

Original

Un nuevo anticuerpo monoclonal

J. Besalduch (*), J. Bargay(*), A. Durán(*), N. Martínez Pomar (**), M. Morey (*), J. Mulet(**), J. Mulet (**), J. Soler (**), C. Viader (**)

Introducción

La interacción molecular entre células hematopoyéticas y el microambiente de su entorno es un prerrequisito indispensable para una hematopoyesis efectiva,(1,2). El microambiente hematopoyético es heterogéneo, comprendiendo una red local de células de estroma, células accesorias y sus productos (3).

Varias moléculas de adhesión y anidación participan en los procesos de contacto entre los progenitores hematopoyéticos y el microambiente del entorno.

Por otro lado, estas moléculas proporcionan una importante ayuda a las células hematopoyéticas para que (recalen) en regiones específicas y más tarde respondan desarrollándose frente a estímulos locales (4,5).

A partir de la caracterización serológica de estructuras de la superficie celular, en un principio se descubrió que anticuerpos anti moléculas PECAM-1/CD31, reaccionaban con neutrófilos y monocitos (6,7). Amplios estudios fenotípico y bioquímicos han demostrado que el mAb CD31 reconoce una glicoproteína de membrana (8-10) de 130 KDa, expresada por plaquetas

(9-11) células endoteliales (12-13) subclases de linfocitos T (14-15) y precursores granulocito/macrófago (16-17).

La expresión de estas moléculas de adhesión en progenitores de médula ósea (18) CD34+ y en la mayoría de células del microambiente nos sugirió la posibilidad de que la molécula CD31 juegue un papel en la regulación de la hematopoyesis a través de su actuación en el "tráfico" leucocitario.

En este estudio presentamos un nuevo anticuerpo monoclonal anti CD31 denominado IP28A obtenido frente a linfocitos de sangre periférica. Mostramos la reactividad del IP28A con células mononucleares derivadas de sangre humana de cordón umbilical. Debemos remarcar que hemos hallado que el Ip28A marca todas las células Cd34 positivas y potencia las GM-CFU y BFU-E cuando es adicionado a cultivos hematopoyéticos.

Materiales y métodos

Células

Las células mononucleares de sangre humana de cordón, fueron separadas por centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway N.J) según el método ya descrito (19). (Se seleccionaron positivamente células pluripotenciales CD34+ de sangre de cordón) utilizando un procedimiento de inmunofluorescencia con anticuerpo anti CD34 conjugado con fluoresceína (Cellpro Inc USA).

Brevemente, las células mononucleares (MNC) se mezclaron con CD34 biotinilado y tras incubación, se centrifugaron y una vez resuspendidas en BSA al 5% se depositaron en una columna de avidina. Las células absorbidas fueron drenadas separadamente en tubos de centrifugación conteniendo BSA al 5%. En todos los casos la viabilidad celular fue > 90% con Trypanblue.

La pureza de las células separadas se determinó por citometría de flujo (FACS

(*) Servicio de Hematología, Hemoterapia, Hospital Son Dureta

(**) Fundación Balear Transplant

Vantage, Becton Dickinson, Mountain View, CA) y fue > 80%. La viabilidad celular se determinó usando el test de exclusión de Trypan-blue. Una línea celular KGla se conserva en medio Iscove (GIBKO UK) suplementado con un 30% de suero bovino fetal (FCS). las células L transfectadas con CD31 humano fueron gratuitamente cedidas (gentilmente donadas) por el Dr. S. Shaw (Exptl Immunol Br, NIH, Bethesda, MD).

Anticuerpos monoclonales

El anticuerpo monoclonal (mAb) IP28A fue obtenido inmunizando ratones BALB/c con linfocitos de sangre periférica (PBL) como ya describimos previamente (20). De forma resumida, células esplénicas de ratones inmunizados, fueron fusionadas con una línea celular NS1 cuatro días después de la última inyección.

