Schmidt RE, Royer HD, Hercend T, Hussey RE, Reinherz EL.** Analysis of T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer clones. *Science* 1985; 228: 1540-1543.
20. **Trinchieri G.** Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
21. **Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH.** Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 1991; 146: 4421-4426.
22. **Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH.** The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 4480-4486.
23. **Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH.** Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-3191.
24. **Tutt MM, Kuziel WA, Hacket J, Bennet M, Tucker PW, Kumar V.** Murine natural killer (NK) cells do not express functional transcripts of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, or  $\gamma$ -chain genes of the T cell receptor. *J Immunol* 1986; 137: 2998-3001.
25. **Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI.** Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* 1973; 33: 2898-2902.
26. **West WH, Cannon GB, Kay HD, Bonnard GD, Herberman RB.** Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of the effector cells. *J Immunol* 1977; 118: 355-361.
27. **Hercend T, Meuer S, Brennan A, Edson MA, Acuto O, Reinherz EL, Schlossman SF, Ritz J.** Identification of a clonally restricted 90 kd heterodimer on two human cloned natural killer cells: its role in cytotoxic effector function. *J Exp Med* 1983; 158: 1547-1560.



28. **Biron CA, Byron KA, Sullivan JL.** Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989; 320: 1731-1735.
29. **Welsh RM.** Regulation of virus infections by natural killer cells: A review. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1986; 5: 169-199.
30. **Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J.** Human natural killer cell adhesion molecules: Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J Immunol* 1990; 145: 3194-3201.
31. **Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S.** Interleukin-2 augments natural killer activity. *Nature* 1981; 291: 335-338.
32. **Sone S, Utsugi T, Nii A, Ogura T.** Differential effects of recombinant interferons  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  on induction of human lymphokine (IL-2)-activated killer activity. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 425-431.
33. **Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A, Strausser JL, Rosenberg SA.** *In vitro* growth of cytotoxic human lymphocytes. IV. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by lymphocytes cultured in T cell growth factor. *Cancer Res* 1981; 41: 4420-4425.
34. **Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA.** Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982; 155: 1823-1841.
35. **Phillips JH, Lanier LL.** Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity. *J Exp Med* 1986; 164: 814-825.
36. **Ortaldo JR, Mason A, Overton R.** Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 1986; 164: 1193-1205.

37. **Ballas ZK, Rasmussen W.** Lymphokine-activated killer (LAK) cells. IV. Characterization of murine LAK effector subpopulations. *J Immunol* 1990; 144: 386-395.
38. **Lotze ME, Matory YL, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharow SO, Seipp CAY, Custer MC, Rosenberg SA.** *In vivo* administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells *in vivo* with recombinant IL-2. *J Immunol* 1985; 135: 2865-2875.
39. **Unanue ER.** Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 1984; 2: 395-428.
40. **Urban JL, Shephard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ, Schreiber H.** Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5233-5237.
41. **Russell SW, McIntosh AT.** Macrophages isolated from regressing Moloney sarcomas are more cytotoxic than those recovered from progressing sarcomas. *Nature* 1977; 268: 69-71.
42. **Rosenberg SA, Green EA, McGrogan M, Doyle M, Kawasak E, Koths K, Mark DF.** Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *E. coli*. *Science* 1984; 223: 1412-1415.
43. **Holbrook NJ, Smith KA, Fornace AJ, Comeau C, Wiskocil RL, Crabtree GR.** T-cell growth factor: complete nucleotide sequence and organization of the gene in normal and malignant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1634-1638.
44. **Leonard WJ, Depper JM, Uchiyama T, Smith KA, Waldmann TA, Greene WC.** A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor: partial characterization of the receptor. *Nature* 1982; 300: 267-270.
45. **Sharon M, Klausner RD, Cullen BR, Chizzonite R, Leonard WJ.** Novel



- interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions. *Science* 1986; 234: 859-863.
46. **Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, Taniguchi T.** Interleukin-2 receptor  $\beta$  chain gene. Generation of three receptor forms by cloned human  $\alpha$  and  $\beta$  chain cDNA's. *Science* 1989; 244: 551-556.
  47. **Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nakamura K, Sugamura K.** Cloning of the  $\gamma$  chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992; 257: 379-382.
  48. **Cantrell DA, Smith KA.** Transient expression of interleukin-2 receptors: Consequences for T-cell growth. *J Exp Med* 1983; 158: 1895-1991.
  49. **Liu CC, Raffi S, Granelli-Piperno A, Trapani JA, Young JDE.** Perforine and serine esterase gene expression in stimulated human T cells: Kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporin A. *J Exp Med* 1989; 170: 2105-2118.
  50. **Phillips JH, Takeshita, Sugamura K, Lanier LL.** Activation of natural killer cells via the p75 interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1989; 170: 291-296.
  51. **Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levin H, Smith KA, Ritz J.** Functional consequences of IL-2 receptor expression on resting human lymphocytes: Identification of a novel NK subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 1990; 171: 1509-1526.
  52. **Nagler A, Lanier LL, Phillips JH.** Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16<sup>+</sup> natural killer cells *in vivo*. *J Exp Med* 1990; 171: 1527-1533.
  53. **Jung LK, Hara T, Fu SM.** Detection and functional studies of p60-65 (Tac antigen) on activated human B cells. *J Exp Med* 1984; 160: 1597-1602.

