

---

# Trasplante de células hematopoyéticas

## Hematopoietic stem cells transplant

Jorge W. Oliveros Alvear \*  
Cecilia Sandoval Carrasco \*\*  
Rafael S. Cires Drouet \*\*\*  
Mariela A. Blum Maridueña \*\*\*\*  
Alfonso J. Tafur Chang \*\*\*\*\*

### Resumen

*El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) es la infusión de células progenitoras a fin de restablecer la función medular e inmune en pacientes con enfermedades hematológicas malignas y no malignas adquiridas y genéticas. El impacto del TCH se refleja en las alternativas de tratamiento, mayor difusión de la técnica y mejores opciones al paciente.*

*El procedimiento consiste en la obtención de progenitores hematopoyéticos periféricos, mediante las células CD34+ (2- 2.5 x 10<sup>6</sup>/Kg peso); es un excelente predictor de prendimiento del injerto. El trasplante de donante no relacionado, permite tratamiento a pacientes que carecen de donantes familiares histoi-  
dénticos. Otra variante de TCH es el mini-trasplante, utilizando dosis bajas de quimioterapia e inmunosupresores, produciendo menos complicaciones, pero jerarquizando el efecto “injerto sobre tumor”, que permite la remisión de enfermedades neoplásicas hematológicas y no hematológicas, siendo una alternativa en países en vías de desarrollo, por la posibilidad de disminuir costos y complicaciones.*

**Palabras claves:** Trasplante de células hematopoyéticas, Trasplante médula ósea, Trasplante autólogo, Trasplante alogénico, Células progenitoras, Mini-trasplante.

### Introducción

El trasplante de células hematopoyéticas (TCH), es la infusión de células progenitoras o “Stem Cells” (SC) a fin de reestablecer la función medular e inmune en pacientes con una variedad de enfermedades malignas hematológicas (leucemia, linfoma, mieloma), enfermedades no malignas adquiridas de la médula ósea (aplasia medular), enfermedades genéticas asociadas con una anormal hematopoyesis o alteración en la función medular (talasemias, drepanocitosis, inmunodeficiencia

### Summary

*Transplant of Hematopoietic Stem Cells (HSCT) is the infusion of hematopoietic progenitor cells in patients with hematologic malignant, non malignant, acquired and genetic disorders of the bone marrow to reestablish immune and marrow function. The impact of the HSCT reflects on the choices of treatment, the wide diffusion of the technique and better options to the patient.*

*This procedure consist to obtain the peripheral hematopoietic progenitors; through the CD34+ cells (2-2.5 x 10<sup>6</sup>/Kg) is an excellent predictor of the successful of the engraftment. Transplant from not-related donors allow treatment to patients who lack of haploidentical family donors. Other variable of HSCT is mini-transplant, using low-doses of chemotherapy and immunosuppressors, it produces less complications, and enhances the effect “graft vs tumor”. This allows the remission of the malignant hematologic and non-hematologic diseases. It is becoming a good choice for treatment in developing countries, because decrease costs and complications.*

**Key words:** Transplant of Hematopoietic Stem Cells, Bone Marrow Transplant, Autologous Transplant, Halogenic transplant, Progenitor cells, Mini-Transplant.

combinada severa). El TCH también ha sido usado para el soporte de pacientes que reciben quimioterapia en altas dosis, cuya toxicidad hematológica limitaría su administración (cáncer de mama, tumor de células germinales y de ovario). Aunque, el uso de médula ósea por vía oral a fin de tratar algunas enfermedades hematológicas se registró a finales del siglo XVII, el primer reporte del uso de médula ósea endovenosa para el tratamiento de un paciente con aplasia medular, se le atribuye a Osgood en el año 1939 (13).

---

174 \* Medicina Interna – Hematología. Médico Consultor Sala Santa Elena Hosp. Luis Vernaza. Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínica Kennedy. Guayaquil - Ecuador  
\*\* Inmunohematología-Hemoterapia IDYTES Hospital Clínica Kennedy. Guayaquil - Ecuador  
\*\*\* Médico Residente Hospital Alcívar. Unidad Cuidados Intensivos. Guayaquil - Ecuador  
\*\*\*\* Doctor en Medicina y Cirugía. Guayaquil - Ecuador

La subsecuente identificación de los antígenos del trasplante (sistema HLA humano-histocompatibilidad) y el desarrollo de técnicas de criobiología para congelar y descongelar células hematopoyéticas, han permitido una mejor difusión del procedimiento. Enormes han sido los avances en esta área, a tal punto que un premio Nobel, fue asignado a E. Donnall Thomas por sus contribuciones al trasplante (17). Apelbaum en 1978 publicó la primera serie de trasplante autólogo de médula ósea (TAMO) exitoso (1). Actualmente el número anual de trasplantes autólogos de médula ósea ha sobrepasado al número de trasplantes alogénicos de médula ósea (TallMO) y muchas variantes de los mismos se están describiendo.

Los principales inconvenientes del trasplante autólogo de médula ósea fueron las prolongadas citopenias (en especial neutropenia), aumentando el tiempo de hospitalización, y la mortalidad; por lo que surgió la necesidad de buscar otras fuentes de células para reconstitución hematopoyética. Así para los años 80's las células progenitoras de sangre periférica (CPSP) se usaron como fuente para la regeneración hematopoyética; este procedimiento ha ganado enorme difusión en la práctica clínica del trasplante hematopoyético y básicamente ha reemplazado a la médula ósea para esta terapia.

Los factores que han contribuido a que el TCH haya ganado máxima difusión son : a) el uso de progenitores hematopoyéticos periféricos, lo que asegura un corto tiempo de "engraftment" (injerto), menor estancia hospitalaria, y menores complicaciones infecciosas; b) el advenimiento de factores de crecimiento hematopoyético (filgrastim, lenograstim, molgrastim, etc), que han conseguido disminuir la estancia hospitalaria, el tiempo de uso de antibióticos, lo cual redundo en beneficio del procedimiento; c) las mejores políticas de soporte y cuidados del paciente, aunado al incremento del uso de antibióticos de amplio espectro y antimicóticos sistémicos.

### Tipos de trasplante

La decisión para el uso de TCH está determinado por la enfermedad que afecta al paciente y sus condiciones generales, así como la disponibilidad del donante. En algunos casos, más de una opción es posible (tabla 1).