El "screening" inicial por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo usando un FACS Vantage (Becton Dickinson) mostró todos los sobrenadantes del cultivo de sangre periférica (PBL). Los cultivos conteniendo los anticuerpos seleccionados fueron clonados dos veces por dilución límite.

Los hidridomas clonados fueron inmortalizados en ratones BALB/c por pasajes sucesivos mediante inyección intraperitoneal potenciada con "pristame". El fluido ascítico fue recolectado, ultracentrifugado y purificado cuando fue necesario, en columnas de afinidad de Sepharosa-proteína G (Pharmacia Biotech, Uppsala Suecia). El Ip28A es una IgG.

Otros anticuerpos como CD3, Cd4, Cd8, CD16, Cd19 conjugados con FITC y Cd34 conjugado con PE fueron adquiridos de Immunotech (Marseilla, Francia) y Becton Dickinson respectivamente. Se realizaron marcajes indirectos utilizando un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón, marcado con PE también de Immunotech. Cuando fue preciso también se utilizó IgG de ratón de Immunotech en exceso para saturar la reactividad GAM.

Tinción Inmunofluorescente

Se realizó doble inmunofluorescencia incubando las células con IP28A no marcado y a continuación con un anti-anticuerpo marcado con PE. Tras una incubación de 30' las células fueron lavadas e incubadas en exceso de IgG de ratón previamente a la adición del mAb de ratón directamente conjugado, para evitar una fijación inespecífica.

Tras los últimos lavados las células se resuspendieron en 0.3 ml de PBS frío con 0,1% de formalina. El análisis de citometría de flujo fue realizado con ayuda de un FACS Vantage (Becton Dickinson) como ya hemos descrito (19).

Estudios bioquímicos

Las células fueron marcadas en superficie con 125I, lactoperoxidasa y H2O2 como ya hemos descrito (20).

Las células iodadas fueron lisadas a continuación en un tampón de lisis estándar (10mM tris-HCl pH=7.4, 1% Nomidet P-40, 150mM NaCl, 1mg/ml BSA, 2 mM PMSF, 20 mM iodocetamida y 1 U/ml de aprotinina como inhibidor de proeasas).

Se realizaron según técnica ya descrita (20) reacciones de inmunoprecipitación y análisis en SDS-PAGE (geles de acrilamida al 10%) en condiciones reductoras y no reductoras. tras autorradiografía de los geles, los pesos moleculares fueron calculados por comparación con la movilidad de proteínas estándar (Amersham, Bauckinghamshire, UK).

Unidades formadoras de Colonias

Se testaron en colágeno (Imedex, Lyon, Francia), tanto unidades formadoras de colonias granulocito-Macrofago (CFU-GM) como unidades creadoras de la serie eritroide (BFU-E) utilizando una técnica ya descrita (21). Brevemente, células mononucleares de sangre de cordón fueron cultivadas en medio Iscove (GIBCO) conteniendo 30% de colágeno acuoso y 20% de FCS. Los cultivos de CFU-GM fueron

suplementados con factor humano recombinante estimulador de células pluripotenciales hCSF (100ng/ml) (Amgen, Cambridge, UK) y GM-CSF (4ng/ml) (Boehringer Mannheim Germany). Del mismo modo en los ensayos con BFU-E se utilizaron 2U/ml de eritropoyetina (Boehringer Mannheim).

Se añadió IP28A purificado al medio de cultivo a distintas concentraciones. También se efectuaron cultivos control en presencia de factores de crecimiento con y sin un mAb irrelevante del mismo isotipo (CD106, V-CAM) (23) a una concentración de 1mg/ml. Los cultivos se realizaron por duplicado en placas de cultivo de 35mm (Nunc, Dinamarca) y fueron incubados a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% humidificada. Tras 12 días de incubación, los cultivos de CFU-GM fueron transferidos de las placas de cultivo a un porta objetos de cristal, la matriz de colágeno se deshidrata desecándola con monofilamento de nylon (ZBF, Ruschlikon, Suiza) y papel secante apretado durante 30 segundos con una placa de cristal. Las finas películas de colágeno obtenidas fueron secadas al aire y teñidas en May-Grunwald-Giemsa (Farmacia). Se contabilizaron las colonias y los "cluster" (racimos) de acuerdo al siguiente criterio colonias: agregados conteniendo 50 o más células. "Clusters": agregado de 5 a 50 células. las unidades de precursores de la serie eritroide conteniendo hemoglobina, fueron contabilizadas el día 14.

