

UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

**CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN
AL ESTUDIO DEL IMPLANTE MEDULAR Y DE LAS
QUIMERAS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE
MÉDULA ÓSEA**

**Tesis presentada por
Salut Brunet Mauri para optar al
título de Doctor en Medicina y
Cirugía**

Barcelona, Julio de 1990

4.2.2 RESULTADOS GLOBALES DEL ESTUDIO DEL FENOTIPO ERITROCITARIO

EN 25 pacientes se realizó estudio de quimera para valorar el implante de serie roja en el post-TMO. Los resultados se muestran en la Tabla 42.1.

Para la valoración del implante se ha procedido a estudiar a los pacientes tal y como se ha expuesto en el apartado 3.1.3.

En 18 pacientes (72%) el estudio del fenotipo eritrocitario pre-TMO mostró unos marcadores específicos donante-receptor o receptor. En los restantes pacientes el marcador obtenido, con las salvedades hechas en el apartado 3.1.3. fué del donante.

En 19 pacientes se constató implante entre los días +40 y +120, con una mediana de 90 días. En el resto de pacientes no fué posible valorar este criterio puesto que no se remitieron muestras para su documentación. La mediana de seguimiento, con este método, de los 25 pacientes ha sido de +360 días (extremos 90-1825).

Se han objetivado un total de 11 quimeras mixtas (44%) de los 25 pacientes, tal como se muestra en la Tabla 42.1. De éstas, 3 (UPN 38, 61, 85) han sido estables a lo largo del tiempo, con oscilaciones del porcentaje de hematíes residuales del receptor en todos los casos de entre un 2-20%. Además, la quimera mixta roja ha permanecido estable, independientemente de la evolución del paciente. Al cuarto paciente (UPN 122), no se le practicaron más determinaciones para valorar si se trataba o no de una quimera mixta estable.

En 7 de los 11 pacientes (UPNs 55, 82, 91, 92, 102, 128, 129) se detectó quimera mixta inicialmente, para posteriormente, revertir en todos los casos a quimera eritrocitaria total. Existía incompatibilidad ABO en 5 de los 7 casos (3 mayor y 2 menor) y fué en los 3 con incompatibilidad ABO mayor, en los que no se revertió a quimera roja total hasta el año del TMO. En el resto de casos se revertió a quimera roja total entre los +90 y +180 días. El porcentaje de hematíes residuales detectados tuvo relación con el tipo de incompatibilidad ABO: En los 3 pacientes con incompatibilidad ABO mayor hasta los +120 días la mayor parte de hematíes (80-95%) seguían siendo del receptor, para paulatinamente revertir a quimera roja. En el resto de pacientes el porcentaje de hematíes residuales del receptor osciló entre un 5-20%. De los 11 pacientes, 3 (27%) han recaído (UPN 55, UPN 61, UPN 92), 1 paciente (UPN 38) falleció por sepsis en RCC a los 18 meses del TMO y el resto de los pacientes (64%) continúa en RCC con un seguimiento de +9 a +22 meses (mediana +12 meses) post-TMO.

En 13 pacientes (52%) la quimera detectada durante todo el seguimiento fué total. De éstos, 3 (23%) pacientes (UPN 27, UPN 34, UPN 84) han fallecido como consecuencia de presentar recaída leucémica. En ningún caso el estudio practicado en el momento de la recaída demostró la presencia de algún elemento eritrocitario del receptor. En 1 caso el paciente falleció a los +8 meses del TMO por enterocolitis necrotizante en RC y el resto de pacientes sigue en RCC entre +5 y +53 (mediana 36 meses) post-TMO.

El UPN 72, sometido a TMO por Talasemia Mayor, presentó durante su seguimiento dos etapas bien diferenciadas. EL

estudio pre-TMO fué difícil de practicar debido a las múltiples transfusiones recibidas, pero se pudieron establecer diferencias claras entre el donante y el receptor. En el post-TMO y a los +60 días, al analizar la fracción rica en reticulocitos, se demostró que el fenotipo eritrocitario era igual al del donante. Posteriormente y a los +120 días se demostró una recuperación autóloga. Actualmente sigue bajo regimen transfusional.

4.2.3 RESULTADOS GLOBALES DEL ESTUDIO CITOGENETICO

En la Tabla 42.2 se muestran los resultados del estudio citogenético en el post-TMO.

Para la valoración del implante se han estudiado los 14 pacientes en los que se obtuvo muestra antes del día +30. En el 50% de los casos en los que se remitió muestra el día +14 (2 de 4 pacientes), se obtuvieron metafases adecuadas para el análisis. Las causas por las que no se pudo efectuar el estudio en el día +14 en 2 pacientes fué la no obtención de mitosis. En el 100% de los casos (12 de 12 pacientes), en los que la muestra se remitió los días +21 y +30, se obtuvieron metafases adecuadas para el análisis.

La mediana de seguimiento de los 17 pacientes, con este método, ha sido de +180 días (extremos 21-900).

De los 17 pacientes estudiados, en 10 (59%) se constató quimera linfohematopoyética total durante todo su seguimiento, tanto en sangre periférica (SP+) como en médula ósea (MO-). De estos 10 pacientes, 2 (UPN 56, UPN 141), fallecieron por EICH aguda y el resto (80%) sigue en RCC

con un seguimiento entre +9 y +42 meses (mediana +20).

En 4 pacientes (24%) inicialmente se constató implante linfohematopoyético total tanto en SP+ como en MO-, pero a lo largo del seguimiento presentaron recaída de su enfermedad (UPN 61, UPN 84, UPN 92, UPN 99). En este momento se constató en 3 de ellos, estudiados en MO-, la presencia de metafases correspondientes a células del receptor. En el caso del UPN 84, el estudio se realizó en el día +135 (1.5 meses antes de la recaída) y se objetivó que mientras 4 de las metafases analizadas eran del donante las 4 restantes eran hipodiploides, sin poder determinar claramente su origen.

En 3 (18%) pacientes se detectó la presencia de quimeras mixtas en las muestras estudiadas en SP+. El paciente UPN 109, tenía un donante del mismo sexo, pero disponía en el momento del diagnóstico del Cr Ph'. En el día +30, se demostró, en el análisis efectuado en MO-, ausencia de anomalías cromosómicas incluido el Cr Ph'. Mientras que en SP+, entre los días +60 y +120, se objetivaron metafases con múltiples anomalías no clonales sugestivas de irradiación y ausencia del Cr Ph'. A partir del día +180, tanto el estudio efectuado en MO- como en SP+, no detectó anomalías cromosómicas incluyendo el Cr Ph'. A los +360 días post-TMO el paciente sigue en RC.

En el paciente UPN 122, inicialmente tanto en SP+ como en MO-, se demostró implante total. En el día +90 en un estudio practicado en SP+ se demostró la presencia de 1 metafase correspondiente a células del receptor con múltiples anomalías. A los +180 días el estudio citogenético efectuado en SP+ demostró quimera total.

El paciente UPN 128 disponía de un donante de distinto sexo. Hasta el día +90, el estudio citogenético practicado en SP+ demostró la persistencia de algunas metafases XY con anomalías no clonales sugestivas de lesión por irradiación. Sin embargo en MO-, el estudio citogenético practicado a los +14 y +90 días objetivó quimera total sin evidencia de anomalías cromosómicas, al igual que el estudio en SP+ efectuado en el día +120.

4.2.4 RESULTADOS DEL ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN

Mediante la utilización del panel de sondas dialélicas y multialélicas, antes comentadas, se ha efectuado el seguimiento en 50 pacientes en el período post-TMO. La Tabla 42.3 muestra los resultados obtenidos.

De los 50 pacientes estudiados, 41 fueron analizados prospectivamente y en 9 se inició el estudio en distintos momentos después del TMO. Para la valoración del implante medular se han considerado dos aspectos: la capacidad del método para documentarlo y la validez del mismo para evidenciar dicho implante en etapas muy tempranas del post-TMO.

En lo que se refiere a la capacidad del método para demostrar la existencia de una quimera hematopoyética, se han considerado los resultados obtenidos en la totalidad de los pacientes (n=50). En 2 pacientes no se obtuvo muestra pre-TMO y para este análisis se considerarán aparte.

En 47 de los 48 pacientes (98%), el polimorfismo obtenido en la fase pre-TMO fué máximo informativo donante-receptor

o máximo informativo receptor y tan sólo en 1 paciente (2%), el polimorfismo fué máximo informativo donante.

Los resultados obtenidos con el estudio de los polimorfismos del ADN han evidenciado la existencia de quimera total a lo largo de todo el seguimiento en 37 pacientes, lo que representa el 77% del total. La mediana de seguimiento con ésta técnica ha sido de +180 días (extremos 21-1825 días).

La incidencia de EICH aguda en estos 37 pacientes fue del 68%: en 12 (32%) casos no hubo evidencia de enfermedad, en 14 casos (38%) de grado I, en 5 casos (14%) de grado II, en 2 casos (5%) de grado III y en 4 casos (11%) de grado IV (Tabla 42.4).

De los pacientes con quimera total durante todo el seguimiento, 3 (8%) fallecieron de recaída de su enfermedad (UPN 27 con recaída focal; UPN 34 presentó recaída a expensas de células del donante y en el caso del UPN 218 no se remitió muestra para su estudio), 10 (27%) pacientes fallecieron de consecuencias relacionadas con el TMO (UPN, 56, UPN 68, UPN 94, UPN 141, UPN 149, UPN 240, UPN 244, UPN 246, UPN 253 y UPN 263) y 24 (65%) pacientes siguen en RCC entre +1 y +48 (mediana 11) meses post-TMO.

En 11 pacientes (23%), se ha demostrado la coexistencia de poblaciones celulares de diferente origen en distintos períodos del seguimiento. A lo largo de éste se ha evidenciado lo siguiente: En 6 casos esta heterogeneidad correspondía a la recaída leucémica que se presentó tras un primer período de quimera total (UPNs 55, 61, 84, 92, 99 241C). En 3 casos la coexistencia de dos poblaciones celulares cumplía el criterio de quimera mixta; en un caso (UPN 38), apareció después de que se demostró quimera total,

mientras que en los otros dos pacientes (UPN 109 y UPN 122), la recuperación hematológica fué a expensas de las dos poblaciones. El UPN 122 reversionó en el día +60 a quimera linfohematopoyética total y el UPN 109 sigue con quimera mixta linfohematopoyética estable. En 2 pacientes se detectó también inicialmente la coexistencia de dos poblaciones celulares. En ambos casos se demostró, antes de los +3 meses del TMO, la recuperación de la hematopoyesis del receptor; en el UPN 64 se puso en evidencia a los +2 meses la recaída leucémica, mientras que en el UPN 72 la recuperación autóloga supuso para el paciente el volver a su estado de talasémico mayor. De los 11 pacientes con quimera mixta 2 (18%) siguen en RCC (UPN 109 y UPN 122) con un seguimiento entre los +10 y +12 (mediana 11) meses post-TMO.

La incidencia de EICH aguda en estos 11 casos fue: en 3 pacientes (27%) no hubo evidencia de enfermedad, en 5 (45%) fue de grado I y en 3 (27%) de grado II. Ningún paciente de este grupo presentó EICH grado IV (Tabla 42.4).

En 2 de los 50 pacientes, debido a la falta de estudio en el periodo pre-TMO, sólo ha sido posible documentar en el post-TMO de la paciente UPN 9 la presencia de unos marcadores del ADN idénticos a los del donante durante toda la evolución y sigue en RCC a los +53 meses post-TMO. En la paciente UPN 47 se ha observado, mediante la utilización de 3 sondas multialélicas, lo siguiente: desde el día +21, en que se objetivó el implante medular, se observó además la presencia de fragmentos de ADN que no correspondían a los del donante, por lo que se puede deducir que presentaba una coexistencia de 2 poblaciones, la del donante mayoritaria-

mente y, con toda probabilidad, la presencia de células residuales del receptor. Este hecho se dió hasta el día +540 y pudo ser comprobado utilizando las 3 sondas. A partir de este momento la paciente reversionó a quimera linfohematopoyética total. La paciente presentó EICH agudo grado II y sigue en RCC a los +37 meses post-TMO.

Para valorar el segundo aspecto, es decir, la validez del método para documentar el implante en etapas precoces del TMO, se han considerado los resultados obtenidos en los 40 pacientes analizados prospectivamente. En 24 de éstos, el TMO se realizó en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, extrayéndose, en la mayoría de ellos, muestras en el día +14 y en el resto a partir del día +21. En 8 pacientes, en los que se obtuvo muestra suficiente para efectuar la digestión, se pudo constatar el implante medular en el día +14. En 14 pacientes se pudo demostrar el implante en el día +21 y en 2 pacientes se objetivó en el día +30. La causa por la que no se pudo evaluar el implante en todos los casos en que se remitió muestra en el día +14 y en el día +21, fué la poca cantidad de muestra para la obtención del ADN necesario para efectuar la digestión.

El TMO se realizó en la Escuela de Hematología Farreras Valentí del Hospital Clínic en 18 pacientes. Las muestras que se remitieron para su estudio al Hospital de Sant Pau, fueron extraídas mayoritariamente a partir del día +21. En este grupo de pacientes la valoración del estudio del ADN, para documentar precozmente la existencia del implante, no puede ser tan rigurosa como en el grupo anterior. De todos modos se constató que en 10 pacientes (55%) existía evidencia de implante en el día +21 y que en la totalidad de los

casos, en los que se remitió muestra, la evidencia se obtuvo en la muestra del día +30. Por consiguiente, en el 100% de los pacientes analizados se constató el implante al primer mes del TMO.

4.2.5 UTILIDAD DE LOS DISTINTOS METODOS PARA LA VALORACION DEL IMPLANTE MEDULAR

Los 3 métodos han demostrado su utilidad en la valoración del implante medular. Con respecto a cuál es el método con el que más precozmente se puede demostrar el implante, el estudio del fenotipo eritrocitario, no es un método adecuado puesto que para que sea fiable ha de existir un intervalo de aproximadamente 90 días entre la última transfusión de hematíes y la recogida de la muestra.

Cuando consideramos los enfermos analizados en el día +14, mediante los métodos citogenético y molecular, en el 50% de los casos se pudo documentar el implante con el estudio citogenético, frente al 100% de los casos con el estudio molecular ($P=0.077$) (Tabla 42.5). Asimismo si se consideran los pacientes analizados en el día +21 y +30 con ambos métodos, en el 100% de los pacientes se pudo documentar el implante con ambos. Sin embargo, han de tenerse en cuenta al efectuar comparaciones, las ventajas y limitaciones de cada técnica.

Ambas técnicas comparten el hecho de que se analiza toda la hemopoyesis, en especial cuando el análisis se practica en médula ósea. En contraste, cuando el estudio citogenético se practica en una muestra de SP normal, estimulada con

PHA+, solamente se analizan linfocitos.

En nuestra casuística el número de pacientes que se han beneficiado del estudio citogenético ha sido menor que con el estudio de los polimorfismos del ADN, debido a que el mismo se ha efectuado en aquellos pacientes sin identidad sexual con el donante y/o cuando presentaban previamente un cromosoma marcador. Por otra parte, el análisis citogenético requiere un número de células muy superior (x15) al estudio molecular. Finalmente, se ha de tener en cuenta la gran laboriosidad que representa el conseguir un número de metafases adecuadas para documentar el implante, que aumenta notablemente en el caso de analizar MO-.

4.2.6 UTILIDAD DE LOS DISTINTOS METODOS PARA VALORAR EL ESTADO QUIMERICO

De los 50 pacientes seguidos a lo largo de toda su evolución, se ha analizado la persistencia de quimera linfohematopoyética total, la presencia de quimeras mixtas y la repoblación autóloga en distintos momentos del seguimiento (a los +90 y +180 días). En las Tablas 42.6 y 42.7 se muestran los resultados obtenidos.

Al analizar, globalmente la incidencia de quimeras mixtas, se detectó un mayor porcentaje de células residuales en los pacientes analizados con el estudio del fenotipo eritrocitario, en relación con las detectadas mediante el estudio de los polimorfismos del ADN ($p < 0,05$) (Tabla 42.8).

4.2.6.1 ESTUDIOS PRACTICADOS A LOS +90 DIAS

A los +90 días, mediante el estudio citogenético, fue posible evaluar la quimera en 9 pacientes. Dicho estudio se practicó en 5 casos en SP+ y en 5 casos en MO-. En SP+ se demostró en 3 casos la presencia de quimeras mixtas. El seguimiento de estos pacientes (+9 y +12 meses con una mediana de 10) ha demostrado que siguen en RC mantenida. En uno de ellos, además, se practicó simultáneamente estudio en MO-. En este momento, en MO- se demostró quimera total. En el estudio con MO- se objetivaron 5 quimeras totales. De ellos, 2 pacientes (UPN 84 y UPN 92) recayeron posteriormente (a los +6 y +13 meses, respectivamente). En el día +90, el estudio citogenético, realizado en MO-, no demostró ninguna quimera mixta.

En 20 pacientes se practicó estudio de quimera a los +90 días mediante los FRLP. En 15 casos (75%), se detectó quimera linfohematopoyética total. De éstos, 2 pacientes (13%), (UPN 84 y UPN 92), recayeron posteriormente a los +6 y +14 meses respectivamente. En 5 pacientes (25%), se detectó la presencia de quimera mixta. De éstos, 2 pacientes (40%), (UPN 61 y UPN 241C), recayeron a los +9 y +4 meses del TMO respectivamente. Los pacientes con LA en los que se detectó quimera mixta con el estudio de los FRLP en el día +90 mostraron, en nuestro análisis, un riesgo de recaída significativamente mayor en comparación con aquellos en los que se detectó quimera total ($p < 0,05$) (Figura 42.1).

Si bien en 14 pacientes se había valorado el implante medular mediante el estudio del fenotipo eritrocitario, es

difícil, en el día +90, la interpretación del hallazgo de una quimera mixta, debido a que la vida media de los hematíes es de 120 días, aproximadamente.

4.2.6.2 ESTUDIOS PRACTICADOS A LOS +180 DIAS

A los +180 días, se practicó en 13 pacientes estudio del fenotipo eritrocitario. En 8 casos (61.5%), se constató quimera roja total. Dos pacientes (UPN 84 y UPN 92) presentaron, posteriormente, recaída de su enfermedad a los +6 y +14 meses, respectivamente. En 5 pacientes (38.5%) se detectó quimera mixta. De éstos, 3 pacientes con incompatibilidad ABO mayor reversionaron a quimera roja total al año del TMO. En 2 pacientes la quimera mixta ha permanecido estable durante todo su seguimiento. De los 5 pacientes con quimera mixta, 2 presentaron recaída de su enfermedad. En un caso (UPN 55), el estudio del fenotipo eritrocitario realizado en el momento de la recaída, demostró quimera roja total. El estudio del paciente (UPN 61) demostró persistencia de su quimera mixta con el mismo porcentaje de hematíes residuales del receptor.

En 7 pacientes se efectuó estudio citogenético a los +180 días. El análisis se realizó en 4 casos con MO- y en 4 pacientes en SP+. En todos ellos se constató quimera total. De los pacientes analizados con SP+, 2 pacientes (UPN 61 y UPN 92) presentaron recaída a los +9 y +14 meses respectivamente. De los pacientes analizados en MO-, un paciente el (UPN 92) recayó.

En 18 casos se pudo efectuar en el día +180 estudio median-

te los polimorfismos del ADN. En 12 pacientes (67%) se constató, en este momento, la presencia de quimera linfohematopoyética total. De éstos, 1 paciente (UPN 92) recayó posteriormente, como ya ha sido comentado. En 4 casos (22%) se detectó la presencia de quimera mixta (UPN 47, UPN 55, UPN 61 y UPN 109). El UPN 55 reversionó posteriormente a quimera total para recaer finalmente a los +26 meses. El UPN 47 siguió con quimera mixta estable hasta el día +540, reversionó posteriormente a quimera total en el día +720. El UPN 61 recayó a los +9 meses. El UPN 109 sigue con quimera linfohematopoyética mixta estable. En 2 (11.1%) casos se demostró, en este momento, repoblación autóloga. En un caso el paciente estaba diagnosticado de Talasemia mayor (UPN 72) y el otro (UPN 84) coincidió con la recaída leucémica. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a riesgo de recaída, para los pacientes con LA y LMC en los que se detectó quimera mixta en este momento, en relación a los que se detectó quimera total (P:NS).