54. **Malkovsky M, Loveland B, North M, Asherson GL, Gao L, Ward P, Fiers W.** Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 1987; 325: 262-265.
55. **Bennett JM, Catowsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C.** Proposals for the classification of acute leukemias: French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-458.
56. **Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, Boyd AW, Slaughenhaupt B, Park E, Jensen J, Coral F, Mayer RJ, Sallan SE, Ritz J, Schlossman SF.** B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B differentiation. *J Clin Invest* 1984; 74: 332-340.
57. **Foon KA, Todd RF.** Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 688: 1-31.
58. **Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF.** Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1588-1592.
59. **Davey MP, Bongiovani KF, Kaulfersh W, Quertermous T, Seidman JG, Hershfield MS, Kurtzberg J, Haynes BF, Davis MM, Waldmann TA.** Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement and expression in human lymphoid leukemia cells at different stages of maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8759-8763.
60. **Bennett JM, Catowsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C.** Proposed revised criteria for the classification of acute leukemia. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-625.
61. **Bennett JM, Catowsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C.** Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocytic lineage (M7). *Ann Intern Med* 1985; 103: 460-462.

62. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C.** Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991; 78: 325-329.
63. **Traweek ST.** Immunophenotypic analysis of acute leukemia. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 504-512.
64. **Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H, McCulloch EA.** Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* 1983; 61: 1138-1145.
65. **Greaves MF, Chan LC, Furley AJW, Watt SM, Molgaard HV.** Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 1986; 67: 1-11.
66. **Gale RP, Ben Bassat I.** Hybrid acute leukemia. *Br J Haematol* 1987; 65: 261-264.
67. **Casares S, Rodríguez JM, Martín A, Parrado A.** T cell receptor gene rearrangements in lymphoid and non-lymphoid leukaemias. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 119-125.
68. **Bernácer M, Bosch JM, Mestre JL, Prieto L, Sánchez Guilarte.** Leucemias agudas linfoblásticas. *Medicine (Madrid)* 1988; 12: 585-594.
69. **Fernández Rañada JM, Figuera A, Fernández Garese D, Camara R, Steegmann JL, Olmeda F.** Leucemias agudas no linfoides. *Medicine (Madrid)* 1988; 12: 570-578.
70. **Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Rongden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM.** Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-562.
71. **Gardella S.** Autotrasplante de médula ósea. Barcelona 1990.

72. **Charak BS, Choudhary GD, Tefft M, Mazumder A.** Interleukin-2 in bone marrow transplantation: preclinical studies. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 103-111.
73. **Dutcher JP, Wiernik PH, Markus S, Weinberg V, Schiffer CA, Harwood KW.** Intensive maintenance therapy improves survival in adult acute nonlymphocytic leukemia: an eight-year follow-up. *Leukemia* 1988; 2: 413-419.
74. **Urban JL, Schreiber H.** Tumor antigens. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 617-644.
75. **Greenberg PD, Cheever MA, Fefer A.** Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+2- lymphocytes. *J Exp Med* 1981; 154: 952-963.
76. **Rosenberg SA, Spiess PJ, Lafreniere R.** A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 233: 1318-1321.
77. **Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp SA, Simpson C, Carter C, Bock S, Schartzentruber D, Wei JP, White DE.** Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988; 319: 1676-1680.
78. **Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan M, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson C, White DE.** A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316: 889-897.
79. **Konrad MW, Hemstreet G, Hersh EM, Mansell PWA, Mertelsmann R, Kolitz JE, Bradley EC.** Pharmacokinetics of recombinant interleukin 2 in humans. *Cancer Res* 1990; 50: 2009-2017.

80. **Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, Schow P, Ross ME, Klumpp TR, Soiffer RJ, Smith KA, Ritz J.** Selective modulation of human natural killer cells *in vivo* following prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 1993; 91: 123-132.
81. **West WH, Tauer KW, Yannelli JR, Marshall GD, Orr DW, Thurman GB, Oldham RK.** Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med* 1987; 316: 898-905.
82. **Stein RC, Malkovska V, Morgan S, Galazka A, Aniszewski C, Roy SE, Shearer RJ, Marsden RA, Bevan D, Gordon-Smith DE, Coombes RC.** The clinical effects of prolonged treatment of patients with advanced cancer with low-dose subcutaneous interleukin 2. *Br J Cancer* 1991; 63: 275-278.
83. **Foa R, Caretto P, Fierro MT, Bonferroni M, Cardona S, Guarini A, Lista P, Pegoraro L, Mandelli F, Forni G, Gavosto F.** Interleukin 2 does not promote the *in vitro* and *in vivo* proliferation and growth of human acute leukaemia cells of myeloid and lymphoid origin. *Br J Haematol* 1990; 75: 34-40.
84. **Lotzová E, Savary CA, Keating MJ.** Studies on the mechanism of defective natural killing in leukemia-diseased patients. *Exp Hematol* 1982; 10: 83-88.
85. **Lotzová E, Savary CA, Herberman RB.** Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *J Immunol* 1987; 138: 2718-2727.
86. **Dawson MM, Johnston D, Taylor GM, Moore M.** Lymphokine activated killing of fresh human leukaemias. *Leuk Res* 1986; 10: 683-688.
87. **Mageed AA, Findley HW Jr, Franco C, Singhapakdi S, Alvarado C, Chan WC, Ragab AH.** Natural killer cells in children with acute leukemia. The effect of interleukin-2. *Cancer* 1987; 60: 2913-2918.
88. **Lotzová E, Savary CA, Herberman RB.** Inhibition of clonogenic growth of fresh

- leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. *Leuk Res* 1987; 11: 1059-1066.
89. **Lista P, Fierro MT, Liao XS, Bonferroni M, Brizzi MF, Porcu P, Pegoraro L, Foa R.** Lymphokine-activated killer (LAK) cells inhibit the clonogenic growth of human leukemic stem cells. *Eur J Haematol* 1989; 42: 425-430.
90. **Pollack SB.** *In vivo* functions of natural killer cells. *Surv Synth Pathol Res.* 1983; 2: 93-97.
91. **Slavin S, Ackerstein A, Kedar E, Weiss L.** IL-2 activated cell-mediated immunotherapy: control of minimal residual disease in malignant disorders by allogeneic lymphocytes and IL-2. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6 (Suppl 1): 86-90.
92. **Foa R, Meloni G, Tosti S, Novarino A, Fenu S, Gavosto F, Mandelli F.** Treatment of acute myeloid leukaemia patients with recombinant interleukin 2: a pilot study. *Br J Haematol* 1991; 77: 491-496.
93. **Hamon MD, Prentice HG, Gottlieb DJ, Macdonald ID, Cunningham JM, Smith OP, Gilmore M, Gandhi L, Collis C.** Immunotherapy with interleukin 2 after ABMT in AML. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 309-401.
94. **Komori T, Sugiyama H, Ogawa H, Oka Y, Miyake S, Soma T, Tani Y, Minami Y, Kunisada K, Masaoka T, Kishimoto S.** Treatment of a patient in a relapse after bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia with the systemic administration of allogeneic lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Eur J Haematol* 1989; 43: 184-85.
95. **Rodríguez JM, Carmona M, Noguerol P, Parody R, Ruíz M, Espigado I, Caso F, Elorza MA, Parrado A.** Obtención y criopreservación de células progenitoras pluripotenciales hematopoyéticas de sangre periférica. *Biol Clin Hematol* 1989; 11: 199-205.

96. **Espigado I, Rodríguez JM, Carmona M, Noguero P, Ruiz M, Caso F, Elorza MA, Parrado A, Picabea L.** Peripheral blood stem cell collection: comparison of two protocols. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5(Suppl.1): 32.
97. **Muul LM, Nason-Burchenal K, Carter CS, Cullis H, Slavin D, Hyatt C, Director EP, Leitman SF, Klein HG, Rosenberg SA.** Development of an automated closed system for generation of human lymphokine-activated killer (LAK) for use in adoptive immunotherapy. *J Immunol Methods* 1987; 101: 171-181.
98. **Hay R, Macy M, Chen TR, McClintock P, Reid Y, editores.** American type culture collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. Sexta edición. Rockville, 1988.
99. **Rodríguez JM, Carmona M, Noguero P, Ruíz M, Parody R, Vidal F, Pérez Hurtado JM, Espigado I.** A fully automated method for mononuclear bone marrow concentration. *J Clin Apheresis* 1992; 7: 101-109.
100. **Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, Ault KA.** Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry* 1990; 11: 452-459.
101. **Oshimi K, Oshimi Y, Akutsu M, Takei Y, Saito H, Okada M, Mizoguchi H.** Cytotoxicity of interleukin 2-activated lymphocytes for leukemia and lymphoma cells. *Blood* 1986; 68: 938-948.
102. **Panayotides P, Porwit A, Sjögren AM, Wasserman J, Reizenstein P.** Resistance of some leukemic blasts to lysis by lymphokine activated killer (LAK) cells. *Eur J Haematol* 1988; 40: 362-367.
103. **Fierro MT, Liao XS, Lusso P, Bonferroni M, Matera L, Cesano A, Lista P, Arione R, Forni G, Foa R.** *In vitro* and *in vivo* susceptibility of human leukemic cells to lymphokine activated killer activity. *Leukemia* 1988; 2: 50-54.
104. **Adler A, Chervenick PA, Whiteside TL, Lotzová E, Herberman RB.** Interleukin 2 induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in the peripheral blood and