Característica	Trasplante alogénico	Trasplante autólogo
Edad limitante del candidato (años)	40-55	60-70
Problema primario en realizar el Tx.	Estrechamente vinculado a compatibilidad HLA relacionado o no relacionado	Colectar un suficiente número de progenitores hematopoyéticos no contaminados por el tumor
Complicación más seria	EICH	Recaída
Efecto anticancer de SC infundidas	Probado en un buen número de cánceres	No probado. Manipulación del sistema inmune es posible.
Uso en desórdenes no malignos	Potencialmente curativo en enfermedades genéticas e inmunológicas	No útil. La posibilidad de Terapia Génica podría ampliar su uso.

**Trasplante Alogénico de Médula Ósea o Células Progenitoras Periféricas (TallMO), de donante compatible relacionado.-** Esto involucra el uso de médula ósea o células progenitoras periféricas de un hermano (a) HLA – idéntico. En ocasiones, un hermano puede ser parcialmente compatible o bien un donante familiar (con un antígeno de discrepancia "mismatch") puede ser usado para TMO.

**Trasplante Alogénico de Médula Ósea o Células progenitoras Periféricas (TallMO), de donante compatible no relacionado.-** Dado que hay un limitado número de alelos en un sistema HLA, la tipificación de grandes números de individuos ha llevado a la observación que compatibilidades completas ("full mismatches") es posible en la población general. Existen registros internacionales a fin de conseguir potenciales donantes; en este aspecto hay más de 5 millones de donantes voluntarios (el Anthony Nolan Bone Marrow Trust (ANBMT); en Londres ha provisto más de 2000 donaciones voluntarias no relacionadas, de un registro que supera el medio millón de potenciales donantes (comunicación personal del Dr. A. Madrigal, Director del ANBMT).

**Trasplante alogénico Haplo- Idéntico.-** Esta modalidad permite el trasplante de células hematopoyéticas depletadas de linfocitos T del donante, usualmente un hermano o un pariente, quien es 50% compatible con el receptor. Aunque estos son los trasplantes más difíciles a realizar en forma satisfactoria, hay un gran interés en esta

opción debido a que la mayoría de los pacientes tiene un familiar, quien es por lo menos 50% compatible en el HLA. Aunque la mayoría de los pacientes consiguen un injerto viable y pocos tendrían enfermedad injerto contra huésped (EICH) significativa, la tasa de recaída es alta y el proceso de reconstitución inmune es bastante lento. Los pacientes llegan a tener infecciones graves por el largo tiempo de estancia en el centro de trasplante.

**Trasplante autólogo de médula ósea (TAMO).**- Esta forma de trasplante corresponde al uso de la propia médula ósea del paciente, la cual es extraída y criopreservada previa la administración de altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia. Posteriormente, al completar la terapia, las células de la médula ósea criopreservada son descongeladas y reinfundidas dentro del paciente para reestablecer la hematopoyesis. El concepto "Rescate Hematopoyético", viene de la posibilidad que tiene el paciente de recibir altas dosis de drogas anti-neoplásicas efectivas que de otra forma no las podría recibir.

**Trasplante Singénico.**- En esta forma de trasplante, la médula ósea o las CPSP son procuradas de un individuo quien es un gemelo genéticamente idéntico del paciente.

**Infusión de leucocitos del donante.**- Esto comprende la infusión de células mononucleares de la médula de un donante en el receptor para tratar la recaída posterior al trasplante. Las células pueden mediar un efecto antitumor, conocido como "Enfermedad injerto contra tumor", y puede conseguir la remisión de la enfermedad maligna.

**Trasplantes no mieloablativos o mini-trasplantes.**- Este enfoque usa dosis bajas de agentes quimioterápicos en el régimen de acondicionamiento, con o sin irradiación corporal total e inmunosupresión, para facilitar el "engraftment" de las SC del donante. Las SC del donante obtenidas ya sea de médula ósea o sangre periférica son luego infundidas dentro del paciente, llevando a la recuperación hematopoyética. El mayor efecto terapéutico en este tipo de trasplante resulta del efecto injerto contra tumor, debido a que los regímenes no-mieloablativos tienen poca eficacia antitumor (11).

**Trasplante de células progenitoras de cordón umbilical.**- La sangre del cordón umbilical del

recién nacido contiene un gran número de SC, las cuales han demostrado ser capaces de conseguir "engraftment" a largo plazo en niños y en algunos adultos después del trasplante. Similar a los registros de donantes de médula ósea no relacionados, existen bancos de cordón umbilical, como fuente de SC para ser utilizadas en trasplantes de donantes no relacionados. Dada la inmadurez inmunológica de las SC del cordón, estos trasplantes pueden ser utilizados cuando existe disparidad ("mismatching") en la tipificación del HLA entre el donante y el receptor. Los trasplantes de sangre del cordón son generalmente usados en situaciones donde un donante adulto no relacionado, no puede ser identificado en los registros internacionales (8).

### Trasplante alogénico

Tipificación HLA:

Para realizar un trasplante alogénico se procura encontrar un donante emparentado HLA compatible, quien generalmente es un hermano. La fórmula para calcular la probabilidad de que una persona particular tenga un hermano HLA compatible es:

$(1-0.75)^n$ , donde n denota el número de hermanos potencialmente donantes. En general, un paciente con solo un hermano tiene un 25% probabilidad ser compatible. El tamaño promedio de la familia americana, usualmente limita la posibilidad de encontrar un donante familiar a aproximadamente un 30% de los pacientes (2).

La tipificación HLA es realizada de muestras de sangre obtenidas del paciente y de los potenciales donantes. Los métodos serológicos han sido usados para detectar la identidad de los antígenos de clase I y II, los métodos moleculares están siendo ahora utilizados para redefinir la compatibilidad para ambos antígenos. Una compatibilidad es notada cuando los antígenos mayor de clase I y II (locus A y B); así también como los antígenos de clase II (DR), son los mismos que aquellos del donante. Cada hermano recibe un set de antígenos (A, B, DR) del padre y de la madre (cromosoma 6). La identificación genotípica puede ser confirmada al tamizar a los padres y determinar la herencia de cada set de antígenos.