4.2.6.3 CONCORDANCIA ENTRE LOS DISTINTOS METODOS

A LOS +90 DIAS

A los +90 días, se estudiaron 9 pacientes mediante los polimorfismos del ADN y el estudio citogenético (Tabla 42.9). En todos, exepcto en un caso (89%), ambos métodos fueron concordantes en cuanto a los resultados obtenidos. En el UPN 122, mientras el estudio mediante los FRLP efec-

tuado en sangre periférica no detectó células residuales del receptor, el estudio citogenético efectuado en SP+ demostró la presencia de 1 metafase con múltiples anomalías. Posteriormente (+180 días), el análisis efectuado en SP+ evidenció quimera total. Clínicamente sigue en RC.

A LOS +180 DIAS

La Tabla 42.10 muestra los resultados obtenidos. De los 7 pacientes analizados con 2 métodos, existió concordancia en 5 de ellos (71%). En el caso del UPN 84, el análisis del día +180 coincidió con la recaída leucémica y mientras que los FRLP evidenciaron que la mayoría de linfocitos pertenecía al receptor, el estudio del fenotipo eritrocitario constató que la serie roja era del donante. En el caso del UPN 85, el estudio de los FRLP evidenciaron quimera total durante toda su evolución, mientras que el estudio del fenotipo eritrocitario demostró la presencia de un 2% de hematies residuales del receptor durante todo el seguimiento.

De los 6 pacientes que se pudieron analizar mediante los 3 métodos, existió discordancia de los resultados en 4 de ellos (67%). En 2 casos dicha discordancia fué debida al resultado del estudio del fenotipo eritrocitario. En los 2 casos había incompatibilidad ABO mayor. En el caso del UPN 109, mientras el estudio citogenético efectuado en MO- demostró ausencia del Cr Ph' y de anomalías no clonales, el fenotipo eritrocitario demostró quimera total. El estudio con los FRLP, analizados tanto en sangre periférica como en

médula ósea, evidenció la presencia de un pequeño porcentaje de células residuales del receptor. El paciente (UPN 61) tenía incompatibilidad ABO menor entre donante-receptor. Los estudios del fenotipo eritrocitario y de los FRLP demostraron la presencia de una quimera mixta. En contraste, el estudio citogenético demostró que todas las metafases analizadas eran del donante. El paciente recayó a los +270 días.

INCIDENCIA DE ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL RECEPTOR

La incidencia de EICH moderada-grave (grados III-IV) fué de un 14% (6 pacientes) en los pacientes con quimera total, analizada con los FRLP, frente a un 0% de EICH para los pacientes en los que se detectó quimera mixta, mientras que la incidencia de EICH moderada (grados I-II) fué del 51% (19 pacientes), para los pacientes con quimera total frente a 8 pacientes (72%), en los que se detectó quimera mixta en cualquier momento de su evolución (P:NS) (Tabla 42.4).

4.2.7 UTILIDAD DE LOS DISTINTOS METODOS EN EL ESTUDIO DE LA RECAIDA MEDULAR

De 40 pacientes con LA o LMC evaluados, 9 (22%) han presentado recaída leucémica (Tabla 42.11). De éstos, en el momento del TMO, 7 estaban diagnosticados de LAL (1 en 1ª RC y 6 en 2ª RC) y 2 casos de LANL (1ª RC y recaída respectivamente). La mediana de aparición de la recaída fué de 9

meses (extremos 2-27 meses). En 3 casos se estudió el origen de la recaída mediante el fenotipo eritrocitario, en 3 mediante el estudio citogenético y en los 9 casos, la recaída se analizó mediante el estudio de los polimorfismos del ADN. En 3 pacientes se pudo analizar mediante 2 métodos y en 1 caso mediante los tres métodos.

Mediante el estudio del fenotipo eritrocitario, en ninguno de los 3 casos, este método sirvió para filiar el origen de la recaída. En 2 casos (67%) el estudio demostró quimera roja total. En el paciente restante (UPN 61), que presentó quimera mixta persistente durante todo el seguimiento, el análisis efectuado en el momento de la recaída, demostró el mismo porcentaje de hematíes residuales.

En los 3 casos en que el estudio de la recaída se efectuó mediante el análisis citogenético en MO-, (UPN 61, UPN 92 y UPN 99) éste demostró la presencia de metafases correspondientes a células del receptor con múltiples anomalías clonales en 2 de los 3 pacientes lo que confirmó que la misma se originó a expensas de las células residuales del paciente.

Es de destacar que en una paciente (UPN 92) el estudio se efectuó simultáneamente en MO- y en SP+. Los resultados de la SP+ mostraron tan sólo metafases XY, mientras que la MO- mostró, además de metafases XY, la presencia de metafases XX con múltiples anomalías clonales y t(15;17). Biológicamente, la paciente presentaba, en SP, leucocitosis de $27 \times 10^6/l$ con un recuento diferencial de 5% de blastos y linfocitosis absoluta, cuyo estudio fenotípico demostró que se trataba de una linfocitosis T8. El análisis de la médula ósea mostró infiltración absoluta por blastos de tipo

promielocítico.

Mediante los FRLP se estudiaron los 9 pacientes que presentaron recaída y en todos los casos en que la misma fue medular fue posible filiar su origen. El paciente UPN 27 presentó recaída localizada en la vertebra D8. En los estudios medulares practicados, hasta el inicio de la quimioterapia, no se constató recaída medular. No se efectuó estudio del material obtenido en la punción de la D8 y el análisis de los FRLP de la médula ósea demostró repetidamente quimera linfohematopoyética total.

De los 8 pacientes con recaída leucémica medular, en 7 el estudio demostró que el origen de la misma fue a partir de células residuales del receptor.

En 3 pacientes (UPN 55, UPN 84 y UPN 99) el origen de la recaída se estudió mediante 2 métodos. En el paciente UPN 55, mientras el estudio del fenotipo eritrocitario demostró en el momento de la recaída quimera total de serie roja, el estudio de los polimorfismos del ADN demostró que la misma se originó a expensas de células residuales del receptor. En el paciente UPN 84 el estudio del fenotipo eritrocitario demostró quimera roja total, mientras que el estudio mediante los FRLP evidenció la presencia de material genético del receptor. El estudio citogenético del paciente UPN 99 efectuado en médula ósea, en el momento de la recaída, evidenció, además, de metafases del donante, la presencia de metafases del receptor. El estudio de los polimorfismos del ADN demostró que la misma se originaba a partir de células residuales del receptor.

En 2 pacientes (UPN 61 y UPN 92) el estudio de la recaída se efectuó mediante los 3 métodos. El estudio de los poli-

morfismos del ADN, demostró en el paciente UPN 61, que el origen de la recaída era a expensas de la reaparición de células residuales del propio paciente. El estudio citogenético corroboró el diagnóstico y los resultados del estudio del fenotipo eritrocitario no fueron de utilidad. Asimismo, en la paciente UPN 92 el estudio de los polimorfismos del ADN evidenció la reaparición progresiva de células residuales del receptor, así como la sensibilidad de las mismas al tratamiento citostático, puesto que finalizado éste, se pudo comprobar la disminución progresiva del marcador de ADN específico del receptor.

En el paciente UPN 34 el estudio de los polimorfismos del ADN practicado en médula ósea, en el momento de la recaída, con una sonda que mostró un polimorfismo máximo informativo receptor objetivó tan sólo fragmentos de ADN correspondientes a células del donante, por lo que el estudio sugiere que la recaída se originó a expensas de hemopoyesis del donante.

TABLA 41.1a DIFERENCIAS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	SEXO DONANTE	RECEPTOR	DONANTE
9/M	M	rr	R1r
27/V	V	R1r	R1R1
28/V	V	ND	ND
34/V	V	JKa-	Jka+
36/V	M	A	O
38/M	M	R1r	R1R1
45/V	V	AB	B
47/M	V	rr	R1r
48/V	M	A	B
53/M	V	R1r	R1R2
55/V	V	O	A
56/M	V	rr	R1r
61/V	M	A	O
64/V	V	Fya+	Fya-
66/V	M	O	A

UPN: Número identificación del paciente;
 ND: no determinado; FI: fenotipo identico.

TABLA 41.1b DIFERENCIAS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	SEXO DONANTE	RECEPTOR	DONANTE
68/V	V	R ₀ r	R1r
72/V	V	R1r	rr
74/V	V	D+	D-
79/V	M	B	AB
82/M	V	B	A
84/V	M	rr	R1r
85/V	M	A	O
87/V	M	Fyb+	Fyb-
91/V	V	A	O
92/M	V	AB	B
94/V	M	O	A
99/V	M	Fya-	Fya+
100/V	V	O	A
102/M	V	O	A
109/V	V	Fyb-	Fyb+

UPN: Número identificación del paciente;
 ND: no determinado; FI: fenotipo idéntico.

TABLA 41.1c DIFERENCIAS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	SEXO DONANTE	RECEPTOR	DONANTE
122/V	M	D-	D+
128/V	M	R2r	rr
129/M	V	R1r	R1R2
135/M	V	AB	A
139/V	M	A	O
141/V	M	B	A
143/V	M	A	O
147/V	V	JKb-	JKb+
149/V	V	R2r	R1R2
153/V	M	R1r	R2r
157/M	M	B	AB
159/M	M	A	O
216C/M	M	O	A
218C/V	M	FI	FI

UPN: Número identificación del paciente;
 ND: no determinado; FI: fenotipo idéntico.

TABLA 41.16 DIFERENCIAS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	SEXO DONANTE	RECEPTOR	DONANTE
220C/V	M	O	A
221C/M	V	Jk(b+)	Jk(b-)
229C/V	V	R1R2	R1r
233C/M	M	R1r	rr
240C/M	V	D*	R1r
241C/M	V	O	A
242C/M	M	R1r	R2R2
243C/M	M	D*	R1r.
244C/V	M	A	B
246C/M	V	R1R2	R1x
248C/V	V	O	A
253C/V	V	A	O
257C/M	M	PI	PI
261C/M	M	ND	ND
262C/V	V	D*	R1r

UPN: Número identificación del paciente;

ND: No determinado; PI: fenotipo idéntico.

*: No se pudieron determinar más antígenos por transfusiones previas

TABLA 41.1e DIFERENCIAS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	SEXO DONANTE	RECEPTOR	DONANTE
263C/V	V	R1R2	R1R1
266C/V	M	O	B
269C/M	M	A	O
271C/M	V	A	O
272C/V	V	ND	ND
273C/V	M	ND	ND
274C/M	M	r r	R1r

UPN: Número identificación del paciente;
 ND: no determinado; FI: fenotipo identico.

TABLA 41.2 DIFERENCIAS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO
EN PAREJAS DONANTE RECEPTOR

PACIENTE I*/SEXO	SEXO DONANTE	RECEPTOR	DONANTE
VA/M	V	B	A
JG/V	M	FI	FI
DA/M	V	R1r	R1R2
PC/M	V	ND	ND
JP/V	V	R1R2	R2r
EG/V	M	O	A
CM/M	M	A	O
MC/M	V	O	A
CH/M	M	R1R2	R2r
JE/V	M	r'r"	R1r
MM/V	V	ND	ND
AO/V	V	s	S
LM/M	V	R1R2	R1r
TY/V	V	ND	ND
GB/M	M	R1R1	R1R2
PG/M	V	Jk(a+)	Jk(a-)

I: identificación; ND: no determinado;
FI: fenotipo idéntico.

TABLA 41.3 NOMENCLATURA DEL SISTEMA Rh

WIENER	FISHER/DACE
R1	CDe
R2	cDE
Ro	cDe
Rz	CDE
r	cde
r'	Cde
r''	cdE

TABLA 41.4a RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	TaqI+ St-14	TaqI+ MetH	HincII+ ε	HincII+ Pseudoβ	HinfI+ MS1	HinfI+ MS31
27/V	A	A	N	R	ND	ND
28/V	A	N	N	A	ND	ND
34/V	D	R	D	D	ND	ND
36/V	D	D	N	N	ND	A
38/M	N	R	N	A	ND	ND
45/V	N	A	N	N	ND	ND
48/V	A	N	N	N	ND	ND
53/M	A	R	N	N	ND	ND
55/V	A	ND	A	N	ND	ND
56/M	A	N	A	N	ND	ND
61/V	D	N	N	N	A	A
64/V	A	R	N	N	ND	ND
66/V	D	R	ND	ND	ND	ND

UPN: Número identificación paciente; V: varón; M: mujer;
A: polimorfismo informativo donante-receptor; ND: no
determinado; N: polimorfismo no informativo;
R: polimorfismo informativo receptor; D: polimorfismo
informativo donante

TABLA 41.4b RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	TaqI+ St-14	TaqI+ Meth	HincII+ ε	HincII+ Pseudoβ	HinfI+ MS1	HinfI+ MS31
68/V	A	R	R	R	ND	ND
72/V	N	R	N	N	A	ND
74/V	N	R	N	N	ND	ND
79/V	N	R	ND	ND	A	N
82/M	R	N	N	N	A	ND
84/V	A	N	D	D	ND	ND
85/V	N	N	N	D	ND	ND
87/V	A	N	D	D	ND	ND
91/V	A	R	R	R	ND	ND
92/M	N	N	R	A	ND	ND
94/V	D	D	N	N	A	ND
99/V	D	N	R	N	A	ND
100/V	A	R	D	D	ND	ND

UPN: Número identificación paciente; V: varón; M: mujer;
A: polimorfismo informativo donante-receptor; ND: no
determinado; N: polimorfismo no informativo;
R: polimorfismo informativo receptor; D: polimorfismo
informativo donante

TABLA 41.4c RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	TaqI+ st-14	TaqI+ Meth	TaqI+ XV 2C	HincII+ ε	HincII+ Pseudos	HincII+ MS1	HincFI+ MS31
102/M	A	R	ND	D	A	ND	ND
109/V	N	A	ND	A	A	ND	ND
122/V	N	N	N	N	A	ND	ND
128/V	A	N	A	N	N	ND	ND
129/M	A	ND	R	N	R	ND	ND
135/M	A	N	ND	ND	ND	ND	ND
139/V	N	ND	N	R	ND	A	A
141/V	A	N	N	R	ND	ND	ND
143/V	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
147/V	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
149/V	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
153/V	N	ND	ND	ND	ND	N	A
157/M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A

UPN: Número identificación paciente; V: varón; M: mujer;
A: polimorfismo informativo donante/receptor; ND: no determinado;
N: polimorfismo no informativo; R: polimorfismo informativo receptor; D: polimorfismo informativo donante

TABLA 41.4d RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE	TaqI+	TaqI+	TaqI+	TaqI+	TaqI+	TaqI+	TaqI+	HincII+	HincII+	HincII+	HincII+	HincI+	EcoRI	HincI+	MS31
UPN/SEXO	St-14	Meth	XJ2.3	PERT87.15	XV	ZC	ε	Pseudob	MS1	paW101	MS31	MS31	MS31	MS31	MS31
159/M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	ND	ND	A	ND	ND	N
216C/M	A	N	N	N	N	N	R	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
218C/V	A	N	D	D	D	D	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
220C/V	N	R	ND	ND	ND	ND	D	D	N	ND	ND	N	ND	ND	A
221C/M	A	R	A	A	A	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N
229C/V	A	N	ND	ND	ND	ND	R	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
233C/M	N	ND	N	N	N	N	D	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
240C/M	R	N	R	ND	ND	N	N	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
241C/M	N	N	D	ND	ND	N	N	D	N	ND	ND	N	ND	ND	D
242C/M	N	D	D	R	R	D	D	N	A	A	A	A	A	A	A
243C/M	N	R	ND	ND	ND	ND	N	N	A	N	N	A	N	R	R
244C/V	D	N	N	ND	ND	N	N	N	A	ND	ND	A	ND	A	A
246C/M	R	N	R	ND	ND	N	N	R	A	ND	ND	A	ND	ND	ND

UPN: Número identificación paciente; V: varón; M: mujer; A: polimorfismo informativo donante/receptor; ND: no determinado; N: polimorfismo no informativo; R: polimorfismo informativo receptor; D: polimorfismo informativo donante

TABLA 41.4e RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL PRE-TMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE

PACIENTE UPN/SEXO	TaqI+ St-14	TaqI+ Meth	TaqI+ XV 2C	HincII+ ε	HincII+ Pseudob	HincII+ MS1	HincII+ MS31
248C/V	A	N	A	D	N	ND	ND
253C/V	A	N	R	D	R	ND	ND
257C/M	N	R	ND	N	N	A	A
261C/M	A	R	N	N	ND	ND	ND
262C/V	A	N	ND	H	N	ND	ND
263C/V	A	N	N	D	ND	ND	ND
266C/V	D	N	ND	N	N	A	A
267C/V	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
269C/M	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
271C/M	ND	ND	ND	ND	ND	A	ND
272C/V	A	ND	ND	ND	ND	N	ND
273C/V	R	ND	ND	ND	ND	D	N
274C/M	ND	ND	ND	ND	ND	A	A

UPN: Número identificación paciente; V: varón; M: mujer;
A: polimorfismo informativo donante/receptor; ND: no determinado;
N: polimorfismo no informativo; R: polimorfismo informativo receptor; D: polimorfismo informativo donante

TABLA 41.5 RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN
EN PAREJAS DONANTE RECEPTOR

PACIENTE I/SEXO	TaqI+ St-14	TaqI+ Meth	TaqI+ XV 2C	HincII+ e	HincII+ Pseudo β	HinfI+ MS1	HinfI+ MS31
VA/M	N	N	ND	R	A	ND	ND
JG/V	A	N	ND	N	D	ND	ND
DA/M	R	A	ND	R	ND	ND	ND
PC/M	A	N	ND	N	ND	ND	ND
JP/V	A	A	R	N	ND	ND	ND
EG/V	N	N	R	N	ND	ND	ND
CM/M	ND	ND	ND	N	ND	ND	A
MC/M	ND	ND	ND	ND	ND	N	A
CH/M	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
JE/V	ND	ND	ND	ND	ND	N	A
MM/V	A	ND	ND	ND	ND	N	N
AO/V	ND	ND	ND	ND	ND	A	A
LM/M	ND	ND	ND	ND	ND	N	A
TY/V	ND	ND	ND	ND	ND	A	D
GB/M	ND	ND	ND	ND	ND	D	A
PG/M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A

I: identificación paciente; V: varón; M: mujer; A: polimorfismo informativo donante/receptor; ND: no determinado; N: polimorfismo no informativo; R: polimorfismo informativo receptor; D: polimorfismo informativo donante.

TABLA 41.6 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS INFORMATIVOS EN PAREJAS DONANTE-RECEPTOR

POLIMORFISMOS (Nº parejas)*	N U M E R O D E P A R E J A S (%)			
	INFORMATIVO DONANTE-RECEPTOR	INFORMATIVO RECEPTOR	INFORMATIVO DONANTE	NO INFORMATIVO
TAQ I (56)	28 (50%)	17 (30%)	6 (11%)	5 (9%)
HINC II (50)	11 (22%)	9 (18%)	11 (22%)	19 (38%)
HINF I (24)	23 (96%)	-	1 (4%)	-

*: n= 80

TABLA 42.1a RESULTADOS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO
EN EL POST-TMO

UPN	MARCADORES ESPECIFICOS	DIAS POST-TMO	INTERPRETACION
9	Donante	+1825	Quimera total
27	Receptor	+360	Quimera total
34	Donante	+60, 270, 360	Quimera total
36	Receptor/Donante	+180, 270, 540	Quimera total
38	Receptor/Donante	+360, 480	Quimera mixta
45	Receptor/donante	+180, 720	Quimera total
47	Donante	+210, 270, 540 +720, 795	Quimera total
53	Donante	+120, 180, 540 +720, 900	Quimera total
55	Receptor/donante	+30, 60, 90 +120, 180 +360, 450, 720 +820, 827	Quimera mixta Quimera total
61	Receptor	+90, 180 +210, 280	Quimera mixta
68	Receptor/Donante	+120, 210	Quimera total
72	Receptor/donante	+60, +120	Quimera total Rec autóloga
82	Receptor/donante	+30, 60 +120, 180 +360	Quimera mixta Quimera total

UPN: número identificación paciente

TABLA 42.1b RESULTADOS DEL FENOTIPO ERITROCITARIO
EN EL POST TMO

UPN	MARCADORES ESPECIFICOS	DIAS POST-TMO	INTERPRETACION
84	Receptor/Donante	+120, 180	Quimera total
85	Receptor	+90, 180 +360, 540	Quimera mixta
87	Receptor/Donante	+120, 180, 360	Quimera total
91	Receptor	+90 +180, 360	Quimera mixta Quimera total
92	Receptor/Donante	+40, 60 +120, 180	Quimera mixta Quimera total
102	Donante	+60, 120, 180 +360	Quimera mixta Quimera total
109	Receptor/Donante	+75, 210, 270	Quimera total
122	Donante	+40	Quimera mixta
128	Receptor	+90 +120	Quimera mixta Quimera total
129	Receptor/Donante	+120 +180	Quimera mixta Quimera total
244C	Receptor/donante	+120	Quimera total
248C	Donante	+90	Quimera total

UPN: número identificación paciente

TABLA 42.2 a ESTUDIO CITOGENETICO POST-TMO

UPN/ Sexo	Sexo D	F	Día+14	Día+21	Día+30	Día+60	Día+120	Día+180	Día+270	Día+360	>Día+540
36/M	M	SP+							Ph'-(30)		Ph'-(27)
53/M	V	MO- SP+			XY(20)	XY(26)				XY(35)	XY(21)
56/M	M	SP+	N.M.	XY(22)							
61/V	M	MO- SP+ SP-			XX(30)				XX(5) XY(7)*		
								XX(20)			
82/M	V	MO- SP+	XY(22)	XY(22)			XY(29) XY(26)	XY(19)			XY(25)

D: Donante; F: fuente; V: varón; M: mujer; MO-: médula ósea sin phitohemaglutinina;
 SP+: sangre periférica con phitohemaglutinina; SP-: sangre periférica sin phitohemaglutinina;
 (): número de metafases estudiadas; *: Hiperplooidias del receptor; NM: No mitosis.