Estudios estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos dosis/efecto. El modelo matemático de regresión considera la misma sangre de cordón para distintas dosis, utilizando el software SAS...

Resultados

Estudios bioquímicos del IP28A/CD31

En orden a definir la molécula identificada por el mAb Ip28A, la línea celular

Jurkat fue marcada con 125I por el método de la lactoperoxidasa. a los lisados en detergente fueron inmunoprecipitados con el mAb IP28A y un mAb CD5 aL1 utilizado como control positivo y analizados por SDPAGE.

La figura 1 muestra que el mAb IP28A precipitaba dos bandas específicas de 130 y 135KDa en condiciones reductoras con una pequeña variación a la baja en condiciones no reductoras. Por otra parte y tal como era de suponer el mAb 4L1 precipitaba la característica banda de 67KDa correspondiente a la estructura CD5. Las dos bandas observadas en el precipitado de IP28A corresponden probablemente a dos estados distintos de glicosilación de las misma molécula, también expresados por la línea celular jurkat.

Estos resultados bioquímicos junto a la demostración de que el IP28A reacciona específicamente solo con células L transfectadas con CD31 y no con células L transfectadas con Cd6 (resultados no expuestos) nos lleva a la conclusión de que la estructura reconocida por el mAb IP28A es CD31.

Subclases de células mononucleares de sangre de cordón definidas por el mAb Ip28A.

En orden a determinar subclases de linfocitos CD31+ de sangre de cordón, se realizaron series de análisis a doble color (dos colores) por citometría de flujo.

Como se demuestra en la tabla I se ha comprobado que el mAb reacciona con subpoblaciones linfocitarias T, incluyendo linfocitos CD3+ CD4+ y Cd*, uniéndose preferentemente a la subpoblación T helper. Además una subclase de linfocitos B, CD19+ y células NK CD16+ expresan la estructura celular de superficie identificada por el mAb IP28A (Fig.2). Vale la pena mencionar que la frecuencia de unión del mAb Ip28A a las subpoblaciones linfoides, fue similar en las tres clases de las muestras de sangre testadas (datos no presen-

tados). Posteriormente, testamos las células Cd34+ de sangre de cordón obtenidas en columnas de separación por inmunoadfinidad, de biotina-avidina. En dos experimentos por separado, más del 90% de las células cd34+, fueron seleccionadas positivamente, como indicaron los resultados de citometría de flujo presentados en la figura 3. Además el análisis por doble tinción realizado con estas células inmunopurificadas, mostró que el 100% de las Cd34+ eran también Ip28A positivas.

El mAb IP28A actúa sinérgicamente con factores de crecimiento en la expansión de las células progenitoras de sangre de cordón.

Para determinar si las moléculas IP28/ACD31 de la superficie celular eran funcionales en las células progenitoras, estudiamos el efecto del mAb IP28A en la diferenciación de células pluripotenciales hematopoyéticas. Los resultados presentados en la tabla 2, revelaron que la adición de mAb CD31 al cultivo, incrementó significativamente el número de colonias derivadas de CFU-GM contabilizadas a partir del doceavo día de co-cultivo ($p=0.0004$). A pesar de que también pudimos observar un incremento de los "clusters" derivados de CFU-GM, no resultó significativamente distinto al número de "clusters" observados en ausencia del mAb CD31 ($p=0.31$). Tomados en conjunto, estos datos indican que el crecimiento global ("clusters" más colonias derivadas de CFU-GM) sufrió un importante incremento en presencia del mAb CD31 ($p=0.0005$). Además, pudo observarse aumento del tamaño de las colonias de los cultivos que contenían IP28A como puede verse en el experimento representado en la Fig.4. De igual manera el número de colonias derivadas de BFU-E se incrementó significativamente en presencia del mAb CD31 ($p=0.0001$) (tabla 3). Cabe destacar que el análisis estadístico reveló la inexistencia de relación dosis/efecto del mAb CD31 en los ensayos realizados con cultivos de CFU-GM y BFU-

