

T. Proo. 24/91  
T 10/33

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ..... 8/05/2002 .....  
ENTRADA NUM. .... 1712 .....

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**TESIS DOCTORAL**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
N.º Documento 613377395  
N.º Copia 16347924

**“ POLIMORFISMO DE DNA EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO  
HUMANO ”**

**CLARA ISABEL ESPARZA DEL VALLE**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
30 ABR. 2002  
COMISION DE DOCTORADO

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES  
GRANADA

**“POLIMORFISMO DE DNA EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO  
HUMANO”**

Trabajo presentado por CLARA ISABEL ESPARZA DEL VALLE para  
optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas



**Abril de 2002**

D. FRANCISCO RUIZ-CABELLO OSUNA, Doctor en Farmacia y Jefe de Sección de Biopatología Tumoral del Servicio de análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado "Polimorfismo de DNA en diagnóstico genético humano", ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup> Clara Isabel Esparza Del Valle, para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas.

Granada, a 29 de abril de 2002

  
Francisco Ruiz-Cabello Osuna

D.ANTONIO ROMERO AGUILAR, Doctor en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado "Polimorfismo de DNA en diagnóstico genético humano", ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup> Clara Isabel Esparza Del Valle, para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas.

Granada, a 29 de abril de 2002

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Romero Aguilar', written in a cursive style.

Antonio Romero Aguilar

D. ALFONSO SERRRANO GARBALLO, Doctor en Biología y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital de Málaga.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado "Polimorfismo de DNA en diagnóstico genético humano", ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup> Clara Isabel Esparza Del Valle, para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas.

Granada, a 29 de abril de 2002



Alfonso Serrano Garballe

A mi familia

**AGRADECIMIENTOS**

A mis directores por todas sus enseñanzas y por haber estado a mi lado durante la realización de esta tesis, siempre que solicité su ayuda.

Al Dr. Federico Garrido le agradezco el haberme permitido llevar a cabo este trabajo, poniendo a mi disposición todos los medios necesarios.

Agradezco a todos mis adjuntos su comprensión y apoyo, que me ha permitido compaginar el trabajo de investigación con mis rotaciones y mis guardias. En especial a Nani y a su marido Fermín.

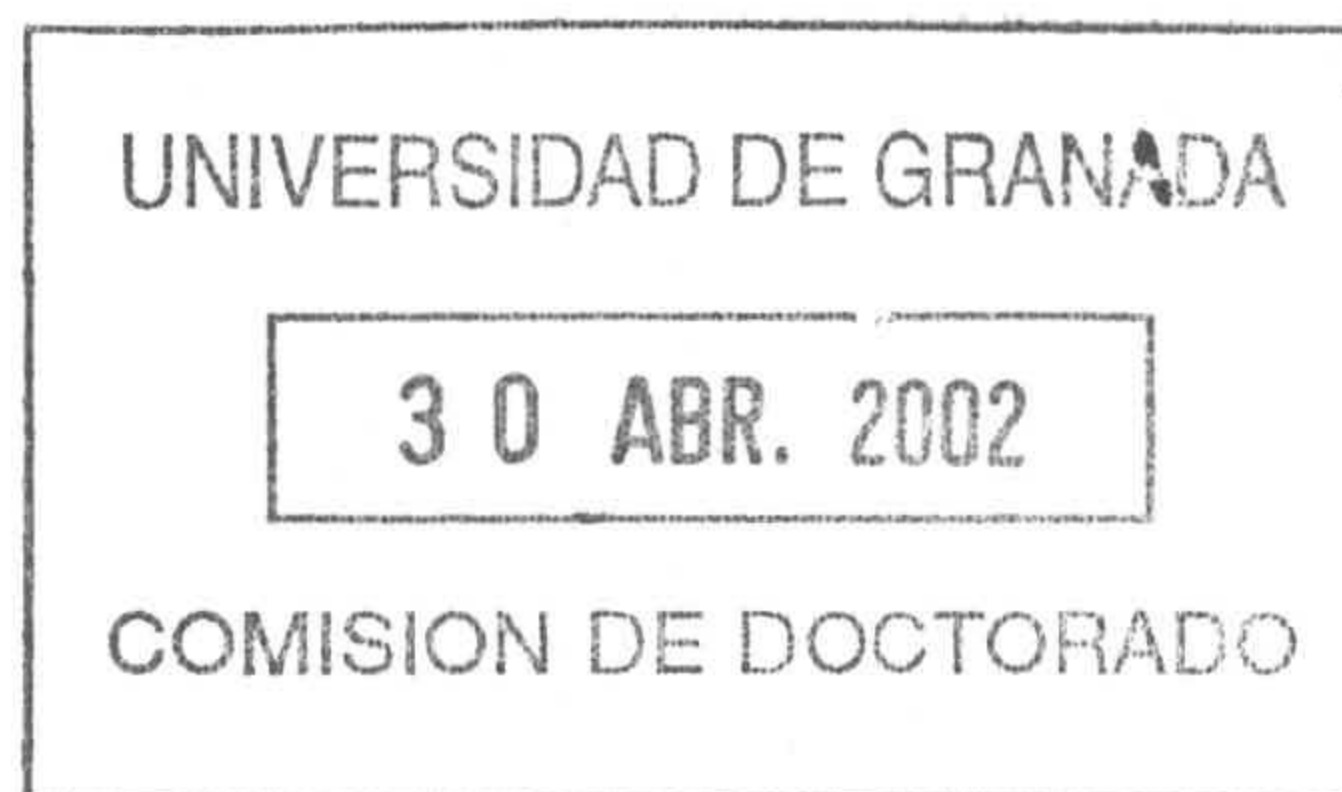
Muchas gracias a mis amigos y compañeros de trabajo: Rosa, Pepi, Inma, Ana, M<sup>a</sup> José, Susana, Pilar J, Pilar H, Angel, Carmen A y Carmen G, gracias a ellos ha sido más un placer que una ardua labor.

Agradezco a la Dra. Teresa Cabrera su ayuda con los datos de los casos de cánceres colorrectales y con sus consejos sobre el "papeleo".

Además de la dedicatoria, quiero agradecer a mis padres ser mi mejor ejemplo tanto en profesionalidad como en bondad, a mis hermanos y a Isi todo su cariño, a mi tía Aranchita y a Julita sus cuidados cuando iba a casa a "recargar pilas", a la peque de la familia haberme aguantado todos los días y haber sido mi crítica más encantadora.

Nada de esto hubiera sido posible sin el apoyo, la ayuda (sobre todo informática) y el amor de Jose Manuel, mi marido.





<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS</b> .....	2
1.1. CONCEPTO Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS	
1.2. TIPOS DE TRASPLANTE	
1.2.1. CLASIFICACIÓN DEPENDIENDO DEL TIPO DE DONANTE	
1.2.2. CLASIFICACIÓN DEPENDIENDO DE LA PROCEDENCIA DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.	
1.2.3. CLASIFICACIÓN DEPENDIENDO DEL TIPO DE ACONDICIONAMIENTO	
1.3. INDICACIONES DEL TPH	
1.4. COMPLICACIONES	
1.4.1. COMPLICACIONES PRECOCES	
1.4.2. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)	
1.4.3. ENFERMEDAD VENOOCLUSIVA HEPÁTICA	
1.4.4. RECHAZO DEL INJERTO	
1.4.5. INMUNODEFICIENCIAS	
1.4.6. INFECCIONES	
1.4.7. NEUMONÍA INTERSTICIAL	
1.4.8.COMPLICACIONES TARDÍAS	
1.5. REACCIÓN DE INJERTO CONTRA LEUCEMIA	
1.6. TPH Y CELULARIDAD T	
1.6.1. RECEPTORES DE LINFOCITOS T (TCRs)	
<b>2. ESTUDIO DEL QUIMERISMO EN HEMATOLOGÍA: IMPLICACIONES DEL POLIMORFISMO DEL ADN</b> .....	15
2.1. CONCEPTO	
2.2. QUIMERISMO EN TPH	
2.2.1. INDICACIONES DEL ANÁLISIS DEL QUIMERISMO EN TPH	
2.2.2. ANÁLISIS DEL QUIMERISMO MEDIANTE MARCADORES GENÉTICOS POLIMORFICOS	
<b>3. MUTACIONES EN MICROSATÉLITES COMO MARCADORES DE INESTABILIDAD GENOMICA EN EL CÁNCER COLORRECTAL</b> .....	21
3.1. INTRODUCCIÓN	
3.2. BASES A MOLECULARES DEL CANCER DE COLON	
3.3. TUMORES DE LA VÍA SUPRESORA	
3.4. TUMORES DE LA VÍA MUTADORA	

3.4.1.CANCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO O SD DE LYNCH	
<b>OBJETIVOS:</b> .....	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS:</b> .....	28
<b>1. PACIENTES HEMATOLÓGICOS:</b> .....	29
1.1. DATOS CLÍNICOS	
1.2. CRITERIOS DE REALIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DEL TPH	
1.2.1. OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA	
1.2.2. INDICACIONES DEL TRASPLANTE	
1.2.3. INDICACIONES DEL TIPO DE TRASPLANTE	
1.2.4. ACONDICIONAMIENTO	
1.3. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES POSTRASPLANTADOS	
1.3.1. EICH: PROFILAXIS, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	
1.3.1.1. EICH AGUDA	
1.3.1.2. EICH CRÓNICA	
1.3.2. DIAGNÓSTICO DE RECAÍDA	
1.3.3. PROTOCOLO DE ESTUDIO DE QUIMERISMO	
<b>2. PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL:</b> .....	39
2.1. SISTEMAS DE ESTADIAJE DE LA TUMORACIÓN	
2.2. CRITERIOS CLÍNICOS DE HNPCC	
<b>3. ANÁLISIS DE MARCADORES DE MICROSATÉLITE:</b> .....	41
3.1. EXTRACCIÓN DE DNA	
3.1.1. DE SANGRE PERIFÉRICA	
3.1.2. DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS	
3.1.3. DE PIEZA TUMORAL SIN MICRODISECCIÓN	
3.1.4. DE PIEZA TUMORAL TRAS MICRODISECCIÓN	
3.2. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)	
3.2.1. SENCILLA: INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	
3.2.2. MULTIPLEX: QUIMERISMO MEDULAR	
3.3. ELECTROFORESIS CAPILAR	
3.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
3.4.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL QUIMERISMO	
3.4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	

4. INMUNOFENOTIPAJE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO:.....	53
4.1. ESTUDIO DE LOS MARCADORES LEUCÉMICOS	
4.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	
4.1.2. ANÁLISIS	
4.2. ESTUDIOS DE MARCADORES DE TCR	
4.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	
4.2.2. ANÁLISIS	
5. ESTUDIO LA REGIÓN CDR3 DEL TCRs MEDIANTE RT-PCR:.....	55
5.1. EXTRACCIÓN DE RNA	
5.2. SÍNTESIS DE cDNA	
5.3. AMPLIFICACIÓN DE $\beta$ -ACTINA	
5.4. REACCIÓN DE PCR	
5.5. ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR	
5.6. SECUENCIACIÓN	
5.7. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
6. ANÁLISIS DE LOS REORDENAMIENTOS BCR-ABL Y PML-RAR MEDIANTE RT-PCR.	63
6.1. BCR-ABL	
6.2. PML-RAR	
7. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU:.....	66
8. MÉTODOS ESTADÍSTICOS:.....	68
<b>RESULTADOS:.....</b>	<b>69</b>
1. ESTUDIO DEL QUIMERISMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS:.....	70
1.1. QUIMERISMO Y APARICIÓN DE EICH	
1.2. EICH Y TIPO DE TRASPLANTE	
1.3. QUIMERISMO Y RECAÍDA	
1.4. QUIMERISMO Y TIPO DE TRASPLANTE	
2. ESTUDIO DEL QUIMERISMO SEGÚN LA PATOLOGÍA HEMATOLÓGICA:.....	77
2.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)	
2.2. LINFOMA NO HODGKIN (LNH)	
2.3. MIELOMA MÚLTIPLE (MM)	
2.4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)	

2.5. SÍNDROME MIELODISPLÁSICO (SMD) Y APLASIA MEDULAR (AM)	
2.6. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)	
3. EVALUACIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR) MEDIANTE EL ESTUDIO DEL QUIMERISMO:.....	92
3.1. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA	
3.2. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	
3.3. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA-M3	
4. RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR T POST-TRASPLANTE, ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS RECEPTORES $\beta$ (TCRs) :.....	100
4.1. ESTUDIO DE LA COMPLEJIDAD DEL REPERTORIO TCR EN RELACIÓN A LA TÉCNICA DE TRASPLANTE UTILIZADO	
4.2. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE TCRs Y EL ESTADO DE INMUNOCOMPETENCIA DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS	
4.2.1. MENOS DE UN AÑO POST-TRASPLANTE	
4.2.2. MÁS DE UN AÑO POST-TRASPLANTE	
5. TRISOMÍA 12 Y LINFOCITOSIS PROGRESIVA EN LLC-B:.....	122
6. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TUMORACIONES COLORRECTALES:.....	125
6.1. ESTUDIO DEL PANEL DE MICROSATÉLITES ELEGIDO MEDIANTE LÍNEAS CELULARES DE INESTABILIDAD CONOCIDA	
6.2. CASOS DE TUMORES COLORRECTALES CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	
6.3. CONTROLES MEDIANTE ANÁLISIS DEL MICROSATÉLITE BAT-26 EN EL SEGUIMIENTO DE LA PACIENTE CO-A.	
6.4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TUMOR GÁSTRICO DEL PACIENTE CO-123.	
<b>DISCUSIÓN:</b> .....	134
1. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES EN EL SEGUIMIENTO EVOLUTIVO DE LOS PACIENTES TRAS TPH:.....	135.
2. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER COLORRECTAL:.....	152

CONCLUSIONES:.....	159
BIBLIOGRAFÍA:.....	162
GLOSARIO:.....	183

# INTRODUCCIÓN

## 1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

### 1.1. CONCEPTO Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) consiste en la administración de un tratamiento citotóxico con dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia, como tratamiento efectivo en pacientes con enfermedades hematológicas malignas, que tiene como efecto secundario letal la destrucción de la médula ósea. La recuperación de la actividad hematopoyética e inmunológica se consigue al suministrar progenitores hematopoyéticos de un donante compatible o del propio paciente previamente extraídos. Como inmunoterapia el TPH proporciona un conjunto de células inmunocompetentes que ejercen un potente efecto injerto contra tumor o leucemia independiente de los efectos de la terapia a altas dosis.