TABLA 42.2b ESTUDIO CITOGENETICO POST-TMO

UPN/ Sexo D	Sexo F	Día+21	Día+30	Día+60	Día+90	Día+180	Día+360	>Día+540
84/V	M	MO-			XX(24)	XY?(4)* XX(4)		
85/V	M	SP+			XX(23)		XX(20)	XX(24)
87/V	M	MO- SP+	XX(13)	XX(20)	XX(16)		XX(21)	
92/M	V	MO-	XY(23)	XY(19)	XY(22)	XY(22)	XY(9) XX(9)	XY(24)
94/V	M	MO-	XX(23)					
99/V	M	MO-	XX(24)	XY(22) XX(8)				

D: Donante; F: fuente; V: varón; M: mujer; MO-: médula ósea sin phitohemaglutinina;
 SP+: sangre periférica con phitohemaglutinina; SP-: sangre periférica sin phitohemaglutinina;
 (): número de metafases estudiadas; *: practicado en el día +135. Metafases hipodiploides sin
 poder determinar el origen; **: practicado a los +76 días

TABLA 42.2c ESTUDIO CITOGENETICO POST-TMO

UPN/ Sexo	Sexo	F	Día+14	Día+21	Día+30	Día+60	Día+90	Día+120	Día+180
102/M	V	MO- SP+		XY(24)	XY(14)	XY(30)			XY(27)
109/V	V	MO- SP+		Ph'-(17)	Ph'-(49)*	Ph'-(22)*	Ph'-(22)*	Ph'-(22)*	Ph'-(20) Ph'-(22)
122/V	M	MO- SP+		XX(25) XX(22)		XX(25) XY(1)*			XX(23)
128/V	M	MO- SP+	XX(23)			XX(22) XX(22) XY(2)*		XX(24)	
129/M	V	MO- SP+		XY(22)				XY(23)	
141/V	M	MO-		XX(24)					

D: Donante; F: fuente; V: varón; M: mujer; MO-: médula ósea sin pithohemaglutinina;
 SP+: sangre periférica con pithohemaglutinina; SP-: sangre periférica sin pithohemaglutinina;
 (): número de metafases estudiadas; *: Múltiples anomalías no clonales

TABLA 42.3a RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN

UPN	POLIMORFISMOS INFORMATIVOS	DIAS POST-TMO	INTERPRETACION
9	--	+1095, 1460 +1825	Patrón donante
27	A	+360, 450, 540	Quimera total
28	A	+360, 540, 720	Quimera total
34	R	+270, 450	Quimera total
36	A	+270, 420, 540 +720, 900, 1360	Quimera total
38	A	+180, 360 +480 +510, 540	Quimera total Quimera mixta Quimera total
45	A	+300, 365, 540 +720, 1080	Quimera total
47	--	+21, 30, 90 +180, 210 +270, 540 +720, 795	Quimera mixta Patrón donante
53	A	+21, 30, 35 +90, 180, 360 +540, 720, 900	Quimera total
55	A	+14, 21, 30 +60, 90 +180 +360, 450, 540 +600, 720 +810, 820, 827	Quimera total Quimera mixta Quimera total Rec leucémica

UPN: Número identificación paciente; A: Polimorfismo informativo donante-receptor; R: Polimorfismo informativo receptor

TABLA 42.3b RESULTADOS DE LOS FRLP EN EL POST-TMO

UPN	POLIMORFISMOS INFORMATIVOS	DIAS POST-TMO	INTERPRETACION
56	A	+21, 30	Quimera total
61	A	+14, 30, 60 +90, 180 +270, 280	Quimera total Quimera mixta Rec leucémica
64	A	+21, 30 +60	Quimera mixta Recaída leucémica
68	A	+21, 30, 60 +90, 120 +180, 210	Quimera total
72	A	+21, 60, 90 +180	Quimera mixta Rec autóloga
82	A	+14, 21, 30 +60, 90, 120 +180, 360, 540	Quimera total
84	A	+30, 60, 90 +135 +180	Quimera total Quimera mixta Rec leucémica
85	A	+21, 30, 60 +90, 180, 360 +540, 600	Quimera total
87	A	+21, 30, 90 +180, 360	Quimera total
91	A	+21, 30, 60 +90, 180, 360	Quimera total

UPN: Número identificación paciente; A: Polimorfismo informativo donante-receptor

TABLA 42.3c RESULTADOS DE LOS FR/LP EN EL POST-TMO

UPN	POLIMORFISMOS INFORMATIVOS	DIAS POST-TMO	INTERPRETACION
92	A	+14, 21, 30 +60, 90, 180 +390, 392, 400	Quimera total Rec leucémica
94	A	+14, 21, 30	Quimera total
99	A	+14, 21, 60 +76	Quimera total Rec leucémica
102	A	+30, 60, 90 +180	Quimera total
109	A	+21, 30, 60 +90, 120, 150 +180, 270	Quimera mixta
122	A	+21 +60, 90, 180	Quimera mixta Quimera total
128	A	+14, 21, 30 +60, 120	Quimera total
129	A	+21, 30, 60 +90, 180	Quimera total
141	A	+21, 30, 45	Quimera total
149	A	+21, 30, 45 +60, 90	Quimera total
153	A	+14, 21, 30 +60, 90	Quimera total
157	A	+21, 30, 60	Quimera total
216C	A	+30, 60	Quimera total

UPN: Número identificación paciente; A: Polimorfismo informativo donante-receptor.

TABLA 42.3d RESULTADOS DE LOS FRLP EN EL POST-TMO

UPN	POLIMORFISMOS INFORMATIVOS	DIAS POST-TMO	INTERPRETACION
218C	A	+21, 30	Quimera total
220C	A	+21, 300	Quimera total
221C	A	+21, 30, 180	Quimera total
229C	A	+90	Quimera total
240C	R	+21	Quimera total
241C	D	+30, 60 +90	Patrón donante Quimera mixta
242C	A	+30, 360	Quimera total
243C	A	+30, 120	Quimera total
244C	A	+21	Quimera total
246C	A	+14, 21, 30 +60	Quimera total
248C	A	+21, 60	Quimera total
253C	A	+21	Quimera total
263C	A	+30	Quimera total
266C	A	+21, 60	Quimera total
269C	A	+60	Quimera total
272C	A	+30	Quimera total
274C	A	+21, 30	Quimera total

UPN: Número identificación paciente; A: Polimorfismo informativo donante-receptor; D: Polimorfismo informativo donante; Polimorfismo informativo receptor

TABLA 42.4 QUIMERAS MIXTAS Y GRAVEDAD DE LA EICH

GRADOS	QUIMERA MIXTA	QUIMERA TOTAL
I	5	14
II	3	5
III-IV	0	6

p: NS

TABLA 42.5 UTILIDAD DEL ESTUDIO CITOGENETICO Y DE LOS FRLP EN LA VALORACION DEL IMPLANTE MEDULAR

	NO PACIENTES	DIA DEL IMPLANTE		
		+14	+21	+30
ESTUDIO CITOGENETICO	14	50%	100%	100%
ESTUDIO FRLP	40	100%	100%	100%

p: NS

TABLA 42.6 ANALISIS DE LA QUIMERA (+90 DIAS)

	NUMERO PACIENTES	QUIMERAS TOTALES	QUIMERAS MIXTAS
Análisis citogenético	9		
MO-	5	5 (2)	0
SP+	5	2 (0)	3 (0)
Estudio de los FRLP	20	15 (2)	5 (3)*

Número de pacientes con quimera total, quimera mixta y repoblación autóloga analizados a los +90 días post-TMO mediante el estudio citogenético y los polimorfismos del ADN.

*: un caso de repoblación autóloga en paciente con Talasemia Major

TABLA 42.7 ANALISIS DE QUIMERA (+180 DIAS)

	NUMERO TOTAL	QUIMERAS TOTALES	QUIMERAS MIXTAS	REPOBLACION AUTOLOGA
Fenotipo eritrocitario	13	8 (2)	5 (2)	
Análisis citogenético	7			
MO-	4	4 (1)	-	
SP+	4	4 (2)	-	
Estudio con los FRLP	18	12 (1)	4 (2)	2*

*: Un paciente con Talasemia Mayor y otro con recaída leucémica.

TABLA 42.8 QUIMERAS MIXTAS POST-TMO DURANTE EL SEGUIMIENTO

ESTUDIO	QUIMERA MIXTA	QUIMERA TOTAL
FENOTIPO		
ERITROCITARIO	11	13
FRLP	11	37

p < 0,05

TABLA 42.9 ESTUDIOS REALIZADOS A LOS +90 DIAS

UPN	POLIMORFISMOS DEL ADN	CITOGENETICA
47	Quimera Mixta	-
53	Quimera Total	Quimera Total*
55	Quimera Total	-
61	Quimera Mixta	-
68	Quimera Total	-
72	Quimera Mixta	-
82	Quimera Total	-
84	Quimera Total	Quimera Total
85	Quimera Total	Quimera Total
87	Quimera Total	Quimera Total
91	Quimera Total	-
92	Quimera Total	Quimera Total
102	Quimera Total	Quimera Total
109	Quimera Mixta	Quimera Mixta (SP+)
122	Quimera Total	Quimera Mixta (SP+)
128	-	Quimera Mixta (SP+)
129	Quimera Total	Quimera Total
149	Quimera Total	-
153	Quimera Total	-
229C	Quimera Total	-
241C	Quimera Mixta	-

*: Practicado en MO-

TABLA 42.10 ESTUDIOS REALIZADOS A LOS +180 DIAS

UPN	POLIMORFISMOS DEL ADN	CITOGENETICA	FENOTIPO ERITROCITARIO
38	Quimera Total	-	-
47	Quimera Mixta	-	-
53	Quimera Total	-	Quimera Total
55	Quimera Mixta	-	Quimera Mixta
61	Quimera Total	Quimera Total	Quimera Mixta
68	Quimera Total	-	-
72	Rec. Autóloga	-	-
82	Quimera Total	Quimera Total	Quimera Mixta
84	Rec. Autóloga	-	Quimera Total
85	Quimera Total	-	Quimera Mixta
87	Quimera Total	-	Quimera Total
91	Quimera Total	-	Quimera Total
92	Quimera Total	Quimera Total	Quimera Total
102	Quimera Total	Quimera Total	Quimera Mixta
109	Quimera Mixta	Quimera Total*	Quimera Total
122	Quimera Total	Quimera Total	-
129	Quimera Total	Quimera Total	Quimera Total
221C	Quimera Total	-	-

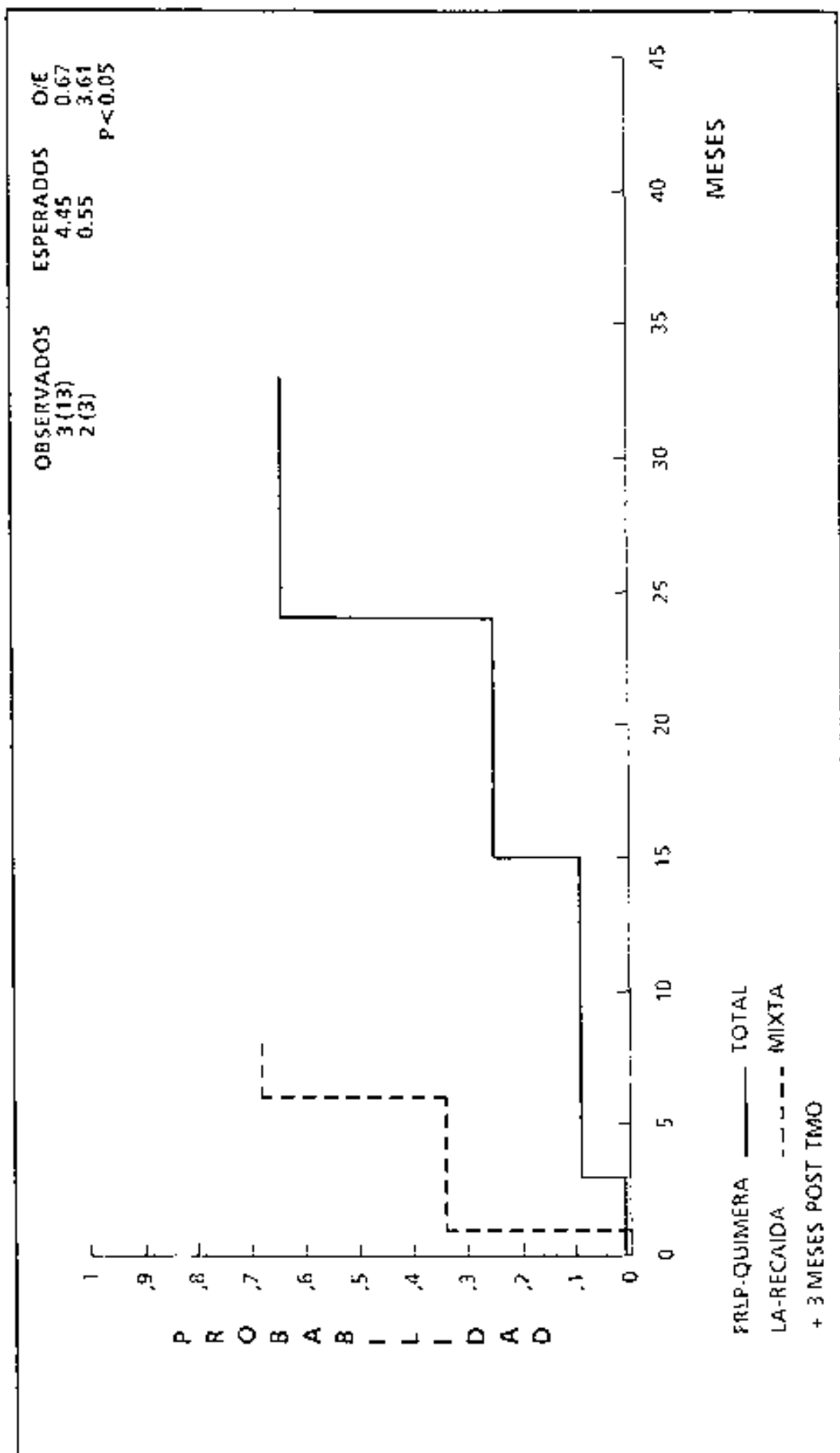
* MO- y SP+

TABLA 42.11 ESTUDIO DE LA RECAIDA LEUCEMICA

UPN	DIAGNOSTICO	FENOTIPO ERITROCITARIO	ESTUDIO CITOGENETICO		POLIMORFISMOS DEL ADN	ORIGEN DE LA RECAIDA
			MO-	SP+		
27	LAL-2a RC	-	-	-	QT	No valorable
34	LAL-2a RC	-	-	-	QT	Donante
55	LAL-1a RC	QT	-	-	RA	Receptor
61	LAL-2a RC	QM	QM	-	RA	Receptor
64	LAL-2a RC	-	-	-	RA	Receptor
84	LAL-2a RC	QT	-	-	RA	Receptor
92	LANL-1a RC	-	QM	QT	QM	Receptor
99	LAL-2a RC	-	QM	-	RA	Receptor
241C	LANL-RECAIDA	-	-	-	QM	Receptor

UPN: Número identificación del paciente; MO: médula ósea sin PHA; SP+: sangre periférica con PHA ; QT: quimera total; QM: quimera mixta; RC: remisión completa; RA: recuperación autóloga.

FIGURA 42.1 RECAIDAS EN PACIENTES CON QUIMERA MIXTA Y QUIMERA TOTAL POST TMO



5 DISCUSSION

El estudio del origen de las células linfohematopoyéticas es de gran valor para interpretar la evolución de los pacientes en el post-TMO.

5.1 FASE PRE-TMO

En el 100% de las parejas donante-receptor estudiadas (N=80) fué posible, mediante el estudio de los FRLP, encontrar un polimorfismo marcador para el ulterior seguimiento en el período post-TMO. En el 97,5% de los casos el polimorfismo obtenido fué máximo informativo donante-receptor o máximo informativo receptor. La alta probabilidad de que con estas sondas polimórficas se obtenga un polimorfismo informativo donante-receptor en una misma digestión, simplifica mucho el procedimiento y además permite cuantificar las proporciones de los dos tipos celulares con mucha mayor exactitud. Las bandas del paciente y del donante se pueden comparar en la misma muestra hibridada sin introducir los errores debidos a la variación experimental de la concentración de ADN, de la transferencia del gel o de la hibridación de la sonda. La ventaja de este método es que determinadas sondas, comparten polimorfismos de restricción de un mismo enzima lo que hace que una muestra de ADN digerida con un determinado enzima de restricción pueda ser rehibridizada con varias sondas y sea posible, con un mínimo de células, demostrar un polimorfismo informativo. Con el panel de 9 sondas utilizado es posible estudiar 10 polimorfismos con sólo el empleo de 3 enzimas de restricción. Sólo la sonda Paw101 demuestra un polimorfismo con un cuarto enzima de restricción. Knowlton et al (1986), es-

tuñaron un panel de 12 sondas altamente polimórficas y demostraron que con tan sólo 4 sondas se podía encontrar un polimorfismo informativo. Asimismo, Hutchinson et al (1989), con la utilización de sondas minisatélite subclonadas, objetivó la presencia de polimorfismos informativos donante-receptor en todos los pacientes estudiados. Dado que estas sondas tienen unos altos niveles de heterocigotía (98% para la sonda MS1 y 99% para la MS31), la probabilidad de que 2 hermanos sean idénticos es del orden del 25% con cada sonda. Si se utilizan el panel de 6 sondas minisatélite esta probabilidad es del 0.0004%. En esta fase, de 24 parejas donante-receptor estudiadas con 2 sondas minisatélite clonadas (MS1 y MS31) obtuvimos, en el 96% de los casos, un polimorfismo informativo donante-receptor que nos ha permitido efectuar el seguimiento del paciente en el post-TMO, excepto en los casos de TMO singénico.

En 43 pacientes existía diferencia de sexo entre donante-receptor por lo que en el 52% de los casos era posible el seguimiento, mediante análisis citogenético, de los pacientes en el post-TMO. En el momento del diagnóstico sólo se estudiaron los pacientes con LMC o LANL-M3 (promielocítica) y en este caso aunque el donante fuese del mismo sexo se disponía de un cromosoma marcador útil para el estudio de la quimera en el post-TMO. La identidad de sexo es una de las limitaciones que tiene el estudio citogenético para determinar la quimera, puesto que no todos los pacientes pueden ser seguidos con esta metodología. En los casos en que donante y receptor sean del mismo sexo y no exista un cromosoma marcador se pueden estudiar los polimorfismos

citogenéticos mediante las bandas C, y las Q visibles con técnicas de fluorescencia (Godde-Salz, 1986; Bertheas et al, 1988). Khokar et al (1987), utilizaron los polimorfismos identificados con las bandas Q, como método de estudio del implante en pacientes con identidad sexual entre donante y receptor. De 17 parejas donante-receptor analizadas, en el 85% encontraron al menos un heteromorfismo capaz de distinguir el receptor del donante, lo que viene a corroborar que aún en el caso de que se realice el estudio citogenético al donante y al receptor en busca de polimorfismos, éstos no se encuentran en el 100% de los pacientes. Según Godde-Salz (1986) el estudio de los polimorfismos no es un método útil para el seguimiento de los pacientes.