En los casos en los cuales los pacientes necesitan un trasplante alogénico y carecen de un donante

familiar, la identificación de donantes no relacionados es necesaria y puede ser investigada de los archivos del programa nacional de donantes de médula (USA), así también en otros registros internacionales como el banco de donantes de médula ósea “Anthony Nolan” de Londres. Como existen múltiples alelos para un locus HLA dado, la identificación serológica no necesariamente implica la identificación genotípica, tales son el caso entre receptor y donantes hermanos relacionados. El desarrollo de técnicas moleculares como el uso de sondas oligonucleótidas, ha incrementado enormemente la precisión de la tipificación HLA, y ha permitido la mejor selección específica de donantes de médula ósea; sin embargo esta precisión cada día disminuye las posibilidades de encontrar un donante familiar compatible.

**Ventajas y desventajas.-** Las mayores ventajas del trasplante alogénico, son: la ausencia de células malignas del injerto; el efecto potencial inmunológico anticáncer del inóculo (efecto injerto vs tumor); y la posibilidad para tratar enfermedades malignas y no malignas de la médula ósea, incluido enfermedades genéticas e inmunológicas.

Entre las desventajas del trasplante alogénico, se incluyen: la dificultad de encontrar un donante HLA compatible apropiado, y la posibilidad de desarrollar después de trasplante un síndrome conocido como “enfermedad injerto contra huésped” (EICH), lo cual contribuye a la morbilidad y mortalidad del procedimiento.

### **Trasplante autólogo**

**Ventajas y desventajas.-** En el trasplante autólogo (TA), las SC reinfundidas son de la propia médula ósea o de la sangre periférica del paciente. Así estas células no pueden causar EICH, por lo tanto el TA es asociado a una menor morbilidad y mortalidad que el TAlMO, incrementando el número de pacientes quienes pueden someterse a este procedimiento, así también la edad (>60 años) no es una limitante para su realización.

Las desventajas más importantes de la TAMO, son: la posibilidad de contaminación con células tumorales del injerto causando un incremento en la tasa de recaídas; la ausencia del efecto inmunológico injerto contra tumor y la limitada

posibilidad de usar SC autólogas en el tratamiento de enfermedades linfo-hematopoyéticas congénitas no malignas (7).

### **Indicaciones para el TCH**

Los métodos de TCH han complicado la elección para el paciente y para los médicos entre las diferentes opciones de trasplantes en algunas instancias; por lo tanto, la decisión requiere una evaluación del paciente y del tipo de enfermedad. En general, para las enfermedades que requieren reemplazo de un tejido hematopoyético anormalmente funcionando tales como la talasemia y aplasia medular; la elección es un trasplante alogénico. Sin embargo, una terapia genética de las SC es mucho más real; aún en estas enfermedades, pueden ser candidatos a trasplante autólogo después de manipulaciones genéticas (deficiencia de adenosin deaminasa, enfermedad granulomatosa crónica).

### **Fases del trasplante**

**1.- Obtención de progenitores de médula ósea para autotrasplante.-** Los riesgos asociados a la recolección de médula ósea son raros y están vinculados a aquellos relacionados con la anestesia. El paciente requiere una valoración del riesgo quirúrgico, como la que se realiza a pacientes que van a ser sometidos a cirugía programada, justamente el ambiente quirúrgico estéril es el área en donde se realiza el procedimiento; requiriendo anestesia general, aunque también se han descrito técnicas con anestesia raquídea.

El procedimiento, salvo en ciertas variantes, se basa en la técnica descrita por Thomas y Storb en 1970 (16), en la cual la médula se obtiene por aspiraciones repetidas (aproximadamente 50 a 100 aspiraciones), principalmente en la cresta iliaca posterior. Cuando es necesario de la cresta iliaca anterior o del esternón. Cada aspiración no debe superar los 10 ml, para evitar la contaminación con sangre. Aproximadamente se recolecta de 10 a 15ml/Kg peso del paciente, lo cual corresponde al 5% del total de médula ósea. Todas las jeringuillas deben estar impregnada con heparina sódica. La médula obtenida es transferida a un recipiente con anticoagulante en solución salina. El sistema tradicional abierto, ha sido reemplazado por sistemas cerrados, comercialmente disponibles.

Después de que la médula ósea ha sido recolectada, la suspensión celular es filtrada a través de un sistema de fenestrado, a fin de remover los agregados, partículas de grasa y fragmentos óseos. Posteriormente, la preparación celular es transferida al laboratorio de criobiología.

Aunque no hay datos concluyentes acerca del número y el tipo de células que se requieren para asegurar un buen prendimiento del injerto (engraftment), se acepta en forma universal que la cantidad de células mononucleares sería de  $3 \times 10^8$  /Kg de peso. No obstante se han documentado hematopoyesis sostenida con valores inferiores. Otros parámetros también se han evaluado como predictores de "engraftment", a saber, el recuento de unidades formadoras de colonias, y el número de células CD34+. La correlación de células CD34+ en médula ósea, no ha tenido el mismo impacto en la predicción de engraftment de CPSP.

**Movilización y recolección de CPSP.-** Aunque las CPSP pueden ser obtenidas sin movilización, la recolección puede ser expandida por estimulación exógena previa a la cosecha de SC, asegurando un mayor número de las mismas y una buena calidad de injerto. Los agentes utilizados para la movilización de CPSP son: agentes quimioterápicos y/o factores de crecimiento hematopoyéticos.

Las ventajas de cada una de las modalidades están determinadas, por el tipo de enfermedad de base, el estadio de la misma y el protocolo de la institución que trasplanta. Nosotros, salvo particularidades, recomendamos ciclofosfamida a 3 g/m<sup>2</sup> mas factores estimulantes de colonias de granulocitos (CSF-G) como el filgrastim a dosis de 5 a 10 µg/kg/día (4, 6, 15, 18). La fase de movilización comienza con la administración de la quimioterapia movilizadora y a las 24 horas se inicia los CSF-G. Habitualmente entre el 5 y 7mo día luego de un período de descenso de granulocitos, empieza a incrementarse el recuento, llegando a un valor mayor a  $1000 \times \text{mm}^3$ , momento en el cual se realiza la recolección de SC a través de un catéter doble lumen de 11 a 13 French de diámetro. Se coloca un acceso venoso central (subclavia o yugular interna), el cual se conecta tanto en la rama venosa (salida), como en la rama arterial (entrada) a una máquina citoseparadora (aféresis), como la Cobe BTC Spectra, Fresenius AS104, o la Baxter CS300 Plus.

Aproximadamente se procesan 10 litros en cada sesión, con un flujo de 30 a 80 ml/min, pero el volumen procesado puede ser incrementado a 16L acorde a la necesidad y tolerancia del paciente.