- bone marrow of acute leukemia patients. I. Feasibility of LAK generation in adult patients with active disease and in remission. *Blood* 1988; 71: 709-716.
105. **Adler A, Albo V, Blatt J, Whiteside TL, Herberman RB.** Interleukin-2 induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in the peripheral blood and bone marrow of acute leukemia patients: II. Feasibility of LAK generation in children with active disease and in remission. *Blood* 1989; 74: 1690-1697.
106. **Teichmann JV, Ludwig WD, Seibt-Jung H, Thiel E.** Induction of lymphokine-activated killer cells against human leukemia cells in vitro. *Blut* 1989; 59: 21-24.
107. **Archimbaud E, Bailly M, Doré JF.** Inducibility of lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with acute myelogenous leukaemia in complete remission and its clinical relevance. *Br J Haematol* 1991; 77: 328-334.
108. **Archimbaud E, Thomas X, Campos L, Magaud JP, Fiere D, Doré JF.** Susceptibility of adult acute lymphoblastic leukemia blasts to lysis by lymphokine-activated killer cells. *Leukemia* 1991; 5: 967-971.
109. **Findley HW Jr, Mageed AA, Nasr SA, Ragab AH.** Recombinant interleukin-2 activates peripheral blood lymphocytes from children with acute leukemia to kill autologous leukemic cells. *Cancer* 1988; 62: 1928-1931.
110. **Gottlieb DJ, Prentice HG, Heslop HE, Bello-Fernandez C, Bianchi AC, Galazka AR, Brenner MK.** Effects of recombinant interleukin-2 administration on cytotoxic function following high-dose chemo-radiotherapy for hematological malignancy. *Blood* 1989; 74: 2335-2342.
111. **Blaise D, Olive D, Stoppa AM, Viens P, Pourreau C, Lopez M, Attal M, Jasmin C, Monges G, Mawas C, Mannoni P, Palmer P, Philip T, Maraninchi D.** Hematologic and immunologic effects of the systemic administration of recombinant interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 76: 1092-1097.



112. **Keever CA, Klein J, Leong N, Copelan EA, Avalos BR, Kapoor N, Cunningham I, Tutschka PJ.** Effect of GVHD on the recovery of NK cell activity and LAK precursors following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 289-295.
113. **Reittie JE, Gottlieb D, Heslop HE, Leger O, Drexler HG, Hazlehurst G, Hoffbrand AV, Prentice HG, Brenner MK.** Endogenously generated activated killer cells circulate after autologous and allogeneic marrow transplantation but not after chemotherapy. *Blood* 1989; 73: 1351-1358.
114. **Favrot MC, Floret D, Negrier S, Cochat P, Bouffet E, Dacheng Z, Franks CR, Bijman T, Brunat-Mentigny M, Philip I, Philip T.** Systemic interleukin-2 therapy in children with progressive neuroblastoma after high dose chemotherapy and bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 499-503.
115. **Greenberg PD.** Mechanisms of tumor immunology. Stites DP, Terr AI, eds. *Basic and Clinical Immunology*. Séptima edición. Norwalk, 1991: 580-587.
116. **Foa R, Fierro MT, Tosti S, Meloni G, Gavosto F, Mandelli F.** Induction and persistence of complete remission in a resistant acute myeloid leukaemia patient after treatment with recombinant interleukin-2. *Leuk Lymph* 1990; 1: 113-117.
117. **Foa R, Meloni G, Tosti S, Novarino A, Fenu S, Guarini A, Cardona S, Gillio Tos A, Gavosto F, Mandelli F.** Treatment of residual disease in acute leukemia patients with recombinant interleukin 2 (IL2): Clinical and biological findings. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6(suppl 1): 98-102.
118. **Talpaz M, Bielski M, Hersh EM.** Studies of natural killer cell activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity among patients with acute leukemia in complete remission. *Cancer Immunol Immunother* 1982; 14: 96-98.
119. **Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J.** Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated

- antigens, NKH1<sub>A</sub> and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest* 1985; 75: 932-943.
120. **Perussia B, Fanning V, Trinchieri G.** A human NK and K subset shares with cytotoxic T cells expression of the antigen recognized by the antibody OKT8. *J Immunol* 1983; 131: 223-231.
121. **Baume DM, Caligiuri MA, Manley TM, Daley JF, Ritz J.** Differential expression of CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells. *Cell Immunol* 1990; 131: 352-365.
122. **van de Griend RJ, van Krimpen BA, Ronteltap CPM, Bolhuis RLH.** Rapidly expanded activated human killer cell clones have strong antitumor cell activity and have the surface phenotype of either T $\gamma$ , T-non- $\gamma$ , or null cells. *J Immunol* 1984; 132: 3185-3191.
123. **Lanier LL, Kipps TJ, Phillips JH.** Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3<sup>+</sup> T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med* 1985; 162: 2089-2106.
124. **Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J.** A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 1986; 164: 351-356.
125. **Lanier LL, Le AM, Ding A, Evans EL, Krensky AM, Clayberger C, Phillips JH.** Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL 2-dependent cytotoxic and non-cytotoxic T cell lines. *J Immunol* 1987; 138: 2019-2023.
126. **Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF.** Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983; 131: 1789-1796.
127. **Sawada H, Abo T, Sugawara S, Kumagai K.** Prerequisite for the induction of