El desarrollo del TPH se inicia tras la Segunda Guerra Mundial. Los efectos hematológicos producidos por la irradiación en los supervivientes de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki, estimularon la investigación del potencial radioprotector de la médula ósea en animales de experimentación. En 1957 Thomas ED demostró en humanos que se podían infundir con seguridad grandes cantidades de células hematopoyéticas obteniendo un injerto medular transitorio. Este autor junto con Mathé, son los pioneros en el desarrollo clínico inicial del TPH, en 1959 realizaron el primer alo-trasplante. En 1963, Mathé describió por primera vez el cuadro clínico de enfermedad injerto contra huésped (EICH) agudo y aportó la primera evidencia de supervivencia duradera con prendimiento completo del injerto en un paciente con leucemia aguda. En 1964, Dausset y cols describen el primer antígeno HLA (HLA-A2) y caracterizan el sistema de histocompatibilidad, básico para selección del donante de médula ósea (Santos, 1983; Korbling M y Fliedner TM, 1994). En 1976 se realizan los primeros iso y alo-TPH en España. En 1991 se creó el Registro Español de Donantes de MO (REDMO).

Tabla 1: Datos de la ONT (organización nacional de trasplantes) sobre la actividad de TPH alogénico en España.

Diagnóstico	1998	1999	2000
LMA	86	115	133
LLA	111	105	98
LMC	88	113	102
LLC	6	13	13
MM	18	31	24
EH	1	13	10
LNH	28	26	39
AM + F	24	27	35
E.C.	15	12	18
Tumores sólidos	0	0	2
Otros	13	6	10
Total	423	503	523

LMA: leucemia mieloide crónica; LLA: leucemia linfocítica aguda; LMC: leucemia mieloide aguda; LLC: leucemia linfocítica crónica; M: mieloma múltiple; EH: enfermedad de Hodgkin; LNH: linfoma no Hodgkin; AM: aplasia medular; F: Fanconi; E.C.: enfermedades congénitas.

Tabla 2: Actividad de TPH dependiendo del tipo de progenitores hematopoyéticos utilizados.

Trasplantes alogénicos en el año 2000			
MO	SP	SCU	TOTAL
158	333	32	523

MO: médula ósea; SP: sangre periférica; SCU: sangre de cordón umbilical



Tabla 3: Distribución de los trasplantes alogénicos realizados en el año 2000 dependiendo de la relación entre donante y receptor

Emparentados			No emparentados	
HLA idénticos	HLA no idénticos	Singénicos	HLA idénticos	HLA no idénticos
388	37	7	58	33

## 1.2. TIPOS DE TRASPLANTE

La definición del tipo de trasplante se relaciona con el tipo de donante, con la procedencia de los progenitores hematopoyéticos o con el tipo de acondicionamiento.

### 1.2.1. CLASIFICACIÓN DEPENDIENDO DEL TIPO DE DONANTE

TMO singénico. La médula ósea procede de gemelos univitelinos u homocigotos, por lo tanto idéntica a la del receptor desde un punto de vista genético e inmunológico. (Hess 1997)

TMO autólogo. La médula procede del propio paciente. Su extracción y conservación permite administrar un tratamiento a altas dosis con intención erradicativa del tumor, para injertarla después como rescate hematopoyético. La situación biológica es similar al TMO singénico. (Simmet 2000)

TMO alogénico. La médula ósea procede habitualmente de un hermano genética e inmunológicamente diferente al receptor pero con compatibilidad del sistema HLA. Tienen identidad para los antígenos de histocompatibilidad clase I y clase II, los cuales se heredan con carácter mendeliano simple, un haplotipo de cada progenitor, por lo que la probabilidad de disponer de un hermano HLA idéntico es de aproximadamente un 25%. La utilización de médula ósea no idéntica, procedente de la misma familia, es posible si la diferencia es sólo en un antígeno, de un haplotipo y el otro es igual. La posibilidad de encontrar un donante con estas características es de un 10%. También es posible el uso de médula compatible de donantes no relacionados, la posibilidad de encontrar un donante compatible en los bancos internacionales es de un 35%. (Revisado por Bensinger y Storb 2001)

### 1.2.2. CLASIFICACIÓN DEPENDIENDO DE LA PROCEDENCIA DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Médula Ósea. Se obtienen mediante punciones múltiples de las crestas iliacas posteriores, anteriores y, ocasionalmente, esternón o meseta tibial.

Progenitores de Sangre Periférica (PSP). La observación por primera vez en 1951 de que las células mononucleadas de sangre periférica podían proteger a ratones irradiados de una aplasia medular mortal, confirmó la existencia de células germinales hematopoyéticas circulantes en sangre. La presencia de estas células en el hombre se demostró en 1971 por Chervenick y Boggs. Son obtenidos mediante aféresis, después de movilización de los progenitores hematopoyéticos (PH) hacia la sangre periférica con factores estimuladores de colonias, quimioterapia o ambos (Craig y cols, 1992). Actualmente el 90% de los auto-TMO se realizan empleando PSP, ya que estos se obtienen de forma sencilla y la recuperación de neutrófilos y plaquetas después del TMO es muy rápida. El uso de PSP para alo-TMO es de un 30% en Europa y de un 64% en España.

Sangre de cordón umbilical (SCU). Se recogen por punción de la vena umbilical inmediatamente después del parto. Se obtienen 70-120 ml de sangre que contiene los PH. Las dos grandes ventajas de la SCU y de la placenta del recién nacido son la disponibilidad de un gran número de unidades que en condiciones normales se desechan, y que los progenitores de SCU tienen una mayor capacidad de proliferación y menor capacidad inmunogénica que los de MO y SP (Laughlin, 2001; Hows JM, 2001).

Hígado Fetal. Se disgrega el hígado de fetos procedentes de abortos hasta obtener suspensiones celulares que incluyen los PH (Pschera, 2000).

### 1.2.3. CLASIFICACIÓN DEPENDIENDO DEL TIPO DE ACONDICIONAMIENTO

Existen numerosos esquemas de acondicionamiento. El diseño de los mismos suele ser empírico y se han publicado muy pocos estudios randomizados que definan la superioridad de un régimen frente a otro. El tratamiento ideal debe ser capaz de erradicar

la enfermedad, tener una morbilidad aceptable, sin mortalidad relacionada con el tratamiento y, en el receptor alogénico, un efecto inmunosupresor suficiente para evitar el rechazo del implante. En el alo-trasplante se distinguen dos modalidades de acondicionamiento, mieloablatoivo y no-mieloablatoivo en función de la intensidad y finalidad del mismo.

Tabla 4: Características de los acondicionamientos mieloablatoivo y no-mieloablatoivo

alo-TPH mieloablatoivo	alo-TPH no mieloablatoivo
1. Erradicación del a clona maligna	1. Menor capacidad erradicatoria
2. Inmunosupresión suficiente para permitir el implante funcional y permanente	2. Intensa inmunosupresión post-TPH para lograr un quimerismo mixto o completo
3. Aceptable mortalidad relacionada con el trasplante	3. Nula o mínima mortalidad relacionada con el trasplante

#### Acondicionamiento mieloablatoivo

Dependiendo de la composición del inóculo se subdivide en:

Trasplante Estándar: inóculo completo;

Selección +: inóculo con deficiencia parcial de celularidad T. Los linfocitos T del donante son los responsables de la EICH, su eliminación evitaría esta complicación pero no mejora los resultados clínicos ya que en trasplantes con eliminación de linfocitos T existe un mayor riesgo de fallo de implante y de recaída leucémica. Por ello, cuando se trata de trasplantes entre hermanos HLA idénticos se realiza una eliminación de linfocitos T parcial, quedando una cierta cantidad de linfocitos T en el inóculo con objeto de facilitar el implante y mantener, al menos en parte, el efecto antileucémico de los linfocitos T. (Martín-Henao, 2001)

#### Acondicionamiento no mieloablatoivo

La posibilidad de alcanzar un quimerismo mixto o completo si se administran progenitores hematopoyéticos tras un tratamiento inmunosupresor no mieloablatoivo, así como la demostración de que estos progenitores implantados pueden originar reacción de injerto contra tumor, ha abierto un nuevo campo de investigación. Este tipo de

trasplante estaría indicado en pacientes de edad avanzada (mayores de 50 años) y con problemas médicos que impidan la administración de un tratamiento de acondicionamiento clásico. Este acondicionamiento retrasa y mitiga la severidad del daño de la EICH sobre los tejidos.

Cuando tras el acondicionamiento se administra el inóculo completo se denomina mini-trasplante. (revisado por Maris M y cols, 2001)

### 1.3. INDICACIONES DEL TPH

Desde el punto de vista terapéutico un trasplante puede ser utilizado para:

- aportar células con capacidad de autorrenovación, como en la aplasia medular, las inmunodeficiencias severas y las alteraciones de células fagocitarias;
- erradicar la población hematopoyética anormal tumoral (leucemias) o con alteración genética (talasemia) y sustituirla por médula ósea normal
- en tumores sólidos quimiosensibles con médula ósea normal, intentar la erradicación de la neoplasia con altas dosis de quimioterapia.

La utilización de uno u otro tipo de trasplante se basa en:

- la existencia de un donante HLA compatible;
- la contaminación de la médula ósea por células tumorales;
- el efecto injerto contra leucemia;
- el uso de médulas alogénicas en los defectos cuantitativos o cualitativos de la hematopoyesis e inmunopoyesis,
- la realización de trasplante autólogo en tumores sólidos y linfomas sin afectación de la hematopoyesis medular.

La intención en la indicación del TMO es curativa. Para que sea eficaz es importante y en ocasiones necesario que el tumor sea quimiosensible, que la masa tumoral sea reducida y que la situación clínica del enfermo sea buena. La edad del paciente es un factor importante, sobre todo en el TMO alogénico, en donde por encima de 45-55 años se origina una mortalidad importante.

Tabla 5: Indicaciones del trasplante alogénico

Enfermedades Congénitas	Enfermedades Adquiridas	
	Neoplásicas	No Neoplásicas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunodeficiencia congénita combinada</li> <li>• Aplasia medular de Fanconi</li> <li>• Talasemia Mayor</li> <li>• Drepanocitosis</li> <li>• Eritroblastopenia de Blackfan-Diamond</li> <li>• Neutropenia de Kostmann</li> <li>• Síndrome de Wiskott-Aldrich</li> <li>• Osteopetrosis juvenil</li> <li>• Tesaurosismosis</li> <li>• Enfermedad granulomatosa crónica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemias agudas</li> <li>• Leucemia mieloide crónica</li> <li>• Leucemia linfática crónica</li> <li>• Linfomas no-hodgkinianos</li> <li>• Enfermedad de Hodgkin</li> <li>• Mieloma múltiple</li> <li>• Histiocitosis</li> <li>• Amiloidosis</li> <li>• Síndromes mielodisplásicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplasia medular grave</li> <li>• Hemoglobinuria paroxística nocturna</li> </ul>

#### 1.4. COMPLICACIONES

##### 1.4.1. COMPLICACIONES PRECOCES

Constituyen un grupo heterogéneo, las más comunes son náuseas y vómitos, mucositis orofaríngea, dolor abdominal, cistitis hemorrágica, y con una menor incidencia síndrome de hiperpermeabilidad capilar, síndrome del implante, hemorragia alveolar difusa, microangiopatía trombótica, síndrome de neumonía idiopática, síndrome de disfunción multiorgánica.

##### 1.4.2. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)

Enfermedad resultante del reconocimiento como extraños de antígenos del receptor por parte de los linfocitos T del donante. Para que ocurra deben cumplirse las siguientes condiciones: el implante debe contener células inmunocompetentes, el

receptor debe tener aloantígenos que difieran de los del donante y el receptor debe ser incapaz de producir respuesta inmune contra el injerto.

Aparece en más del 60% de los pacientes sometidos a TPH alogénico de hermano compatible a pesar de la identidad HLA. Desde el punto de vista clínico y evolutivo se distingue una forma aguda y otra crónica. La EICH que aparece antes del día 100 post-trasplante se considera aguda y, si aparece más tarde crónica. Sin embargo, estos tiempos no son estrictos y es preferible usar criterios clínicos para la definición del tipo de EICH (revisado por Cuttler y cols, 2001).

#### EICH aguda.

Aparece habitualmente entre el día 20 y el 60 post-trasplante en pacientes que han recibido médula ósea HLA idéntica de un hermano y reciben algún tipo de profilaxis de EICH. En pacientes que no han recibido profilaxis o han recibido trasplante de donante HLA no idéntico puede aparecer una forma hiperaguda de EICH en una o dos semanas. En el hombre se manifiesta en tres órganos diana: piel, tracto gastrointestinal, hígado.

En el 40% de los pacientes que desarrollan EICH aguda, esta es de intensidad moderada a grave (grados 2-4) y precisa tratamiento, siendo causante directa o indirectamente de un 20% de mortalidad.

Entre los factores que influyen en el desarrollo de la EICH se incluyen:

Factor	Mayor riesgo de EICH aguda sí:
Compatibilidad donante /receptor	Diferencias HLA o DnE
Alo sensibilización de donantes	Mujeres con embarazos previos o transfusiones
Edad del paciente y del donante	Mayor edad
Relación sexo donante/receptor	Donante mujer → receptor varón
Régimen de acondicionamiento	Mayor Intensidad
Cantidad de linfocitos T del inóculo	Sin DLT > depleción parcial > depleción total
Tipo de profilaxis de la EICH	No profilaxis > CyA o MTX > CyA+MTX > DLT
Grado de cumplimiento profilaxis	No administración de las dosis previstas
Medidas de aislamiento	Aislamiento LAF (solo demostrado en AM)
Descontaminación intestinal	Ninguna > parcial > total

HLA: antígenos leucocitarios humanos; DnE: donante no emparentado; DLT: eliminación de linfocitos T; CyA: ciclosporina A; MTX: metotrexato; LAF: habitación con flujo laminar de aire filtrado.