En 75 parejas se estudió el fenotipo eritrocitario post-TMO mediante el tipaje para 19 antígenos. En el 3,6% de las parejas no se obtuvieron marcadores. Estos datos concuerdan con lo publicado por Petz et al (1987) que de 275 parejas donante receptor estudiadas no encontró marcadores en el 3% de los casos. Asimismo, Van Dijk et al (1987) de 50 parejas estudiadas no encontró marcadores en 3 de ellas. Uno de los problemas más importantes en el estudio pre-TMO, es la dificultad de analizar, a veces, el fenotipo eritrocitario del receptor, debido a transfusiones previas. Este hecho, referido también por otros autores (van Dijk et al, 1987), se agrava en los casos en que el paciente es enviado a un Centro de referencia para el TMO. Con el estudio de la FRR se ha podido, en ocasiones, determinar el fenotipo del receptor. Una buena estrategia sería la recogida y conservación de una muestra de hematíes a todo paciente diagnosticado de hemopatía maligna previa a cualquier transfusión.

5.2 PASR POST-TMO

En este apartado se discutirán los siguientes aspectos: el implante medular, las quimeras mixtas y las recaídas leucémicas.

5.2.1 VALORACION DEL IMPLANTE MEDULAR

De los 50 pacientes evaluados se detectó inicialmente implante en el 100% de los casos, independientemente de la técnica utilizada para su estudio. En 3 pacientes el ADN somático se obtuvo a través del cultivo de fibroblastos (Ginsburg et al, 1985). El análisis de los FRLP junto al estudio citogenético permitió objetivar el implante en el 100% de los pacientes al mes del TMO. El estudio con los FRLP fue más útil que el citogenético puesto que permitió analizar el 100% de las muestras en el día + 14, en los que hubo suficiente número de células, frente al 50% de los pacientes analizados con el estudio citogenético, sin llegar a obtenerse diferencias estadísticamente significativas debido al escaso número de pacientes (p: NS).

Ginsburg et al (1985) y Knowlton et al, (1986) mediante los FRLP objetivaron el implante en algunos pacientes a las 2 semanas del TMO, al igual que en nuestros pacientes en que también fue posible documentar el mismo en el día +14. En la mayoría de casos publicados la documentación de la quimera se ha realizado al mes del TMO (Yam et al, 1987; Yam et al, 1987a; Ginsburg et al, 1985), datos superponibles a los encontrados por nosotros. Estos hallazgos

demuestran que los FRLP pueden utilizarse muy precozmente para demostrar el implante, aunque la cifra de leucocitos sea muy baja, puesto que con 1×10^6 de células se puede realizar el estudio. En el periodo inicial post-TMO, para obtener esta cifra es necesario procesar alrededor de 25-50 ml de sangre periférica. El estudio con los FRLP es muy útil, sobre todo en aquellos casos en que se sospecha un rechazo del implante (Ginsburg et al, 1985; Blazar et al, 1985). Hasta el presente, sólo el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés polymerase chain reaction) (Eisenstein, 1990), que permite amplificar hasta un millón de veces el fragmento de ADN a estudiar, ha podido demostrar el implante a los 7 días del TMO (van Leeuwen et al, 1990).

Mediante el estudio citogenético también ha sido posible demostrar el implante en los 14 pacientes que se han analizado, tanto en MO- como en SP+. Lawler et al (1984) estudió el implante medular en 45 pacientes sin identidad sexual. A las 2 semanas del TMO pudo demostrar el implante en los casos en los que se analizó la médula ósea y a las 3 semanas en aquellos en los que el estudio citogenético se realizó a partir de sangre periférica. De los enfermos analizados por nosotros en el 50% de los pacientes, en que se recibió muestra, pudo constatarse el implante a las 2 semanas y en el 100% de los casos, en aquellos pacientes en que la muestra se recibió en el día +21 ó +30. Schimtz et al, (1985) también demostraron implante de células del donante a las 2 semanas del TMO. Hill et al, (1986) en un estudio en 96 pacientes con donantes de diferente sexo, sometidos a TMO por AA, demostró implante de células del

donante entre los 14-68 días post-TMO con una mediana de 18 días. Offit et al (1990) demostró implante entre las 2-3 semanas del TMO en la mayoría de 64 pacientes sometidos a TMO, por LMC en fase crónica.

Con el estudio del fenotipo eritrocitario, la mediana de días para demostrar el implante de serie roja fué de 90 (extremos 30-120) en los 19 pacientes evaluados. Van Dijk et al, (1987) demuestran a las 4 semanas del TMO la presencia de hematíes del donante en un 71% de los casos y en casi todos ellos a los 2 meses del TMO. Estos autores aplican una política transfusional, que consiste en congelar en el momento del diagnóstico una muestra de sangre a todo paciente que pueda ser candidato a TMO. En el momento en que disponen de un donante, realizan el tipaje extenso de hematíes y a partir de entonces todas las transfusiones de hematíes que precise el paciente se realizarán en base a utilizar hematíes negativos para los antígenos marcadores útiles en el post-TMO. En el supuesto de que sea imposible dar sangre negativa para ambos antígenos (donante y receptor), se utiliza sangre negativa para los antígenos marcadores del donante. En el caso de que las transfusiones no puedan tener en cuenta estos marcadores se asume que las transfusiones son positivas para el marcador/es y debe realizarse una corrección, teniendo en cuenta que la vida media de los hematíes es de 120 días. La contribución máxima de estas transfusiones no seleccionadas a los hematíes marcadores se resta del porcentaje determinado. Puesto que es improbable que todas las transfusiones no seleccionadas sean positivas para un antígeno marcador es probable que algunos porcentajes durante los primeros 4 meses

post-TMO sean en realidad más altos. Van Dijk et al. (1987), al hacer las correcciones, demostraron que no afectaban demasiado los resultados. Mas recientemente este mismo grupo (Bär et al, 1989) analizan la quimera roja mediante la utilización de una microesfera fluorescente. En este método los hematíes se incuban con anticuerpo IgG dirigido contra el antígeno marcador investigado. Después de varios lavados se añade anti-IgG humana unida a microesferas fluorescentes. Con este método, refieren una alta sensibilidad (1 célula positiva de cada 10.000 células negativas) y en el 86% de los casos se pudieron detectar hematíes del donante a los 15 días, siempre que se procedió a la política transfusional antes mencionada (Van Dijk et al, 1987). El hecho real es que en la práctica diaria es muy difícil de realizar esta política, entre otras razones porque muchos pacientes son referidos de otro centro y la mayoría no están tipados en el momento del diagnóstico. Podemos concluir, en base a lo expuesto, que el método con el que siempre es posible demostrar el implante es el estudio de los polimorfismos del ADN. Asimismo, con ambos métodos (el citogenético y el molecular) puede demostrarse el implante antes del mes del TMO. La mayor diferencia entre ambos ha radicado, en nuestro estudio, en la precocidad de la detección: cuando se ha dispuesto de suficientes células los polimorfismos del ADN han documentado el implante en el día +14 en el 100% de los pacientes, frente al 50% con el estudio citogenético. Además, permite evaluar a todos los pacientes independientemente de los requerimientos transfusionales y de la identidad o no de sexo. Una ventaja adicional de este método, en especial si se analiza

la médula ósea, es la demostración del implante de toda la hemopoyesis y no de una serie, como ocurre con el estudio del fenotipo eritrocitario.

Si se considera que tanto el estudio de los FRLP y en especial el análisis citogenético, son métodos laboriosos que precisan de un laboratorio y personal altamente cualificado, no disponible aún en la mayoría de los centros, mientras que el estudio del fenotipo eritrocitario forma parte de la práctica asistencial diaria, podría justificarse el hecho de que habitualmente sea éste último el método más frecuentemente utilizado para demostrar el implante, a pesar de que en nuestro medio no se puede demostrar hasta los +90 días.

5.2.2 ESTUDIO DE LAS QUIMERAS MIXTAS

Mediante la utilización de dosis altas de quimioterapia más ICT total o fraccionada seguida de TMO alogénico, se consigue la desaparición de la linfhemopoyesis del receptor y la médula ósea es reemplazada por las células del donante, con lo que se obtiene una quimera teóricamente "pura". En los inicios del TMO se creyó que la incidencia de quimeras mixtas era muy baja, pero con el paso del tiempo aparecieron las publicaciones que ponían en evidencia que la presencia de quimeras mixtas era más frecuente de lo esperado, con una incidencia entre el 11-57% en los TMO sin tratamiento "in vitro" anti-T (Thomas et al, 1975a, Sparkes et al, 1977; Branch et al, 1982; Singer et al, 1983; Lawler et al, 1984; Walker et al, 1986; Vincent et al, 1986; Yam et

al, 1987; Petz et al, 1987; Bertheas et al, 1988; Bretagne et al, 1987). Con la utilización de tratamientos "in vitro" de la médula ósea con anticuerpos monoclonales anti-T, la realización de TMO no histocompatibles y los cambios en las terapéuticas de acondicionamiento, la incidencia de quimeras mixtas ha aumentado de una manera espectacular para situarse por encima del 50%. Esto se ha demostrado tanto con el estudio los polimorfismos del ADN como con el estudio citogenético (Schmitz et al, 1985; Blazar et al, 1985; Ginsburg et al, 1985; Hill et al, 1986; Lawler et al, 1986; Bretagne et al, 1987; Yam et al, 1987; Bertheas et al, 1988; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990).

De los 50 pacientes sometidos a TMO, 25 fueron evaluados mediante el fenotipo eritrocitario, 17 con el estudio citogenético y la totalidad de los pacientes fueron seguidos con el estudio de los polimorfismos del ADN. Los pacientes analizados fueron sometidos a TMO a partir de un donante HLA compatible excepto en un paciente y en ningún caso la médula ósea del donante fué tratada "in vitro". Independientemente de la técnica efectuada, se ha podido objetivar en 14 pacientes (28%), la presencia de quimera mixta, excluidos aquellos casos en los que ésta se detectó en el momento de la recaída leucémica.

5.2.2.1 MEDIANTE EL ESTUDIO DEL FENOTIPO ERITROCITARIO

Con el estudio del fenotipo eritrocitario se detectaron, en 11 pacientes (44%), la presencia de quimeras mixtas en algún momento de la evolución, con una diferencia estadís-

ticamente significativa en relación a las detectadas con el estudio de los polimorfismos del ADN ($p < 0.05$). Esto se debe, probablemente, a la mayor sensibilidad del estudio del fenotipo eritrocitario ($< 2\%$ frente a un 5-10% con el estudio de los FRLP). En 3 de ellos la coexistencia de hematíes del donante y del receptor permaneció estable a lo largo del tiempo (desde el día +90 hasta el +540), independientemente de la evolución de los pacientes. El porcentaje de hematíes residuales osciló entre un 2-20%. Branch et al (1982) publicaron 4 pacientes sometidos a TMO, en los que se detectó, entre los 238-553 días del TMO, la persistencia de hematíes residuales del receptor en porcentajes que oscilaron entre el 2-50%. Cabe destacar que 3 de los 4 pacientes tenían incompatibilidad ABO mayor. La evolución de estos pacientes al igual que la de los nuestros no evidenció un mayor índice de recaídas por el hecho de tener una quimera mixta. En contraste, Van Dijk et al (1987) publican que en los pacientes, cuyo porcentaje de hematíes residuales se mantuvo estable a lo largo del tiempo, no hubo ninguna relación con el riesgo de recaída, mientras que en aquellos casos en que el porcentaje fué aumentando el paciente recayó.

Siete pacientes en los que, inicialmente, se detectó quimera mixta, reversionaron a quimera total entre los 90-360 días. En 5 de los 7 casos (71%) existía incompatibilidad ABO entre donante y receptor (3 mayor y 2 menor). En los casos con incompatibilidad ABO mayor, hasta los +120 días del TMO, la serie roja detectada era aún del receptor, para paulatinamente revertir a quimera roja total al año del TMO, datos que concuerdan parcialmente con los de de Bär et

al (1989) y totalmente con los de Sniecinski et al (1987) y Reviron et al (1987).

Bär et al, (1987) muestran que con la utilización de las microesferas fluorescentes no detectaron hematíes del donante, en pacientes con incompatibilidad ABO mayor, al mes en 4 pacientes, a los 2 meses en 1 caso y a los 3, en 2 pacientes, encontrando una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de repoblación de la serie roja, a los 3 meses del TMO, entre los pacientes sin incompatibilidad ABO mayor y aquellos casos con incompatibilidad ABO mayor. Sin embargo, mientras nuestros pacientes no reverteron a quimera total hasta el año del TMO (de acuerdo con Sniecinski et al (1987) y Reviron et al (1987), Bär et al, (1987) publican que a los 6 meses todos los pacientes eran quimeras rojas totales. Petz et al, (1987) encontraron una mayor incidencia de quimeras mixtas entre pacientes con incompatibilidad ABO mayor, valorada fundamentalmente con la detección de aloanticuerpos frente a los hematíes, que en los pacientes sin incompatibilidad ABO mayor ($p=0.006$), si bien la significación estadística se perdía si se excluían los pacientes cuyo único marcador genético era la detección de aloanticuerpos frente a los hematíes. Además, como en nuestros casos, 3 pacientes tardaron entre 170 y >605 días a revertir a quimera roja total, estando una paciente bajo régimen transfusional a los 20 meses del TMO por carecer de eritropoyesis.

De los 3 pacientes con quimera mixta persistente, el estudio de los polimorfismos del ADN demostró discordancia de resultados: en el UPN 38 se detectó quimera mixta transitoria para revertir posteriormente a quimera total; en el

UPN 61 el estudio de los FRLP demostró quimera total hasta el día +60; posteriormente se detectó quimera mixta, hasta el momento de la recaída a los +270 días en que se demostró que toda la hemopoyesis era del receptor, mientras el porcentaje de hematíes del receptor permaneció estable a lo largo de todo el seguimiento. El estudio citogenético de éste paciente demostró quimera total hasta el momento de la recaída en que corroboró los datos de los FRLP. En el UPN 85, tanto el estudio de los FRLP como el citogenético objetivaron quimera total durante todo el seguimiento. Estas discordancias pueden ser debidas por una parte a una mayor sensibilidad del estudio del fenotipo eritrocitario para detectar pequeños porcentajes de hematíes residuales, que pueden llegar hasta el 0.01% (Schattenberg et al, 1989), y por otra que con el estudio de los FRLP se analizan todas las células nucleadas, por lo que un pequeño porcentaje de hematíes residuales puede no ser objetivado al analizar toda la hemopoyesis globalmente, dado que la sensibilidad del método de los FRLP es del orden del 5-10% de quimerismo si bien algunos autores bajo condiciones óptimas pueden detectar 0.1-1% de células residuales (Knowlton et al, 1986; Blazar et al, 1986; Ginsburg et al, 1995; Yam et al, 1987a, Petz et al, 1987; Bretagne et al, 1987). Asimismo, también existió discordancia de resultados en los pacientes que inicialmente presentaron quimera mixta eritrocitaria y posteriormente revertieron a quimera total, tanto al realizar el análisis con los polimorfismos del ADN como con el estudio citogenético, probablemente por las mismas razones antes mencionadas, teniendo en cuenta además que con el estudio citogenético, para excluir un 5% de

mosaicismo con un 95% de confianza, deben ser evaluadas al menos 59 metafases (Hook, 1977).

En un caso con Talasemia Major (UPN 72), se demostró inicialmente implante de serie roja y posteriormente se evidenció rechazo del implante con repoblación de la médula ósea autóloga. En este paciente, debido a las múltiples necesidades transfusionales, fué muy difícil realizar el estudio del fenotipo eritrocitario pre-TMO. Se analizó la FRR y se pudo demostrar el fenotipo más probable. A los +60 días, el estudio del fenotipo eritrocitario demostró implante total de la serie roja. La probabilidad de que el fenotipo eritrocitario estudiado en la FRR correspondiera a hematíes transfundidos es del orden del 0.7% por lo que se puede establecer con casi toda seguridad que inicialmente existió implante. En este caso el estudio de los polimorfismos del ADN fué mucho más efectivo, pues une al hecho ya comentado de la no dependencia transfusional la ventaja de analizar toda la hemopoyesis. Se pudo demostrar la presencia de quimera mixta hasta que a los 4 meses del TMO la médula ósea se había repoblado de nuevo con la hemopoyesis del receptor, probablemente por insuficiencia del tratamiento de acondicionamiento. Al ser el donante del mismo sexo no se practicó estudio citogenético.

5.2.2.2 MEDIANTE EL ANALISIS CITOGENETICO

Con el estudio citogenético realizado en 17 pacientes se detectó quimera mixta en 7 pacientes (41%), en algún momento de la evolución. En 3 (43%) de los 7 pacientes la pre-

sencia de metafases del receptor, efectuado en MO-, coincidió o antecedió en pocas semanas a la recaída del paciente. En 1 paciente (14%) se detectó la presencia de anomalías cromosómicas, sin que se pudiera determinar el origen celular un mes y medio previo a la recaída leucémica. En 3 casos (43%) se detectó quimera mixta en las muestras estudiadas en SP+ y todos ellos entre los +90 y +180 días revertieron a quimera total, estando los 3 pacientes en RCC (entre +9 y +12 meses). El estudio del fenotipo eritrocitario en los 2 pacientes que revertieron a quimera total fue coincidente y el estudio con los FRLP detectó en 1 caso quimera total y en el otro quimera mixta en el día +21 y quimera total a partir de entonces. En el caso del paciente con LMC con donante del mismo sexo, pero con el Cr Ph' como marcador, el hecho de encontrar en SP+ metafases XY con múltiples anomalías no clonales y ausencia del Cr Ph' sugiere que dichas metafases podrían corresponder a linfocitos residuales dañados por la radioterapia, pero pertenecientes a la clona no leucémica del receptor. En este paciente el estudio efectuado a los 6 meses en MO- y SP+ no objetivó ninguna anomalía citogenética. Arthur et al (1988) encontraron en 3 de 48 pacientes con LMC, en los que se efectuó estudio citogenético, células del receptor Ph'- entre 6 y 36 meses post-TMO en 1 paciente y a los 6 y 9 meses en los 2 pacientes restantes. En todos los casos existía diferencia de sexo entre donante y receptor y el estudio se practicó en MO-. Estos autores asumieron que eran células del receptor, pertenecientes a la clona no leucémica, aunque no se puede descartar que se tratara de células Ph'- preleucémicas, de acuerdo con los estudios de

Fialkow et al (1981).

El hecho de encontrar células Ph⁺- del receptor en el post-TMO había sido descrito previamente por otros autores (Vincent et al, 1986; Becher et al, 1987). Estos hallazgos pueden significar que el régimen de acondicionamiento utilizado no es el más eficaz para erradicar la hemopoyesis del receptor de manera permanente y también que algunas células leucémicas pueden ser más sensibles al tratamiento que las "stem cells" normales. Una explicación alternativa sería que los linfocitos T presentes en la médula del donante jugarían un papel muy importante en el control o erradicación de la leucemia. En este sentido se han postulado diferentes hipótesis: un mecanismo inmunológico directo o un mecanismo indirecto, relacionado probablemente con la capacidad de los linfocitos T para facilitar el implante a través de la producción de linfoquinas. Estos mecanismos relacionados con los linfocitos T suprimirían la leucemia y permitirían la reaparición de células normales del receptor (Goldman, 1988a). Estos planteamientos estarían apoyados en el hecho de la mayor cantidad de recidivas entre los pacientes con LMC sometidos a TMO con médula ósea tratada con anticuerpos anti-T, independientemente de si tienen o no EICH (Arthur et al, 1988; Sessarego et al, 1989; Alimena et al, 1990; Horowitz et al, 1990).

En el paciente con LMC (UPN 109), en el que se detectó hasta los +6 meses quimera mixta con el estudio citogenético en SP+, el estudio de los polimorfismos del ADN demostró la presencia y persistencia de quimera mixta estable durante todo el seguimiento y el paciente no presenta a los +12 meses signos clínico-biológicos de LMC. No se puede descar-

tar con el estudio citogenético el que existiera quimera mixta, debido a la identidad sexual entre donante y receptor. Solamente en el caso de que se hubiera estudiado al donante en busca de un polimorfismo marcador y éste se hubiera demostrado, hubiera sido posible excluir la presencia de una quimera mixta. El estudio del fenotipo eritrocitario, en este caso, demostró en 3 determinaciones quimera total de la serie roja, poniendo en evidencia que probablemente la población residual del receptor que detectamos no era la eritropoyética. Este hecho permite hacer hincapie en la necesidad de evaluar el estado quimérico con un método que estudie todas las líneas celulares.