- lymphokine-activated killer cells from T lymphocytes. *J Immunol* 1988; 140: 3668-3673.
128. **Higuchi CM, Thompson JA, Cox T, Lindgren CG, Buckner CD, Fefer A.** Lymphokine-activated killer function following autologous bone marrow transplantation for refractory hematological malignancies. *Cancer Res* 1989; 49: 5509-5513.
129. **Boldt DH, Mills BJ, Gemlo BT, Holden H, Mier J, Paietta E, McMannis JD, Escobedo LV, Sniecinski I, Rayner AA, Hawkins MJ, Atkins MB, Ciobanu N, Ellis TM.** Laboratory correlates of adoptive immunotherapy with recombinant interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in humans. *Cancer Res* 1988; 48: 4409-4416.
130. **Kubo K, Tachino J, Ichikawa J, Hamamoto K, Ueda K.** HLA typing using IL-2 activated T lymphocytes: usefulness in pediatric candidates for allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 185-190.
131. **Michon JM, Caligiuri MA, Hazanow SM, Levine H, Schlossman SF, Ritz J.** Induction of natural killer effectors from human thymus with recombinant IL-2. *J Immunol* 1988; 140: 3660-3667.
132. **Weil-Hillman G, Fisch P, Prieve AF, Sosman JA, Hank JA, Sondel PM.** Lymphokine-activated killer activity induced by *in vivo* interleukin 2 therapy: predominant role for lymphocytes with increased expression of CD2 and Leu19 antigens but negative expression of CD16 antigens. *Cancer Res* 1989; 49: 3680-3688.
133. **Itoh K, Tilden AB, Kumagai K, Balch CM.** Leu-11<sup>+</sup> lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2-induced activated killer (AK) cells. *J Immunol* 1985; 134: 802-807.
134. **Tilden AB, Itoh K, Balch CM.** Human lymphokine-activated killer (LAK) cells: identification of two types of effector cells. *J Immunol* 1987; 138: 1068-1073.

135. **Ferrini S, Miescher S, Zocchi MR, von Fliedner V, Moretta A.** Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer cells: analysis at the population and clonal levels. *J Immunol* 1987; 138: 1297-1302.
136. **Grimm EA, Ramsey KM, Mazumder A, Wilson DJ, Djeu JY, Rosenberg SA.** Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J Exp Med* 1983; 157: 884-897.
137. **Kalland T, Belfrage H, Bhiladvala P, Hedlund G.** Analysis of the murine lymphokine-activated killer (LAK) cell phenomenon: dissection of effectors and progenitors into NK- and T-like cells. *J Immunol* 1987; 138: 3640-3645.
138. **Ballas ZK, Rasmussen W.** Lymphokine-activated killer (LAK) cells. VI. NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> LAK effectors are derived from CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup> precursors. *Cell Immunol* 1991; 134: 296-313.
139. **London L, Perussia B, Trinchieri G.** Induction of proliferation *in vitro* of resting human natural killer cells: expression of surface activation antigens. *J Immunol* 1985; 134: 718-727.
140. **Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, Phillips JH.** Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 antigen. *J Exp Med* 1988; 167: 1572-1585.
141. **Letellier C, Rameliarison L, Fizet D, Ferrer AM, Vezon G.** The influence of criopreservation on activity and surface markers of lymphokine-activated killer cells. *Vox Sang* 1991; 61: 90-95.
142. **Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J.** Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1-6.

143. **Siegel JP, Sharon M, Smith PL, Leonard WJ.** The IL-2 receptor  $\beta$  chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 1987; 238: 75-78.
144. **Kehrl JH, Dukovich M, Whalen G, Katz P, Fauci AS, Greene WC.** Novel interleukin 2 (IL-2) receptor appears to mediate IL-2-induced activation of natural killer cells. *J Clin Invest* 1988; 81: 200-205.
145. **Owen-Schaub LB, Loudon WG, Yagita M, Grimm EA.** Functional differentiation of human lymphokine-activated killing (LAK) is distinct from expansion and involves dissimilar interleukin 2 receptors. *Cell Immunol* 1988; 111: 235-246.
146. **LeFor AT, Eisenthal A, Rosenberg SA.** Heterogeneity of lymphokine-activated killer cells by IL-2. Separate lymphoid subpopulations lyse tumor, allogeneic blasts, and modified syngeneic blasts. *J Immunol* 1988; 140: 4062-4069.
147. **Fuchshuber PR, Lotzová E, Savary CA.** Generation of MHC-nonrestricted and restricted oncolytic subsets from human bone marrow. *Cell Immunol* 1992; 139: 30-43.
148. **Chadwick BS, Brady G, Miller R.** Characterization of murine lymphokine-activated killer cell cultures separated according to cell size. *Cell Immunol* 1993; 46: 1-10.
149. **Friedrich W, O'Reilly RJ, Koziner B, Gebhard DR Jr, Good RA, Evans RL.** T-lymphocyte reconstitution in recipients of bone marrow transplants with and without GVHD: imbalances of T-cell subpopulations having unique regulatory and cognitive functions. *Blood* 1982; 59: 696-701.
150. **Gratama JW, Naipal A, Oljans P, Zwaan FE, Verdonck LF, de Witte T, Vossen JMJJ, Bolhuis RLH, de Gast GC, Jansen J.** T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4<sup>+</sup> and T8<sup>+</sup> T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood* 1984; 63: 1416-1423.