#### EICH crónica.

Clásicamente es aquella que aparece después del día +100 pero, si para el diagnóstico se emplean las características clínicas puede observarse con anterioridad. Su incidencia es muy variable (30-80%) dependiendo de los factores de riesgo como son la compatibilidad HLA, la EICH aguda previa, la edad, el tipo y duración de la profilaxis para EICH, la infección de virus grupo herpes o la infusión de linfocitos del donante. (Revisado por Margolis y Vogelsang, 2000)

Puede originarse de Novo (sin EICH aguda), de forma quiescente (tras EICH aguda aparentemente resuelta) y progresiva (evolución de EICH aguda sin resolución). Los tejidos diana son el conjuntivo y el inmune. Se observan dos formas, la limitada o localizada, definida como la afectación cutánea circunscrita con o sin disfunción hepática, y la forma extendida, en la cual existe una afectación cutánea generalizada o localizada pero asociada a histología hepática de hepatitis crónica o cirrosis, o a la afectación de cualquier otro órgano. Clínicamente, el síndrome seco y la afectación cutánea se presentan en más del 60% de los casos. En el 80% de los casos se observa disfunción hepática. (Przepiorka D, 2001).

#### 1.4.3. ENFERMEDAD VENOOCLUSIVA HEPÁTICA

Obstrucción fibrosa de las vénulas centrolobulillares del hígado secundaria a la quimiorradioterapia de preparación para el TMO. Aparece en el 15-20% de los TPH alogénicos.

#### 1.4.4. RECHAZO DEL INJERTO

El rechazo de injerto se define como un fallo de implante (cifra de neutrófilos menor a 200/ $\mu$ l en el día +21 ó +28) con evidencia celular o serológica de reaparición de células linfoides del huésped, generalmente de estirpe T, con o sin reacción concomitante del resto de la hematopoyesis del huésped (maligna o normal). Ocurre en menos de un 2% de los trasplantes alogénicos de hermano HLA idéntico, cuando existe incompatibilidad en un locus esta frecuencia aumenta al 10% y a un 20% si la

HLA: antígenos leucocitarios humanos; DnE: donante no emparentado; DLT: eliminación de linfocitos T; CyA: ciclosporina A; MTX: metotrexato; LAF: habitación con flujo laminar de aire filtrado.

#### EICH crónica.

Clásicamente es aquella que aparece después del día +100 pero, si para el diagnóstico se emplean las características clínicas puede observarse con anterioridad. Su incidencia es muy variable (30-80%) dependiendo de los factores de riesgo como son la compatibilidad HLA, la EICH aguda previa, la edad, el tipo y duración de la profilaxis para EICH, la infección de virus grupo herpes o la infusión de linfocitos del donante. (Revisado por Margolis y Vogelsang, 2000)

Puede originarse de Novo (sin EICH aguda), de forma quiescente (tras EICH aguda aparentemente resuelta) y progresiva (evolución de EICH aguda sin resolución). Los tejidos diana son el conjuntivo y el inmune. Se observan dos formas, la limitada o localizada, definida como la afectación cutánea circunscrita con o sin disfunción hepática, y la forma extendida, en la cual existe una afectación cutánea generalizada o localizada pero asociada a histología hepática de hepatitis crónica o cirrosis, o a la afectación de cualquier otro órgano. Clínicamente, el síndrome seco y la afectación cutánea se presentan en más del 60% de los casos. En el 80% de los casos se observa disfunción hepática. (Przepiorka D, 2001).

#### 1.4.3. ENFERMEDAD VENOOCLUSIVA HEPÁTICA

Obstrucción fibrosa de las vénulas centrolobulillares del hígado secundaria a la quimiorradioterapia de preparación para el TMO. Aparece en el 15-20% de los TPH alogénicos.

#### 1.4.4. RECHAZO DEL INJERTO

El rechazo de injerto se define como un fallo de implante (cifra de neutrófilos menor a 200/ $\mu$ l en el día +21 ó +28) con evidencia celular o serológica de reaparición de células linfoides del huésped, generalmente de estirpe T, con o sin reacción concomitante del resto de la hematopoyesis del huésped (maligna o normal). Ocurre en menos de un 2% de los trasplantes alogénicos de hermano HLA idéntico, cuando existe incompatibilidad en un locus esta frecuencia aumenta al 10% y a un 20% si la



incompatibilidad es de 2-3 loci, en trasplantes con deplección de linfocitos T su frecuencia es de un 10%. Su aparición se confirma mediante estudios de quimerismo.

#### 1.4.5. INMUNODEFICIENCIAS

La quimiorradioterapia supraletal, asociada al trasplante, induce una inmunodeficiencia que no se recupera de forma completa hasta los 9-12 meses y que condiciona la presencia de infecciones oportunistas. No existen diferencias en el tiempo de recuperación en función del tipo de TPH (autólogo, alogénico, singénico). La incompatibilidad HLA entre el donante y el receptor y la existencia de EICH aguda o crónica, retrasa la reconstitución inmune.

#### 1.4.6. INFECCIONES

En función del tipo de infección se suelen diferenciar tres fases post –TPH.

La primera fase comprende generalmente entre los días 0 al +20. El factor de riesgo más importante es la neutropenia y, por tanto las infecciones más frecuentes son bacterianas y fúngicas.

La segunda se inicia con el injerto hematológico y se extiende hasta el día +100. Constituye la fase en la que existe una inmunodepresión celular más profunda y en ella es especialmente frecuente y grave la infección por citomegalovirus (CMV) en forma de neumonía intersticial bilateral ya que es la causa más frecuente de muerte infecciosa tras TMO.

La tercera fase o fase tardía se inicia en el día +100 y su duración se prolonga en caso de existir EICH crónica. Se caracteriza por la frecuencia de infecciones virales por herpes zoster, e infecciones bacterianas por gérmenes grampositivos encapsulados de vías respiratorias. (Revisado por Silber y Goldberg, 1993)

#### 1.4.7. NEUMONÍA INTERSTICIAL

Aparece en el 20-40% de los pacientes trasplantados y es la causa de mayor mortalidad. El 50% de los casos se deben a CMV, el resto se relaciona con la irradiación corporal total, otros virus y *Pneumocystis carinii*. Los principales factores de riesgo son la edad del paciente, la EICH aguda grave y la utilización de irradiación corporal total en el tratamiento de acondicionamiento.

#### 1.4.8. COMPLICACIONES TARDÍAS

Aparecen meses o años después del TPH con una incidencia que va aumentando con el progresivo incremento del número de largos supervivientes. (Kolb, 1997).

Tabla 6: Riesgos potenciales tras un trasplante

Causa	Efecto
<ul style="list-style-type: none"> <li>El propio trasplante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>EICH crónica</li> <li>Inmunodeficiencia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Intensidad del acondicionamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infertilidad</li> <li>Cataratas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>La enfermedad base</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recaídas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Multifactorial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enfermedad pulmonar crónica</li> <li>Segundas neoplasias</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Problemas de tratamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Problemas óseos</li> <li>Miositis y miopatía</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Interacción injerto-receptor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Síndromes linfoproliferativos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Procesos de reparación que originan cicatrices</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disfunción genitourinaria</li> <li>Deterioro de la función respiratoria</li> </ul>

#### 1.5. REACCIÓN DE INJERTO CONTRA LEUCEMIA

En 1956 Barnes y Loutit propusieron que el trasplante de médula ósea estaba asociado a un efecto antitumoral no explicable por el tratamiento quimio o radioterápico pretrasplante. Este efecto se denominó efecto injerto contra leucemia (ICL). Tras distintos estudios en modelos murínicos, donde se observó la presencia de células T con un efecto ICL independiente de EICH, se encontraron las primeras evidencias indirectas del mismo fenómeno en humanos que sufrían LMA. Así enfermos con LMA que recibían alotrasplantes y que no desarrollaban EICH tenían un riesgo menor de recaída que los receptores de trasplantes de gemelo idéntico (Horowitz y cols, 1990). Otras evidencias indirectas de la presencia de efecto ICL y del papel fundamental de los linfocitos T son, además de la baja frecuencia de recaídas objetivadas en pacientes que sufren EICH aguda, el alto grado de recaídas tras trasplantes realizados con deplección de celularidad

T y la posible reinducción de remisión mediante la infusión de linfocitos del donante (Sullivan y cols, 1989; Kolb y cols, 1995).

### 1.6. TPH Y CELULARIDAD T

Uno de los impedimentos más serios en el TPH es el prolongado periodo en el que la inmunidad celular T del paciente está disminuida tanto cuantitativa como cualitativamente. En muchos de estos pacientes la función tímica está seriamente dañada debido a diversos factores como pueden ser la enfermedad primaria del paciente, el tratamiento, el acondicionamiento pre-trasplante, la presencia de EICH y el tratamiento inmunosupresor para la profilaxis y tratamiento de la misma. Esta situación se agrava en pacientes con edades avanzadas ya que la función tímica decrece con la edad. Así en adultos los mecanismos timo dependiente, que incluye tanto selección positiva como negativa, es un proceso muy lento aunque que se ha demostrado la existencia de mecanismos alternativos timo independientes.

La complejidad de los repertorios de celularidad T involucrados en la respuesta inmune juega un papel importante en la respuesta a superantígenos virales o bacterianos y en la aloinmunidad que incluye el rechazo de injertos y la reacción anti-tumor tras TPH.

#### 1.6.1. RECEPTORES DE LINFOCITOS T (TCRs)

Los linfocitos expresan gran cantidad de moléculas en su superficie que pueden ser usadas para distinguir las distintas poblaciones celulares. Estos marcadores pueden ser identificados mediante anticuerpos monoclonales y se ha desarrollado una nomenclatura denominada sistema CD. El término CD (cluster designation) se refiere a una agrupación de anticuerpos monoclonales que específicamente se unen a los marcadores celulares.

Históricamente las células T eran distinguidas de las B por su capacidad de unirse a eritrocitos de carnero. Esta reacción es debida a la molécula CD2 de los linfocitos T. Pero el marcador del linaje T es el receptor de antígeno o TCR que se adquiere durante proceso de maduración de los linfocitos T en el timo. Existen dos tipos de TCRs. El TCR-2, presente en aproximadamente el 90-95% de la celularidad T, es un heterodímero unido por dos puentes disulfuro, compuesto de moléculas  $\alpha$  y  $\beta$  de glicoproteína. Ambas cadenas están compuestas de dos dominios: la porción amino terminal consistente en una región de secuencia variable de aminoácidos (región V) y la región carboxilo terminal

formada por una región de secuencia constante de aminoácidos (región C) (Wilson RK y cols, 1988). El TCR-1 que se ha caracterizado sobre la superficie de los timocitos jóvenes y un pequeño subgrupo de células T periféricas (5-10% del total), es también un heterodímero con unión de puentes disulfuro, compuesto de cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ . Su potencial de diversidad parece ser limitado en comparación con el receptor  $\alpha/\beta$ . Ambos receptores están asociados al complejo CD3.

Las células TCR-2 pueden ser subdivididas en dos subpoblaciones independientes, aquellas que presentan el marcador CD4 (CD4<sup>+</sup>) y que son las inductoras de la respuesta inmune, y las CD8<sup>+</sup> con función predominantemente citotóxica. Las células CD4<sup>+</sup> reconocen su antígeno específico en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II mientras que las CD8<sup>+</sup> reconocen antígeno en asociación con la molécula de HLA tipo I, por lo que la presencia de un tipo u otro de linfocitos limitará los tipos de células con las que interaccionarán los linfocitos T.

La mayoría de las células TCR-1 circulantes no poseen ni el marcador CD4 ni el CD8, aunque algunas podrían ser CD8<sup>+</sup>.

La diversidad de TCRs viene determinada por su región complementaria determinante CDR3 que juega un papel fundamental en el reconocimiento antigénico al formar parte de la zona de unión del complejo mayor de histocompatibilidad expresados por células presentadoras de antígeno. El CDR3 de los genes TCR beta son generados por reordenamientos extensivos y fusiones entre segmentos V, J y D y por inserciones y deleciones aleatorias de nucleótidos de unión, dando lugar a productos finales altamente heterogéneos. La secuencia del CDR3 define un único clonotipo TCR que actuará como una huella identificativa en el linaje en el que se presente.

Tras la pérdida de células T maduras, como ocurre tras quimioterapia o después de un acondicionamiento mieloablativo antes de un TPH alogénico, la regeneración de la población T puede producirse por al menos dos vías. La primera es la transferencia de células T maduras derivadas del injerto a la periferia, seguidas de una expansión dirigida por antígeno. Este proceso, timo independiente, es el que probablemente proporciona la primera serie de células T tras el trasplante (Mackall y cols, 1996 y 1997). Estas células que presentan una diversidad de TCRs limitada pueden permanecer en sangre periférica de 10 a 20 años (Pawelec, 1995), si se producen las interacciones TCR-péptido/MHC adecuadas. El segundo tipo de mecanismo involucra la selección de las células precursoras derivadas del injerto, en el timo y/o posiblemente en lugares periféricos de

selección (Lundqvist y cols, 1995; Collins y cols, 1996) Este proceso de selección tímica probablemente proporciona una reconstitución más duradera de la celularidad T y potencia un repertorio de TCRs más diverso. Ya que la función tímica decrece con la edad, este mecanismo de selección se piensa que es más efectivo en alo-TPH en receptores jóvenes, como se ve reflejado en la recuperación retardada en receptores adultos, especialmente de las células CD4<sup>+</sup>. ( Storek y cols, 1995).