Los análisis citogenéticos efectuados en MO- presentan menos limitaciones metodológicas, si se comparan con los de SP+: al no estimular con PHA las células de la MO-, el análisis incluye todas las líneas celulares, a diferencia de la SP+ en la que, como consecuencia de la estimulación, se estudian preferentemente los linfocitos. En consecuencia, la incidencia de quimera mixta es mucho menor si se analiza la MO- (Przepiorka et al, 1990; Lawler et al, 1984). Nuestra experiencia personal apoya este criterio, puesto que en un caso de quimera mixta detectada en SP+ (UPN 128) en el que al mismo tiempo se estudió la MO-, la quimera fué total, esto nos sugirió que, probablemente, en SP+ habíamos detectado los linfocitos residuales del receptor.

Lawler et al, (1984) estudiaron en el post-TMO a 45 pacientes sin identidad sexual con el donante y sin tratamiento "in vitro" de la médula ósea y demostraron en 7 de 39 casos la persistencia de células del receptor, en MO-, y

en 8 de 31 pacientes en SP+ sin posterior evidencia de recaída leucémica en 4 de ellos a partir de las 9 semanas del TMO. En 3 de los casos sólo se detectaron en una ocasión (MO-) y en 2 de ellos que fallecieron por EICH no se evidenció leucemia al practicar la autopsia, mientras que en el tercer caso a las 39 semanas seguía en RCC. El cuarto paciente de esta serie ha persistido en RCC, pero en diferentes momentos de su evolución se han detectado células normales del receptor en SP+. Schimtz et al, (1985) estudiaron 9 pacientes sometidos a TMO a partir de un donante histocompatible y acondicionados con el esquema de Seattle más ICT fraccionada, al igual que los pacientes referidos por nosotros. De este grupo, encontraron células del receptor en 4 de 7 injertos estables, tanto en análisis efectuados en SP+ como en MO- y solo uno de ellos recayó. En el resto de los casos revertieron a quimera total entre 55-180 días del TMO y siguen en RCC. Walker et al, (1986) analizaron los resultados del estudio citogenético post-TMO en 39 pacientes con hemopatías malignas, sin tratamiento "in vitro" de la médula ósea y encontraron 10 quimeras mixtas en MO-. Los pacientes en que ésta se detectó durante las 6 primeras semanas del post-TMO, no tuvieron mayor riesgo de recaída, mientras que en aquellos casos en que la quimera mixta se detectó a partir de las 6 semanas del TMO, recayeron posteriormente. En los pacientes estudiados por nosotros, en los que la quimera mixta se detectó durante las 6 semanas del TMO, no presentaron tampoco recaída de su enfermedad, si bien en todos los casos aquella se detectó en SP+, mientras que en los 4 casos (uno de ellos de difícil valoración) en que la quimera mixta se detectó en MO-

entre 8-55 semanas post-TMO, antecedió o coincidió con la recaída. En la mayoría de casos las quimeras mixtas que se encuentran en el post-TMO y no relacionadas con recaída, revierten a quimera total a los 6 meses y en todo caso al año del TMO. Singer et al (1983) publicaron el caso de un paciente diagnosticado de LAL, que a las 6 semanas del TMO, presentó características clínico biológicas de recaída leucémica, si bien posteriormente presentó médula ósea normal. A los 1907 días del TMO el análisis citogenético evidenció metafases del receptor, comprobado por cultivos a largo término, mientras que el paciente sigue en RCC. Branch et al (1982) también publicaron 4 pacientes en los que se demostró, entre los 352 y 553 días post-TMO, quimera mixta roja y en 2 casos en que se practicó estudio citogenético post-TMO en SP+ se objetivaron entre los días +365 y +535 metafases del receptor y los pacientes persistían en RCC a los +445 y +662 días respectivamente. Hasta el momento, el caso descrito por Singer et al, (1983) es el que ha presentado una quimera mixta estable de más larga duración y demuestra, de acuerdo con lo publicado recientemente por diversos autores y corroborado en parte en nuestra casuística, que el hecho de presentar quimera mixta no implica un mayor riesgo de recaídas leucémicas (Petz et al, 1987; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990).

El grupo de Seattle publicó recientemente los resultados del seguimiento post-TMO mediante estudio citogenético en pacientes con LANL, sometidos a TMO sin tratamiento "in vitro" de la médula ósea (Przepliorcka et al, 1989). En este trabajo se documentó la presencia de quimera mixta en 12 de 184 pacientes (6%) analizados en MO- antes del día 100 y en

18 de 140 pacientes (13%) estudiados en SP+ también antes del día 100, con una incidencia global del 15%. Esta cifra es similar al 17% encontrada por Petz et al (1987) al utilizar el estudio citogenético, polimorfismos del ADN y fenotipo eritrocitario para el estudio de 172 pacientes con leucemia y con TMO sin tratamiento "in vitro". La incidencia global de quimera mixta objetivada por nosotros (28%) es ligeramente superior a la reportada por estos 2 autores. Al igual que en nuestros pacientes, no encontraron en el análisis efectuado en MO- la presencia de metafases con anomalías secundarias a irradiación, las cuales sí fueron encontradas en SP+. En este sentido diversos trabajos señalan la presencia de células del receptor afectadas por la radioterapia, que disminuyen a lo largo del tiempo en pacientes sometidos a TMO, si bien en algunos casos, se ha publicado persistencia de células con alteraciones debidas a irradiación, tanto en pacientes sometidos a TMO como en pacientes tratados con radioterapia por otras causas (Carbonell et al, 1983; Baker et al, 1986; Buckton et al, 1978).

Los resultados de Przepiorka (1990), al igual que los de Petz et al, (1987) demostraron que la detección de quimeras mixtas transitorias no estaba relacionada con el estado pre-TMO, el tipo de TMO (compatible o incompatible), el tipo de irradiación (ICT vs ICT Fr) y/o acondicionamiento, la edad, el riesgo de recaída leucémica ni la presencia de EICH. Parte de estos resultados no concuerdan, en cambio, con los publicados por Hill et al, (1986) que de 96 pacientes sometidos a TMO por AA y analizada la quimera mediante estudio citogenético, documentaron una alta in-

incidencia de quimeras mixtas (58%) y demostraron que la incidencia de EICH aguda (grados II-IV) era significativamente menor en los pacientes con quimera mixta. Asimismo, la incidencia de rechazo fué significativamente mayor en dichos pacientes. Estos pacientes fueron acondicionados únicamente con quimioterapia y probablemente esta alta incidencia de quimera mixta es debido al tipo de acondicionamiento. Estos mismos autores refieren que cuando añaden ICT al régimen de acondicionamiento la incidencia de quimera mixta es mucho más baja.

5.2.2.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN

Con el estudio de los polimorfismos del ADN detectamos quimera mixta en 12 pacientes (24%) en algún momento del seguimiento. En 2 de los casos (16%) su aparición coincidió con la recaída leucémica, en 1 paciente (12%) no se pudo asegurar si desde la recuperación ya coexistía una quimera mixta y en 2 casos (16%), la recuperación hematológica post-TMO demostró desde el inicio una repoblación autóloga que significó en un caso recaída y en el otro la demostración del fracaso del TMO para erradicar la Talasemia mayor. Recientemente Lucarelli et al (1990) han publicado los resultados de 222 pacientes con talasemia mayor sometidos a TMO y acondicionados solamente con quimioterapia, como el caso de nuestro paciente. De los análisis efectuados se deduce que en los pacientes menores de 16 años el riesgo de presentar fallo de implante, y en consecuencia recidiva de la talasemia, viene condicionado por el hecho de que el

paciente tenga hepatomegalia y fibrosis portal o uno de los dos parámetros. No se detectó ninguna recaída en el grupo de pacientes que no tenían ninguno de estos datos. Nuestro paciente tenía hepatomegalia en el momento del TMO y no se realizó biopsia hepática para valorar la fibrosis portal.

De los 7 (58%) casos restantes en 2 (28%) la quimera mixta permaneció estable desde la recuperación hasta el día +720 en un caso y durante todo el seguimiento en el otro; en 3 pacientes se detectó quimera mixta transitoria y en 2 casos la aparición de la quimera mixta antecedió 2 y 6 meses la recaída leucémica respectivamente.

La presencia de quimeras mixtas estables ha sido descrita con el estudio de diferentes marcadores genéticos y sobre todo más frecuentemente en pacientes sometidos a TMO con médula ósea tratada "in vitro" (Blazar et al, 1985; Bretagne et al, 1987; Petz et al, 1987; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990; Offit et al, 1990). Este hecho indica que el mecanismo por el que se logra la remisión no es simplemente el tratamiento con dosis supraletales de quimio-radioterapia seguido de infusión de médula ósea del donante. El efecto injerto versus leucemia puede contribuir a mantener la remisión después del TMO, pero este efecto por si solo no es esencial puesto que también se logran remisiones estables y duraderas en pacientes sometidos a TMO singénico y en pacientes tratados solamente con quimioterapia, por lo que este hecho sugiere que el efecto injerto versus leucemia es distinto del de aquellas células responsables de evitar la reaparición de células hematopoyéticas normales del receptor (Roy et al, 1990). De los 2 pacientes con quimera mixta estable, el (UPN 109) ya ha

sido ampliamente discutido y la paciente diagnosticada de AA grave (UPN 47) recibió quimio-radioterapia como tratamiento de acondicionamiento. En el pre-TMO no se pudo realizar el estudio de los polimorfismos del ADN. En el post-TMO se practicó el estudio del donante y de las muestras de la paciente en diferentes momentos y se pudo constatar, al utilizar tres sondas muy polimórficas, la presencia de un fragmento de ADN que no era idéntico al del donante. A partir del día +720 el patrón que se obtuvo fue idéntico al del donante por lo que se asumió que había revertido a quimera total. A los +37 meses la paciente sigue asintomática. No se practicó estudio citogenético en esta paciente y el estudio del fenotipo eritrocitario demostró durante todo el seguimiento quimera total de la serie roja. Yam et al (1987) objetivaron, también con el estudio de los FRLP, la presencia de quimera mixta en 3 pacientes en los que no se realizó estudio pre-TMO. En otros 4 pacientes, que tampoco tenían estudio pre-TMO, demostraron, con un 98,7% de probabilidades, quimera linfohemopoyética total al utilizar 5 sondas muy polimórficas. Tanto los resultados de Yam et al (1987) como el resultado obtenido en nuestra paciente ponen en evidencia una ventaja adicional del estudio de los polimorfismos del ADN: la posibilidad de documentar la quimera (sea ésta mixta o total) con una alta probabilidad si se utilizan sondas adecuadas aún en el caso de no disponer de muestras de ADN del receptor, previas al TMO. Una alternativa es la obtención de una muestra de ADN del receptor en el post-TMO a partir de biopsia cutánea y posterior cultivo de los fibroblastos (Ginsburg et al, 1985). En 3 (6%) de los 48 pa-

cientes (UPN 36, UPN 45, UPN 82) analizados por nosotros el estudio pre-TMO del paciente se realizó a partir de cultivo de fibroblastos, lo que ha permitido su valoración durante todo el seguimiento.

Asimismo, Yam et al (1987) publican los resultados del estudio con diversos marcadores genéticos en el post-TMO y de 27 pacientes con hemopatías malignas sometidos a TMO sin médula ósea tratada, encontraron 3 pacientes con quimeras mixtas estables y en RCC entre 41 y 53 meses post-TMO. Knowlton et al (1986) describieron 2 quimeras mixtas y en 1 paciente con el estudio de los FRLP se detectó quimera mixta hasta el año del TMO sin evidencia de recaída leucémica. En un análisis retrospectivo, Petz et al (1987) objetivaron, mediante el estudio con diversos marcadores genéticos, un 17% de quimera mixta (29 de 172 pacientes). De éstos 29, un 83% siguen en RCC con un seguimiento de más de 9 años. En 3 de los pacientes, analizados por nosotros con el estudio de los FRLP, se detectaron quimeras mixtas transitorias. Este es un hecho también destacado por varios autores. Yam et al (1987) en un estudio prospectivo en 19 pacientes sometidos a TMO sin tratamiento de la médula ósea, objetivó 2 quimeras mixtas transitorias que revertieron posteriormente a quimera total. Según estos autores el hecho de presentar un pequeño porcentaje de células residuales del receptor no implica un mayor riesgo de recaída, mientras que en los casos en que el porcentaje aumenta a lo largo del tiempo el pronóstico es malo. Petz et al, (1987) confirma con sus resultados estos datos: en los pacientes en que el porcentaje de hemopoyesis residual no aumentó o permaneció estable no hubieron recaídas,

mientras que cuando el porcentaje (la intensidad de los fragmentos) aumentó, significó la recaída del paciente. En nuestros pacientes, en los que el porcentaje de hemopoyesis residual no aumentó o permaneció estable, no se detectaron recaídas, mientras que un aumento del porcentaje (la intensidad de los fragmentos) significó la recaída del paciente. En cambio Roy et al (1990), en un trabajo que analiza la historia natural de las quimeras mixtas en pacientes sometidos a TMO con tratamiento "in vitro" de la médula ósea, encuentra un incremento de hasta un 20% de células residuales del receptor durante el seguimiento de los pacientes, sin que este incremento suponga un mayor riesgo de recaída leucémica. Además, observaron en 1 paciente un aumento transitorio de hasta un 75% de células residuales del receptor para disminuir hasta el 25% posteriormente y en 2 casos persistencia de hasta un 50% de células residuales; los 3 pacientes siguen en RCC. En ninguno de nuestros pacientes pudimos observar este hecho. Siempre que detectamos aumento de la intensidad de los fragmentos significó recaída del paciente (Submitted to Blood).

No hemos observado EICH aguda grados III-IV en los pacientes que han presentado quimera mixta, analizada con los FRLP (0 de 11 frente a 6 de 37), datos que concuerdan con diversos autores (Hill et al, 1986; Yam et al 1987; Petz et al, 1987; Bretagne et al, 1987; Bertheas et al, 1988; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990). En la mayoría de casos publicados los pacientes habían recibido tratamiento "in vitro" de la médula ósea, por lo que es difícil de comparar con aquellos que no fueron sometidos a tratamiento "in vitro". Debido a que, en algunos casos, la

valoración de la quimera mixta se ha realizado a partir de los 6 meses del TMO es difícil dilucidar si la alta incidencia de quimera mixta en pacientes tratados es la causa o consecuencia de la baja incidencia y severidad de la EICH en estos pacientes. Estudios en animales han demostrado que una población de células del donante pueden ayudar al implante de la hemopoyesis del donante sin producir EICH, por lo que probablemente las células T responsables de mantener un injerto estable no son las mismas que causan la EICH (Roy et al, 1990). Con referencia al hecho aceptado de que los pacientes con leucemia que presentan EICH tienen menor riesgo de recaída (Weiden et al, 1981), Hill et al, (1986) al analizar sus resultados sugieren que una explicación alternativa al efecto injerto versus leucemia sería que las células leucémicas persistentes, solas o junto a otros elementos del receptor, serían capaces de suprimir la reacción injerto versus receptor.

Algunos estudios indican que los pacientes en los que se detecta quimera mixta tienen un mayor riesgo de recaídas leucémicas (Lawler et al, 1984; Walker et al, 1986; Bretagne et al, 1987) mientras que otros no corroboran este hallazgo (Schmitz et al, 1985; Schattenberg et al, 1989; Petz et al, 1987; Roy et al, 1990).

El análisis efectuado, a los +3 meses, con el estudio de los FRLP demuestra que presentar quimera mixta implica, en nuestros pacientes, un riesgo de recaída leucémica significativamente mayor. Przepiorka et al, (1989) no encontraron mayor riesgo de recaída en los pacientes con quimera mixta analizados citogenéticamente antes del día +100, al igual que Walker et al, (1986). Offit et al,

(1990) analizaron 64 pacientes con LMC sometidos a TMO con médula ósea tratada "in vitro" y objetivaron que los pacientes que presentaban más de un 25% de metafases del receptor, durante los 3 primeros meses del TMO, tenían una supervivencia libre de enfermedad significativamente menor que aquellos con menos del 25% de células residuales. No hemos encontrado en la literatura ningún estudio de los FRLP, a los 3 meses post-TMO. El hecho de que los pacientes con quimera mixta, objetivada a los 3 meses, tengan un mayor riesgo de recaída puede deberse a que se detectan células residuales del receptor pertenecientes a la clona leucémica, porque el tratamiento de acondicionamiento no haya sido suficientemente erradicativo.

En cambio el mismo análisis efectuado a los +6 meses está en la línea de lo publicado por Schattenberg et al, (1989) y Roy et al, (1990) en el sentido de que los pacientes con LA o LMC, en los que se detectó quimera mixta, no tienen mayor riesgo de recaída leucémica, al detectar población endógena no leucémica. Es decir, el hallazgo de células normales del receptor no afecta al pronóstico de los pacientes sometidos a TMO. Roy et al, (1990), a la vista de sus resultados, postula que el subgrupo de células responsable del efecto injerto versus leucemia es distinto del subgrupo responsable de evitar la reaparición de células residuales normales del receptor.

CONCORDANCIA DE LOS DISTINTOS METODOS

En el 89% de los casos los resultados del estudio de quime-

ra, realizados a los pacientes en el día +90, con los FRLP y el análisis citogenético, fueron coincidentes. En un caso (UPN 122) se evidenció, en una metafase estudiada en SP+, la presencia alteraciones citogenéticas inducidas por radioterapia, mientras que el estudio de los FRLP efectuado en sangre periférica detectó quimera total.

A los +180 días existió coincidencia de resultados en un 71% de los casos, cuando se estudió la quimera con el fenotipo eritrocitario y los FRLP. En el caso de la recaída leucémica (UPN 84), el fenotipo eritrocitario demostró implante total de serie roja mientras que el estudio de los FRLP demostró reaparición de la hemopoyesis del receptor. En el caso del UPN 85, probablemente, la sensibilidad del fenotipo eritrocitario era mayor y se detectó un 28 de serie roja residual, frente al análisis de toda la hemopoyesis como es el caso de los FRLP.

Las discordancias aumentaron al realizar el estudio en un mismo paciente con los 3 métodos, situándose en el 67%. En 2 casos la discordancia fué debida al estudio del fenotipo eritrocitario y en los 2 restantes al estudio citogenético, reflejando así una mayor sensibilidad del fenotipo eritrocitario y de los FRLP frente al estudio citogenético.

Hemos encontrado en nuestra casuística una diferencia estadísticamente significativa a favor del fenotipo eritrocitario en la capacidad de detección de células residuales, al comparar el estudio de los FRLP con el fenotipo eritrocitario. Sin embargo, el estudio del fenotipo eritrocitario tiene el gran inconveniente de que sólo detecta serie roja, por lo que no es un buen método de seguimiento para el estudio de la evolución de estos pacientes. Los FRLP son el

método de elección para la detección y seguimiento de la quimera mixta, pues unen a la detección precoz, el que evalúan toda la hemopoyesis. En la valoración de la quimera mixta con el estudio citogenético hay que tener en cuenta que en SP+ aparecen células del receptor con alteraciones citogenéticas inducidas por radioterapia. Este hecho obliga a realizar el estudio citogenético en MO- para valorar correctamente una quimera mixta.

5.2.3 RECAIDAS LEUCEMICAS

Uno de los problemas más serios que presentan los pacientes sometidos a TMO es el de la recaída de la enfermedad de base. Esta se observa entre un 20% o menos cuando el TMO se realiza en fases muy tempranas de la enfermedad (Goldman et al, 1988; Barrett et al, 1989; IBMTR, 1989) y hasta un 60% de los pacientes, según el tipo de leucemia y el estado en que se realizó el TMO (Boyd et al, 1982; Thomas et al, 1983; Champlin et al, 1989; Goldman et al, 1988; Gratwohl et al, 1988; Santos et al, 1989; Petersen et al, 1990).

De los 40 pacientes diagnosticados de LA y LMC evaluados por nosotros, 9 (22%) han recaído (Tabla 42.7). La mediana de aparición de la recaída fué de 9 meses con unos extremos de entre 2 y 27 meses, datos que concuerdan con los publicados por Boyd et al, (1982). La mediana de reaparición de la leucemia, de acuerdo con estos autores, fue de 6 meses con unos extremos de 1-24 meses.