E no pudiéndose potenciar en general su acción utilizando dosis de mAb Cd31 superiores a 0.1 ug/ml de medio de cultivo. No obstante la adición al medio de cantidades de IP28A purificado, inferiores a 0.1 ug/ml redujo el efecto coestimulante (datos no presentados).

Por otro lado, no existieron diferencias significativas en los cultivos control realizados con o sin la adición del mAb irrelevante.

Discusión

En un intento de definir subtipos específicos de glicoproteínas de la superficie celular, produjimos mAb anti clones humanos de células T funcionales, IL-2 dependientes (23) o bien anti líneas de células leucémicas funcionales(24) por inmunizaciones repetidas. En el presente trabajo empleamos un mAb CD31 denominado IP28A que fue obtenido inmunizando ratones con PBL. Las pruebas iniciales, fueron realizadas con vistas a seleccionar anticuerpos que reaccionaran con subclases de células mononucleares de sangre de cordón. Los primeros ensayos con tinción por inmunofluorescencia simple indirecta, realizados con el mAb IP28A demostraron que distintas líneas celulares T, leucémicas, incluyendo células Jurkat, eran también reactivas.

Mostramos que el IP28A reconoce una estructura de la superficie celular de 130-135 KDa y como además hallamos que dicho anticuerpo reacciona específicamente con células L transfectadas con CD31, pudimos demostrar que el IP28A es un mAb CD31. Análisis de las células mononucleares de sangre de cordón de distintas muestras, evidenciaron que en la mayoría de donantes entre 20-30% de los linfocitos discriminados por citometría de flujo, reaccionaron con IP28A.

Tinciones a doble color indicaron que las moléculas CD31 eran expresadas por subpoblaciones celulares CD4+, CD8+, B

y NK derivadas de sangre de cordón. Estos resultados están en concordancia con los presentados por otros equipos (7). Es interesante recalcar que hemos podido comprobar que la molécula CD31 se expresa en grandes cantidades en células hematopoyéticas humanas CD34+ aisladas a partir de sangre de cordón. La expresión de PECAM-1 en células CD34+ sugiere que esta molécula puede actuar como una molécula de adhesión heterotípica y/o homotípica y por tanto del reclutamiento del linaje celular como del tráfico de las células progenitoras hematopoyéticas primitivas. Del mismo modo se puede proponer que las moléculas CD31 pueden estar involucradas en la compartimentación intratímica y en la maduración de los linfocitos T inmaduros, ya que se encuentran altamente expresadas en timocitos (7) y en células endoteliales (12,13). Por lo tanto estudiamos porque el mAb IP28A muestra propiedades agonistas que pueden medirse testando su acción en el crecimiento de progenitores. Debemos remarcar que es bien conocido que la interacción de un mAb con su epítipo puede mimificar la interacción de la molécula con uno de sus ligandos. Los resultados presentados en este trabajo muestran como la molécula Cd31 está implicada en el proceso regulador de la hematopoyesis.

La adición del mAb CD31 a cultivos "in vitro" de células mononucleares derivadas de sangre de cordón ha revelado que este mAb fomenta significativamente el potencial crecimiento de los progenitores hematopoyéticos productores de CFU-GM y BFU-E.