151. **Schroff RW, Gale RP, Fahey JL.** Regenerations of T cell subpopulations after bone marrow transplantation: cytomegalovirus infection and lymphoid subset imbalance. *J Immunol* 1982; 129: 1926-1930.
152. **Favrot M, Janossy G, Tidman N, Blacklock H, Lopez E, Bofill M, Lampert I, Morgenstein G, Powles R, Prentice HG, Hoffbrand AV.** T cell regeneration after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 59-72.
153. **Atkinson K, Hanse JA, Storb R, Goehle S, Goldstein G, Thomas ED.** T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-supressor subsets. *Blood* 1982; 59: 1292-1298.
154. **Forman SJ, Nocker P, Gallagher M, Zaia J, Wright C, Bolen J, Mills B, Hecht T, Blume K.** Pattern of T cell reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation for acute hematological malignancy. *Transplantation* 1982; 34: 96-98.
155. **Linch DC, Knott LJ, Thomas RM, Harper P, Goldstone AH, Davis EG, Levinsky RJ.** T cell regeneration after allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1983; 53: 451-458.
156. **Janossy G, Prentice HG, Grob JP, Ivory K, Tidman N, Grundy J, Favrot M, Brenner MK, Campana D, Blacklock HA, Gilmore MJM, Patterson J, Griffiths PD, Hoffbrand AV.** T lymphocyte regeneration after transplantation of T cell depleted allogeneic bone marrow. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 577-586.
157. **Bengtsson M, Smedmyr B, Simonsson B, Öberg G, Lönnerholm G, Tötterman TH.** Repopulation of T, B, and natural killer-like cells in the blood and marrow after purged autologous bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 1988; XX: 506-509.
158. **Keever C, Small T, Flomenberg N, Heller G, Pekle K, Black P, Pecora A, Gillio A, Kernan NA, O'Reilly RJ.** Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients

- of conventional marrow grafts. *Blood* 1989; 73: 1340-1350.
159. **Leino L, Lilius EM, Nikoskelainen J, Pelliniemi TT, Rajamäki A.** The reappearance of 10 differentiation antigens on peripheral blood lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 339-344.
  160. **Anderson KC, Ritz J, Takvorian T, Coral F, Daley H, Gorgone BC, Freedman AS, Canellos GP, Schlossman SF, Nadler LM.** Hematologic engraftment and immune reconstitution posttransplantation with anti-B1 purged autologous bone marrow. *Blood* 1987; 69: 597-604.
  161. **Bengtsson M, Tötterman TH, Smedmyr B, Festin R, Öberg G, Simonsson B.** Regeneration of functional and activated NK and T sub-subset cells in the marrow and blood after autologous bone marrow transplantation: a prospective phenotypic study with 2/3-color FACS analysis. *Leukemia* 1989; 3: 68-75.
  162. **Lum LG.** The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987; 69: 369-380.
  163. **Niederweiser D, Gastl G, Rumpold H, Marth CH, Kraft D, Huber CH.** Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). *Br J Haematol* 1987; 65: 301-305.
  164. **Hokland M, Jacobsen N, Ellegaard J, Hokland P.** Natural killer function following allogeneic bone marrow transplantation. Very early reemergence but strong dependence of cytomegalovirus infection. *Transplantation* 1988; 45: 1080-1084.
  165. **Ault KA, Antin JH, Ginsburg D, Orkin SH, Rapoport JM, Keohan ML, Martin P, Smith BR.** Phenotype of recovering lymphoid B cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med* 1985; 161: 1483-1502.
  166. **Gottschalk LR, Bray RA, Kaizer H, Gebel HM.** Two populations of CD56 (Leu-

- 19)+/CD16+ cells in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 259-264.
167. **Jacobs R, Stoll M, Stratmann G, Leo R, Link H, Schmidt RE.** CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 1992; 79: 3239-3244.
168. **Dokhelar MC, Wiels J, Lipinski M, Tetaud C, Devergie A, Gluckman E, Tursz T.** Natural killer cell activity in human bone marrow recipients. Early reappearance of peripheral natural killer activity in graft versus host disease. *Transplantation* 1981; 31: 61-65.
169. **Livnat S, Seigneuret M, Storb R, Prentice R.** Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after marrow transplantation. *J Immunol* 1980; 124: 481-490.
170. **Ettinghausen SE, Moore JG, White DE, Platanius L, Young NS, Rosenberg SA.** Hematologic effects of immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in cancer patients. *Blood* 1987; 69: 1654-1660.
171. **McMannis JD, Fisher RI, Creekmore SP, Braun DP, Harris JE, Ellis TM.** *In vivo* effects of recombinant IL-2. I. Isolation of circulating Leu-19<sup>+</sup> lymphokine-activated killer effector cells from cancer patients receiving recombinant IL-2. *J Immunol* 1988; 140: 1335-1340.
172. **Ellis TM, Creekmore SP, McMannis JD, Braun DP, Harris JA, Fisher RI.** Appearance and phenotypic characterization of circulating Leu 19<sup>+</sup> cells in cancer patients receiving recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 1988; 48: 6597-6602.
173. **Urba WJ, Steis RG, Longo DL, Kopp WC, Maluish AE, Marcon L, Nelson DL, Stevenson HC, Clark JW.** Immunomodulatory properties and toxicity of interleukin 2 in patients with cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 185-192.
174. **Higuchi CM, Thompson JA, Petersen FB, Buckner CD, Fefer A.** Toxicity and