Boyd et al, (1982) analizaron la incidencia de recaídas leucémicas en 243 pacientes diagnosticados de LA (LANL y

LAL) sometidos a TMO a partir de un donante de diferente sexo. De éstos, 74 pacientes (31%) recayeron de su leucemia y 1 paciente desarrolló un sarcoma inmunoblástico. En 54 pacientes se obtuvo muestra, en el momento de la recaída, para estudio citogenético. En 3 casos (5%) el origen de la misma fué a expensas de células del donante. En 4 pacientes en los que la recaída se originó a partir de células del receptor, se evidenciaron anomalías citogenéticas que diferían de la clona leucémica original. En el resto de los pacientes el origen de la recaída fué a expensas de células del receptor.

Witherspoon et al, (1986) revisaron las recaídas leucémicas aparecidas más allá de 2 años del TMO. De 232 pacientes, con LA y en RCC, analizados a partir de los 2 años del TMO con un seguimiento de 2-14,2 años, 17 pacientes recayeron entre los 2,0 y los 6,3 años del TMO. No se han descrito recaídas en pacientes que han sobrevivido más de 6,3 años. De nuestros casos, un paciente presentó recaída medular a los 27 meses del TMO, si bien a los +14 y +19 meses presentó recaída testicular y meníngea respectivamente. Witherspoon et al, (1985) estudiaron, además, el origen de las recaídas en 11 pacientes que disponían de marcadores genéticos. En 5 casos el origen fué a partir de células residuales del receptor y en 5 no tenían marcadores informativos para distinguir el donante del receptor. Un caso tuvo origen a partir de las células del donante, estudiado con los polimorfismos del ADN (Witherspoon et al, 1985). Los restantes 5 casos se analizaron sólo en base a criterios morfológicos, por lo que no se pudo filiar su origen. De los 9 pacientes de nuestro grupo que han recaído, ha sido

posible filiar el origen de la misma en todos aquellos casos que presentaron recaída medular.

En todos los pacientes se efectuó, en el momento de la recaída, estudio de la médula ósea y/o sangre periférica con los polimorfismos del ADN, en 3 de los 5 casos sin identidad sexual se realizó estudio citogenético y en otros 3 casos, en los que habían transcurrido más de 3 meses de la última transfusión, se practicó estudio del fenotipo eritrocitario.

En el paciente que presentó recaída focal (UPN 27), el estudio de los polimorfismos del ADN, practicado en médula ósea, evidenció un patrón linfohematopoyético del donante, si bien en ninguno de los aspirados medulares que se efectuaron se evidenció recaída medular y no se efectuó estudio de la muestra en que se objetivó la recaída, no pudiéndose extrapolar, a partir de estos datos, el origen de la misma. No se practicó estudio del fenotipo eritrocitario y el estudio citogenético carecía de valor, puesto que donante y receptor eran del mismo sexo.

En todos los casos analizados con los FRLP, excepto en uno, el origen de la recaída fué a expensas de las células del receptor, datos que fueron corroborados en aquellos pacientes en los que se pudo efectuar estudio citogenético de la MO-. El caso de la paciente UPN 241C es demostrativo de la necesidad de disponer de un polimorfismo informativo donante-receptor o receptor para su correcto análisis. En ésta paciente solamente fué posible, mediante el estudio con las diferentes sondas, encontrar un polimorfismo informativo donante, por lo que no es posible determinar si ya en la primera muestra analizada presentaba una quimera

mixta. Coincidiendo con la recaída leucémica se objetivó un aumento en la intensidad del fragmento de ADN compartido por el donante y el receptor, junto con una discreta disminución del fragmento específico del donante, lo que sugiere, sin que se pueda asegurar con certeza, que la recaída se originó a partir de células residuales del receptor, con persistencia en el momento del estudio de hemopoyesis del donante. Este hecho se pudo comprobar en el paciente UPN 61, en el que inicialmente se detectó un polimorfismo informativo donante. En el momento de la recaída se pudo demostrar, al analizar la fracción mononuclear de la médula ósea, que toda la hemopoyesis era del receptor, puesto que no se visualizó el fragmento de ADN del donante. En el momento en que se obtuvo un polimorfismo informativo donante-receptor, con las sondas minisatélites, se pudo objetivar la presencia de quimera mixta desde los +90 días del TMO.

El estudio de los polimorfismos del ADN fué, pues, de gran utilidad para filiar el origen de la recaída y en el caso de 2 pacientes (UPN 61 y UPN 84) la reaparición de células residuales del receptor antecedió en 6 y casi en 3 meses, respectivamente, la aparición de la recaída leucémica. Por el contrario, el estudio citogenético solamente fue capaz de detectar hemopoyesis clonal del receptor en el momento de la recaída. Estos 2 casos ilustran la dificultad técnica del estudio citogenético, que viene dado por el hecho de encontrar suficientes mitosis que permitan excluir, con una alta probabilidad la existencia de una quimera mixta y que, en ocasiones es imposible, por mala calidad de las mitosis, identificar completamente las aberraciones cromosómicas y

en consecuencia es difícil asegurar con certeza su origen. En el caso de la recaída que presentó la paciente UPN 92, existieron discordancias en los resultados del estudio citogenético efectuado en SP+ y en MO-. El hecho de que en sangre periférica estimulada con PHA se analicen fundamentalmente linfocitos y el que se objetivara tan sólo un pequeño porcentaje de blastos junto a una linfocitosis absoluta, probablemente explique la discordancia de este hallazgo citogenético. Este hecho pone en evidencia, una vez más, que para el estudio de las recaídas es necesario practicar el mismo en MO- o en SP sin PHA.

El estudio del fenotipo eritrocitario no fué, en cambio, de utilidad para demostrar la recaída en ninguno de los 9 casos que se consideran. En 6 pacientes no se pudo estudiar, por estar los pacientes bajo régimen transfusional y en los 3 restantes no hubo cambios en el fenotipo. En 2 casos (UPN 55 y UPN 84) sólo se detectaron hematíes del donante y en el paciente UPN 61 se mantuvieron los mismos porcentajes de hematíes residuales objetivados durante todo el seguimiento. A parte de la dificultad, ya comentada, de efectuar el estudio debido al intervalo entre transfusión y fiabilidad del análisis, en el caso de la recaída leucémica, no tiene mucho sentido el analizar el fenotipo eritrocitario, debido a, por una parte, la vida media de los hematíes y por otra a que solamente se analiza una línea celular. Van Dijk et al, (1987), si bien no estudiaron el origen de la recaída con el análisis del fenotipo eritrocitario, encontraron que en 2 de 3 pacientes en los que el porcentaje de hematíes residuales fue en aumento, esto significó la recaída leucémica.

En la mayoría de casos, publicados en la literatura, y de acuerdo con nuestros hallazgos, el origen de las recaídas leucémicas ha sido a expensas de la reaparición de células residuales neoplásicas del receptor (Deeg et al, 1984; Ginsburg et al, 1985; Minden et al, 1985; Champlin et al, 1987; Ganessan et al, 1987; Brunet et al, 1989; Offit et al, 1990), demostrado con los FRLP y/o estudio citogenético. La existencia de las recaídas, a partir de la reaparición de células leucémicas del receptor, implica que la terapéutica con quimio-radioterapia no ha sido efectiva para erradicar la leucemia del receptor. Es probable, que existan otras variables adicionales, que contribuyan en mayor o menor medida a un riesgo mayor de recaída leucémica. Horowitz et al, (1990) analizaron diversos factores relacionados con la reacción del injerto frente a la leucemia. En un estudio de 2254 pacientes se estudiaron diversos factores, entre ellos el efecto anti-leucémico del TMO alogénico, que se ha visto ocurre en pacientes sometidos a TMO alogénico y que no presentan EICH, los cuales tienen un riesgo mucho menor de recaída leucémica que los pacientes sometidos a TMO singénico. Este efecto se ha demostrado en pacientes con LANL. Otro de los factores es el efecto antileucémico mediado por linfocitos T que influye decisivamente en el riesgo de recaída (Hercend et al, 1986; Horowitz et al, 1990).

Desde los inicios del TMO alogénico como tratamiento de las hemopatías malignas se han descrito, hasta la actualidad, 16 casos de recaída leucémica a partir de células del donante (Fialkow et al, 1971; Thomas et al, 1972; Goh et al, 1977; Eifenbein 1978; Newburger et al, 1981; Withers-

poon et al, 1985; Thomas et al, 1986; Schmitz et al, 1987; Fieg et al, 1988; Marmont et al, 1984; Smith et al, 1985; Schubach et al, 1982; Martin et al, 1984; Stein et al, 1989, Nace et al, 1989). De los 9 pacientes analizados por nosotros y que recayeron, en un paciente (UPN 34) el estudio de la médula ósea, en el momento de la recaída, analizada con el estudio de los FRLP demostró un patrón del donante, lo que sugiere que la misma se originó a partir de las células del donante. La mayoría de recaídas publicadas a partir del donante han aparecido antes de los 3 años del TMO y los mecanismos que explican este tipo de recaídas puede estar en relación a la transferencia a las células trasplantadas de un oncogén dominante residente en el ADN o bien de un virus oncogénico o bien en cromosomas del receptor lesionados por la radioterapia (Fialkow et al, 1971; Thomas et al, 1972; Deeg et al, 1984). En el caso de Witherspoon et al, (1985) en el que el intervalo entre el TMO y la recaída fué de 6 años estos mecanismos no pueden explicar este hecho. Se ha postulado que se precisa más de un oncogén para la plena expresión de la transformación neoplásica (Schmitz et al, 1987).

De los 16 casos documentados como recaídas originadas a partir de células del donante, solamente en 3 el origen de la recaída se ha documentado con estudio molecular (Witherspoon et al, 1985; Fieg et al, 1988; Schubach et al, 1982), en 2 casos el origen se documentó con el estudio de los isoenzimas (Gosset et al, 1979; Martin et al, 1984), en 9 pacientes el origen de la recaída a partir del donante se documentó en base al análisis citogenético y en 3 casos a partir del estudio citogenético y molecular (Stein et al,

1989; Naoe et al, 1989). Stein et al, (1989) publicaron el caso de un paciente varón sometido a TMO a partir de un donante de diferente sexo. En el momento de la recaída mientras el estudio citogenético sugería que la misma era a expensas del donante, debido a la ausencia del cromosoma Y junto con presencia de un polimorfismo del donante, el análisis molecular demostró que la leucemia se originaba a partir de las células residuales del receptor. Asimismo, Naoe et al, (1989) presentaron el caso de una mujer sometida a TMO a partir de un donante de distinto sexo y en el momento de la recaída se evidenció la misma discordancia: mientras el estudio citogenético sugería recaída a expensas del donante (20 metafases 46,XY) el estudio molecular apoyaba la hipótesis de la recaída a expensas del receptor. Una de las explicaciones a estas discordancias sería, en el primer caso, la pérdida del cromosoma Y, que se sabe ocurre en pacientes con síndromes mieloproliferativos y en leucemias (Padre-Mendoza et al, 1979), pero evidentemente esto no explica el caso de Naoe et al (1989) y cuestiona los casos similares al de Stein et al (1989) que fueron diagnosticados solamente en base a estudios citogenéticos. Naoe et al, (1989) sugiere que una explicación a sus resultados sería que el estudio citogenético de la MO- reflejaría la hemopoyesis residual de las células del donante mas que una recaída a partir de la misma, debido al hecho de que solamente se analizan las células en división, mientras que el estudio molecular analiza todas las células nucleadas. Estos datos están de acuerdo con Lawler et al (1984), que también encontró en MO- células normales del donante en división durante la recaída, mientras las presumiblemente

células leucémicas originarias del receptor solamente se pudieron identificar por la presencia del cuerpo Y. Esto implica que encontrar células con un cariotipo normal en una muestra de MO-, en un paciente con recaída leucémica no quiere decir necesariamente que pertenecen a esta población.

El estudio de los 2 pacientes que recayeron y que se analizaron simultáneamente con los 2 métodos demostró una total concordancia en los resultados. En ambos se demostró que el origen de la recaída era a partir de las células del receptor. Para filiar de una manera clara el origen de la recaída leucémica se requiere estudio molecular complementado, siempre que sea posible, con el análisis cromosómico. En el caso de que se disponga de un cromosoma marcador para el seguimiento post-TMO o que se detecten anomalías clonales, el estudio citogenético ofrece la ventaja de demostrar la clonalidad del proceso, mientras que el estudio con las sondas moleculares demuestran reaparición de hemopoyesis residual del receptor sin presuponer si ésta es o no clonal y es a partir de la valoración clínica, que es posible sacar conclusiones. Sin embargo, trabajos recientes que utilizan el estudio de un oncogen para determinar la persistencia de células leucémicas residuales (Ganesan et al, 1988) y para determinar el origen monoclonal o policlonal de la hemopoyesis del donante (Turhan et al, 1989) indican el importante papel que tiene el análisis del ADN en el estudio no solamente del implante, de la aparición o no de quimeras mixtas y el estudio del origen de las recaídas sino también en la valoración de la leucemia residual. El estudio con los FRLP es el método de elección para

evaluar las recaídas leucémicas y el estudio citogenético en M0- puede corroborar el diagnóstico y demostrar la clonalidad del proceso en el caso de poseer un cromosoma marcador no constitucional. El estudio del fenotipo eritrocitario no es útil en la determinación del origen de la recaída leucémica.

6 RESUMEN Y CONCLUSIONES

6.1 RESUMEN

Desde la incorporación del TMO como parte del tratamiento de las hemopatías malignas se han utilizado diversos marcadores genéticos para documentar el implante de la médula ósea del donante. Estos marcadores adolecen de una serie de inconvenientes relacionados, entre otros, con la dependencia transfusional, con la identidad o no de sexo entre donante y receptor, y con el hecho de que no siempre analizan todas las líneas celulares, lo que hace en ocasiones inviable la valoración del implante en etapas precoces del post-TMO y el estudio posterior de la químera. La incorporación de la tecnología del ADN en la caracterización de las poblaciones celulares del post-TMO, permite, en cambio, analizar todas las células nucleadas, es independiente de los requerimientos transfusionales y de la identidad o no de sexo entre donante y receptor y, de hecho, son susceptibles de análisis todos los pacientes sometidos a TMO.

Se presentan los resultados obtenidos en el pre-TMO, al analizar 82 parejas donante-receptor mediante el estudio de los polimorfismos del ADN y con el estudio extenso de hematíes en 75 de ellas, con el fin de obtener un polimorfismo y/o un marcador informativo y los resultados del seguimiento en 50 pacientes diagnosticados de hemopatías y sometidos a TMO a partir de un donante HLA compatible, en diferentes momentos de su evolución. En el período post-TMO se analizaron los 50 pacientes mediante el estudio de los polimorfismos del ADN, en 25, además, con el estudio del fenotipo eritrocitario y en 17 pacientes con el análisis citogenético. Los objetivos han sido:

1. Valorar la contribución de los tres marcadores al estudio del implante medular.
2. Valorar la utilidad de los distintos métodos en la detección de quimeras totales y quimeras mixtas y su relación con el riesgo de recaída.
3. Estudiar el origen de la recaída y determinar el valor de cada método para su filiación.

Para el estudio de los polimorfismos del ADN las muestras de sangre del donante y del receptor se analizaron según el método de Southern con 10 sondas dialélicas multialélicas y minisatélites y 4 enzimas de restricción, en busca de un polimorfismo informativo donante-receptor, informativo receptor y en última instancia informativo donante. En el post-TMO se estudió al paciente con el polimorfismo más informativo.

El estudio extenso del fenotipo eritrocitario se realizó según técnicas estandarizadas y se estudiaron un mínimo de 19 antígenos eritrocitarios.

El estudio citogenético se practicó solamente en el post-TMO en aquellos pacientes sin identidad sexual con el donante y/o presencia de un marcador cromosómico no constitucional. Se realizó a partir de cultivo de células de médula ósea sin estimulantes y/o sangre periférica con fitohemaglutinina.

Fase pre-TMO

Mediante el estudio de los polimorfismos del ADN se obtuvo un polimorfismo informativo en el 100% de las 80 parejas estudiadas, en el 96% de los casos el estudio del paciente

se realizó a partir de muestras de sangre periférica y en el 4% restante, a partir de biopsia cutánea y posterior cultivo de fibroblastos. Con el estudio extenso de hematíes se obtuvo un marcador en el 96,4% de las 75 parejas estudiadas. Las 7 restantes no se pudieron analizar por estar bajo requerimientos transfusionales.

Fase post-TMO

En todos los pacientes se ha podido objetivar el implante a partir de la médula del donante, mediante las tres técnicas. Con el estudio de los polimorfismos de ADN y el análisis citogenético se ha demostrado el implante antes del mes del TMO en la totalidad de los pacientes analizados, mientras que con el estudio del fenotipo eritrocitario el implante no se pudo objetivar hasta los 3 meses del TMO.

El estudio del fenotipo eritrocitario fue el método más sensible para la detección de células (serie roja), residuales ($p < 0,05$), sin relación con el riesgo de recaída. Con este método se detectaron un 44% de quimeras mixtas. El 27% de estas quimeras ha permanecido estable, independientemente de la evolución clínica del paciente, el 36% de los pacientes revertieron a quimera total entre los 3-6 meses y el 27%, todos ellos con incompatibilidad ABO mayor, revertieron a quimera total al año del TMO. En 1 paciente se constató recuperación autóloga a los 4 meses del TMO.

Las quimeras mixtas detectadas con el estudio citogenético, en médula ósea sin estimulantes, han coincidido siempre con la recaída leucémica. El estudio efectuado en sangre periférica con estimulantes ha puesto en evidencia la presencia de células residuales con anomalías citogenéticas inducidas

por la radioterapia en 17% de pacientes y todos ellos revertieron a quimera linfohematopoyética total a los 4 meses del TMO y no hubo ninguna relación con el riesgo de recaída. Con el estudio de los polimorfismos del ADN se ha detectado un 24% de quimeras mixtas durante todo su seguimiento. En el 18% esta quimera se ha mantenido estable y los pacientes siguen en RCC, en el 54% apareció después de un período de quimera total y fue el prelude de la recaída, en 2 casos la recuperación hematológica fue a expensas del receptor y en un caso hubo posterior rechazo del implante. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la incidencia y gravedad de la EICH aguda entre los pacientes con quimera mixta y quimera total, si bien ningún paciente con quimera mixta presentó EICH grado IV, frente al 18% de los pacientes con quimera total diagnosticados de EICH grado IV. Se ha analizado, además, si la detección de quimera mixta a los +90 y +180 días estaba asociada a un mayor riesgo de recaídas leucémicas. A los +90 días, los pacientes con quimera mixta, detectada con el estudio de los polimorfismos del ADN, tienen en nuestra casuística, un riesgo significativamente mayor de recaída leucémica, si bien esta significación estadística se pierde al analizar los pacientes a los +6 meses del TMO. Asimismo, se ha analizado la concordancia de los distintos métodos de estudio a los +90 y +180 días, cuyos resultados se muestran en los apartados correspondientes.

De los pacientes que han presentado recaída medular a lo largo de la evolución, mediante el estudio de los polimorfismos del ADN se ha podido, en el 100% de los pacientes, documentar, el origen de la misma, mientras que con el

estudio citogenético sólo fue posible corroborar el diagnóstico en el 33% de los casos. En todos excepto en 1 paciente la recaída se originó a expensas de las células residuales del paciente. En 1 paciente el estudio de los polimorfismos del ADN demostró tan solo hemopoyesis del donante en el momento de la recaída.

De los datos analizados se han deducido las siguientes conclusiones:

6.2 CONCLUSIONES

EN EL ESTUDIO DEL IMPLANTE MEDULAR:

1. Los 3 métodos han demostrado ser eficaces en el estudio del origen de las células linfohematopoyéticas en el post-TMO.
2. El estudio del fenotipo eritrocitario no ha demostrado, en nuestro medio, su utilidad para documentar precozmente el implante.
3. Con el estudio citogenético ha sido posible determinar precozmente el implante al mes del TMO. Solamente los pacientes sin identidad sexual con el donante y/o con presencia de un marcador cromosómico no constitucional son susceptibles de este tipo de análisis.
4. El estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica es el método de elección para el seguimiento de los pacientes en el post-TMO. En todos los pacientes se ha podido demostrar implante linfohematopoyético en etapas muy precoces del TMO. Es independiente de la identidad o no de sexo entre el donante y el receptor y de las transfusiones realizadas en el período inicial del post-TMO.