Es importante remarcar que no solo aumentó el número de colonias y "clusters" obtenidos sino que en algunos casos también se observó una alta capacidad de crecimiento de las colonias mieleoes resultantes. la expansión "in vitro" de los progenitores hematopoyéticos, en cultivos suplementados con el mAb Cd31 debe de relacionarse con su acción directa sobre estas células. Una señal de transducción

estimuladora debe seguir a la unión del mAb CD31 con su epítipo y traducirse en un probable aumento en la expresión de receptores para factores de crecimiento, permitiendo a su vez, tras la adición de estos, una óptima proliferación celular. Además es importante remarcar que células accesorias, incluidas células T(25), monocitos (26) y células NK (27,30) ejercen un importante influjo en la modulación de la eritropoyesis. El papel de las NK en la hematopoyesis es contradictorio, habiendo sido descritos ambos tipos de efectos, estimuladores e inhibidores. En lo que atañe al mecanismo de la inhibición hematopoyética, se ha sugerido que interacciones de linfocitos NK con células accesorias contaminantes o incluso con las propias células progenitoras, pueden inducir la activación de las células NK con la subsiguiente secreción de inhibidores del crecimiento tales como el NK producen factores de crecimiento hematopoyético del tipo de la IL-3 y el GM-CSF (30-32). Dado que en nuestro sistema de cultivo empleamos células progenitoras no purificadas, no podemos descartar la posibilidad de un efecto indirecto del mAb IP28A mediado por células accesorias.

En conclusión, hemos demostrado que el mAb CD31 en presencia de factores de crecimiento tales como GM-CSF, hSCF y eritropoyetina puede inducir una expansión significativa de los progenitores de sangre de cordón.

La sangre de cordón se utiliza con éxito en la reconstrucción hematológica en pediatría, no obstante su aplicación en adultos se ver limitada por la cantidad de sangre de cordón requerida. Por todo ello resulta importante definir el papel de distintas citoquinas en combinación con otras señales estimuladoras a través de su acción sobre estructuras de la superficie celular involucradas en la interacción célula-célula, para conseguir una considerable amplificación de los progenitores de sangre de cordón, con vistas a posibilitar la reconstitución hematológica en adultos.

Celulas positivas (%)						
IP28A	CD3	CD3/IP28A	CD4	CD4/IP28A	CD8	CD8/IP28A
21	41	13	32	11	18	8
28	31	16	20	16	15	8
13	35	7	31	7	24	3
25	40	18	15	13	16	3
33	27	21	23	12	9	2
48	47	32	36	21	17	7
28±10.9 ^a	36.8±6.6	17.8±7.7	26.2±4.3	13.4±4.3	16.5±4.4	5.2±2.5

Seis cordones diferentes fueron doblemente marcados con dos colores según la descripción de material y métodos. Cada muestra fue analizada en cytofluorometría de flujo.

^a porcentaje medio ± SD

Tabla 1: Reacción del mAbIP28 con las células mononucleadas de sangre de cordón

Tipo de crecimiento	Control mAb ^a	mAb IP28A concentraciones			p Value
		0.1 µg/ml	0.5 µg/ml	1 µg/ml	
Cluster	18.3±13.2 ^b	26.9±16.4	24.7±17.1	24.3±24.9	0.31
Colony	129±66.9	154.7±81.7	171.1±85.2	175.6±93.9	0.0004
Total	148.3±70.9	181.8±80.7	195.8±87.2	199.9±103.0	0.0005

^a El cultivo control fue realizado con 0.5 µg/ml o 1 µg/ml de un anticuerpo del mismo isotipo CD106. Ninguna diferencia fue observada entre los cultivos con y sin anticuerpo.

^b Mediana ± SD de 18 diferentes muestras de sangre de cordón. Cada cordón fue testado en triplicado, y realizado en 2 ensayos separados.

Tabla 2: Actividad del mAb IP28A sobre el crecimiento de las CFU-GM en cultivos realizados con células de sangre de cordón.

