

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Diseño y tipo de estudio**

Cohorte histórica, tipo estadio o etapa de la enfermedad. En la etapa clínica de su aplicación de acuerdo con la taxonomía de Feinstein se clasifica:

- Objetivo del estudio: Comparativo
- Asignación de la maniobra: Observacional
- Temporalidad: Transversal
- Recolección de datos: Retroactivo

### **6.2. Lugar donde se realizó el estudio**

Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (CHMI)

### **6.3. Población de estudio**

- Población: Pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas totipotenciales alogénicos en el CHMI de Puebla.
- Muestreo no probabilístico tipo censo: comprende todos los sujetos sometidos a trasplante alogénico de células hematopoyéticas totipotenciales en el periodo de enero de 1996 a agosto de 2011.

### **6.4. Criterios de selección.**

#### **6.4.1. Criterios de inclusión**

- Pacientes sometidos a alo-TCH en el CHMI de Puebla de enero de 1996 a agosto de 2011.
- Pacientes que hayan firmado consentimiento informado

#### **6.4.2. Criterios de exclusión**

- Pacientes que no hubiesen firmado consentimiento informado.

## 6.5. Definiciones operacionales de las variables

### Variables relevantes

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Enfermedad de injerto contra huésped (EICH)	Cualitativa	Reacción inmunológica mal regulada entre los linfocitos T del donador y los tejidos del receptor.	Presente o ausente	Nominal dicotómica
EICH aguda	Cualitativa	Se desarrolla en los primeros 100 días posterior al trasplante y se caracteriza por la afección de piel, tracto gastrointestinal e hígado.	Grados I-IV "The Glucksberg grading system".	Ordinal
EICH crónica	Cualitativa	Se desarrolla posterior a los 100 días del alo-TCH, generalmente entre el 4 <sup>a</sup> y 6 <sup>a</sup> mes. Los principales tejidos afectados son la piel, mucosa oral, conjuntival e hígado	Limitada o extensa	Ordinal
Cantidad de células CD34+	Cuantitativa	Cantidad total de células CD34+ transfundidas por kg de peso del receptor.	0.02-17.7x10 <sup>6</sup>	Cuantitativa continua

### Variables secundarias

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Edad	Cuantitativa	Años transcurridos desde el nacimiento hasta el momento del trasplante, se medirá en años cumplidos.	1-70 años	Continua
Género	Cualitativa	Condición fenotípica de hombre o mujer	Femenino o masculino	Nominal dicotómica
Diagnóstico	Cualitativa	Patología de base por la cual el paciente fue sometido al trasplante alogénico de células hematopoyéticas totipotenciales	Benigno o maligno	Nominal dicotómica
Tipo de injerto	Cualitativa	Fuente de obtención de las células CD34+	Sangre periférica o cordón umbilical	Nominal dicotómica
Compatibilidad	Cuantitativa	Afinidad que existe entre los alelos del CMH del donador y receptor	4/6, 5/6 o 6/6	Intervalo
Toma de injerto	Cualitativa	Alcanzar una cuenta absoluta de neutrófilos mayor a 500/ $\mu$ L y de plaquetas mayor a 20,000/ $\mu$ L.	Trasplante exitoso o fallido	Nominal dicotómica

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Tiempo de recuperación de neutrófilos	Cuantitativa	Tiempo transcurrido en días para alcanzar y mantener una cuenta absoluta de neutrófilos mayor a 500/ $\mu$ L por tres días consecutivos.	Días +1 a +30 o sin recuperación	Continua
Tiempo de recuperación de plaquetas	Cuantitativa	Tiempo transcurrido en días para alcanzar y mantener una cuenta absoluta de plaquetas mayor a 20,000/ $\mu$ L durante siete días consecutivos, sin transfusión plaquetaria.	Días +1 a +30 o sin recuperación	Continua
Recaída	Cuantitativa	Recurrencia de la enfermedad tras un trasplante exitoso, en un paciente que previamente había logrado la remisión.	Meses posterior al TCH	Continua
Sobrevida	Cuantitativa	Tiempo de supervivencia transcurrido en meses desde el trasplante de células hematopoyéticas totipotenciales al momento del estudio.	Meses posterior al TCH	Continua