El producto de esta recolección (leucoféresis) consta de células mononucleares, las cuales quedan suspendidas en un sistema cerrado con anticoagulante, generalmente ACD-A. Los riesgos de la leucoféresis están vinculados con la colocación del catéter venoso central y la hipocalcemia transitoria inducida por ACD-A, pero son generalmente bajos. Los procedimientos de leucoféresis se realizan a diario, a fin de conseguir un inóculo recolectado que pueda predecir un buen "engraftment" (eso corresponde a  $2$  a  $2.5 \times 10^6$  /Kg de peso de células CD34+), el valor absoluto de células mononucleares de  $1-2 \times 10^8$  /Kg de peso, el cual puede ser tomado como predictor de engraftment, en lugares en donde la posibilidad de medir células CD34+ no es posible. No obstante, el dosaje de células CD34 se debería realizar por citometría de flujo para tener un parámetro más confiable.

**Criopreservación y almacenamiento de médula Ósea ó CPSP.-** Las técnicas de criobiología, han permitido guardar por períodos prolongados inóculos o injertos viables con capacidad de reconstitución hematopoyética. Una vez obtenida la suspensión de médula ósea o CPSP en bolsas se agrega la misma una sustancia con poder criopreservable (evitan el daño celular por congelamiento). La sustancia criopreservante más utilizada es el dimetilsulfóxido (DMSO) habitualmente al 5%, adicionalmente se le agrega HES al 6%, albúmina humana al 4% o plasma autólogo, produciendo concentraciones celulares de  $1-4 \times 10^8$ /ml.

Existen varios estudios comparativos entre la congelación programada y la no programada, pero la finalidad es mantener el inóculo en temperaturas de  $-80^\circ\text{C}$  a  $-135^\circ\text{C}$  (esta última en recipientes que contienen nitrógeno líquido), este almacenamiento se hace en estructuras metálicas denominadas "containers".

**Regímenes preparativos.-** Tanto para el trasplante autólogo como para el alogénico, el paciente es sometido a un régimen preparativo de acondicionamiento. Este se realiza en los días posteriores a la recolección de médula ósea o de

CPSP, y lógicamente antes de la reinfusión de inóculo almacenado. Tiene como finalidad:

- crear un espacio para que la nueva médula o CPSP se anide y se regenere;
- proveer un suficiente grado de inmunosupresión para evitar la destrucción del injerto por células residuales inmunológicamente activas (en el caso de trasplante alogénico) y por último
- erradicar las células tumorales residuales (en el caso de trasplante autólogo, concepto de altas dosis de quimioterapia).

En el trasplante autólogo, las SC son reinfundidas luego de las terapias de altas dosis, a fin de reestablecer la hematopoyesis lo más rápido posible. Los regímenes dependen de la enfermedad que se está tratando. La protocolización de diferentes esquemas de condicionamiento, toma en cuenta las drogas más efectivas para dicho tumor, y lógicamente los efectos colaterales predecibles, en muchos tumores a más de agentes quimioterápicos se adiciona Radiación Corporal Total (RCT). Los regímenes más utilizados son: Para leucemias agudas: busulfán más ciclofosfamida; aunque la RTC ha demostrado beneficios en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).

Para linfomas Hodgkin y no Hodgkin, esquema BEAM que incluye BCNU, etopósido, citarabina, melfalán; o bien el esquema CBV (ciclofosfamida, BCNU, etopósido).

En mieloma múltiple, altas dosis de melfalán o melfalán más RCT.

El régimen BEAM ha sido el más utilizado principalmente en Europa y ha demostrado ventajas frente al CBV en enfermedad de Hodgkin, el CBV, parecería superior en Linfomas no Hodgkin.

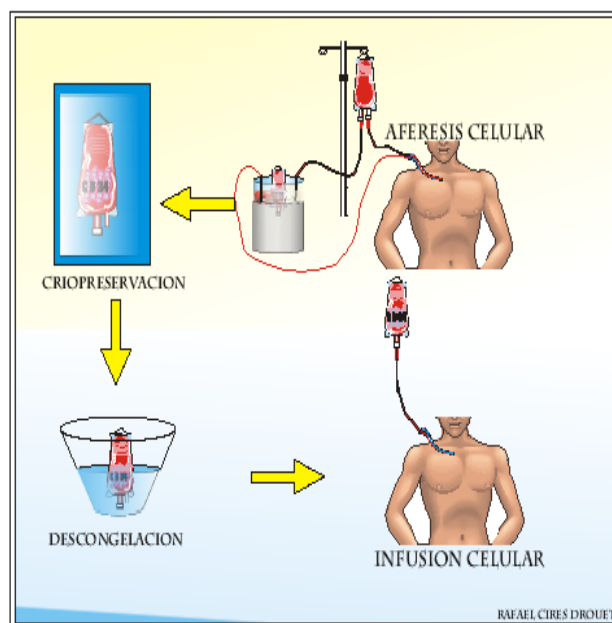
**Descongelamiento y reinfusión.-** Luego de completar el régimen de condicionamiento, se espera un día o más para la reinfusión de la médula ósea o de las CPSP. Previa la infusión del producto o inóculo descongelado, el paciente deberá ser bien hidratado y pre-medicado con antihistamínicos para reducir el riesgo de colapso vascular e hipotensión; esto puede resultar en la liberación de histamina inducida por DMSO. Aunque las reacciones al DMSO son infrecuentes, estas han sido reportadas y van desde efectos cardiovasculares (bradicardia e hipotensión) y encefalopatía, hasta muerte súbita. Frecuentemente el paciente refiere cefalea, náuseas, vómitos y hematuria.

La cantidad de DMSO que puede recibir un individuo es de 1g/Kg de peso en una ocasión. Así, cuando se infunde grandes volúmenes, se prefiere hacer la infusión en varios días, o bien hacer lavados del inóculo para remover sustancias crioprotectoras.

El descongelamiento es usualmente alcanzado por inmersión del producto congelado en baño de maría a 37°-40°C; dichas inmersiones se hacen en un recipiente estéril con agua estéril. Se debe realizar un procedimiento rápido pero no enérgico, a fin de no producir daño en la suspensión celular. No debe haber retardo en el descongelamiento y la infusión, debe hacerse en la habitación del paciente, preferentemente conectado a un monitor electrocardiográfico, de presión arterial y un oxímetro de pulso; a través del catéter venoso central, a un ritmo de infusión que no supere los 150 ml/hr (lógicamente monitorizando los signos vitales, a la expectativa de alguna reacción) (figura 1).