Tipo de crecimiento	Control mAb ^a	mAb IP28A concentraciones			p Value
		0.1 µg/ml	0.5 µg/ml	1 µg/ml	
Colony	101.7±53.6 ^b	132.5±75.2	123.9±70.5	121.3±64.2	0.0001

^a El cultivo control fue realizado con 0.5 µg/ml o 1 µg/ml de un anticuerpo del mismo isotipo CD106. Ninguna diferencia fue observada entre los cultivos con y sin anticuerpo.

^b Mediana ± SD de 12 diferentes muestras de sangre de cordón. Cada cordón fue testado en triplicado, y realizado en 2 ensayos separados.

Tabla 3: Actividad del mAb IP28A sobre el crecimiento de las BFU-E en cultivos realizados con células de sangre de cordón.

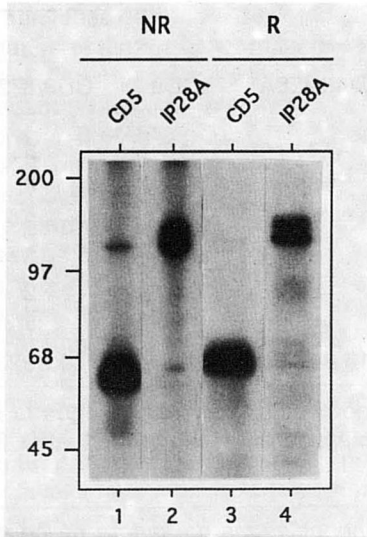


Figura 1: SDS-PAGE Analisis del inmunoprecipitado de las células Jurkat marcadas con ^{125}I . Las alícuotas de los lisados de Jurkat fueron incubados con el líquido de ascitis que contenía el mAb CD5 (banda 1 y 3) o el mAb IP28 (banda 2 y 4). cada muestra fue analizada en condiciones de reducción y no reducción.

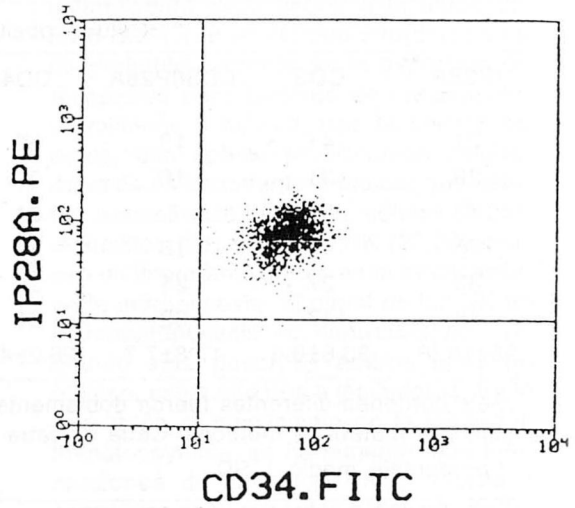


Figura 2: Doble marcaje fluorescente de linfocitos derivados de sangre de cordón. Las células fueron marcadas con IP28A-PE (eje vertical) y CD19, CD 16-FICT (eje horizontal)

Figura 3: Citometría de flujo de progenitos de sangra de cordón. La células purificadas fueron indirectamente marcadas con CD34-FITC y IP28A-PE

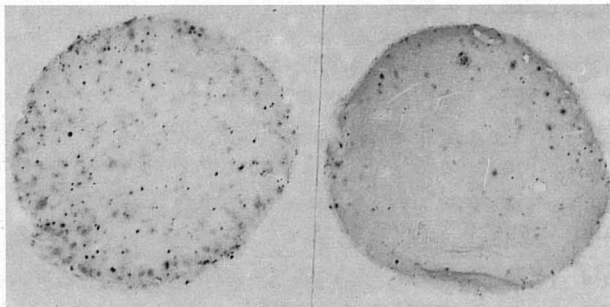
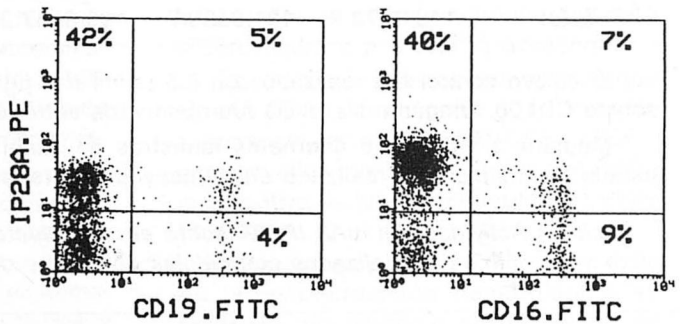