## 2. ESTUDIO DEL QUIMERISMO EN HEMATOLOGÍA: IMPLICACIONES DEL POLIMORFISMO DEL ADN

### 2.1. CONCEPTO

De acuerdo con la terminología médica se define como quimera el estado caracterizado por la coexistencia en un mismo organismo de poblaciones celulares originarias en dos organismos genéticamente distintos de la misma o distinta especie.

Este estado puede desarrollarse de una manera espontánea o como consecuencia de una intervención médica. El quimerismo espontáneo puede ocurrir en gemelos cuando existe una comunicación entre la circulación de sangre de las dos placentas. Otra posibilidad es el estado dispérmico que resulta en un quimerismo primario y constante. La quimera artificial o secundaria se desarrolla debido a intervenciones médicas. Teóricamente, las transfusiones serían la causa más frecuente, pero debido a su carácter de herramienta terapéutica de soporte no existen indicaciones especiales para estudiar el estado de quimerismo en este caso. Los eventos más comunes ocasionan la inducción de estados quiméricos son las transfusiones intrauterinas y el cambio de sangre en niños recién nacidos. También se producen cuando la transfusión ocurre entre pacientes haploidénticos, en poblaciones con alto grado de endogamia o en pacientes que sufren inmunodeficiencias primarias o secundarias.

Existe cada vez mayor interés en el estudio del quimerismo asociado al trasplante de órganos sólidos ya que un estado de quimerismo permanente parece estar asociado con la inducción de tolerancia frente al injerto aunque aún existe controversia sobre si existe asociación entre ambos o son factores independientes. (Wood, 1996 y Brent, 1997).

El quimerismo secundario también se presenta en la mayoría de los casos de trasplante de médula ósea o progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

## 2.2. QUIMERISMO EN TPH

Según la existencia o ausencia de células hematopoyéticas del paciente tras el TPH se distinguen dos situaciones:

- quimerismo completo situación en la que todas las células proceden del donante
- quimerismo mixto en la que coexisten células hematopoyéticas del donante y del receptor.

La instauración de una situación de quimerismo mixto tras TPH tiene potenciales aplicaciones clínicas (Exner y cols, 1999):

Inducción de tolerancia alogénica a órganos sólidos e injertos celulares. Los pacientes post-trasplantados son tolerantes a órganos o injertos de piel del donante sin inmunosupresión tras la realización del TPH debido a una enfermedad hematológica.

Reinducción de auto-tolerancia en enfermedades autoinmunes. En pacientes que sufrían una enfermedad autoinmune, conjuntamente con la enfermedad por la que fueron trasplantados, esta no reaparece tras la realización del TPH.

Tratamiento de enfermedades hematológicas no malignas. Como en el caso de la anemia drepanocítica, donde un quimerismo del 20% resulta en la producción de un 80% de células eritroides normales en el receptor, sugiriendo una ventaja competitiva de los hematíes sanos (Walters y cols, 1996).

### 2.2.1. INDICACIONES DEL ANÁLISIS DEL QUIMERISMO EN TPH

Confirmación del implante de las células hematopoyéticas del donante

Diagnóstico de fallo de implante

Monitorización del implante hematopoyético, en especial en las modalidades de trasplante con un mayor riesgo de recidiva o de fallo del implante (depleción de linfocitos T, disparidad antigénica donante/receptor, alo-TPH con tratamiento de acondicionamiento no mieloablativo)

### 2.2.2. ANÁLISIS DEL QUIMERISMO MEDIANTE MARCADORES GENÉTICOS POLIMORFICOS

El polimorfismo se genera a partir de mutaciones. Los distintos tipos de polimorfismo se definen típicamente según el tipo de mutación que los originó. El polimorfismo más simple y frecuente es aquel que se origina por una mutación en una

única base en la que un nucleótido es sustituido por otro, se denominan polimorfismos de un único nucleótido o SNP (single nucleotide polymorphism) (Brookes, 1999). Otro tipo de polimorfismo es el originado por la inserción o delección de una sección de ADN. El más común de este tipo de polimorfismo es la existencia de patrones de repetición de número variable en una región genómica (Cooper y Krawczak, 1999). Este polimorfismo denominado de repetición presenta muchos alelos y variantes (varios tamaños de repetición distintos) dentro de la población y son por lo tanto considerados altamente polimórficos.

El ADN repetitivo disperso está formado por distintas familias aunque las más conocidas son los elementos nucleares dispersos cortos (SINEs) y largos (LINEs), también llamados trasposones. (Revisado por Finnegan, 1985). Dentro de la familia SINEs la más frecuente en humanos es la secuencia de repetición Alu. Esta secuencia es específica de primates, y consiste en una secuencia de ADN de aproximadamente 280 pares de bases que se repite unas 750.000 veces a lo largo del genoma humano, aparece una media de una vez cada 4000 pares de bases, representando un 5% del genoma humano. Estas secuencias han surgido a través de procesos de retrotransposición, se generan a partir de RNA por transcripción inversa en fragmentos de ADN con la capacidad de insertarse en cualquier región del genoma humano. Dichas inserciones están relacionadas con patologías como Hemofilia B por inserción Alu de novo o neurofibromatosis tipo I (Deininger, 1999)

El ADN repetitivo en tándem o ADN satélite (Britten y cols, 1968; Singer, 1982). está dividido, en función del tamaño de cada repetición individual y del tamaño total en: **Satélites** con un tamaño de 100 Kb con unidades de repetición de cinco a varios cientos de pares de bases. **Minisatélites** que presentan un tamaño total de 0.1-20 Kb con unidades de repetición de seis a cincuenta pares de base. **Microsatélites** que con un tamaño menor de 150 pb están formados por unidades de repetición de una a cinco pares de bases. Los límites de tamaño aceptados para cada grupo no son universales, aunque como consenso se aceptan los anteriormente expuestos (Bennet, 2000).

Los Satélites fueron la primera secuencia de DNA repetitivo en ser descubierto y se denominó así por su aparición como pequeñas bandas que se separaban del grueso

de DNA tras centrifugación en gradiente de densidad. Este DNA no se transcribe y se encuentra en la heterocromatina especialmente en la zona centromérica (Tyler, 1993).

Los minisatélites se dividen en dos clases: Teloméricos que consisten en 10-15 kb de repeticiones de hexanucleótidos (principalmente TTAGGG) localizados en los telómeros de todos los cromosomas, donde posiblemente realicen una función protectora y/o de orientación durante la división celular. Hipervariables, que presentan un elevado polimorfismo (Shiver y cols, 1993; Armour y Jeffreys, 1992).

Los microsatélites también denominados STRs, están presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Tautz, 1989). En procariotas se ha probado su implicación en distintas funciones biológicas mientras que su función en eucariotas no está aún clara, aunque existen teorías que sugieren su influencia en la regulación de la expresión génica. (Revisado por Bennet, 2000).

Los microsatélites se presentan repartidos a lo largo de todo el genoma, apareciendo como media cada 6-8kb. Las repeticiones de mononucleótidos, especialmente repeticiones en A y T, están presentes en alrededor de medio millón de locis (ocupando unas 10 Mb en total), mientras que las repeticiones de pentanucleótidos están presentes sólo en unos miles de locis. Los microsatélites a su vez pueden ser subdivididos en tres tipos: a) Simples son aquellos que poseen una única unidad de repetición en algunos casos con algún alelo que posee alguna inserción o delección ("non-consensus alleles"). b) Compuestos, son aquellos en los que dos unidades de repetición distintas poseen variabilidad dentro del mismo STR. c) Complejos, son sistemas de elevado polimorfismo y de gran complejidad con numerosas unidades de repetición distintas y muchas inserciones y delecciones de tamaño diverso.

Históricamente, el uso de marcadores genéticos ha permitido el estudio de la supervivencia, distribución y diferenciación del injerto de células del donante durante toda la vida del receptor. Los marcadores genéticos informativos en un trasplante alogénico son aquellos que distinguen las células del donante de las del receptor y aquellos que distinguen la celularidad del receptor de las del donante. En muchos casos, los alelos del donante y del receptor para un locus determinado son informativos en ambas direcciones: donante heterocigoto con alelos "a" y "b" y receptor también heterocigoto con alelos "a" y "c", el alelo "b" será el informativo para las células del donante mientras que el alelo "c" será el indicativo de la celularidad del receptor. En otros casos la situación no es



informativa en ambas direcciones: donante homocigoto con un alelo "a" y receptor heterocigoto, alelos "a" y "c", "c" será el alelo informativo para la celularidad del receptor pero no existe marcador informativo de la celularidad del donante. Deben pues evaluarse los marcadores genéticos informativos antes del trasplante para su evaluación tras el mismo. La probabilidad de encontrar marcadores informativos dependerá del número de locus estudiados, del número de alelos de cada locus, de la distribución de dichos alelos y de la relación entre el donante y el receptor. Dentro de los miembros de una misma familia, no existen más de cuatro alelos para cada locus.

Los marcadores genéticos y los métodos de laboratorio utilizados en el estudio del quimerismo han evolucionado considerablemente durante la historia del trasplante de médula ósea. Se han utilizado antígenos de eritrocitos para demostrar la presencia de células del donante tras el trasplante. Los antígenos analizados incluyeron los sistemas ABO, MN y Rh al igual que los sistemas Kell, Kidd, Duffy, Lutheran, Ss y P. Se podían identificar marcadores informativos en el 80% de los casos entre parejas de hermanos. Los ensayos de aglutinación tenían una sensibilidad del 0.1- 0.5%. El análisis mediante citometría de flujo de los marcadores de superficie celular en eritrocitos presenta una mayor sensibilidad 0.01% (Pallavicini y cols 1992; David D y cols 1999). Estos marcadores han sido desplazados de su uso rutinario debido a varios inconvenientes como son, la larga vida de los eritrocitos que puede llevar a errores en la interpretación en el caso de que se realicen transfusiones antes o después del trasplante, por otra parte también dificulta el seguimiento del desarrollo del injerto. Finalmente la hemólisis causada por una incompatibilidad ABO puede retrasar la parición de los eritrocitos del donante en pacientes en los que el injerto de las células mieloides es correcto, por todo esto se concluyó que un estudio del quimerismo limitado al linaje eritropoyético podría llevar a conclusiones erróneas.

En estudios posteriores se utilizaron polimorfismos enzimáticos detectables mediante su variable movilidad electroforética. El uso de enzimas eritocitarias sufre los mismos inconvenientes asociados al uso de los antígenos eritocitarios discutidos anteriormente. El análisis de seis enzimas leucocitarias: fosfatasa ácida, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa, adenilato quinasa, adenosindesaminasa y esterasa D, proporciona marcadores informativos en el 95% de las parejas de hermanos. El ensayo de movilidad electroforética tiene una sensibilidad del 10 al 30%. Este ensayo

requiere un procesamiento cuidadoso de los especímenes para la preservación de la actividad enzimática.

Todos estos ensayos se han ido sustituyendo por ensayos basados en el análisis de DNA.

El estudio de antígenos de HLA está limitado a parejas donante receptor no HLA idénticos por lo que se prefieren marcadores genéticos más ampliamente aplicables.

La utilización de alotipos de inmunoglobulinas como marcadores genéticos presenta problemas cuando se realizan transfusiones o terapias de reemplazo de inmunoglobulinas. Además sólo en el 50% de los casos existen marcadores informativos en ambas direcciones y las medidas son semicuantitativas.

El análisis por citogenética convencional de cromosomas en metafase ha sido un método bien establecido como método para la evaluación del quimerismo en transplantes alogénicos. Pero presenta cuatro importantes limitaciones que han hecho que sea sustituido por otras técnicas de biología molecular. Primero, generalmente no existen marcadores informativos para parejas donante-receptor del mismo sexo salvo en casos raros en los que un reordenamiento estructural o heteromorfismo pueda ser utilizado como marcador genético. Segundo, las técnicas de citogenética son laboriosas y requieren un tiempo de análisis entre 4 y 12 días. Tercero, los resultados se limitan a las células en metafase, las características de cada linaje no son detectables en metafase y se ha observado que los resultados sobre poblaciones diferentes no son siempre concordantes. Por último el número de células en metafase que se pueden evaluar en un sólo ensayo es limitado, lo que lleva a que los ensayos citogenéticos tengan una sensibilidad y precisión limitadas (Diez-Martin y cols, 1998).

Las técnicas de citogenética molecular o técnicas de hibridación in-situ presentan grandes ventajas frente a la citogenética convencional, son simples, rápidas, las células pueden ser analizadas tanto en metafase como en interfase y se pueden analizar gran cantidad de células lo que permite una elevada precisión y sensibilidad. La desventaja es que su utilización rutinaria se vería limitada al caso en el que el donante y el receptor fueran de distinto sexo (Palka y cols, 1996).

También se han utilizado en el estudio del quimerismo ensayos de polimorfismo de fragmentos de restricción, este polimorfismo se hereda de forma mendeliana y pueden ser detectados por ensayos de Southern blot (Yam y cols, 1987 ;Casarino y cols, 1992) . En la mayoría de las parejas donante-receptor se pueden identificar marcadores

informativos con un panel limitado de sondas y endonucleasas de restricción, pero los análisis de Southern blot son complejos, requieren bastante tiempo para su aplicación de rutina. Además, se requiere el uso de sondas marcadas radioactivamente para alcanzar la sensibilidad adecuada para trabajar con las cantidades de DNA de las muestras clínicas. La sensibilidad se limita aproximadamente al 10% y la cuantificación adecuada es difícil.

Los estudios mediante PCR de secuencias específicas de cromosoma Y presenta una buena sensibilidad (0.01%) pero su utilidad se ve limitada a los casos en que existe diferencia de sexo entre donante y receptor (Wilborn y cols, 1993).