EN EL ESTUDIO DE LAS QUIMERAS MIXTAS

5. El estudio del fenotipo eritrocitario es el método más sensible para la detección de células residuales del receptor, si bien, presenta la limitación de analizar solamente la serie roja. No hemos demostrado correlación entre la detección de quimera mixta roja y la presentación de recaída leucémica.
6. Es aconsejable realizar el estudio citogenético en médula ósea sin estimulantes. Cuando se ha efectuado en sangre periférica con fitohemaglutinina se ha puesto de manifiesto la presencia de celularidad del receptor con alteraciones citogenéticas inducidas por radioterapia, en todos los casos en que ésta se ha detectado.
7. El estudio de los polimorfismos del ADN ha demostrado gran especificidad en la detección de hemopoyesis residual del receptor. En los casos en que se ha detectado, han presentado única y exclusivamente recaída, aquellos pacientes en los que se ha objetivado un aumento creciente de la intensidad de los fragmentos de ADN específicos del receptor.

EN EL ESTUDIO DE LAS RECAIDAS

8. El estudio del fenotipo eritrocitario no aporta información para filiar el origen de la recaída.

9. El estudio citogenético, en médula ósea sin estimulantes, ha corroborado el origen de la recaída a través de la diferencia de sexo entre donante y receptor en todos los casos sometidos a estudio. Además, ha permitido establecer el origen clonal de la proliferación neoplásica, siempre que se disponga de un marcador cromosómico no constitucional.

10. El análisis de los polimorfismos del ADN es el método de elección para el estudio de la recaída leucémica. Permite analizar todos los pacientes y filiar el origen de la recaída. Actualmente no se admite una correcta filiación del origen de la recaída sin el estudio molecular adecuado.

El estudio de los polimorfismos del ADN ha sido el método que, en nuestro medio, ha resultado ventajoso en relación a las otras técnicas en la valoración de un estado quimérico post-TMO:

- Documenta de forma precoz el implante al ser independiente de las necesidades transfusionales.
- Permite valorar en todos los pacientes la persistencia de quimera total o mixta al analizar toda la hemopoyesis y ser independiente de la identidad o no de sexo entre donante y receptor.
- Por último, se puede demostrar el origen de la recaída en todos los pacientes.

7 BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Anasetti C, Doney KC, Storb R et al. (1986). Marrow transplantation for severe aplastic anemia. Long term outcome in fifty "untransfused" patients. *Ann Intern Med*, 104: 461-466.

Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, Nathan DG, Orkin SH, Rapoport JM. (1985). Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood*, 66: 1247-1250.

Alimena G, de Cuià MR, Mecucci C et al. (1990). Cytogenetic follow-up after allogeneic bone marrow transplantation for Ph⁺ positive chronic myelogenous leukemia. *Bone marrow Transplant*, 5: 119-127.

Appelbaum FR, Dahlberg MS, Thomas ED et al. (1984). Bone marrow transplantation or chemotherapy after remission induction for adults with acute nonlymphoblastic leukemia. A prospective comparison. *Ann Intern Med*, 101: 581-588.

Appelbaum FR, Sullivan KM, Thomas ED et al. (1985). Allogeneic marrow transplantation in the treatment of MOPP-resistant Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, 11: 1490-1494.

Appelbaum FR, Fisher LI D, Thomas ED. (1988). Chemotherapy v marrow transplantation for adults with acute nonlymphocytic leukemia: a five-year follow-up. *Blood*, 72: 179-184.

Apperley JF, Jones I, Hale G et al. (1986). Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: T-cell depletion reduces the risk of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukemic relapse. *Bone marrow transplant*, 1: 53-56.

Arthur CK, Apperley JF, Guo AP, Rassool F, Gao LM, Goldman JM. (1988). Cytogenetics events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*, 71: 1179-1186.

Bär BMAM, Shcattenberg BA, van Dijk BA, de Man AJM, Kunst VAJM, de Witte T. (1989). Host and donor erythrocyte repopulation patterns after allogeneic bone marrow transplantation analysed with antibody-coated fluorescent microspheres. *Br J Haematol*, 72: 239-245.

Baker MC, Lawler SD, Harris H, Barrett A, Powles RL. (1986). Radiation damage in patients treated by total-body irradiation bone marrow grafting and cyclosporin. *Radiation Res*, 103: 413-424.

Barnes DWH and Loutit JF. (1954). Spleen protection. The cellular hipotesis. In *Radiobiology Symposium Liege*. ZM Bacq ed. 134-135. London Butterworths.

Barnes DWH, Loutit JF. (1956). Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. *Br Med J*, 2: 626-627.

Barrett J, Horowitz MM, Gale RP et al. (1989). Marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: factors affecting relapse and survival. *Blood*, 74: 862-871.

Becher R, Beelen DW, Graeven U, Schaefer U, Schmidt CG. (1987). Triple chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome positive chronic granulocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 67: 373-374.

Belanger R, Gyger M, Perreault C, Bonny Y, St-Louis J. (1988). Bone marrow transplantation for myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 69: 29-33.

Bertheas MF, Maranichini D, Lafage M et al. (1988). Partial chimerism after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation in leukemic HLA-matched patients: A cytogenetic documentation. *Blood*, 72: 89-93.

Billingham RE. (1966). The biology of of graft versus host reactions. *Harvey Lectures*, 62: 21-78.

Blazar BR, Orr HT, Arthur DC, Kersey JH, Filipovich AH. (1985). Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 66: 1436-1444.

Blume KG, Beutler E, Bross KJ, Schmidt GM, Spruce WI, Teplitz RL. (1980). Genetic markers in human bone marrow transplantation. *Ame J Hum Genet*, 32: 414-419.

Blume KG. (1983) Is bone marrow transplantation the optimal treatment for acute myelogenous leukemia, in Gale RP (Ed): *Recent Advances in Bone Marrow Transplantation*. Proceedings of the UCLA symposia. New York, Liss pp 95-104.

Bodey GP, Gehan EA, Freireich EJ, Frei E III. (1971). Protected environment-prophylactic antibiotic program in the chemotherapy of acute leukemia. *Am J Med*, 262: 138-151.

Bortin MM, Gale RP, Rimm AA. (1981). Allogeneic bone marrow transplantation for 144 patients with severe aplastic anemia. *JAMA*, 245: 1132-1139.

Bostrom B, Brunning RD, McGlave P et al. (1985). Bone marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia in first remission: analysis of prognostic factors. *Blood*, 65: 1191-1196.

Botstein D, Whitte RL, Skolnick M, Davis RW. (1980). Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32: 314-331.

Boyd CN, Ramberg RC, Thomas ED. (1982). The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after bone marrow transplantation. *Leuk. Res*. 6: 833-837.

Branch DR, Gallagher MT, Forman S, Winkler KJ, Petz LD. (1982). Endogenous stem cell repopulation resulting in mixed hematopoietic chimerisms following total body irradiation and marrow transplantation for acute leukemia. *Transplantation*, 34: 226-228.

Bretagne S, Vidaud M, Kuentz M et al. (1987). Mixed blood chimerism in T-cell depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood*, 70: 1692-1695.

Brunet S, Casals T, Madoz P, Aventin A, Muñoz E, Baiget M. los polimorfismos del DNA como marcadores de implante en el trasplante alogénico de médula ósea. Valoración preliminar. *Med Clin*, 93: 765- 771.

Buckner CD, Clift RA, Sanders JE. (1978). Protective environment for marrow transplants recipient. A prospective study. *Ann Intern Med*, 89: 893-901.

Buckner CD, Clift RA, Thomas ED et al. (1983). Early infectious complications in allogeneic marrow recipients with acute leukemia: effects of prophylactic measures. *Infection*, 5: 243-250.

Buckner CD, Clift RA, Sanders J, Appelbaum FR. (1988). First versus non first remission acute non lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, (suppl) 73: 234.

Buckton KE, Hamilton GE, Paton L. (1978). Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients. In *Mutagen-induced Chromosome damage in man* (Evans HJ, Lloyd DC eds), pp.142-150. Edinburgh University Press. Edinburgh.

Butturini A, Bortin MM, Gale RP. (1987). Graft-vs-leukemia following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2: 233-242.

Camitta BM, Storb R, Thomas Ed. (1982). Aplastic anemia: pathogenesis diagnosis, treatment and prognosis. *N Eng J Med*, 306: 645-652; 712- 718.

Carbonell F, Ganser A, Fliedner TM, Arnold R, Kubanek B. (1983). The fate of cells with chromosome aberrations after total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Radiation Res*, 93: 453- 460.

Cervantes F. (1990). Leucemia mieloide crónica: una década de progresos. *Med Clin*, 94: 27-35.

Champlin RE, Ho W, Arenson E, Gale RP. (1982). Allogeneic bone marrow transplantation for chronic granulocytic leukemia in chronic or accelerate phase. *Blood*, 60: 1038-1041.

Champlin RE, Feig Sa, Ho Wg, Gale RP. (1984). Graft failure following bone marrow transplantation: its biology and treatment. *Exp Hematol*, 121: 728-733.

Champlin RE, Winston G, Gale RP et al. (1985). Treatment of acute myelogenous leukemia. A prospective controlled trial of bone marrow transplantation versus consolidation chemotherapy. *Ann Intern Med* 102: 285-291.

Champlin RE. (1987). Treatment of aplastic anemia, in Gale RP, Champlin RE (eds): *Progress in bone marrow transplantation*. New York, Liss, 37-52.

Champlin RE, Gale RP. (1987). Bone marrow transplantation for acute leukemia: recent advances and comparison with alternative therapies. *Semin Hematol*, 24: 55-67

Champlin RE, Gale RP. (1989). Acute lymphoblastic leukemia: Recent advances in biology and therapy. *Blood*, 73: 2051-2066.

Champlin RE, Horowitz MM, van Beckum et al. (1989a). Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Blood*, 73: 606-613.

Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, et al. (1987). The treatment of acute nonlymphoblastic leukemia by allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2: 243-258.

Clift RA, Buckner CD, Thomas ED. (1982). Treatment of chronic granulocytic leukemia in chronic phase by allogeneic bone marrow transplantation. *Lancet*, II: 621-623.

Coccia PF, Krivit W, Cerenka J et al. (1980). Successful bone marrow transplantation for infantile malignant osteopetrosis. *N Eng J Med*, 302: 701-708.

Coccia PF, Strandjord SE, Warketintin PI et al. (1988). High-dose cytarabine arabinoside and fractionated total-body irradiation: An improved preparative regimen for bone marrow transplantation of children with acute lymphoblastic leukemia in remission. *Blood*, 71: 888-893.

Cohen S, Chang ACY, Hsu L. (1973). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Echerichia Coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 69: 2110-2114.

Connell MS, Wilson R. (1965). The treatment of x-irradiated germfree CWF and C3H mice with isologous and homologous bone marrow. *Life Sci*, 4: 721-729.

de Man AJM, Foolen WJG, van Dijk BA, Kunst VAJM, de Witte TM. (1988). A fluorescent microsphere method for the investigation of erythrocyte chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using antigenic differences. *Vox Sang*, 55: 37-41.

De Witte T, Schattenberg A, Salden M, Wesseps J, Haanen C. (1987). Mixed chimerism and the relation with leukaemic relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2(suppl 1): 11-12.

Deeg J, Storb R, Thomas ED. (1984). Bone marrow transplantation: a review of delayed complications. *Br J Haematol*, 57: 185-208.

Deeg J, Self S, Storb R et al. (1986). Decreased incidence of marrow graft rejection in patients with severe aplastic anemia: changing impact of risk factors. *Blood*, 86: 1363-1368.

Deeg HJ, Klingemann HG, Phillips GL. (1988). In Springer Verlag Ed. A Guide to bone marrow transplantation: pp 6-106.

Devergie A, Gluckman E. (1982). Bone marrow transplantation in severe aplastic anemia following cytoxan and thoracoabdominal irradiation. *Exp Hematol*, 10: 17-18.

Dinsmore R, Kirkpatrick D, Flomenberg N et al. (1983). Allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in remission: the importance of early transplantation. *Transplant Proc*, 15: 1397-1400.

Dinsmore R, Kirkpatrick D, Flomenberg N et al. (1984). Allogeneic bone marrow transplantation for patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, 63: 649-656.

Domingo-Albós A, Brunet S, Petit J, Puig J, Ayats R, Garcia J, Soler J, Mateo J, Baiget M, Muñiz E. (1990). Successful allogeneic bone marrow transplant for treatment of an evolutive form of Waldenström's macroglobulinemia. *Bone Marrow Transplant*, 5, 107. (Suppl 2).

Doney KC, Weidwn PL, Storb R, Thomas ED. (1981). Treatment of graft versus host disease in human allogeneic marrow graft recipients: a randomized trial comparing anti-thymocyte globulin with corticosteroids. *Am J Hematol*, 11, 1-8.

Eisenstein BY. (1990). The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Eng J Med*, 322: 178-183.

Elfenbeig GJ, Brogaonkar DS, Bias WB et al. (1978). Cytogenetic evidence for recurrence of acute myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation in donor hematopoietic cells. *Blood*, 52: 627-636.

Estivill X, Farrall M, Scambler PJ, Bell GM et al. (1987). A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature*, 326: 840-845.

Fafer A, Cheever MA, Thomas ED. (1982). Treatment of chronic granulocytic leukemia with chemoradiotherapy and transplantation of marrow from identical twins. *N Eng J Med*, 306: 63-68.

Ferrara J, Lipton J, Hellman S, Burakoff S, Mauch P. (1987). Engraftment following T-cell-depleted marrow transplantation. *Transplantation*, 43: 495-499.

Fialkow PJ, Thomas ED, byrant JI, Neiman PE. (1971). Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet*, II: 251- 255.

Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen JA. (1981). Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 58: 158-163.

Fieg SA, Dreazen O, Simon M, Witey F, Schreck R, Gale RP. (1988). B cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) in donor cells following bone marrow transplantation for T cell ALL. Bone Marrow Transplant, 3: 331.

Filipovich AH, Ramsay NKC, McGlave P et al. (1983). Mismatched bone marrow transplantation at the University of Minnesota: use of related donors others than HLA MLC identical siblings and T cell depletion, in Gale RP (ed): recent advances in bone marrow transplantation. New York, Liss, p 769.

Filipovich AH, Vailera DA, Youle RJ et al. (1984). Ex vivo treatment of donor bone marrow with anti-T cell immunotoxins for prevention of graft-versus-host disease. Lancet, I: 469-471.

Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF. (1956). Cytological identification of radiation chimaeras. Nature, 177: 452-454.

Forman SJ, Blume Kg, Krance RA et al. (1987). A prospective randomized study of graft-v-host disease in 107 patients with leukemia: methotrexate/prednisone v cyclosporine A/prednisone. Transplant Proc, 19: 2605.

Frasconi F, Sessarego M, Bacigalupo A et al. (1988). Competition between recipient and donor cells after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Br J Haematol, 69: 471-475.

Fritsch EP, Lawn RM, Maniatis T. (1980). Molecular cloning and characterization of the human β like globin gene cluster. Cell, 19: 959- 972.

Ganessan TS, Ling Min G, Goldman JM, Young BD. (1987). Molecular analysis of relapse in chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. Blood, 70: 873-876.

Gahrton G, Tura S, Flesch M et al. (1987). Bone marrow transplantation in multiple myeloma: Report from the European cooperative group for bone marrow transplantation. Blood, 69: 1262-1264.

Gale RP. (1982). Bone marrow transplantation in acute myelogenous in first remission: evidence for an antileukemic affect of graft-vs-host disease. *Exp Hematol*, 10: 20 (abstract).

Gale RP, Kersey JH, Bortin MM et al. (1983). Bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*, II: 663-667.

Gale RP, Bortin M, van Bekkum DW et al. (1987). Risk factors for acute graft versus host disease. *Br J Haematol*, 67: 397-406.

Gatti RTA, Meuwissen MR, Allen HD, Hong R, Good RA. (1968). Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*, II: 1366-1369.

Gill TS. (1977). III: Chimerism in humans. *Transplant Proc*, 9: 1423- 1427.

Ginsburg D, Antin JH, Smith BR, Orkin HS, Rapoport JM. (1985). Origin of cell population after bone marrow transplantation. Analysis using DNA sequence polymorphisms. *J Clin Invest*, 75: 596-603.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibluing donors. *Transplantation*, 18:295-304.

Godde-Salz E. (1986). Cytogenetic markers in allogeneic bone marrrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet*, 20: 293-299.

Goldman JM, Apperley Jf, Jones l et al. (1986). Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *N Eng J Med*, 314: 202-207.

Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM et al. (1988). Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: increased risk of relapse associated with T cell depletion. *Ann Intern Med*, 108: 806-814.

Goldman JM. (1988a). Cytogenetic evolution after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Nouv Rev Fr Hematol*, 30: 31-33.

Gosset TC, Gale RP, Fleischman BA et al. (1979). Immunoblastic sarcoma in donor cells after bone-marrow transplantation. *N Eng J Med*, 300: 904-908.

Goh K, Klemperer MR. (1977). In vivo leukemic transformation: Cytogenetic evidence of in vivo leukemic transformation of engrafted marrow cells. *Am J Hematol*, 2: 283-290.

Gratwohl A, Zwaan FG, Hermans J, Lykema A. (1986 suppl). Bone marrow transplantation for leukemia in Europe. Report from leukemia working party. *Bone Marrow transplant*, 1: 177-181.

Gratwohl A, Hermans J, Barrett AJ et al. (1988). Allogeneic bone marrow transplantation for leukemia in Europe. Report from the Working party on leukaemia. *Bone Marrow Transplant*, 3: 225-229. (Suppl 1).

Hercend T, Takvorian T, Tantravahi R et al. (1986). Characterization of natural killer cells with antileukemic activity following allogeneic bone marrow transplant. *Blood*, 67: 722-725.

Hervé P, Cahn JY, Flesch M et al. (1987). Successful graft versus host disease prevention without graft failure in 32 HLA-identical allogeneic bone marrow transplantation with marrow depleted of T cells by monoclonal antibodies and complement. *Blood*, 69: 388-393.

Herzig RH, Barrett AJ, Gluckman E et al. (1987). Bone marrow transplantation in high-risk acute lymphoblastic leukemia in first and second remission. *Lancet*, I: 786-789.

Hill RS, Peterson FB, Storb R et al. (1986). Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with higher risk of graft rejection and a lessened incidence of graft versus host disease. *Blood*, 67: 811-826.

Hook EB. (1977). Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *Ame J Hum Genet*, 29: 44-47.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. (1990). Graft versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75: 555-562.

Hurd DD. (1987). Allogeneic and autologous bone marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 14: 407- 415.

Hutchinson RM, Pringle JH, Potter L, Patel I, Jeffreys A. (1989). Rapid identification of donor and recipient cells after allogeneic bone marrow transplantation using specific genetic markers. *Br J Haematol*, 72: 133-140.

Irle C, D'Amato J, van Rood JJ. (1988). Bone marrow transplantation from other than non-identical siblings. *Bone Marrow Transplant*, 3: 37-38.

Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO et al. (1949). Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med*, 34: 1538-1543.

Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. (1951). Recovery from radiation injury. *Science*, 113: 510-511.

Jacobson LO. (1952). Evidence for a humoral factor (o factors) concerned in recovery from radiation injury: a review. *Canc Res*, 12: 315-325.

International Bone marrow Transplant Registry: Transplant or chemotherapy in acute myelogenous leukaemia. (1989). *Lancet*, 1: 119- 123.

Jagannath S, Dicke KA, Armitage JO et al. (1986). High-dose cyclophosphamide, carmustine and etoposide and autologous bone marrow transplantation for relapsed Hodgkin's disease. *Ann Inter Med*, 104: 163-168.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. (1985). Hypervariable α -minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.

Jones L, Thein SL, Jeffreys AJ, Apperley JF, Catovsky D, Goldman JM. (1987). Identical twin marrow transplantation for 5 patients with chronic myeloid leukaemia: role of DNA finger-printing to confirm monozygosity in 3 cases. *Eur J Haematol*, 39: 144-147.

Jonhson FL, Thomas ED, Clark BS, Chard RL, Hartmann JR, Storb R. (1981). A comparison of marrow transplantation with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in second or subsequent remission. *N Engl J Med*, 305: 846-851.

Jonhson FL, Sanders J, Thomas ED. (1987). Long-term follow-up after bone marrow transplantation in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, I: 380-381.

Kan Y, Dozy A. (1978). Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by DNA analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet*, 2: 910-912.