Figura 4: Comparación de la formación de unidades de colónias de granulitos-macrófagos en cultivos que contienen mAb IP28A (izquierda) con los cultivos sin IP28A (derecha)

Como hemos visto, de lo expuesto en el trabajo de Gluckman E. y Carosella E. se deduce que la expansión de las stem cells tiene un peligro potencial cual es la posibilidad de que las células se diferencien hacia un linaje determinado perdiendo la capacidad de autorrenovación y expansión adecuadamente. Con combinaciones de factores de crecimiento que dirijan la diferenciación y expansión adecuadamente. Con combinaciones de Stem Cell Factor (SCF), Interleuquina-3 (IL-3) y otros factores, se ha conseguido expandir células CD34+ unas 50 veces.

Como ya hemos indicado, hasta la fecha se han realizado 35 trasplantes de sangre de cordón de los que disponemos de datos complejos en 26 de ellos. El tiempo medio de recuperación de neutrófilos (500/mm³) fue de 23 días y el de las plaquetas (50.000/mm³) de 44 días.

A pesar de que 11 de estos trasplantes fueron realizados con cordones parcialmente mismatched, sólo se observó una GVH (reacción injerto contra huésped) grave.

El trasplante entre hermanos HLA idénticos es de momento la única indicación establecida, sin embargo, en el futuro y basados en la baja reactividad de los linfocitos T del neonato, podrá extenderse su utilización a personas no relacionadas HLA idénticas o con un mismatch leve.

Por otro lado, el hecho de que la sangre de cordón no esté contaminada por virus como el CMV constituye un factor más a la hora de pensar en ella como alternativa al uso de médula ósea.

Existe en New York un Banco de Sangre de Cordón piloto. El número teórico de muestras de médula ósea precisas para hallar un donante HLA idéntico no relacionado es de 1 en 150.000. Con stem cells de sangre de cordón esta cifra podría reducirse sensiblemente.

Finalmente, cabe considerar la posibilidad de uso de estas stem cells en el futuro por el propio donante y las ventajas que ello le podría suponer, sin olvidar por último, los aspectos éticos derivados del uso de este material.

Aplicación del estudio de enfermedad mínima residual al trasplante de Stem Cells

Los análisis de EMR aplicados a trasplante de médula ósea tienen diversas aplicaciones clínicas, incluyendo la selección apropiada del candidato para el trasplante, monitorizar la efectividad del purgado, predecir los pacientes de elevado riesgo de recidiva, y comparar la eficacia de los regímenes de acondicionamiento pre-trasplante.

Hay mucha controversia sobre qué pacientes son los mejores candidatos para el trasplante de médula ósea. En enfermedades como leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda, la decisión depende de los parámetros clínicos de dichos enfermos (cantidad de leucocitos, anomalías citogenéticas, respuestas a la quimioterapia inicial) que indican que tienen un elevado riesgo de recidiva siguiendo el tratamiento con la quimioterapia estándar. Normalmente, tales decisiones no se basan en la medida directa del tumor, por lo que una alternativa sería estimar la carga tumoral mediante análisis de médula ósea y usar dicha valoración para determinar la terapia a seguir. Hay diversas técnicas utilizadas para detectar las células tumorales residuales entre las que cabe destacar el cultivo clonogénico, la citometría de flujo, PCR.