El uso de minisatélites y de microsátélites como marcadores ha resuelto todas las desventajas de los anteriores marcadores. Es posible encontrar marcadores informativos para prácticamente cualquier pareja donante-receptor con un mínimo de seis marcadores. Su amplificación mediante reacción de cadena de polimerasa multiplex y su análisis en geles de poliacrilamida o resinas comerciales permite su aplicación en el laboratorio de rutina, al ser una técnica robusta, sencilla y rápida, pudiendo obtenerse los resultados en 24-48 h (Luhm y cols, 2000; Millson y cols, 2000).

### 3. MUTACIONES EN MICROSATÉLITES COMO MARCADORES DE INESTABILIDAD GENOMICA EN EL CÁNCER COLORRECTAL

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon y recto es el segundo en incidencia, detrás del de pulmón, en los países más industrializados. De todos los tumores del tracto gastrointestinal es el que reviste mayor importancia y su incidencia ha experimentado un incremento desde el inicio de este siglo (Dunlop, 1992) siendo atribuida esta tendencia a factores dietéticos tales como la ingesta de grasas que aportaría carcinógenos exógenos al tiempo que provocaría una alteración de la flora intestinal con modificaciones en el metabolismo de los ácidos biliares y esteroides y posterior producción de carcinógenos (Abad, 2000).

Dentro del cáncer colorrectal podemos distinguir dos tipos: esporádicos (que representan el 90% de este tipo de tumores) y los síndromes familiares, dentro de los cuales se destacan dos: la Poliposis Múltiple Familiar (FAP) y el HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer).

### 3.2. BASES A MOLECULARES DEL CANCER DE COLON

En el cáncer colorrectal, se produce una progresión del tejido normal a adenoma y de este a un carcinoma invasivo, debido a la acumulación de expansiones clonales de una serie de alteraciones genéticas. Es pues un proceso evolutivo secuencial a nivel somático en el que cada generación celular se ve sometida al proceso de selección natural (Vogelstein and Kinzler, 1993; Bodmer y cols. , 1994, Klein, 1998).

Esta evolución depende de dos elementos esenciales, la presión selectiva y la posibilidad de variabilidad genética (Dawkins, 1989; Alberts y cols. , 1994).

La presencia de homogeneidad genética, preservación del ADN en su replicación, es esencial para evitar las transformaciones neoplásicas. La primera línea de defensa del organismo frente a las mutaciones somáticas la constituyen la coordinación del ciclo celular y los mecanismos enzimáticos de reparación del ADN (Murnane, 1995; Sanchez and Elledge, 1995). Estos mecanismos evitan la dispersión del ADN dañado, interrumpiendo la proliferación hasta que la integridad genómica se restablezca.

Otro mecanismo de preservación es la apoptosis o muerte celular programada. Las células que escapan a la apoptosis tienen mayor probabilidad de replicación. La acumulación de daños en el ADN y el fracaso de los mecanismos de reparación favorecen los fallos del proceso apoptótico.

Estas alteraciones pueden ocurrir en tres clases de genes:

Proto-oncogenes, los cuales cuando están mutados se transforman en oncogenes y actúan promocionando el crecimiento celular

Genes supresores de tumores, que cuando están mutados pierden su regulación de proliferación celular

Genes reparadores de ADN, que al mutar alteran los mecanismos que aseguran la fidelidad en la replicación del ADN, produciendo mutaciones en proto-oncogenes y en genes supresores de tumores

La selección de las alteraciones genéticas no se produce al azar (Lawley, 1994; Levine y cols. , 1995), existiendo distintos patrones de alteraciones en distintos tejidos, lo que implica que los procesos carcinogénicos transcurren por vías alternativas (revisado por Shackney y Shankey, 1997). Estos patrones dividen a los cánceres colorrectales en dos categorías distintas, dependiendo de la inestabilidad genómica de origen: bien una alteración profunda del balance cromosómico o la presencia de inestabilidad de microsatélites.

A cada tipo de inestabilidad le corresponde una vía molecular diferente: por un lado los tumores aneuploides de la vía supresora, y por otro los tumores pseudodiploides con inestabilidad de microsatélites de la vía mutadora.

Ambos tipos de tumores presentan diferencias en su fenotipo (Breivick y cols. , 1997), los tumores de la vía mutadora de microsatélites son en general menos agresivos y tienen mejor pronóstico que los tumores de la vía supresora (Ionov, 1993; Yamamoto, 1999, Samowitz 2001). Los tumores de las dos vías no son distinguibles por análisis microscópico tradicional de histopatología pero sí mediante análisis de inestabilidad de microsatélites.

### 3.3. TUMORES DE LA VÍA SUPRESORA

Estos tumores colorrectales están caracterizados por inestabilidad cromosómica: reordenamientos, pérdidas o ganancias de fragmentos genómicos, (Meuth, 1996), número anormal de cromosomas y cambios en el contenido de ADN nuclear (Thompson y Thompson, 1998). Esta inestabilidad es una consecuencia directa de la presencia de fallos en el control del ciclo celular.

Esta vía también está relacionada con la presencia de alteraciones en el gen TP53, encontrándose en el 70% de los cánceres colorrectales (Goh y cols. , 1994). La proteína p53 juega un papel fundamental en la protección del ADN, su acumulación frena el ciclo celular y promueve la apoptosis (revisado por Gotz y Montenarh, 1996)

### 3.4. TUMORES DE LA VÍA MUTADORA

L. Loeb fue el padre de la idea del fenotipo mutador, la propuso para explicar la presencia en células tumorales de un número de mutaciones superior de la que se podría atribuir a la frecuencia espontánea de mutaciones de las células normales. La inestabilidad de microsatélites fue descrita por primera vez, en publicaciones independientes, por tres grupos en 1993, Thibodeau y cols, Peltomaki y cols que reconocieron la aparición de este tipo de tumores en la zona proximal del colon, su asociación con una mayor supervivencia que los tumores que no presentaban esta anomalía, y la ausencia de pérdida de heterocigosidad. Aaltonen y cols, además asociaron la inestabilidad a un locus que en el que en investigaciones posteriores se encontraría el primero de los genes reparadores. Los estudios de M. Perucho en inestabilidad cromosómica en tumores de colon mediante el método de impresión de

huella dactilar (fingerprinting) y secuenciación permitió el hallazgo de una nueva clase de genes mutadores. Cuando estos genes son inactivados por mutación (mutación mutadora) se produce la acumulación de cientos de miles de mutaciones somáticas de carácter clonal en microsatélites, debido a la incapacidad de reparar errores en la replicación por alineamiento desigual de las cadenas de ADN. Es decir, las mutaciones en microsatélites son consecuencia de mutaciones previas en genes codificantes de factores esenciales para mantener la fidelidad de replicación las secuencias de DNA.

Los genes reparadores de desapareamientos en ADN difieren de los reparadores de excisión de nucleótidos o bases en que reconocen nucleótidos normales que están erróneamente apareados o desapareados en vez de reconocer nucleótidos anormales (Fishel y Kolodner, 1995). Los nucleótidos con un apareamiento erróneo se forman en el ADN por diversos mecanismos, fallo de ADN polimerasa en la incorporación de nucleótidos, daño físico en los nucleótidos ya presentes en la secuencia o por formación de intermediarios heteroduplex durante la recombinación genética. Los mecanismos de reparación mejor conocidos y estudiados son los del sistema mutHLS en E.Coli, ciertos componentes de este sistema se han conservado a través de la evolución y han facilitado la identificación y caracterización de los genes de reparación en humanos. Los primeros genes reparadores humanos aislados fueron el hMSH2 (Fishel y cols. , 1993; Leach y cols, 1993) y el hMLH1 (Broner y cols, 1994; Papadopoulos y cols, 1994) . Siendo estos los que aparecen más frecuentemente alterados, el hMSH2 en un 31% y el hMLH1 en un 33%. Los otros genes reparadores conocidos son el hPMS2 que aparece alterado en un 4%, el hPMS1 (Nicolaidis y cols, 1994) y el hMSH6 (Akiyama y cols, 1997) que raramente se alteran.

Los tumores de la vía mutadora son mayoritariamente diploides o pseudoploides. Además se observa en ellos una ausencia de mutaciones de los genes de la vía supresora como APC, RAS y p53.

#### 3.4.1. CANCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO (HNPCC) O SÍNDROME DE LYNCH

El NHPCC fue descrito por Warthin en 1913, pero su patogenia no fue elucidada hasta los años 90 (Lynch, 1993) cuando se catalogó como una enfermedad genética con herencia autosómica dominante que se caracteriza por estar relacionada con defectos en los genes que codifican las proteínas reparadoras del ADN (Parsons, 1993). Mediante

estudios de ligamiento se caracterizó el gen en la banda cromosómica 2p15-p16 en familias con HNPCC seleccionados de acuerdo con estrictos criterios clínicos (Peltomäki, 1993). Más tarde en ese mismo año el gen del HNPCC fue aislado (Fishel y cols, 1993; Leach y cols, 1993).

La mayoría de los tumores de colon hereditarios no polipósicos (HNPCC), el 15% de los esporádicos con localización proximal del colon (Aaltonen y cols, 1993) y una proporción similar de carcinomas gástricos y de endometrio (Eshleman y Markowitz, 1995), manifiestan inestabilidad de microsatélites. Dentro del total de tumores colorrectales los tumores HNPCC representan el 5% y los tumores esporádicos con inestabilidad en microsatélites representan el 13%.

Los pacientes con HNPCC tienen un riesgo aumentado de tener cáncer de colon, recto y otros órganos como endometrio, estómago, ovario, intestino delgado, sistema hepato-biliar, riñón y uréter que desarrollan a una edad media de 42 años, más de dos décadas más temprano que la población general (Lynch, 1993). Pueden ser clasificados en dos categorías Síndrome de Lynch I y II, dependiendo en la ausencia o presencia de cánceres extracolónicos respectivamente.

## OBJETIVOS



El polimorfismo de ADN se ha generado a través de la acumulación de mutaciones producidas espontáneamente y a un ritmo constante a lo largo de la evolución. Si bien, el polimorfismo en genes que podemos denominar “no neutros” pueden estar sujetos a presión selectiva, esto no ocurre así cuando las regiones polimórficas se encuentran en zonas no codificantes o intergénicas. De hecho, el significado de este polimorfismo, y más concretamente de las zonas de repetición o “microsatélites” no se conoce. Sin embargo, los microsatélites constituyen herramientas biológicas de enorme utilidad en el análisis genético.

En este estudio hemos analizado estas zonas de repetición en dos situaciones distintas: el seguimiento del trasplante hematológico y en la identificación de familias con riesgo de padecer cáncer hereditario. En este sentido, nuestros objetivos se pueden resumir en los siguientes:

1. Desarrollo de un técnica sensible e informativa para el estudio del quimerismo hematológico y su cinética durante el trasplante hematológico.
2. Evaluar el quimerismo postrasplante, como marcador de significado pronóstico, del curso clínico del trasplante y en la detección de EICH o de recaída leucémica. También la valoración del quimerismo en función de su localización anatómica y de su presencia en las distintas poblaciones leucocitarias sobre todo en regímenes no mieloablativos,

Por otra parte, la quimioterapia mieloablativa previa o el tipo de inóculo utilizado en el trasplante medular se asocia frecuentemente con inmunodeficiencia celular T.

3. Estudio comparativo de la reconstitución de la diversidad T en las distintas técnicas de trasplante utilizadas.

La falta de un registro adecuado de cáncer y de la reducción en la tasa de la natalidad está dificultando la identificación de familias con sospecha de cáncer hereditario. Un subgrupo de cáncer de colon obedece a fallos en los mecanismos reparadores de ADN y presenta fenotipo de inestabilidad de microsatélites.

4. Establecimiento de un panel mínimo de microsatélites para el estudio de la inestabilidad genómica como marcadores de selección de familias con cáncer de colon hereditario.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. PACIENTES HEMATOLÓGICOS

### 1.1 DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES

Entre enero de 1999 y diciembre de 2001 se ha realizado el seguimiento de 21 pacientes tras someterse a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos de sangre periférica (TPH) en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

La edad media fue de cuarenta años, intervalo de diecinueve a sesenta y un años. Tres de ellos padecían Leucemia Mieloide Crónica, siete Leucemia Mieloide Aguda (cuatro M2, dos M1 y uno M3), uno Leucemia Linfoide Crónica B, tres Leucemias Linfoblásticas Agudas, tres Linfomas no-Hodgkin (dos de células grandes y uno folicular), dos Mielomas, un Síndrome Mielodisplásico y una Aplasia Medular.

En todos los casos salvo uno el trasplante fue alogénico de hermano HLA idéntico, en el caso restante los hermanos diferían en un locus HLA-B. Once de los trasplantes se realizaron entre hermanos de distinto sexo. Se llevaron a cabo tres tipos de trasplantes, cinco con Selección +, donde se realizó un acondicionamiento mieloablativo e inóculo con deficiencia en la celularidad T, nueve estándar en los que tras acondicionamiento mieloablativo el inóculo fue completo y siete mini-trasplantes en los que el acondicionamiento es no-mieloablativo y el inóculo completo. El acondicionamiento mieloablativo se realizó mediante irradiación corporal total en todos los casos junto con tratamiento con Ciclofosfamida o Etopósido dependiendo del paciente. El acondicionamiento no-mieloablativo se realizó con Fludarabina/Busulfan/Gammaglobulina Antitimocito o con Fludaramina/Melfalan/Gammaglobulina Antitimocito. La profilaxis para la enfermedad de Injerto contra Huésped se realizó administrándose Ciclosporina junto con Metotrexato o Prednisona.