## 6.6. Procedimiento

### 6.6.1. Pacientes

A través del registro en el CIBMTR (Center for International Blood & Marrow Transplant Research) se identificaron a todos los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células hematopoyéticas en el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (CHMI) en el periodo comprendido entre enero de 1996 y agosto de 2011. Una vez identificados, con previa autorización del Director General del CHMI el Dr. Guillermo José Ruiz Argüelles, se accedió al archivo clínico para revisar el expediente de cada paciente.

Se obtuvo la siguiente información para realizar la base de datos, para su posterior análisis:

- Historia clínica: Género, fecha de nacimiento, diagnóstico.
- Notas de evolución: Fecha de trasplante, tipo de injerto, EICH, gravedad de EICH, recaída, otras complicaciones, fecha de última revisión o muerte, causa de muerte.

- Estudios de laboratorio: Compatibilidad HLA donador/receptor, cantidad de células CD34+ (cuantificación por citometría de flujo), toma de injerto (días para recuperación de neutrófilos y plaquetas).

La muestra consistió en 163 pacientes, de los cuales se excluyeron a tres por no contar con la información necesaria para completar el análisis. Las características de los pacientes se presentan en la Tabla 1.

Una vez completada la base de datos se ordenó a los pacientes de acuerdo a la cantidad de células CD34+ que recibieron y se agruparon en el cuartil correspondiente. Se realizó una segunda categorización de acuerdo a los desenlaces buscados: toma de injerto, EICH (incidencia y gravedad), recaída, mortalidad y supervivencia.

- Toma de injerto: Se identificaron a los pacientes que presentaron un trasplante exitoso (recuperación de la cuenta absoluta de neutrófilos y plaquetas). Se excluyeron para el análisis de este desenlace a los pacientes que no presentaron una cuenta de neutrófilos menor a 500/ $\mu$ L o plaquetaria menor a 20,000/ $\mu$ L durante su seguimiento.
- EICH: El diagnóstico fue efectuado por un mismo investigador, eliminando de esta manera la variabilidad interobservador. La EICH aguda se clasificó de acuerdo a los criterios estándar, mientras que la enfermedad crónica se evaluó en aquellos pacientes con supervivencia mayor a 100 días y se clasificó en limitada o extensa.
- Recaída: Se identificaron a los pacientes que durante sus consultas de seguimiento presentaron recaída de la enfermedad demostrada por estudios de laboratorio. Se cuantificó el tiempo de recaída en meses desde la fecha del alo-TCH. Para éste análisis se excluyeron a los pacientes con diagnóstico de enfermedad benigna.
- Mortalidad: Se identificaron a los pacientes que fallecieron durante su seguimiento. Se clasificaron por causa de mortalidad de acuerdo a la información obtenida de su expediente clínico en: progresión de la enfermedad, EICH, otras complicaciones asociadas al alo-TCH (sepsis, trombocitopenia,

SIRPA, insuficiencia hepática, paro cardiorrespiratorio, muerte súbita, entre otras) y desconocida.