El trasplante autólogo de médula ósea (TAMO) es un tratamiento opcional importante en enfermos con diversas enfermedades hematológicas y con tumores sólidos. La hipótesis central de dicho tratamiento es que la contaminación del purgado con células tumorales contribuirá a incrementar la recidiva de los pacientes transplantados. Hay bastantes evidencias que confirman dicha hipótesis.

El mayor problema que aparece en los análisis del purgado es la sensibilidad de los mismos. Debido a que normalmente durante el trasplante autólogo de médula

ósea se infunden más de 10.9 células, se requieren análisis que puedan detectar un pequeño número de células tumorales en sangre periférica o médula ósea, por lo que la aplicación de técnicas cada vez más sensibles es importante en este campo.

La recidiva es un problema importante en los pacientes tratados con terapia mieloblástica seguida de trasplante de

médula ósea, particularmente en pacientes con trasplante autólogo, aunque también los enfermos transplantados con médula ósea alogénica presentan riesgo de recidiva. Así, la predicción de los enfermos con mayor riesgo de recidiva es primordial no sólo para realizar el diagnóstico del enfermo, sino también para iniciar una terapia post-trasplante.

Bibliografía

1. Gribben JG, Freedman AS, Voo SD, Blake K, Shu RS, Freedman G, Longtine JA, Pinkus GS, Nadler LM. All Advanced Stage Non-Hodgkin's Lymphomas With a Polymerase Chain Reaction Amplifiable Breadpoint of bcl-2 Have Residual Cells Containing the bcl-2 Rearrangement at Evaluation and After Treatment. *Blood*, Vol 78, No 12, 1991: 3275-3280
2. Hart JS, Trujillo Jm, Freireich EJ, George SL, Frei III E. Cytogenetic studies and their clinical correlates in adults with acute leukemia. *Ann Intern Med* 75: 353, 1971.
3. Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW, Westbrook CA. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J. Pathol* 136: 131, 1990.
4. Heerema NA, Argyropoulos G, Weetman R, tricot G. Secker Walker LM. Interphase in situ hybridization reveals minimal residual disease in early remission and return of the diagnostic clone in karyotypically normal relapse of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 7: 537, 1993.
5. Davi F, Nguyen-Salomon, Leboeuf D, Debert C, Taher M, Valensi, Canioni D, Brousse N, Varet B, Macintyre EA. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia*, 1995, vol 9:471-479
6. Campana D, Pui C. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Methodologic Advances and Clinical Significance. *Blood*, Vol 85, No 6, 1995: 1416-1434
7. Cervantes F. Los estudios de biología Molecular en la leucemia mieloide crónica. *Med Clin (Barc)* 1993; 101: 538-540.
8. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, De Dleijn A, Grosveld G: Structural organization of the ber gene and its role in the ph' translocation. *Nature* 315: 758. 1985
9. Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Gooley LT, Mi JX, Dobrovic A, Norman JE, Bolton AE, Dale BM. Significance of Molecular Marker-Positive Cells After Autologous Peripheral-Blood Stem-Cell Transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, vol 13, No 5, 1995:1073-1079.
10. McDonnell TJ, Jorsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to grade malignant lymphoma in mice transgenic for thet (14;18). *Nature* 349:254, 1991.
11. Ramasamy I, Brisco M, Morley A. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992; 45:770-775.
12. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh S-H, Sykes PJ, Seshadri R, Toogood I, Waters K, tauro G, Ekert H, Morley AA. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 343: 196. 1994.
13. Brisco MJ, Cordon J, Hughes E, Neoh SH, Nicholson I, Sykes PJ, Tauro G, Ekert H, Waters K, Toogood I, Seshadri R, Morley AA, and the Australian and New Zealand Children's Cancer Study Group. Prognostic significance of detection of monoclality in remission marrow in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *leukemia*, vol 7: 1514, 1993.
14. Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach A et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from HLA identical sibling. *New England Journal of Medicine*, 321:1174-1178. 1989.
15. Gribben JG, Freedman AS, Neuberger D, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N. Engl J Med* 1991; 325: 1525-1533.