**Figura 1**

**Fases del reemplazo de células hematopoyéticas**



**Fase aplásica y recuperación post- trasplante.-** Posterior a la administración de los regímenes preparativos y después del trasplante, todos los pacientes necesitan atención especial, debido a las complicaciones infecciosas que aparecen en el estado neutropénico. El tiempo de duración de la neutropenia que sigue al trasplante incrementa los

riesgos de complicaciones infecciosas. Los pacientes que se someten a trasplante alogénico usualmente requieren estricto aislamiento, mientras que los pacientes que reciben trasplante autólogo requieren protección menos rigurosa. En el trasplante alogénico, ciertas complicaciones pueden desarrollarse y requieren un tratamiento especial. Para algunas de estas complicaciones debemos tomar medidas profilácticas para evitar su desarrollo.

La recuperación hematológica sobreviene cuando el injerto ha prendido, esto se manifiesta en el momento en que el recuento neutrofilico alcanza más de 500 x mm<sup>3</sup>, y el recuento plaquetario es mayor de 20000 x mm<sup>3</sup>, sin requerimientos de transfusiones. Habitualmente el engraftment granulocítico se lo consigue del 9no al 12do día pos- infusión, y el engraftment plaquetario sucede al día 14to cuando se utiliza CPSP, mientras que cuando se utiliza médula ósea el engraftment sucede al 17mo día.

Con la disponibilidad de antieméticos más efectivos (ondasentrón, granisentrón, tropisentrón) muchos pacientes pueden ser manejados de manera ambulatoria.

### **Modificaciones del injerto de "STEM CELLS"**

Las desventajas en el procedimiento tanto autólogo como alogénico ha llevado al desarrollo de ciertas técnicas de modificación del injerto:

- Remoción de célula T de la médula del donante
- Selección de célula progenitoras periféricas
- Eliminación de células tumorales del injerto autólogo
- Inmunomodulación post-trasplante

**Cuidado hospitalario del paciente trasplantado.-** El paciente trasplantado debe estar rodeado de un ambiente seguro y de medidas especiales, debido a que, como es un paciente inmunodeprimido, esta expuesto a muchas infecciones. Estas medidas se van a dividir en tres niveles: 1) medidas a nivel de infraestructura; 2) a nivel de personal médico; 3) y a nivel de visitantes y accesorios personales de paciente.

A nivel de infraestructura, el paciente con trasplante alogénico debe ser ubicado en una unidad especial, con ciertas características; como

un recambio mínimo de aire de 12 veces por hora, y filtros de ventilación HEPA (high – efficiency particulate air) capaces de remover partículas > 0,3 um de diámetro. Estas medidas no se han comprobado necesarios en el caso de trasplantes autólogos, sin embargo deben ser considerados en los trasplantes autólogos con prolongada neutropenia. El uso de sistemas de aire de flujo laminar fue considerado para pacientes con anemia aplásica que recibían TCH, pero no se ha comprobado que mejore la supervivencia, su uso es opcional. Las habitaciones de los paciente trasplantados deberán tener presión positiva en comparación con las habitaciones que los rodeen, de tal manera que siempre el aire saldrá de la habitación cuando se abra una puerta. El aislamiento de los pacientes debe ser más estricto en los días de mayor neutropenia. Los pacientes deberán permanecer en habitaciones privadas, y se deberá restringir el número de personas que ingrese a esa habitación, al mínimo necesario. Cada habitación deberá tener sus propios implementos, tales como estetoscopio, tensiómetro, monitores; los cuales no podrán ser sacados de la habitación mientras se encuentre el paciente hospitalizado, y serán de uso único para el paciente.

A nivel de personal médico medidas simples como el lavado de manos antes y después de entrar a la habitación del paciente, y con mayor razón si se va a manipular al paciente, es muy importante, las manos se deberán lavar con jabones antimicrobianos, y se deberán secar con toallas descartables.

El personal médico que va a manipular al paciente se deberá colocar los guantes después de lavarse las manos y dentro de la habitación del paciente, y los deberá descartar en la misma habitación. Este personal también deberá estar vacunado contra enfermedades transmisibles como varicela, rubéola, sarampión, paperas, e influenza; para evitar el contagio con el paciente.

A nivel del cuidado del paciente, se deberá hacer un examen odontológico completo antes de empezar el tratamiento; esto se debe hacer porque el paciente va a presentar mucositis en algún momento, y el tener alguna infección dental puede adyugar al ingreso de bacterias, o a infecciones locales difíciles de tratar. Los pacientes en la unidad de trasplante deberán tener una limpieza

bucal estricta, para esto se recomienda enjuagues bucales con agua estéril, solución salina o soluciones de bicarbonato de sodio de 4 a 6 veces al día, y los dientes se deberán cepillar al menos dos veces diarias, con un cepillo normal, o si la mucositis lo impide un cepillo de cerdas suaves. La pasta dental es opcional de acuerdo a la tolerancia del paciente. El cuidado de la piel del paciente también es muy importante por lo que diariamente se deberá revisar las áreas más propensas a infectarse, tales como el área perineal, y los accesos vasculares. Se deberá tener un buen aseo del área perineal para disminuir los riesgos de infecciones, y se tratará de evitar el uso de tampones para evitar irritación vaginal. A propósito del cuidado de los accesos vasculares, éstos se deberán revisar diariamente buscando signos de infección (3).

Los accesos vasculares periféricos serán cambiados máximos cada 72 horas o antes si hay signos de infección; y los equipos serán reemplazados de igual manera en cada cambio de catéter. Los sellos de antibióticos con vancomicina y/o ciprofloxacina, realmente disminuyen la tasa de infecciones relacionadas a catéteres, pero su uso no se recomienda debido al riesgo de desarrollar resistencia bacteriana en las bacterias que colonizan los catéteres. Los sellos de heparina si son efectivos en el cuidado del catéter, para evitar la trombosis del catéter. Los sellos de trombolíticos también fueron muy efectivos, pero poco rentables económicamente (5, 10).