- immunomodulatory effects of interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1991; 77: 2561-2568.
175. **Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, Schow P, Ross ME, Klumpp TR, Soiffer RJ, Smith KA, Ritz J.** Selective modulation of human natural killer cells *in vivo* after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 1993; 91: 123-132.
176. **Soiffer RJ, Murray C, Cochran K, Cameron C, Wang E, Schow PW, Daley JF, Ritz J.** Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin-2 after autologous and T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1992; 79: 517-526.
177. **Sondel PM, Kohler PC, Hank JA, Moore KH, Rosenthal NS, Sosman JA, Bechhofer R, Storer B.** Clinical and immunological effects of recombinant interleukin 2 given by repetitive weekly cycles to patients with cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 2561-2567.
178. **Foa R, Guarini A, Gillio Tos A, Cardona S, Fierro MT, Meloni G, Tosti S, Mandelli F, Gavosto F.** Peripheral blood and bone marrow immunophenotypic and functional modifications induced in acute leukemia patients treated with interleukin 2: evidence of *in vivo* lymphokine activated killer cell generation. *Cancer Res* 1991; 51: 964-968.
179. **Ellis TM, Fisher RI.** Functional heterogeneity of Leu 19<sup>bright+</sup> and Leu 19<sup>dim+</sup> lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1989; 142: 2949-2954.
180. **Hank JA, Kohler PC, Weil-Hillman G, Rosenthal NS, Moore KH, torer B, Minkoff D, Bradshaw J, Bechhofer R, Sondel PM.** *In vivo* induction of the lymphokine-activated killer (LAK) phenomenon: interleukin-2 (IL-2)-dependent human non-MHC restricted cytotoxicity (NRC) generated *in vivo* during administration of recombinant IL-2. *Cancer Res* 1988; 48: 1965-1971.

181. **Goldstein D, Sosman JA, Hank JA, Weil-Hillman G, Moore KH, Borchert A, Bechhofer R, Storer B, Kholer PC, Levitt D, Sondel PM.** Repetitive weekly cycles of interleukin 2: effect of outpatient treatment with a lower dose of interleukin 2 on non-major histocompatibility complex-restricted killer activity. *Cancer Res* 1989; 49: 6832-6839.
182. **Weil-Hillman, Voss SD, Fisch P, Schell K, Hank JA, Sosman JA, Sugamura K, Sondel PM.** Natural killer cells activated by interleukin 2 treatment *in vivo* respond to interleukin 2 primarily through the p75 receptor and maintain the p55 (TAC) negative phenotype. *Cancer Res* 1990; 50: 2683-2691.
183. **Voss SD, Robb RJ, Weil-Hillman G, Hank JA, Sugamura K, Tsudo M, Sondel PM.** Increased expression of the interleukin 2 (IL-2) receptor  $\beta$  chain (p70) on CD56<sup>+</sup> natural killer cells after *in vivo* IL-2 therapy: p70 expression does not alone predict the level of intermediate affinity IL-2 binding. *J Exp Med* 1990; 172: 1101-1114.
184. **Sánchez Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ, Springer TA.** Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, LFA-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7489-7492.
185. **Schmidt RD, Caulfield JP, Michon J, Hein A, Kamada MM, MacDermott RP, Stevens RL, Ritz J.** T11/CD2 activation of cloned human natural killer cells results in increased conjugate formation and exocytosis of cytotoxic granules. *J Immunol* 1988; 140: 991-1002.
186. **Lotze MT, Custer MC, Sharrow SO, Rubin LA, Nelson DL, Rosenberg SA.** *In vivo* administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer: development of interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration. *Cancer Res* 1987; 47: 2188-2195.
187. **Macdonald D, Jiang YZ, Gordon AA, Mahendra P, Oskam R, Palmer PA, Franks CR, Barret AJ.** Recombinant interleukin 2 for acute myeloid leukaemia in first complete remission: a pilot study. *Leuk Res* 1990; 14: 967-973.

188. **Meloni G, Foa R, Tosti S, Vignetti M, Mancini F, Guarini A, Marchis D, Gavosto F, Mandelli F.** Autologous bone marrow transplantation followed by interleukin-2 in children with advanced leukemia: a pilot study. *Leukemia* 1992; 6: 780-785.
189. **Noguerol P, Parrado A, Carmona M, Rodríguez JM.** Viabilidad de progenitores hematopoyéticos en médula ósea de pacientes con leucemia aguda en remisión completa tratada *in vitro* con IL-2. Comunicación 280. XXXIV Reunión Nacional AEHH. *Sangre* 1992; 37 (Supl 4): 87.
190. **Charak BS, Malloy B, Agah R, Mazumder A.** A novel approach to purging of leukemia by activation of bone marrow with interleukin 2. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6: 193-198.
191. **Long GS, Cramer DV, Harnaha JB, Hiserodt JC.** Lymphokine-activated killer (LAK) cells purging of leukemic bone marrow: range of activity against different hematopoietic neoplasms. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6: 169-177.
192. **van den Brink MRM, Voogt PJ, Marijt WAF, van Luxemburg-Heys, van Rood JJ, Brand A.** Lymphokine-activated killer cells selectively kill tumor cells in bone marrow without compromising bone marrow stem cell function *in vitro*. *Blood* 1989; 74: 354-360.
193. **Gambacorti-Passerini C, Rivoltini L, Fizzotti M, Rodolfo M, Sensi ML, Castelli C, Orazi A, Polli N, Bregni M, Siena S, Borin L, Pogliani E, Corneo GM, Parmiani G.** Selective purging by human interleukin-2 activated lymphocytes of bone marrows contaminated with a lymphoma line or autologous leukaemic cells. *Br J Haematol* 1991; 78: 197-205.
194. **Pistoia V, Gio R, Nocera A, Leprine A, Perata A, Ferrarini M.** Large granular lymphocytes have a promoting activity on human peripheral blood erythroid burst forming units. *Blood* 1985; 65: 464-472.