Paciente	Nº	Edad	Sexo R/D	Diagnóstico	Fase
DMM	1	21	M/F	LMC	FC
FMG	2	31	F/M	LMC	FA
MAAR	3	60	F/F	LMC	FC
MRD	4	55	M/M	LLC-B	Rec QS
IRM	5	31	F/F	LNH/DCG	QR
FPP	6	41	M/F	LNH/DCG	Rec2
EVV	7	45	F/M	LNH/FOL	RC1
JOB	8	45	M/M	MM /BJ	QR
MAML	9	51	F/M	MM	QR
AAO	10	61	M/F	LAM/M2	RC1
LMR	11	19	F/F	LAM/M3	RC2
RRE	12	46	F/M	LAM/M1	RC1
CTR	13	49	M/M	LAM/EH	RC1
AGG	14	44	F/F	LAM/M2	RC1
IRV	15	33	F/M	LAM/M2	RC2
EVC	16	33	M/F	LAM	Rec1
MFG	17	40	M/F	SMD/AREB	Enf Act
ENC	18	33	F/F	AM	Dx
CGG	19	34	F/F	LAL	QR
RLF	20	37	M/F	LAL	RC1
MALG	21	44	F/F	LAL	QR

Tabla 1: Clasificación de pacientes según diagnóstico y situación en el momento de la realización del trasplante. R: Receptor, D: Donante, M: Masculino, F: Femenino, LMC: Leucemia Mieloide Crónica, LLC-B: Leucemia Linfática Crónica B, LNH/DCG: Linfoma No Hodgkin De Células Grandes, LNH/FOL: Linfoma No Hodgkin Folicular, MM: Mieloma Múltiple; MM/BJ: Mieloma Múltiple Bences Jones, LAM: Leucemia Aguda Mieloide; EH: Enfermedad de Hodgkin, SMD/AREB: Síndrome Mielodisplásico/Anemia Refractaria con exceso de blastos, AM: Aplasia Medular, LAL: Leucemia Aguda Linfoide. FC = Fase Crónica; RC = Remisión completa; Rec = Recaída; Rec QS = Recaída Quimiosensible; QR = Quimio-Resistente; Enf Act = Enfermedad Activa; Dx = Diagnóstico;

## 1.2 CRITERIOS DE REALIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DEL TPH

### 1.2.1 OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA

El empleo de progenitores de sangre periférica (PSP) se ha generalizado en los últimos años, habiendo sustituido en la mayoría de las indicaciones a los progenitores obtenidos por aspiración medular. Debido a que los PSP están presentes en la circulación en muy bajas concentraciones, su recolección selectiva en cantidades adecuadas requiere la administración de citocinas que inducen la movilización de los PSP, y el empleo de separadores celulares. En nuestro caso los trasplantes se realizaron con progenitores de sangre periférica movilizados con G-CSF a dosis de 10 µg/Kg, con citaféresis al 5º día tras la movilización.

Los trasplantes con PSP presentan las siguientes ventajas, no requieren anestesia para la obtención de progenitores hematopoyéticos (PH), se consiguen más PH que mediante aspirado medular, la recuperación de la hematopoyesis se logra en menos tiempo, se pueden obtener PSP cuando su obtención de médula ósea es imposible (casos de mielofibrosis o irradiación pélvica) y por último los efectos adversos son menos frecuentes, menos intensos y de menor duración durante la recolección de PSP que con la aspiración de médula ósea.

Los cuidados y soporte se llevaron a cabo según los protocolos del servicio de hematología.

### 1.2.2 INDICACIONES DEL TRASPLANTE

Dependiendo de la enfermedad hematológica de cada paciente las indicaciones de realización de un TPH son:

- LMC en primera fase crónica, en fase acelerada o segunda fase crónica.
- LLC-B : en pacientes de hasta 50 años de edad, con factores de mal pronóstico y hermano HLA idéntico; enfermedad resistente a tratamiento previo, incluso en pacientes con más de 55 años si el acondicionamiento es no mieloablativo.
- AM severa: al diagnóstico en adultos menores de 40 años o tras fracaso del tratamiento de inmunosupresión.
- SMD: al diagnóstico en adultos menores de 55 años en caso de  $IP \geq 1.5$ .
- LAM: en pacientes menores de 60 años, si es M3 en segunda remisión completa, en el resto en primera remisión completa.

- LAL: en pacientes menores de 60 años en primera remisión completa si existen factores de alto riesgo y en segunda remisión completa o recaída incipiente.
- LNH: en pacientes menores de 60 años en primera, segunda o tercera remisión completa o recaída incipiente, dependiendo del tipo de LNH. Generalmente tras recaída, habiendo sido sometido con anterioridad a un trasplante autólogo.

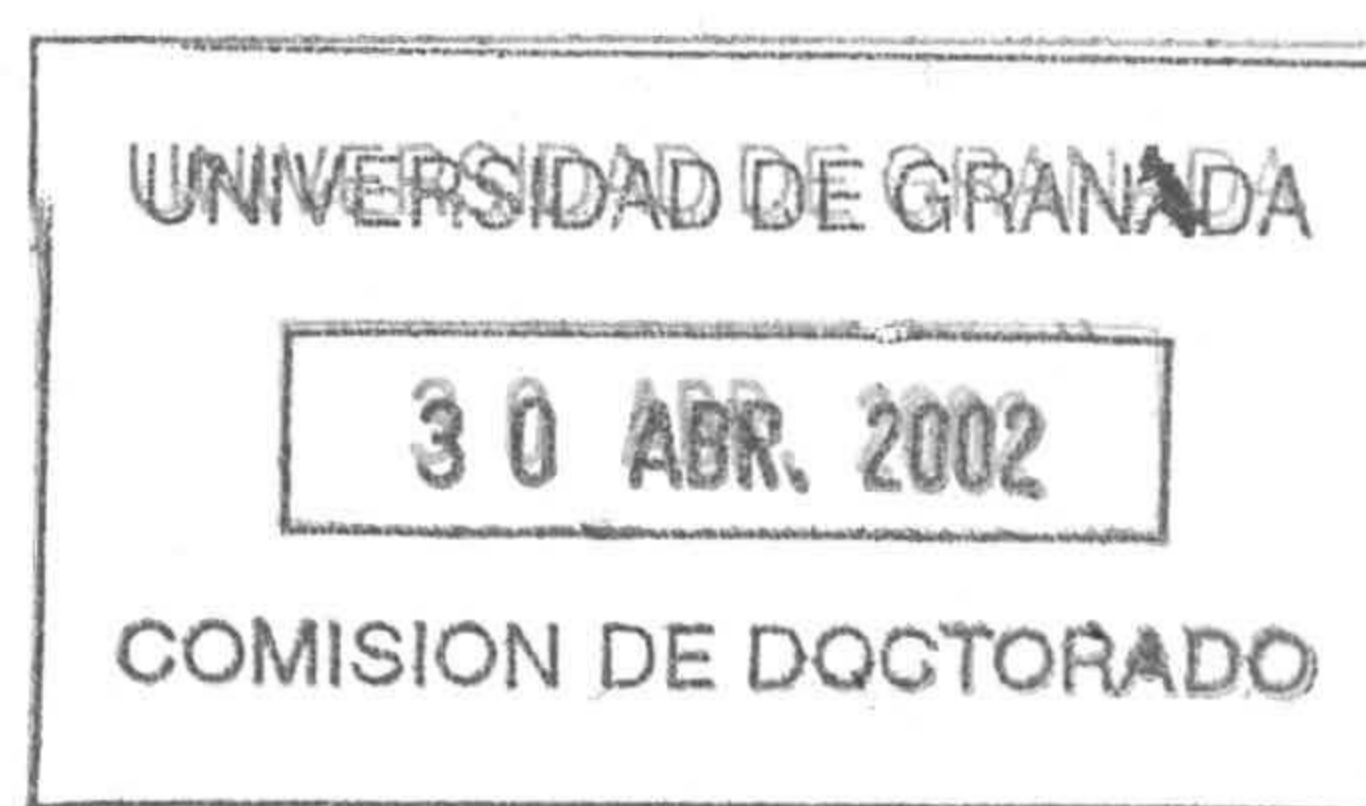
### 1.2.3 INDICACIONES DEL TIPO DE TRASPLANTE

- Menores de 45 años y buen estado clínico son candidatos a la realización de un trasplante **estándar**
- Edades superiores de 45 años
  - **Mini-trasplante:** en segundos trasplantes o en pacientes cuyo estado clínico impida la realización de un trasplante estándar (en este último caso la elección se hará independientemente de la edad)
  - **Con deplección de células T:** si existe alto riesgo de aparición de EICH, como en casos de donantes no HLA idénticos.

### 1.2.4 ACONDICIONAMIENTO

El tratamiento ideal debe ser capaz de erradicar la enfermedad, tener una morbilidad aceptable, sin mortalidad relacionada con el tratamiento y, un efecto inmunosupresor suficiente para evitar el rechazo del implante.

En nuestros pacientes el acondicionamiento dependió del tipo de trasplante llevado a cabo.



Nº	Tipo de Trasplante	Acondicionamiento
1	Selección +	ICT-CY
2	Standard	ICT-CY-VP16
3	Mini	Flu-Bu-ATG
4	Mini	Flu-Bu-ATG
5	Standard	BEAM-ATG
6	Mini	Flu-Bu-ATG
7	Mini	Flu-Bu-ATG
8	Mini	Flu-Mel-ATG
9	Mini	Flu-Mel-ATG
10	Selección +	ICT-CY
11	Standard	Bu-CY
12	Selección +	ICT-CY
13	Mini	Flu-Bu-ATG
14	Mini	Flu-Bu-ATG
15	Selección +	Cy-Mel
16	Standard	Cy-ICT
17	Standard	Bu-CY
18	Standard	CY-ATG
19	Selección +	Cy-ICT
20	Standard	Cy-ICT
21	Standard	Cy-ICT

Tabla 2: Tipo de trasplante realizado y acondicionamiento. Standard: Acondicionamiento mieloablatoivo + inóculo completo; Selección +: Acondicionamiento mieloablatoivo + inóculo con deficiencia parcial de celularidad T; Mini-trasplante: Acondicionamiento no mieloablatoivo + inóculo completo; ICT: Irradiación Corporal Total; VP16: Etopósido; CY: Ciclofosfamida; Flu: Fludarabina. Bu: Busulfan; ATG: Ganmaglobulina Antitimocito.

### 1.3 SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTE

#### 1.3.1 EICH: PROFILAXIS, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

##### 1.3.1.1 EICH AGUDA

La profilaxis se realizó con CsA (ciclosporina A) y MTX (metotrexato)

El diagnóstico se realizó valorando la afectación de los tres órganos diana, piel, intestinos e hígado:

- Piel.- las primeras manifestaciones de la EICHa son normalmente la aparición de eritemas maculopapulosos de localizados a generalizados que suelen predominar en palmas, plantas, orejas, mejillas, cuello, cara interna de los muslos, tronco y flancos. En formas más avanzadas aparecerá como descamación cutánea, formación de bullas y necrosis epidérmicas, no siendo infrecuente que se asocie a afectación mucosa.
- Hígado.- esta es la segunda afectación más frecuente, apareciendo casos de colestasis.
- Intestino.- puede aparecer en la región distal manifestándose con diarrea intensa, rectorragia, dolor cólico e íleo, o bien de forma proximal acompañada de náuseas, anorexia, vómitos e intolerancia alimentaria.

En todos los casos necesarios se realizaron biopsias tanto de piel como de intestino para la realización del diagnóstico. Entre nuestro grupo de pacientes no se realizó ninguna biopsia hepática.



La gradación de la EICHa se realizó según los parámetro clásicos: grado de afectación por órganos y gradación clínica.

Organo	Grado	Características
Piel	+	Eritema macupapuloso < 25 Superficie Corporal
	++	Eritema macupapuloso 25-50% Superficie corporal
	+++	Eritrodermia generalizada
	++++	Eritrodermia generalizada descamación y vesículas
Hígado	+	Bilirrubina, 2-3 mg/dl
	++	Bilirrubina, 3-6 mg/dl
	+++	Bilirrubina, 6-15 mg/dl
	++++	Bilirrubina, >15mg/dl
Intestino	+	Diarrea, 500-1000 ml/día o náuseas persistentes
	++	Diarrea, 1000-1500 ml/día
	+++	Diarrea, > 1500 ml/día
	++++	Dolor abdominal intenso con o sin íleo intestinal.

Tabla 4: Grado de afectación por órganos

Grado	Piel		Hígado		Intestino		AEG
Grado I	+ / ++	y	0	y	0	0	0
Grado II	+ / +++ / ++++	y	+	y / o	+	+	+
	+++ <sup>1</sup>			o	+ <sup>1,2</sup>		
Grado III	++ / ++++	y	++ / ++++	y / o	++ / ++++	++	++
Grado IV	++ / ++++ / +++++	y	++ / ++++ / +++++	y / o	++ / ++++ / +++++	+++	+++

Tabla 5: Gradación clínica

AEG: Afectación del Estado General. <sup>1</sup> Modificación de la clasificación clínica que pretende valorar la afectación aislada del intestino o piel. <sup>2</sup> EICH intestinal proximal demostrada por biopsia gástrica en ausencia de diarrea.

Tratamiento:

- 1ª Línea: PRD
- 2º Línea: ATG
- 3º Línea: FK506 (Tanolimus)
- 4º Línea: Anti CD25 (Leucotac)

## 1.3.1.2 EICH CRÓNICA

Diagnóstico, las manifestaciones clínicas valoradas que aparecen entre un 50-80% de los casos son por orden de importancia en la frecuencia de aparición:

- Cutánea: es el órgano más frecuentemente afecto junto al hígado. Las lesiones más frecuentes son similares al liquen plano, morfea, esclerodermia, eritrodermia, hiperqueratosis, descamación cutánea, hiper o hipopigmentación en áreas de presión o trauma
- Mucosa: oral (liquen plano, síndrome seco) y vaginal (síndrome seco, dispareumia, estenosis)
- Hepática: colestasis
- Ocular: síndrome seco y conjuntivitis

También aparecen casos de caquesia, alteraciones gastrointestinales, afectaciones pulmonares y neuromusculares.