Keating A, Singer JW, Killen PD et al. (1982). Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature*, 298: 280-283.

Kernan MA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. (1987). Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. *Transplantation*, 43: 842-847.

Knowlton RG, Brown VA, Braman C et al. (1986). Use of highly polymorphic ADN probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood*, 68: 378-385.

Khokhar MT, Lawler S, Powles RL, Millar JL. (1987). Cytogenetic studies using Q-band polymorphisms in patients with AML receiving marrow from like-sex donors. *Hum Genet*, 76: 176-180.

Kunkel LM, Monaco AP, Middleworth W, Ochs H, Latt SA. (1985). Specific cloning of DNA fragment absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci* 82: 4778-82

Lazarus HM, Coccia PF, Herzig RH et al. (1984). Incidence of acute graft-versus-host disease with or without methotrexate prophylaxis in allogeneic bone marrow transplant patients. *Blood*, 64: 215-2200

Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstein GR. (1984). Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol*, 56: 431-443.

Lawler SD, Harris H, Millar J, Barrett A, Powles RL (1987). Cytogenetic follow-up studies of recipients of T-cell depleted allogeneic bone marrow. *Br J Haematol*, 65: 143-150.

Levine AS, Siegel SE, Schreiber AD et al (1973). Protected environments and prophylactic antibiotics. A prospective controlled study of their utility in the therapy of acute leukemia. *N Eng J Med*, 288: 477-483.

Lindsley DL, Odell TT Jr et Tausche FG. (1955). Implantation of functional erythropoietic elements following total body irradiation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 90: 512-515.

Lorenz E, Uphoff DE, Reid TR, Shelton E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow infections. *J Natl Cancer Inst*, 12: 197-201.

Lorenz E, Congdon CC, Uphoff DE. (1952). Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pig by bone marrow injection. *Radiology*, 58: 863-877.

Lorenz E, Congdon CC. (1954). Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous and heterologous bone marrow. *J Natl Cancer Inst*, 14: 955-961.

Lucarelli G, Galimberti M, Delfini C et al. (1985). Marrow transplantation for thalassaemia following busulphan and cyclophosphamide. *Lancet I*, 1355-1356.

Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, et al. (1990). Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Eng J Med*, 322:417- 421.

McGlave PB, Haake R, Miller W, Kim T, Kersey J, Ramsay NK. (1987). Therapy of severe aplastic anemia in young adults and children with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 70: 1325-1330.

Marmont A, Frassoni F, Bacigalupo A et al. (1984). Recurrence of Ph⁺-positive leukemia in donor cells after marrow transplantation for chronic granulocytic leukemia. *N J Eng Med*, 310: 903-906.

Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD et al. (1985). Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood*, 6: 664-672.

Martin PJ, Shulman HM, Schubach WH, et al. (1984). Fatal Epstein-Barr-virus-associated proliferation of donor B cells after treatment of acute graft-versus-host disease with a murine anti-T-cell antibody. *Ann Intern Med*, 101: 310-315.

Mathé G, Jammet H, Pendic B et al. (1959). Transfusionset greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés a haute dose accidentellement. *Rev Franç Etud Clin Biol*, 4: 226-238.

Mathé G, Amiel JL, Schwarzenbg L et al, (1963). Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone marrow transplantation. *Br Med J*, II: 1633-1635.

Michallet M, Corront B, Hollard D, Gratwohl A, Domingo A, Brunet S. (1988). Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia: report from the European Cooperative group for bone marrow transplantation (8 cases). *Nouv Rev Pr Hematol*, 30: 467-470.

Migdalska KZ. (1958). Special section-transplantation of bone marrow. *Blood*, 13: 300-301.

Minden MD, Messner HD, Beich A. (1985). Origin of leukemic relapse after bone marrow transplantation detected by restriction fragments length polymorphism. *J Clin Invest*, 75: 91-93.

Mitsuyasu RT, Champlin RE, Gale RP et al. (1986). Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T- cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. *Ann Intern Med*, 105: 20- 26.

Mitchison NA. (1956). The colonization of irradiated tissue by transplanted spleen cells. *Br J Exp Path*, 37: 239-247.

Morrison M, Samwick AA. (1940). Intramedullary (sternal) transfusion of human bone marrow. *J Am Med Assoc*, 115: 1708-1711.

Naoe T, Kiyoi H, Yamanaka K, Naito K, Yamada K. (1989). A case of cALL relapse after allogeneic BMT: Recurrence of recipient cell origin, initially determined as being that of donor cell origin by sex chromosome. *Br J Haematol*, 73: 420-421.

Newburger PE, Latt SA, Pesando JM et al. (1981). Leukemia relapse in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *N.Engl J Med*, 304: 712-714.

Oberlé I, Drayna D, Camerino G, White R, Mandel JL. (1985). The telomeric region of the human X chromosome long arm: presence of a highly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 2824-2828.

Offit K, Burns J, Cunningham I et al. (1990). Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood*, 75: 1346-1355.

Oliff A, Ramu NP, Poplack. (1978). Leukemic relapse 5 1/2 years after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 52: 281-284.

Odom LP, August CS, Githens JH et al. (1978). Remission of relapsed leukemia during a graft versus host reaction: A graft-versus-leukemia reaction" in man?. *Lancet*, II: 537-540.

O'Reilly RJ. (1987). Current developments in marrow transplantation. *Transplant Proc*, 19: 92-102.

Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. (1939). Aplastic anaemia treated with daily transfusions and intravenous marrow. *Ann Int Med*, 13: 357-367.

Osserman EF, DiRe LB, DiRe J, Sherman H, Hersman JA, Storb R. (1982). Identical twin marrow transplantation in multiple myeloma. *Acta Haemat*, 68: 215-223.

Quine WE. (1896). The remedial application of bone marrow. *J Am Med Assoc*, 26: 1012-1013.

Padre-Mendoza T, Farnes P, Barker B, Smith PS, Forman EN. (1979). Y chromosome loss in childhood leukaemias. *Br J Haematol*, 41;43-48.

Petersen FB, Clift RA, Buckner CD. (1990). Outcome and complications of allogeneic and autologous bone marrow transplantation for acute leukemia. *Biol Clin Hematol*, 11: 75-82.

Petz LD, Yam P, Wallace RB et al. (1987). Mixed hemato-poietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood*, 70: 1331-1337.

Pollard CM, Powles R, Millar JL et al. (1986). Leukaemic relapse following Campath 1 treated bone marrow transplantation for leukemia. (letter). *Lancet*, II: 1343-1344.

Powles RL, Kay HEM, Clink HM et al. (1983). Mismatched family donors for bone marrow transplantation as treatment for acute leukemia. *Lancet*, I: 612-615.

Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G et al. (1982). Use of anti-T cell monoclonal antibody OKT3 to prevent acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia. *Lancet*, I: 700-703.

Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G et al. (1984). Depletion of T- lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukemic marrow transplant recipients. *Lancet* I: 472-475.

Przepiorka D, Ramberg R, Thomas ED.(1989). Host metaphases after chemoradiotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 8: 661-665.

Proudfoot NJ, Shander MHM, Manley JL, Geffer ML, Maniatis T.(1980). Structure and in vitro transcription of human globin genes. *Science*, 209: 1329-1336.

Ramsay NK, Kersey JHM, Robison LL et al (1982). A randomized study of the prevention of acute graft-versus-host disease. *N Eng J Med*, 306: 392-397.

Rappeport JM, Smith BR, Parkman R, Rosen FS. (1983). Application of bone marrow transplantation in genetic diseases. *Clin Haematol*, 12:755-773.

Ray PN, Belfall B, Duff C et al. (1985). Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 672-675.

Reisner Y, O'Reilly RJ, Kapor N, Good RA. (1980). Allogeneic bone marrow transplantation using stem cells fractionated by lectins: in vitro analysis of soy bean agglutinin. *Lancet* II: 1320-1324.

Reviron J, Schenmetzler C, Bussel A, Frappaz D, Devergie A, Gluckman E. (1987). Obstacle to red cell engraftment due to major ABO incompatibility in allogeneic bone marrow transplants (BMT): quantitative and kinetics aspect in 58 patients. *Lancet*, I: 472-475.

Ribera JM, Feliu E, Rozman C et al. (1988). Y-body in bone marrow precursors, peripheral blood cells and alveolar macrophages for demonstration of haemopoietic engraftment in allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Haematol*, 40: 424-429.

Rodt H, Netzel B, Kolb HJ et al (1982). Suppression of GVHD antisera: clinical results in 20 patients. In *Experimental Hematology today* (Ed) Baum SJ, Ledney GD, Thierfelder S, pp 147-153. Basel: S. Karger.

Roy DC, Tantravahi R, Murray C et al. (1990). Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. *Blood*, 75: 296-304.

Santos GW, Owens AH jr. (1968). Syngeneic and allogeneic marrow transplants in the cyclophosphamide pretreated rat. In *Advance in Transplantation* (Ed.) Dausset J, Hamberger J, Mathé G. pp 431-436. Copenhagen: Munksgaard.

Santos GW, Saral R, Burns WH et al. (1986). Bone marrow transplantation with HLA identical donors in the acute leukemias-Baltimore experience in Hagenbeek A, Lowenberg B (eds): minimal residual disease in acute leukemia. Rotterdam, Martinus Nijhoff p 305-317.

Santos GW. (1989). Marrow transplantation in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, 74: 901-908.

Schattenberg A, De Witte M, Salden J et al. (1989). Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood*, 73:1367-1372.

Schretzenmayr A. (1937). Anamiebehandlung mit Knochenmarksinjektionen. *Klin Wochensc*, 16: 1010-1012.

Schmitz N, Godde-Salz E, Loffler H. (1985). Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow transplants after fractionated total-body irradiation. *Br J Haematol*, 60: 239-244.

Schmitz N, Johannson W, Schimdt G, vopn der Helma K, Loffler H. (1987). Recurrence of acute lymphoblastic leukemia in donor cells after allogeneic marrow transplantation associated with a deletion of the long arm of chromosome 6. *Blood*, 70: 1099-1104.

Schubach WH, Hackman R, Neiman PE, Maller G, Thomas ED. (1982). A monoclonal immunoblastic sarcoma in donor cells bearing Epstein-barr virus genomes following allogeneic marrow grafting for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 60: 180-187.

Sessarego M, Frassoni F, Defferrari R, et al. (1989). Cytogenetic follow-up after bone marrow transplantation for Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 42: 253-261.

Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. (1980). Chronic graft-versus-host syndrome in man. *Am J Med*, 69: 204-217.

Simon W, Segel GB, Lichtman MA. (1988). Upper and lower limits in the decision to recommend marrow transplantation for patients with chronic myelogenous leukaemia. *Br J Hematol*, 70: 31-36.

Simmons PJ, Przepiorka D, Thomas ED, Torok-Storb B. (1987). Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature*, 328: 429-432.

Singer JW, Keating A, Ramberg R et al. (1983). Long term stable hematopoietic chimerism following marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: a case report with in vitro marrow culture studies. *Blood*, 62: 869-872.

Smith JL, Heerema NA, Provisor. (1985). Leukaemic transformation of engrafted bone marrow cells. *Br J Haematol*, 60: 415-422.

Sniecinski IJ, Oien I, Petz LD Blume KG. (1987). Immunohematologic consequences of major ABO mismatched bone marrow transplantation. *Transplantation*, 45: 530-534.

Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975; 98: 503-508.

Sparkes MC, Crist ML, Sparkes RS, Gale RD, Feig SA and the UCLA transplantation group. (1977). Gene markers in human bone marrow transplantation. *Vox Sang*, 33: 202-205.

Stein PA, Zimmerman M, Kochera S et al. (1989). Origin of leukemic relapse after bone marrow transplantation: Comparison of cytogenetic and molecular analyses. *Blood*, 73: 2033-2040.

Storb R, Gluckman E, Thomas ED et al. (1974). Treatment of established human graft-versus-host disease by anti-thymocyte globulin. *Blood*, 44: 57-75.

Storb R, Doney KC, Thomas ED. (1982). Marrow transplantation with or without donor buffy coat cells for 65 transfused aplastic anemia patients. *Blood*, 59: 236-246.

Storb R, Prentice RL, Thomas ED et al (1983). Factors associated with graft rejection after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia. *Br J Haematol*, 55: 573-585.

Storb R. (1983a). Human bone marrow transplantation. *Transplant Proc*, 15: 1379-1384.

Storb R, Deeg HJ, Whitehead J et al. (1986). Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Eng J Med*, 314: 729-735.

Storb R, Deeg HJ, Farewell V et al. (1986a). Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute-graft-versus-host disease. *Blood*, 68: 119-125.

Storb R, Deeg HJ, Whitehead J et al. (1987). Marrow transplantation for leukaemia and aplastic anemia: two controlled trials of a combination of methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone or methotrexate alone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc*, 19: 2608-2613.

Storb R, Deeg HJ, Pepe M et al. (1988). Graft-versus-host disease prevention by methotrexate combined with cyclosporine compared to methotrexate alone in patients given marrow grafts for severe aplastic anaemia: long term follow up of a controlled trial. *Br J Haematol*, 72: 567-572.

Storb R, Anasetti C Appelbaum FR et al (1988a). Predictive facts and prevention of acute graft-versus-host disease: The Seattle experience. Bone Marrow Transplant, 3: 7 (suppl 1).

Storb R, Deeg HJ, Pepe M et al. (1989). Methotrexate and cyclosporine vs cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia. Long-term follow-up of a controlled trial. Blood, 73: 1729-1734.

Sullivan KM, Shulman HM, Storb R et al (1981). Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. Blood, 57: 267-276.

Sullivan KM, Storb R, Flournoy N et al. (1982). Preliminary analysis of a randomized trial of immunosuppressive therapy of chronic-graft-versus-host disease (GVHD). Blood 60: 173 (abstract).

Sullivan KM, Deeg HJ, Klosterman A. (1986). Hyperacute graft-v-host disease in patients not given immunosuppression after allogeneic marrow transplantation. Blood, 67: 1172-1175.

Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R et al. (1988). Alternating-day cyclosporine and prednisone for treatment of high-risk chronic graft- v-host disease. Blood, 555-561.

Sullivan KM, Witherspoon RE, Storb R et al. (1988a). Prednisone and azathioprine compared to prednisone and placebo for treatment of chronic graft-versus-host disease: prognostic influence of prolonged thrombocytopenia after allogeneic marrow transplantation. Blood, 72: 546-554

Sullivan KM, Storb R, Buckner CD, et al. (1989). graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. N Eng J Med, 320, 828-834.

Thomas ED, Lichte HC, Lu WC, Ferrebee JW. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Eng J Med, 257: 491-496.

Thomas ED, Byrnt JI, Buckner CD et al. (1972). Leukaemic transformation of engrafted human cells in vivo. *Lancet*, I: 1310-1313.

Thomas ED, Storb R, Giblett ER et al. (1975). Recovery from aplastic anemia following attempted marrow transplantation. *Exp Hematol*, 4: 97-99.

Thomas ED, Buckner CD, Banaji M et al. (1977). One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 49: 511-533.

Thomas ED, Buckner CD, Clift RA et al. (1979). Marrow transplantation for acute non-lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*, 301: 597-599.

Thomas ED. (1982). The role of marrow transplantation in the eradication of malignant disease. *Cancer*, 49: 1963-1969.

Thomas ED, Sanders J, Borgna-Pignatti C et al. (1982a). Marrow transplantation for thalassaemia. *Lancet*, I: 227-229.

Thomas ED, Appelbaum FR, Buckner CD et al. (1983). Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia, in Gale RP (ed): *Recent Advances in Bone Marrow Transplantation. Proceedings of the UCLA symposia*. New York, Liss, p 61-70.

Thomas ED, Sanders JE, Flournoy N et al. (1983a). Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia. A long term follow-up. *Blood*, 62: 1139-1141.

Thomas ED. Marrow transplantation for malignant diseases. (1983b). *Clin Oncol*, 1:517- 531.

Thomas ED, Clift RA, Fefer A et al. (1986). Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 1986; 104: 155-163.

Turhan AG, Humphries RK, Phillips GL, Eaves CJ. (1989). Clonal Hematopoiesis demonstrated by X-linked DNA polymorphisms after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 320: 1655-1661.

Tutschka PJ, Beschorner WE, Hess AD, Santos GW. (1983). Ciclosporin A to prevent graft-versus-host disease.: a pilot study in 22 patients receiving allogeneic marrow transplants. *Blood*, 61: 318-325.

Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. (1987). Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood*, 70: 1382-1388.

Truitt RL, Bortin MM, Rimm AA. (1979). Successful adoptive immunotherapy of AKR spontaneous T-cell Leukemia following antibiotic decontamination and protective isolation. In: Fliedner T, Heit T, Niethammer D, Pfeieger H (eds): Clinical and experimental gnotobiotics. Gustav Fisher Verlag Stuttgart, pp. 215-220.

vanBekkom DW, de Vries JJ (1967). Radiation chimeras. London: Logos. 227 pp.

van Dijk BA, drenthe-Schonk AM, Bloo A, Kunst VAJM, Janseen JTP, de Witte TJM. (1987). Erythrocyte repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: analysis using erythrocyte antigens. *Transplantation*, 44: 650-654.

van Leeuwen JEM, van Tol MJD, Bodzinga BG, Wijnen JTh, Vossen JM, Meera Khan P. (1990). A highly polymorphic and sensitive DNA marker for the detection of chimerism after allogeneic BMT: amplification of VNTR's by the PCR method. *Bone Marrow Transplant*, 5: 128; abstract (suppl 2).

Vincent PC, Young GAR, Singh S, Atkinson K, Biggs JC. (1986). Ph⁻ negative haematological chimerism after marrow transplantation in Ph⁺ positive chronic granulocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 63: 181- 185.

Vogelsang GB, Santos WS, Colvin OM, Chen T. (1988). Thalidomide for graft-versus-host disease. *Lancet*, I: 827.

Walker H, Singer CRJ, Patterson J, Goldstone NH, Prentice HG. (1986). The significance of host haemopoietic cell detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol*, 62: 385-391.

Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fafer A, Buckner CD, Storb R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *N Eng J Med*, 300: 1068- 1073.

Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N Storb R, Thomas ED. (1981). Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. *N Eng J Med*, 304: 1529-1533.

Winston DJ, Gale RP, Meyer DV, Young S, and the UCLA bone marrow transplantation group. (1979). Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Medicine*, 58: 1-35.

White R, Woodward S, Leppert M et al. (1985). A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature*, 318: 382-384.

Witherspoon RP, Schanfield MS, Storb ED, Giblett ER. (1978). Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation*, 26: 407-408.

Witherspoon RP, Schubech W, Neiman P, Martin P, Thomas ED. (1985). Donor cell leukemia developing six years after marrow grafting for acute leukemia. *Blood* 65: 1172-1174.

Witherspoon R, Fluornoy N, Thomas ED, Ramberg R, Buckner CD, Storb R. 1986. Recurrence of acute leukemia more than two years after allogeneic marrow grafting. *Exp Hematol* 1986; 14: 178-181.

Wolf SN, McCurley, Giannone L. (1987). High-dose chemoradiotherapy with syngeneic bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Ame J Hematol*, 26: 191-198.

Wong Z, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys J. (1987). Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet*, 51: 269-288.

Woods WG, Nesbit ME, Ramsay NKC et al. (1983). Intensive therapy followed by bone marrow transplantation for patients with acute lymphocytic leukemia in second or subsequent remission: determination of prognostic factors. *Blood*, 61: 1182-1189.

Wyman AR, White R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 6754-6758.

Yam PY, Petz LD, Knowlton RG et al. (1987). Use of DNA restriction fragment polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation*, 43: 399-407.

Yam P, Petz LD, Ali S, Stock D, Wallace AD. (1987a). Development of a single probe for documentation of chimerism following bone marrow transplantation. *Am J Hum Genet*, 41: 867-881.

Yates JW, Holland JF. (1973). A controlled study of isolation and endogenous microbial suppression in acute myelocytic leukemia patients. *Cancer*, 32: 1490-1498.

Yunis JJ. (1981). New chromosome technique in the study of human neoplasia. *J Hum Pathol*, 12: 540-549.

Zaccaria A, Rosti G, Testoni N et al. (1987). Chromosome studies in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia submitted to bone marrow transplantation. Results of a European cooperative study. *Cancer Genet Cytogenet*, 26: 51-58.



UNIVERSITAT AUTÒNOMA
DE BARCELONA

BIBLIOTECA 275

199684

REC

RTS

SEP 116