### **Complicaciones**

**Sepsis neutropénica.-** Casi todos los pacientes que se someten a trasplante desarrollan fiebre dentro de los primeros 7 días, a menudo con cultivos positivos. La sepsis usualmente es causada por bacterias entéricas y aquellas bacterias de la piel; la elección del esquema antibiótico está basado en análisis del paciente y el resultado de los cultivos. Los antibióticos elegidos deben ser continuados hasta que el recuento de neutrófilos alcance más de  $500 \times \text{mm}^3$ . En el caso de trasplante alogénico, algunos autores usan antibióticos en forma profiláctica para descontaminación (fluoroquinolonas), este enfoque ha sido debatido en vista de la posibilidad de selección de flora y aparición de resistencia bacteriana, en especial el resurgimiento de infecciones micóticas.

Una importante complicación en neutropenias prolongadas, es la aparición de hongos, tipo *Candida sp* y *aspergillus*, los cuales incrementan la morbimortalidad del procedimiento. De acuerdo a recomendación de paneles de expertos, la persistencia de fiebre al 5to a 7mo día en un paciente neutropénico, es una indicación para agregar anfotericina B al esquema de tratamiento. Otra posibilidad ha sido agregar fluconazol en forma profiláctica, siendo esta postura también debatida por algunos grupos (5, 10).

**Mucositis, náuseas y anorexia.-** La toxicidad relacionada al régimen a menudo resulta en mucositis oral severa, náuseas y anorexia. A veces la mucositis se extiende al intestino agregando dolor abdominal, con síndrome diarreico; lo que constituye un reto para el diagnóstico y el manejo de la causa específica. Por la imposibilidad de usar la vía oral, muchos pacientes requieren nutrición parenteral temporal (14).

**Reactivación oral del Virus del Herpes simple (HSV).-** Casi todos los pacientes quienes son positivos para la serología para HSV tiene reactivación del virus, lo cual incrementa el dolor y la molestia en paciente transplantado. La profilaxis con antivirales específicos tipo aciclovir, ha disminuido en forma considerable su aparición; esta profilaxis se debe prolongar hasta el día 30 pos- trasplante.

**Transfusiones.-** Todos los pacientes requieren tanto de glóbulos rojos y de plaquetas en proporción a su pancitopenia. Las plaquetas deben ser mantenidas por encima de  $10.000 \times \text{mm}^3$  debido a la posibilidad de sangrado, en especial a través de la mucositis oral; aunque un umbral más bajo podría ser tolerado. Para pacientes citomegalovirus (CMV) negativo, y para quienes son receptores de un donante CMV negativo, debe recibir productos CMV negativos. Todos los productos sanguíneos deberían ser irradiados a fin de prevenir el “engraftment” de células linfocíticas y también filtrados para reducir la posibilidad de infección por CMV, la aloinmunización y las reacciones febriles. Las transfusiones plaquetarias deben ser de dador único o a través de aféresis, y ante la refractariedad a las transfusiones plaquetarias, debería hacerse compatibilidad HLA, donante receptor.



**Enfermedad veno-oclusiva de Hígado (VEOH).-**

En las primeras semanas luego del trasplante, un síndrome de enfermedad veno-oclusiva, caracterizado por hepatomegalia, ictericia y retención de líquidos, aparece hasta en un 5% al 20% de los pacientes. En la etiopatogenia de este síndrome se inculpa al daño de las células endoteliales y sinusoides del hepatocito, lo cual está relacionado a la intensidad del régimen administrado al paciente.

El diagnóstico del VEOH es hecho en base a una alta sospecha clínica. La aparición de una triada constituida por hepatomegalia, incremento del peso e ictericia, usualmente entre el 8vo y 10mo día después del régimen de condicionamiento. Los pacientes presentan retención renal del sodio y el pronóstico está relacionado al grado de disfunción renal y hepática. Los regímenes que usan busulfán están asociados a una alta incidencia de VEOH.

No hay tratamiento específico para VEOH, pero el manejo del mismo incluye un cuidadoso manejo de sobrecarga hídrica, disfunción renal y otras complicaciones que aparezcan, en especial infecciones asociadas. En algunos casos, el temprano uso de agentes trombolíticos como el activador tisular del plasminógeno pueden revertir la VEOH. La profilaxis con heparina en goteo o bien las heparinas de bajo peso molecular, ha demostrado disminuir la incidencia de VEOH.

**Enfermedad injerto contra huésped (EICH).-**

La enfermedad injerto contra huésped, es un síndrome clínico, que resulta que la infusión de linfocitos inmunocompetentes que acompañan al injerto de médula, y que son capaces de reconocer antígenos menores relacionados a HLA en el huésped, iniciando una reacción inmunológica. Este síndrome puede manifestarse posterior a un trasplante alogénico, o mucho más raro posterior a una transfusión de productos con células sanguíneas en pacientes que son inmunodeprimidos y que parte de los loci de HLA hallan injerto en las células transfundidas. Por razones desconocidas, los órganos que primero se afectan en un EICH son la piel, el hígado, y el aparato gastrointestinal.

Este síndrome ocurre usualmente dentro de los 20 a 60 días posteriores al trasplante y puede variar el grado de severidad.

**Profilaxis.-** Todos los pacientes sometidos a trasplante no libre de células T requieren de profilaxis para EICH. El régimen más común lleva una combinación de metotrexate y ciclosporina o FK506 (tacrolimus (Prograf®)) o ciclosporina y prednisona. La ciclosporina, en ausencia de EICH, es retirada progresivamente en el transcurso de 6-12 meses posterior al trasplante.

**Tratamiento.-** A pesar de la profilaxis, algunos pacientes sometidos a trasplante alogénico todavía desarrollan un grado de enfermedad injerto contra huésped y requieren mayores dosis de prednisona (1-2 mg/Kg/d) para su tratamiento. Para los pacientes que no responden a corticoides, se puede utilizar la globulina antitimocito a 10 mg /kg/d (9, 12).

**EICH crónica**

EICH crónica también puede ocurrir dentro de 3-6 meses en pacientes que han sido sometidos a trasplante alogénico de médula ósea. Usualmente sigue posterior a un evento agudo de EICH, el cual no se ha resuelto. Sin embargo EICH crónica ha sido también relacionada a la infusión de células T en el injerto de médula, lo cual asemeja otras enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, como escleroderma, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar y bronquiolitis obliterante. Los pacientes con EICH crónica usualmente se acompañan de citopenias y de deficiencia inmune.

**Tratamiento.-** La EICH crónica es generalmente tratada con cursos prolongados de esteroides, ciclosporina, FK 506 y ocasionalmente azatioprina y otras modalidades, tales como rayos ultravioletas A (PUVA) para piel y boca en EICH. La talidomida, micofenolato, rapamicina y fotoféresis también han sido empleadas con resultados variables. Al igual que el EICH agudo, el pronóstico del EICH crónico está relacionado a la extensión del órgano comprometido y a la respuesta al tratamiento.