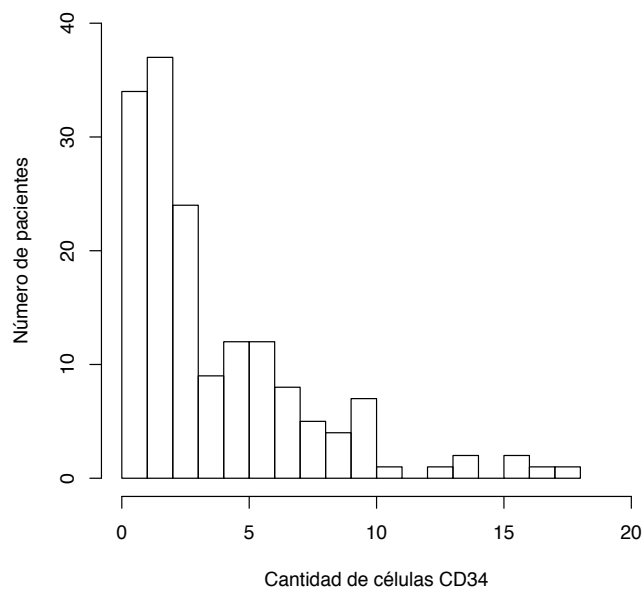
- Supervivencia: Se realizó el análisis a través de curvas de Kaplan-Meier para supervivencia global, comparativa para cuartiles de CD34+, comparativa para presencia o ausencia de EICH y comparativa para recaída.

### **6.6.2. Injerto**

El tipo de injerto se clasificó de acuerdo a su procedencia en sangre periférica y cordón umbilical. Se buscó como mínimo una compatibilidad del 4/6 de los antígenos del CMH HLA-A, HLA-B y HLA-DR. La tipificación serológica para los locus HLA A y B se utilizó hasta el 2003, posteriormente, se utilizó la tipificación por captura molecular de híbridos para estos locus. Los antígenos de la clase II DR se estudiaron utilizando técnicas moleculares. La media de células CD34+ infundidas fue de 3.63 con un rango desde 0.02 hasta 17.7. La distribución de la cantidad de células CD34+ administradas se puede observar en la gráfica 1.

**Tabla 1. Estadística Demográfica**

<b>Receptor</b>	
Género (%)	
Masculino	92 (57.5)
Femenino	68 (42.5)
Edad media (rango)	29 (2-68)
<b>Diagnóstico (%)</b>	
Maligno	145 (90.6)
Benigno	15 (9.3)
<b>Donador</b>	
Género (%)	
Masculino	82 (51.2)
Femenino	66 (41.2)
Desconocido	12 (7.5)
Edad media (rango)	25 (0-72)
<b>Tipo de injerto (%)</b>	
Sangre periférica	128 (80)
Singénico	2 (1.2)
Alogénico	126 (78.7)
Cordón umbilical	32 (20)
<b>Células CD34 x10<sup>6</sup></b>	
Media (rango)	3.63 (0.02-17.7)
p_25	1.10
p_50	2.34
p_75	5.46
<b>Compatibilidad (%)</b>	
4/6	20 (12.5)
5/6	33 (20.6)
6/6	107 (66.8)
<b>EICH (%)</b>	
EICH aguda	83 (51.8)
I-II	48 (75)
III-IV	16 (25)
EICH crónica	36 (43.3)
Limitada	31 (86.1)
Extensa	5 (13.8)
<b>Toma de injerto (%)</b>	132 (82.5)
<b>Recaída (%)</b>	52 (32.5)
<b>Mortalidad (%)</b>	91 (56.8)

**Gráfica 1. Histograma células CD34**

### **6.6.3. Esquema de acondicionamiento y profilaxis contra EICH**

Para estandarizar a la muestra se utilizó el esquema de acondicionamiento mexicano no-mieloablatoivo en todos los pacientes.

Se administró una dosis de 10 $\mu$ g/kg/día de filgrastim al donador en los días -5 a + 2. Los procedimientos de aféresis se realizaron en los días 0, +1 y +2, procesando 5000-7000mL/m<sup>2</sup> en cada una obteniendo un aproximado de 2x10<sup>6</sup> células CD34+ viables por kilo de peso del receptor. La cuantificación de células CD34+ se realizó por citometría de flujo utilizando un equipo Haemonetics V-50 PLUS (Haemonetics Corporation, Braintree, Ma, USA) o un equipo Baxter C-3000 PLUS (Baxter Healthcare, Deeriedl, IL, USA).