Gradación

Limitada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afectación cutánea localizada y/o</li> <li>• Disfunción hepática debida a EICH</li> </ul>
Extensa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afectación cutánea extensa, o</li> <li>• Afectación limitada de piel y/o hígado más alguno de los siguientes:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Afectación ocular (test de Schirmer &lt;5mm)</li> <li>- Afectación de glándulas salivares o mucosa oral demostrada pro biopsia oral</li> <li>- Histología hepática con hepatitis crónica agresiva, puentes de necrosis o cirrosis</li> <li>- Afectación de otros órganos.</li> </ul> </li> </ul>

### 1.3.2 DIAGNÓSTICO DE RECAÍDA

Se considera que existe recaída, dependiendo de la enfermedad, cuando:

- En Leucemias agudas
  - Recaída molecular de la LMA-M3: detección del reordenamiento pml-rar $\alpha$
  - Recaída citogenética: cuando reaparece la anomalía cromosómica existente al diagnóstico al menos en dos metafases.
  - Recaída Hematológica: más de un 5% de blastos
- Leucemia Linfocítica Crónica: más de 5000 linfocitos con coexpresión CD23/CD5
- Linfoma No-Hodgkin: presencia de adenopatías de tamaño significativo
- Leucemia Mielocítica Crónica:
  - Recaída molecular: aparición del reordenamiento bcr-abl
  - Recaída citogenética: detección del cromosoma Philadelphia al menos en dos metafases
  - Recaída Hematológica: leucocitosis

Nº	Tipo de Trasplante	Profilaxis EICH	EICH Aguda	EICH Crónica	Recaída	Sm	Ea
1	Selección +	Csa	0	L*		39+	V
2	Standard	Csa- MTX	0	L	NO	37+	V
3	Mini	Csa- MTX	0	E	NO	13	E
4	Mini	Csa- PRD	II	L	14d/2m	27	E
5	Standard	Csa- MTX	III	E	4 m	12	E
6	Mini	Csa- MTX	0	L	NO	22+	V
7	Mini	Csa- MTX	0	E	NO	22+	V
8	Mini	Csa- MTX	IV	-	NO	3	E
9	Mini	Csa- MTX	III	-	2m	3	E
10	Selección +	Csa	0	-	NO	51+	V
11	Standard	Csa- PRD	I	L	NO	8	E
12	Selección +	Csa	0	No	NO	22+	V
13	Mini	Csa- MTX	0	No	NO	20+	V
14	Mini	Csa- MTX	0	No	NO	14+	V
15	Selección +	Csa	0	-	NO	3	E
16	Standard	Csa- MTX	0	No	6 m	5+	V
17	Standard	Csa- MTX	III	-	NO	2	E
18	Standard	Csa- MTX	0	E	NO	49+	V
19	Selección +	Csa	0	-	NO	1	E
20	Standard	Csa- MTX	I	-	NO	3	E
21	Standard	Csa- MTX	III	-	NO	2	E

Tabla 3: Seguimiento de los pacientes post-trasplante

\*: Aparece tras terapia alogénica con infusiones de linfocitos del donante.

L : Limitada; E: Extensa; - : No valorable; m: meses; d: días; Sm: Supervivencia en meses; Ea: Estado actual; E: Exitus; V: vivo.

El seguimiento de los pacientes se ha realizado hasta el éxitus y en los pacientes vivos hasta el 31-12-01.

### 1.3.3 PROTOCOLO DE ESTUDIO DE QUIMERISMO

Los estudios de quimeras han sido realizados:

1. Situación pre-trasplante
2. Al Implante: neutrófilos  $>500/\mu\text{l}$  y plaquetas  $> 20.000/\mu\text{l}$
3. Aproximadamente a los 90 días, momento en el que se disminuye la dosis de ciclosporina A.
4. Aproximadamente a los 180 días, momento en el que se suspende la dosis de ciclosporina A.
5. Ante la aparición de EICH aguda o crónica, o cambio clínico significativo en cualquiera de ellas.
6. Si existe fallo de implante
7. Si existe recidiva en casos de leucemia mieloide crónica para valorar la realización de una infusión de linfocitos.

## 2. PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

### 2.1 SISTEMAS DE ESTADIAJE DE LA TUMORACIÓN

- Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM) (Adaptado de Fleming y cols, 1997)

#### Estadio Tumoral (T)

- TX El tumor primario no puede ser valorado
- T0 Sin evidencia de tumor primario
- Tis Carcinoma in situ; invasión intraepitelial o de la lámina propia
- T1 El tumor invade la submucosa
- T2 El tumor invade la muscularis propia
- T3 El tumor invade toda la capa muscular hasta la subserosa
- T4 El tumor invade otros órganos o perfora el peritoneo visceral

#### Estadio Ganglionar (N)

- NX No pueden valorarse los ganglios regionales
- N0 Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales
- N1 Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
- N2 Metástasis en 4 ó más ganglios linfáticos regionales
- N3 Afectación de cualquier ganglio linfático a lo largo del denominado tronco vascular

**Estadio Metastásico (M)**

- MX No puede apreciarse la existencia de metástasis a distancia  
 M0 Sin metástasis a distancia  
 M1 Con metástasis a distancia

- Comparación del estadiaje por grupos TMN y sus equivalentes en la clasificación Dukes'/Modified Astler-Coller (Adaptado de Fleming y cols, 1997)

Agrupación TNM	Estadio TNM	Equivalencias Dukes'/MAC
Tis, N0, M0	0	Ninguno
T1, N0, M0	I	A
T2, N0, M0		B1
T3, N0, M0	II	B2
T4, N0, M0		B3
Cualquier T, N1, M0	III	C1
Cualquier T, N2, M0		C2
Cualquier T, N3, M0		C3
Cualquier T, cualquier N, M1	IV	D

**2.2 CRITERIOS CLÍNICOS DE HNPCC**

- AMSTERDAM: Al menos tres familiares con cáncer colorrectal. Deben cumplirse todos los siguientes criterios:
  - 1) Uno de ellos debe ser familiar de primer grado de los otros dos
  - 2) Al menos dos generaciones deben estar afectadas
  - 3) Al menos uno de los cánceres colorrectales debe ser diagnosticado a una edad inferior a 50 años.
  - 4) La poliposis adenomatosa familiar debe ser descartada
- AMSTERDAM II: Al menos tres familiares con cáncer asociado a HNPCC (cáncer colorrectal, endometrio, uretra, pelvis renal y small bowel? . Deben cumplirse todos los siguientes criterios:

- 1) Uno de ellos debe ser familiar de primer grado de los otros dos
- 2) Al menos dos generaciones deben estar afectadas
- 3) Al menos uno de los cánceres colorrectales debe ser diagnosticado a una edad inferior a 50 años.
- 4) La poliposis adenomatosa familiar debe ser descartada

- BETHSEDA:

- 1) Individuos con cáncer en familias que cumplen los requisitos de Amsterdam.
- 2) Individuos con dos cánceres del espectro HNPCC, incluidos cánceres colorrectales sincrónicos o metacrónicos o asociados a cánceres extracolónicos.
- 3) Individuos con cáncer colorrectal y un familiar de primer grado con cáncer colorrectal y/o cáncer extracolónico del espectro HNPCC y/o adenoma colorrectal; no de los cánceres diagnosticados a una edad menor a 45 años y el adenoma diagnosticado a una edad menor a 45 años.
- 4) Individuos con cáncer colorrectal o cáncer endometrial diagnosticado a una edad menor de 45 años.
- 5) Individuos con cánceres colorrectales en el lado derecho con un patrón histopatológico indiferenciado diagnosticado a una edad inferior a 45 años.
- 6) Individuos con adenomas diagnosticados a una edad inferior a 40 años.

(Adaptado de Terdiman y cols, 2001)

### 3 ANÁLISIS DE MARCADORES DE MICROSATÉLITE

#### 3.1 EXTRACCIÓN DE DNA

##### 3.1.1 DE SANGRE PERIFÉRICA

###### Material

- Kit de extracción de DNA Wizard® Genomic DNA de Promega
- Isopropanol (Merk)
- Etanol (Merk)

###### Método

1. Añadir a 300 $\mu$ l de sangre total 900 $\mu$ l de solución de lisis, proporcionada por el kit. Agitar suavemente y dejar 10 min en incubación a temperatura ambiente, con objeto de lisar los glóbulos rojos. Centrifugar a 13000-16000g durante 20s.
2. Eliminar el sobrenadante evitando perturbar el precipitado celular del fondo.
3. Añadir 300  $\mu$ l de solución de lisis nuclear. Ante la formación de grumos celulares incubar la mezcla a 37°C hasta la desaparición de los mismos.
4. Añadir 100 $\mu$ l de solución precipitante de proteínas, mezclar vigorosamente mediante la utilización de vortex y centrifugar a 13000-16000g durante 3 min. a temperatura ambiente.
5. Transferir el sobrenadante claro a un tubo que contenga 300 $\mu$ l de Isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar suavemente por inversión hasta que se observe la formación de la madeja de DNA.
6. Centrifugar a 13000-16000g durante 1min. Decantar el sobrenadante y añadir 300  $\mu$ l de Etanol al 70% para lavar el pellet de DNA. Centrifugar nuevamente en similares condiciones.
7. Aspirar cuidadosamente el Etanol evitando la aspiración del pellet. Invertir el tubo sobre papel secante limpio y dejar secar al aire durante 10-15 min.
8. Añadir 100 $\mu$ l de Solución de Rehidratación e incubar a 65°C durante 1h.
9. Cuantificar y conservar entre 2-8°C.

### 3.1.2 DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

#### SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES

##### Material

- Dynabeds HLA class I. (Dynall)
- Dynabeds HLA clase II. (Dynall)
- PBS
- Citrato Sódico (SIGMA)
- Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich).

##### Método

#### **Aislamiento inmunomagnético de linfocitos B**

1. Centrifugar 10 ml de sangre a 2000 r.p.m. (800-1000  $\times$ g) durante 5 min. sin interrupción.
2. Desechar el plasma y transferir la capa leucocitaria a un tubo de 10ml.



3. Añadir 5 ml de PBS, previamente enfriado, con 0.6% de citrato sódico.
4. Resuspender el producto Dynabeds HLA clase II por agitación suave. Agregar 100µl de la suspensión a la sangre enfriada.
5. Mezclar suavemente durante 10min a 2-8°C por cabeceo y rotación. No utilizar excesiva rotación que puede dañar a las células y aumentar el ruido de fondo.
6. Aislar las células HLA clase II+ aplicando a la pared externa del tubo de ensayo, un imán de tierras raras durante 2-3 min.
7. Desechar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, mientras las células «rosetadas» están unidas a la pared del tubo por la acción del imán.
8. Lavar las células aisladas HLA clase II+, 4-5 veces, separando el tubo del imán y añadiendo al resuspendido de células rosetadas 5 ml de PBS a 2-8°C (utilizar PBS con 0.6% de citrato sódico en el primer lavado). Aplicar el imán un mínimo de 30 segundos para recoger las células. Descartar el PBS mientras se mantiene el tubo adosado al imán.

#### **Aislamiento inmunomagnético de linfocitos T**

La muestra se procesa igual que en el apartado anterior pero usando Dynabeds HLA clase I.

#### **Aislamiento de la población mieloide**

1. Diluir la sangre periférica con PBS
2. Añadir suavemente la sangre, dejando que resbale por las paredes del tubo, con una pipeta Pasteur sobre 4 ml de Histopaque-1077.
3. Centrifugar a 2500 r.p.m. durante 20 min.
4. Recoger la capa celular que se sitúa sobre los hematíes
5. Lavar con PBS

#### **EXTRACCIÓN DEL DNA**

##### **Material**

- Buffer de Extracción:

1ml de TrisHCL 1 M, pH 7.5

2 ml de 0.5 M EDTA

1ml de NaCl 5M (Sigma)

10 ml de 20% SDS (MERK)

86 ml de H<sub>2</sub>O

- Columnas Centricon 100. (Amicon millipore)
- TE: Tris HCl 10mM pH8 + EDTA 1mM pH8. (Merk)
- Fenol (Merk)
- Fenol-Sevag (Merk)
- Sevag: Cloroformo:Alcohol isoamílico 24:1 (Merk)

#### Método

1. Añadir 0.5 ml de Buffer de Digestión y 30  $\mu$ l de Proteinasa K a 100  $\mu$ l de la muestra
2. Dejar incubando a 56°C como mínimo hora y media.
3. Tras la incubación añadir 0.5 ml de fenol, agitar (vortex) hasta que se forme una emulsión y centrifugar a máxima velocidad (10.000-15.000g) 3-5 min a temperatura ambiente para separar las dos fases. Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo autoclavado. Repetir el proceso de extracción, una segunda vez con fenol-sevag y una última con sevag.
4. Pipetear la fase acuosa (aproximadamente 0.5 ml) del último paso de la extracción en el reservorio superior del Centricon 100 y añadir 1.5 ml de Buffer TE. Centrifugar a 1000g a temperatura ambiente por 20 minutos. La muestra de DNA permanecerá concentrada en 15-50 $\mu$ l de TE buffer en el fondo del reservorio superior del Centricon 100, mientras las moléculas con pesos inferiores a 100.000 daltons pasarán a través del filtro. Eliminar el efluente del reservorio inferior y repetir el lavado y centrifugado otras dos veces añadiendo 2ml de Buffer TE al reservorio superior.
5. Después del último lavado, recoger los aproximadamente 15-50  $\mu$ l de concentrado de DNA invirtiendo el reservorio superior en el tubo proporcionado por el sistema y centrifugar a 500g por 2 minutos.
6. Cuantificar e identificar el DNA. Conservar a 2-6°C o congelar a -15 o -25°C hasta su utilización.

#### 3.1.3 DE PIEZA TUMORAL SIN MICRODISECCIÓN

##### Material

- Buffer de Extracción: 10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl y 2 mM EDTA. (Merck)
- Proteinasa K (Roche)

- Dodecil sulfato sódico (SDS) 10%. (Merk)
- Fenol (Merk)
- Sevag: Cloroformo:Alcohol isoamílico 24:1
- NaCl 5M (Sigma)
- Etanol puro (Merk)

#### Método

1. - Disgregar el tejido tumoral, congelado en nitrógeno líquido, en un mortero enfriado a su vez con nitrógeno líquido
2. - En un tubo universal de 50 ml añadir a la muestra: 5 ml de buffer de extracción, 100µl de Proteinasa K y 250 µl de SDS 10%. Introducir en un baño a 56°C durante 24h.
3. - Añadir 10 ml de Fenol, agitar y centrifugar durante 10 min a 2500 r.p.m. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
4. - Añadir 10 ml de SEVAG, agitar centrifugar 10 min a 2500 r.p.m. y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
5. - Añadir 800 µl de NaCl 5M y volúmenes iguales de Etanol frío
6. - Recoger la medusa de DNA que se forma con la ayuda de una pipeta pasteur de cristal estéril y lavarla en Etanol al 70%.
7. - Diluir la medusa en TE y conservar a 4°C hasta su utilización.