**EICH y recaída.-** A pesar que la EICH ha contribuido significativamente a la morbilidad y mortalidad en pacientes sometidos a trasplantes alogénicos de médula ósea, está asociado índices muy bajos de recaídas, en pacientes con cánceres hematológicos (14) (tabla 2)

**Tabla 2**  
**Clasificación clínica del EICH agudo de acuerdo a daño de los órganos**

Nivel del daño	Afección del Órgano		
	Piel	Hígado (bilirrubina)	Tracto GI
1	Rash máculopapular en más del 25% de la superficie corporal.	2-3 mg/dl	500-1000 ml de líquido en heces por día
2	Rash máculopapular en 25 – 50% de la superficie corporal total.	>3-6 mg/dl	1000-1500 ml de líquido en heces por día
3	Eritroderma generalizado	>6-15 mg/dl	>1500ml de líquido en heces por día
4	Eritroderma generalizado con formación de bulas y descamación	>15 mg/dl	Dolor abdominal severo con o sin ileo
Grado Clínico	Daño del Órgano		
	Piel	Hígado	Tracto GI
I	1 o 2	0	0
II	1-3	1	1
III	2 o 3	2 o 3	2 o 3
IV	2-4	2-4	2 - 4

Grado II o mayor, requiere daño de la piel más daño hepático y/o del tracto GI. Grado IV requiere un extremo deterioro del estado mental.

**Infecciones tardías.-** Las infecciones tardías después de un trasplante de médula ósea son causadas por la inmunidad celular y humoral disminuida. Los patógenos tardíos más comunes incluyen el pneumocistis carinii, varicela zoster y bacterias encapsuladas.

**Profilaxis para pneumocistis.-** Todos los pacientes sometidos a un trasplante alogénico requieren profilaxis para pneumocistis carinii. Esto puede ser obtenido con una tableta de doble dosis de trimetopim – sulfametoxazol bid, dos veces por semana una vez que la hematopoyesis ha sido recuperada. Los fármacos alternativos son la pentamidina inhalada (NebuPent, Pentam300) ha sido utilizada, pero debido a fallas con este esquema, no es preferido.

**Tratamiento para el Herpes zoster.-** Aproximadamente 40% de los pacientes pueden desarrollar herpes zoster (localizado al dermatoma o diseminado) el cual es usualmente tratado con

aciclovir IV u oral. El paciente puede quejarse de dolor localizado por varios días antes que se desarrolle el rash. El uso de valanciclovir (Valtrex®) por un año después del trasplante, puede reducir el riesgo de reactivación del herpes después de un trasplante alogénico de médula ósea.

**Profilaxis bacteriana.-** Muchos pacientes con EICH crónico desarrollan también un síndrome de inmunodeficiencia severa que los lleva a ser susceptibles a las infecciones de bacterias encapsuladas, primeramente en los senos paranasales y los pulmones. En algunos casos, la profilaxis con trimetopim – sulfametoxazol o penicilina es necesaria, así como la administración de inmunoglobulina.

### Infección por CMV

Históricamente, la neumonía intersticial por CMV ha sido responsable de aproximadamente el 15% al 20% de las muertes posteriores a un trasplante alogénico de médula ósea. La neumonía por CMV ocurre 7 a 10 semanas posteriores al trasplante, y es debido a una reactivación del CMV latente en el paciente o es adquirida del donante o de transfusiones. La infección activa por CMV, la EICH, y la inhabilidad por desarrollar una respuesta inmune específica para el virus que limite la infección viral son factores de riesgo para neumonía por CMV.

**Diagnóstico.-** La infección es detectada por la combinación de una radiografía de tórax anormal, hipoxemia y la detección de CMV en el lavado bronquioalveolar o en biopsias de pulmón, así mismo como la ausencia de otros patógenos.

**Tratamiento.-** El único tratamiento consistente ha sido la combinación de ganciclovir (Cytovene) 5 mg/Kg bid por 3 semanas, e inmunoglobulina IV dada todos los restantes días. A pesar de que la razón de esta sinergia entre estos agentes es desconocida, ninguno de los dos, usado solo, es efectivo en revertir la neumonía, cuando ésta se ha desarrollado.

**Prevención en pacientes seronegativos.-** Lo más exitoso es la prevención de la infección por CMV en pacientes CMV- seronegativos quienes tienen un donante seronegativo y todas las transfusiones de sangre y plaquetas deben ser CMV negativo. Como muchos pacientes que se someten a trasplante son seropositivos, esta estrategia tiene aplicación limitada. Sin embargo la presencia de leucocitos en los productos sanguíneos incrementa la transmisión de CMV. Entonces, el uso de productos sanguíneos

CMV seronegativos en pacientes CMV seronegativos disminuye la incidencia de infección primaria por CMV. El estado de CMV debería ser determinado en todos los pacientes antes del trasplante para ordenar un plan y estrategias de transfusiones de sangre y derivados.

**Prevención en pacientes seropositivos.-** La estrategia más efectiva para prevenir la reactivación de la infección por CMV en pacientes que son seropositivos es el uso preventivo de ganciclovir, ya sea profilácticamente en todos los pacientes seropositivos o al primer signo de infección de CMV después del trasplante (como indicamos por cultivo de sangre, cultivo virales, o reacción de cadena de polimerasa PCR). El tiempo y la duración de la profilaxis es todavía controversial.

El ganciclovir ha sido el agente más efectivo para ambas estrategias, porque reduce significativamente la reactivación viral y las enfermedades asociadas. Sin embargo, si uno espera hasta después de la reactivación viral, para empezar la terapia con ganciclovir, algunos pacientes no se beneficiarán de la medida profiláctica, en los cuales la reactivación ocurre simultáneamente con la enfermedad. El ganciclovir tiene muchos efectos colaterales, incluyendo neutropenia y elevación de la creatinina, lo cual expone a los pacientes a una potencial toxicidad.

La duración requerida del tratamiento con ganciclovir es todavía desconocida, pero esto podría aparentar que al menos 6 semanas son necesarias para proteger al paciente de una reactivación y el desarrollo de pneumonitis dentro de los primeros 3 meses después del trasplante. Algunos pacientes han desarrollado neumonía por CMV tardía después de discontinuar la droga; se produce probablemente por la inhibición del ganciclovir en el desarrollo del células T citolíticas específicas para CMV. No obstante, el uso de ganciclovir, ha reducido el problema relacionado con la neumonía por CMV y podría ser una parte de la estrategia de manejo para prevenir las complicaciones que siguen a un trasplante alogénico.