En los receptores el régimen de acondicionamiento consistió en busulfan 4mg/kg VO en los días -6 y -5; ciclofosfamida 350mg/m<sup>2</sup> IV en los días -4,-3 y -2; y fludarabina 30mg/m<sup>2</sup> IV en los días -4,-3 y -2. Los concentrados de las aféresis se transfundieron de manera inmediata los días 0, +1 y +2.

Se administró ondansetrón (1mg/hr IV durante 4 horas después de la quimioterapia), ciprofloxacino 500mg cada 12hr, fluconazol 100mg cada 6hr, aciclovir 400mg cada 12hr, suspendiéndolos hasta obtener una cuenta de neutrófilos mayor a 500/ $\mu$ L.

Como profilaxis para EICH se administró ciclosporina A 5mg/kg IV iniciando el día -1; y metotrexate 5mg/m<sup>2</sup> en los días +1, +3, +5 y +11. La ciclosporina A se continuó hasta el día 180, con ajustes de acuerdo a su concentración plasmática (150-275ng/mL).

## **6.7. Análisis estadístico**

### **6.7.1. Modelo de regresión lineal**

La estimación de los parámetros que definen los distintos modelos de regresión lineal se llevaron a cabo con la función lm() del paquete estadístico R para 2.14.1 GUI 1.43 Leopard build 32-bit (5989). Esta función usa el método de Mínimos Cuadrados Ordinarios cuyos valores son consistentes y tienen una distribución normal. Este

modelo se utilizó para estimar la asociación existente entre variables continuas como la cantidad de células CD34+ con los días para la recuperación de neutrófilos y plaquetas, los meses para la recaída y meses para mortalidad.

### **6.7.2. Modelo de regresión logística**

El modelo de regresión logístico es un modelo no lineal empleado para variables dependientes binarias. Se usa la función logística con rango entre 0 y 1 para modelar la probabilidad de que la variable binaria  $Y_i$  sea igual a 1. Al no ser lineal, los parámetros de la regresión logística no tienen la interpretación directa de un efecto marginal sobre la probabilidad de que  $Y_i = 1$ . Para evitar elegir una observación arbitraria como referente, en los resultados de modelos logísticos se reporta el efecto marginal promedio (AME) para la muestra de pacientes estudiada. La estimación de los parámetros del modelo logístico se llevó a cabo usando la función `glm()` del programa R. Ésta emplea un método de máxima verosimilitud para estimar los parámetros del modelo. El cálculo y los intervalos de confianza de los efectos marginales promedio se llevó a cabo con el paquete `erer` para R, creado por Changyou Sun de la Universidad Estatal de Mississippi.

El modelo de regresión logística nos permitió calcular la asociación entre la cantidad de células CD34+ con distintos desenlaces como son EICH aguda y crónica, gravedad de las mismas, toma de injerto, recaída y mortalidad con sus distintas causas.

Un aspecto conveniente del modelo logístico es que permite calcular directamente la razón de momios u Odds ratio (OR) de los parámetros estimados. La inferencia estadística correspondiente a la razón de momios fue calculada con base en el método Delta, que es una buena aproximación a la distribución probabilística de funciones continuas de estadísticas para muestras grandes.

En cuanto a la razón de momios los cortes para determinar la exposición al factor de riesgo/protector fueron los cuartiles del rango de células CD34+ administradas, y la presencia/ausencia de EICH.



### **6.7.3. Análisis de supervivencia**

El análisis de supervivencia se llevó a cabo con el paquete Surv para R, creado por Terry M. Therneau de la Clínica Mayo en Minnesota.

### **6.8. Consideraciones bioéticas.**

El presente estudio se llevó a cabo tomando en cuenta por parte de los investigadores, los principios bioéticos fundamentales aplicables a la etapa clínica, como la Declaración de Helsinki, de Tokio modificada y los lineamientos marcados en las leyes general de salud y su correspondiente estatal, así como la normatividad institucional universitaria y del Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, a través de su comité de investigación, ética y bioética.