195. **Voogt P, Falkenburg JHF, Fibbe W, Veenhof W, Hamilton M, van Krimpen B, Bolhuis R.** Normal hematopoietic progenitor cells and malignant lymphohematopoietic cells show different susceptibility to direct cell-mediated MHC-non-restricted lysis by T cell receptor-/CD3-, T cell receptor  $\gamma/\delta^+$ /CD3<sup>+</sup> and T cell receptor  $\alpha\beta^+$ /CD3<sup>+</sup> lymphocytes. *J Immunol* 1989; 142: 1774-1780.
196. **Degliantoni G, Perussia B, Mangoni L, Trinchieri G.** Inhibition of bone marrow colony formation by human natural killer cells and by natural killer cell-derived colony-inhibiting activity. *J Exp Med* 1985; 161: 1152-1168.
197. **Barlozzari T, Herberman R, Reynolds C.** Inhibition of pluripotent stem cells of bone marrow by large granular lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7691-7695.
198. **Burdach S, Levitt L.** Receptor-specific inhibition of bone marrow erythropoiesis by recombinant DNA-derived interleukin-2. *Blood* 1987; 69: 1368-1375.
199. **Burdach S, Shatsky M, Wagenhorst B, Levitt L.** Receptor-specific modulation of myelopoiesis by recombinant DNA-derived interleukin 2. *J Immunol* 1987; 139: 452-458.
200. **Burdach S, Shatsky M, Wagenhorst B, Levitt L.** The T-cell CD2 determinant mediates inhibition of erythropoiesis by the lymphokine cascade. *Blood* 1988; 72: 770-775.
201. **Miller JS, Verfaillie C, McGlave P.** Adherent lymphokine-activated killer cells suppress autologous human normal bone marrow progenitors. *Blood* 1991; 77: 2389-2395.
202. **Niemeyer CM, Sieff CA, Smith BR, Ault KA, Nathan DG.** Hematopoiesis *in vitro* coexists with natural killer lymphocytes. *Blood* 1989; 74: 2376-2382.
203. **Schmidt-Wolf IGH, Aihara M, Negrin RS, Blume KG, Chao NJ.** *In vitro* and *in*

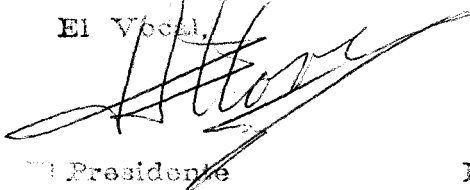
- vivo* activity of murine lymphokine-activated killer cells after cryopreservation. Transfusion 1992; 32: 42-45.
204. **Lotzová E, Savary CA.** Generation of NK cell activity from human bone marrow. J Immunol 1987; 139: 279-284.
205. **Keever CA, Pekle K, Gazzola MV, Collins NH, Gillio A.** NK and LAK activities from human marrow progenitors. I. The effects of interleukin-2 and interleukin-1. Cell Immunol 1990; 126: 211-226.
206. **van den Brink MRM, Boggs S, Herberman RB, Hiserodt JC.** The generation of natural killer (NK) cells from NK precursor cells in rat long-term bone marrow cultures. J Exp Med 1990; 172: 303-313.
207. **Carron JA, Cawley JC.** IL-2 abolishes fibroblast proliferation in long-term bone marrow culture by inhibition of an accessory cell. Br J Haematol 1991; 79: 377-381.
208. **Duncombe AS, Grundy JE, Prentice HG, Brenner MK.** IL2 activated killer cells may contribute to cytomegalovirus induced marrow hypoplasia after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1991; 7: 81-87.
209. **Ackerstein A, Kedar A, Slavin S.** Use of recombinant human interleukin-2 in conjunction with syngeneic bone marrow transplantation in mice as a model for control of minimal residual disease in malignant hematologic disorders. Blood 1991; 78: 1212-1215.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Andrés Pascual Ponsa B  
titulada Análisis de la actividad cultural actual  
y las subsecciones hipodermis en la leucemia  
esplénica: Aspecto clínico y curativo de la leucemia 2  
acordó otorgarle la calificación de APROBADO CON LOBOS

Sevilla, 20 de octubre 1989

El Vocal,



El Presidente

El Vocal,



El Secretario,

El Vocal,



El Doctor

A. Ceballos