### Otras terapias pos-trasplante

**Factores de crecimiento.-** Los factores de crecimiento han encontrado su mejor uso en la aceleración de la recuperación hematopoyética después de una reinfusión de células madre. Estudios clínicos sobre trasplante alogénico no han demostrado todavía una ventaja, probablemente debido a las medicaciones inmunodepresoras

usadas para prevenir la EICH. Los estudios valoran el uso de G-CSF o GM-CSF después de trasplante autólogo de médula; sin embargo el impacto de estos factores en la aceleración de la recuperación hematopoyética, más allá que el uso para trasplante autólogo de células madre, está todavía en investigación.

**Interleukina 2.-** También ha sido explorada como un inmunomodulador pos-trasplante para incrementar la supervivencia inmune de tumor y posiblemente disminuir las recaídas debido a células sobrevivientes en el paciente o células que fueron infundidas en el injerto .

**Eritropoyetina.-** Es usualmente usada en pacientes que persisten con anemia posterior al trasplante.

### Manejo de las recaídas

A pesar de la intensidad del régimen preparativo, algunos pacientes recaen luego del trasplante alogénico. Para pacientes con CML, el retirar la inmunosupresión para obtener un mejor efecto injerto contra tumor, puede llevar a remisión. Otros pacientes con CML pueden responder a interferón pos-trasplante, el cual parece ser muy útil. Intrigantemente, la infusión de células linfoides del donante en pacientes con CML, es una medida muy efectiva para inducir una respuesta hematológica y citogenética en aquellos que han recaído después del trasplante; esta conducta ha llevado a remisiones completas y durables.

Algunos pacientes con AML han respondido a infusión de donantes de células madre, o la combinación de quimioterapia y donación de células madre. Los pacientes con leucemia linfoblástica aguda han tenido la más baja respuesta con esta estrategia.

### Conclusiones

- El trasplante de células progenitoras periféricas es una terapia más allá de experimental, totalmente factible, con cada vez más número de experiencias en el mundo, y es la base para futuras terapias aplicables en pacientes con enfermedades hematológicas y no hematológicas, tanto benignas como de orden maligno. Las diferentes opciones o variantes

con soporte hematopoyético como tratamiento de trasplante, varía de acuerdo a la patología y las condiciones del paciente.

- En nuestro país la técnica ha sido posible de instituir, con experiencias en trasplante autólogo, realizadas por el grupo de trasplante de la Clínica Kennedy. Las complicaciones que aparecen vinculadas al tratamiento, son generalmente bien manejadas, y los avances en el soporte del paciente, permite mantener una morbilidad y mortalidad relacionada al tratamiento bajas, lo cual hace más permisiva la indicación de este procedimiento.
- A futuro, aparecerán más opciones de tratamiento, como la terapia génica y otras terapias de adopción inmune, pero serán basadas en el soporte con células hematopoyéticas, en definitiva seguimos viviendo el nacimiento y alumbramiento de una opción terapéutica que aunque bastante difundida en el mundo, se mantiene en constante y progresivo desarrollo.

### Referencias bibliográficas

1. Applebaum FR, Herzig GP, Ziegler JL et al: Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 52: 85 – 95, 1978
2. Armitage JO: Bone Marrow Transplantation. *N Eng J Med* 330: 827-838, 1994
3. Dykewicz CA, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention; Infectious Diseases Society of America; American Society for Blood and Marrow Transplantation. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: focus on community respiratory virus infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 7 (1): 9S-22S, 2001
4. Elias AD, Ayash L, Anderson KC, et al: Mobilization of peripheral blood progenitor cells by chemotherapy and granulocyte – macrophage colony stimulating factor for hematologic support after high – dose intensification for breast cancer. *Blood* 79: 3036-3044, 1992
5. Gerald D, Maki D, Crnich C, Pappas P, Rolston K: Infections in the neutropenic patient – New views of an old problem. *Hematology* 113-139, 2001
6. Giani AM, Siena S, Bregni M, et al: Granulocyte – Macrophage Colony Stimulating Factor to harvest circulating hematopoietic stem cells for auto transplantation. *Lancet* 2: 580-585, 1989
7. Gorin NC: Autologous Stem Cell Transplantation in acute myelocytic leukemia. *Blood* 92 (4): 1073-1090, 1998
8. Grewal S, Barker J, Davies S, Wagner J: Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord?. *Blood* 101 (11): 4233-4244, 2003
9. Herve P, Wijdenes J, Bergerat JP, et al: Treatment of corticosteroid resistant acute Graft vs Host disease by in vivo administration of anti –interleukin – 2 receptor monoclonal antibody (B-B10). *Blood* 75 (4): 1017-1023, 1990
10. Huges W, Armstrong D, Bodey G, Bow E, et al: 2002 Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *IDSA Guidelines, CID* 34: 730-751, 2002
11. Maloney D, Sandmaier B, Mackinnon S, et al: Non Myeloablative Transplantation. *Hematology* 392-421, 2002
12. Martin P, Schoch G, Fischer L, et al: A retrospective analysis of therapy for acute graft vs host disease, initial treatment. *Blood* 76 (8): 1464-72, 1990
13. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ: Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med* 13: 357-367, 1939
14. Pazdur R, Lawrence C, Hoskins W, Laurence W: Cancer management, a multidisciplinary approach. *PRR Melville, New York* 701-713, 2001
15. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, et al: Effect of peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high- dose chemotherapy. *Lancet* 339: 640-644, 1992
16. Thomas ED, Storb R: Technique for human marrow grafting. *Blood* 36: 507-515, 1970
17. Thomas ED, Storb, Clift RA, et al: Bone Marrow Transplantation. *N Eng J Med* 292: 832-843, 1975
18. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, et al: Single high doses of cichiphosphamide enable the collection of high numbers of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol* 18:442-447, 1990

**Dr. Jorge W. Oliveros Alvear**  
**Correo electrónico: olisan@interactive.net.ec**  
**Dr. Rafael S. Cires Drouet**  
**Correo electrónico: rafaelcires@hotmail.com**  
**Alfonso J. Tafur Chang M.D.**  
**Correo electrónico: alfonso\_tafur@hotmail.com**