#### 3.1.4 DE PIEZA TUMORAL TRAS MICRODISECCIÓN

##### Microdissección

##### Material

- Cortes del tumor primario criopreservados
- azul de toluidina al 0.05%
- Microscopio estereoscópico (Leica Mdelo MA5, Haerbrugg).
- Agujas de Tungsteno (0.5 mm de diámetro, Fine Sciencie Tools)
- Micromanipulador (Leica Modelo M).

##### Método:

- Cubrir los cortes criostáticos de tejido tumoral, de un grosor entre 4 y 8 µm y almacenados en cristales portaobjetos a -40 °C, con una solución de azul de toluidina al 0.05% durante aproximadamente 60 segundos. Esta tinción permite

distinguir las estructuras del corte criostático y poder seleccionar las células tumorales para separarlas del resto.

- Tras la tinción lavar y cubrir el corte con agua bidestilada. Realizar la microdissección en el aparato manual LEICA MS 5 de Heerbrugg. Utilizar agujas de tungsteno (0.5 mm de diámetro, Fine Science Tools) que previamente tratadas durante dos horas a electrolisis en solución de potasa al 0.1% para eliminar todo material contaminante y para conseguir su afilado.
- Recuperar las células tumorales mediante pipetas automáticas de punta desechable. Para evitar que el tejido tumoral quede adherido a la cara interna y borde de la punta de la pipeta, estas puntas se tratan previamente con una solución de silicona (Sigmacote, Sigma). Trasladar el líquido aspirado por la pipeta con el microdisectado en suspensión a un tubo de centrifuga; esta operación se realiza tantas veces como sea necesario hasta obtener una cantidad suficiente de partida para la extracción del DNA.
- El mismo proceso se realizará para conseguir tejido estromático en los casos que esto sea posible. Tras realizar la microdissección, puede congelarse el resultado a  $-40^{\circ}\text{C}$  o continuar el proceso de extracción de ADN
- Reducción del volumen de agua obtenido. Al aspirar cada porción de microdisectado se pueden tomar unos 5  $\mu\text{l}$  de líquido, por lo que al repetir esta operación podemos llegar a tener un volumen tal que diluya los reactivos de la extracción de DNA. Para reducir este volumen se lleva el tubo a centrifuga de vacío, manteniéndose el tiempo necesario para que el volumen de la muestra no interfiera en la extracción. Como el DNA es resistente, puede aplicarse vacío intenso y calor para conseguir reducir volúmenes de 100  $\mu\text{l}$  o más. El volumen final será de unos 10  $\mu\text{l}$ .

#### **Extracción de ADN del microdisectado**

Material:

- Kit QIAmp DNA minikit, QUIAGEN

Método:

- Añadir 90  $\mu\text{l}$  de buffer ATL y 10  $\mu\text{l}$  de proteinasa K. Homogeneizar dando un pulso de agitación de unos 15 segundos en vortex. Incubar a  $56^{\circ}\text{C}$  por espacio de 3 horas y centrifugar

- Añadir 100  $\mu$ l de buffer AL, pulso de 15 segundos. Incubar a 70°C por espacio de 10 minutos. Centrifugado breve.
- Adicionar 100 $\mu$ l de etanol de calidad HPLC, pulso de 15 segundos y centrifugado breve para recuperar pequeñas gotas formadas.
- El contenido se pasa a la columna, se cierra y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Pasar la columna a otro tubo y añadir 250 $\mu$ l de buffer Aw1. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Pasar la columna a otro tubo y añadir 250  $\mu$ l Aw2. Centrifugado a 14000 rpm durante 3 minutos.
- Pasar la columna a otro tubo y añadir 60  $\mu$ l de agua destilada o buffer AE. Se deja incubar 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto. El tiempo de incubación puede prolongarse hasta 5', con lo cual puede mejorarse la cantidad de DNA extraído.
- Es mejor utilizar agua destilada que el buffer AE, ya que así podremos añadir mayor cantidad de DNA para la PCR pues podremos añadir hasta completar el volumen total, poniéndolo en lugar del agua destilada. Si usásemos el tampón AE no podríamos hacerlo porque añadiríamos más sales y alteraríamos las condiciones de reacción de la PCR.
- Alicuotar el producto obtenido tras la centrifugación. Las alícuotas que no vayan a utilizarse pueden congelarse a -40°C para su conservación.

### 3.2 REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

#### 3.2.1 SENCILLA: INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

##### Materiales

- Taq Buffer con Mg (Roche)
- Enzima Taq DNA polimerasa. (Roche)
- Primers: síntesis comercial de PE Applied Biosystem
- DNTPs

	Secuencia	T <sup>a</sup>	Marcaje
BAT 26 FW1	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC	50°C	TET
BAT 26 BW	AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	50°C	
BAT 40 FW2	ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC	45°C	TET
BAT 40 BW	GTA GAG CAA GAC CAC CTT G	45°C	
BAX FW3	ATC CAG GAT CGA GCA GGG CG	55°C	FAM
BAX BW	ACT CGC TCA GCT TCT TGG TG	55°C	
TGFBRII FW4	AAG CTC CCC TAC CAT GAC T	50°C	FAM
TGFBRII BW	TGC ACT CAT CAG AGC TAC AG	50°C	

1.2.3 y 4. Yamamoto H y cols, 1997.

#### Método

- 1- Se prepara una mezcla de reacción independiente para cada pareja de primers, a un volumen final de 50  $\mu$ l, conteniendo 300 ng de DNA, 30 pmol de cada oligonucleótido, 5  $\mu$ l de una mezcla de los cuatro dNTPs 10mM, 5  $\mu$ l de buffer con Mg y una unidad de Taq Polimerasa.
- 2- Se someten a los siguientes protocolos de amplificación en un ciclador GeneAmp 9600 de Perkin-Elmer:

#### BAT 26 y TGF $\beta$ RII

	35 CICLOS					
95°C	94°C	50°C	72°C	72°C	4°C	
5min	1min	1min	1min	10min	:	

#### BAX

	35 CICLOS					
95°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C	
5min	1min	1min	1min	10min	:	

### 3.4.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Los patrones de inestabilidad dependen del tipo de microsatélite:

BAT 26 y BAT 40: aparición de alelos con un tamaño menor al tamaño de los alelos de tejido normal.

BAX (G8): pérdida o ganancia de una base, pasando a ser G7 o G9.

TGF $\beta$ RII: pérdida de una o varias bases.

## 4 INMUNOFENOTIPAJE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

### 4.1 ESTUDIO DE LOS MARCADORES LEUCÉMICOS

#### 4.1.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

##### Materiales

- Anticuerpos monoclonales fluorescentes. (Becton Dickinson)
- Solución de Lisis (Ortho)

##### Método

- 1- Los marcadores monoclonales se utilizan por parejas, uno de ellos marcado con FITC y otro con PE. Añadir 3.5  $\mu$ l de cada marcador monoclonal a 30 $\mu$ l de sangre periférica o 10 $\mu$ l de médula ósea. Mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 20min a temperatura ambiente
- 2- Añadir aproximadamente 1 ml de solución de lisis, mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3- Introducir las muestras en el citómetro.

#### 4.1.2 ANÁLISIS

Utilizaremos una representación de puntos o escategrama, donde se enfrentan dos señales, la dispersión hacia delante y la fluorescencia. Cada punto representa una célula específica que muestra su tamaño y la fluorescencia asociada.

Paneles de marcadores utilizados:

- Leucemias Agudas: CD 45, CD 14, CD 15, CD 34, CD 33, CD 13, DR, CD 2, CD7, CD19, CD3, CD 10, CD 103, FMC-7
- Leucemias crónicas: CD 45, CD 14, CD 3, CD 19, CD 4, CD 8, CD 56/16, DR, CD 20, CD5, CD7, CD2, CD 22, CD 23
- Linfomas: CD 45, CD 14, CD 3, CD 19, CD 4, CD 8, CD 56/16, DR, CD7, CD2, CD 25, CD 11c, CD 20, CD5

## 4.2 ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE TCR

### 4.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Materiales

- Anticuerpos monoclonales fluorescentes.
- Solución de Lisis (Ortho)

Método

- 1- Preparar ocho tubos que contengan 3.5  $\mu$ l de marcador monoclonal CD4 y otros ocho con CD8. Añadir a cada tubo 3.5  $\mu$ l del trio de marcadores monoclonales de las familias V $\beta$  correspondientes, marcadas con fluorescencia PE, FITC y PE/FITC, y 30 $\mu$ l de sangre periférica o 10 $\mu$ l de médula ósea. Mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 20min a temperatura ambiente.
- 2- Añadir aproximadamente 1 ml de solución de lisis, mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3- Introducir las muestras en el citómetro.

### 4.2.2 ANÁLISIS

Una vez seleccionada la población de interés CD4 o CD8, se analiza el escategrama, las tres familias analizadas en cada caso se colocarán en los cuadrantes UL (arriba-izquierda), UR (arriba-derecha) y LR (abajo-derecha).



**BAT 40**

35 CICLOS					
95°C	94°C	45°C	72°C	72°C	4°C
5min	1min	1min	1min	10min	:

**3.2.2 MULTIPLEX: QUIMERISMO MEDULAR****Material**

- Mezcla de reacción AmpFISTR Profiler Plus (Applied Biosystems)
- Mezcla de primers AmpFISTR Profiler Plus (Applied Biosystems)
- DNA Polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)
- Ciclador GeneAmp 9600 de Perkin-Elmer

Microsatélite	Cromosoma	Secuencia de repetición	Tamaño pb	Marcador
D3S1358	3p	TCTA(TCTG) <sub>1-3</sub> (TCTA) <sub>n</sub>	114-142	5-FAM
Vwa	12p12-pter	TCTA(TCTG) <sub>3-4</sub> (TCTA) <sub>n</sub>	157-197	5-FAM
Fga	4q28	(TTTC) <sub>3</sub> TTTT TTCT (CTTT) <sub>n</sub> CTCC (TTCC) <sub>2</sub>	219-267	5-FAM
Amelogenina	X: p22.1-22.3	-	107	JOE
D8S1179	Y: p11.2	-	113	
D21S11	8	(TCTA) <sub>n</sub> / (TCTG) <sub>n</sub>	128-168	JOE
D18S51	21	(TCTA) <sub>n</sub> (TCTG) <sub>n</sub> [(TCTA) <sub>3</sub> TA(TCTA) <sub>3</sub> TCA(TCTA) <sub>2</sub> TCCA TA] (TCTA) <sub>n</sub>	189-243	JOE
D5S818	18q21.3	(AGAA) <sub>n</sub>	273-341	JOE
D13S317	5q21-31	(AGAT) <sub>n</sub>	135-171	NED
D7S820	13q22-31	(GATA) <sub>n</sub>	206-234	NED
	7q11.21-22	(GATA) <sub>n</sub>	258-294	NED

**Método**

1- Añadir los siguientes volúmenes de reactivos en un tubo de microcentrífuga de

1.5 ml:

Nº de muestras × 11.5µl de la mezcla de reacción

Nº de muestras × 5.5µl de mezcla de primers

Nº de muestras × 0.5µl de AmpliTaq Gold DNA Polimerasa

- 2- Añadir 15µl de dicha mezcla en cada tubo de PCR de 0.2ml de paredes finas, con tapa, marcados previamente.
- 3- Incorporar 10µl de dilución de los DNAs de concentración 0.05-0.125 ng/µl.
- 4- Introducir los tubos en un ciclador GeneAmp 9600 de Perkin-Elmer y empezar el programa:

	28 CICLOS					
95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	25°C	
11min	1min	1min	1min	45min	:	

### 3.3 ELECTROFORESIS CAPILAR

#### Fundamento

La incorporación de primers y estándares marcados fluorescentemente permite la detección con láser de los productos de PCR. Las moléculas absorberán la energía luminosa emitida por un laser y la reemitirán a distintas longitudes de onda específicas de cada fluorocromo. Las diferentes longitudes de onda son interpretadas por el software del ordenador y se muestran como distintos colores a tiempo real. De esto modo es posible analizar hasta veinte microsatélites en una misma línea. Los tamaños de los alelos son asignados por el programa informático en referencia a un estándar interno marcado en un color único y distinto del resto. Debe sólo asegurarse que los diferentes fragmentos no se solapen en tamaño y color de marcaje.

#### Material

- Formamida desionizada (Amresco)
- Estándar de peso molecular GeneScan-500[ROX] (Applied Biosystems)
- Secuenciador ABI PRISM 310

### Método

#### 1- Preparar la mezcla de análisis:

Nº de muestras × 24µl de formamida desionizada

Nº de muestras × 1µl de estandar GeneScan-500[ROX]

#### 2- En un tubo del secuenciador añadir 25µl de la mezcla de análisis y 1.5µl del producto de PCR.

#### 3- Tapar los tubos y proceder a su desnaturalización calentándolos durante tres minutos a 95°C en un ciclador e introducirlos posteriormente en hielo durante al menos tres minutos.

#### 4- Introducir las muestras en el secuenciador ABI PRISM 310, utilizando la resina POP-4.

### 3.4 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los datos obtenidos por el instrumento ABI PRISM se analizarán mediante el programa informático Gene Scan que asignará un tamaño y cuantificará los fragmentos detectados creando una serie de archivos. Los datos de dichos archivos serán reanalizados mediante el programa Genotyper. Este último identifica los fragmentos mostrándolos como picos etiquetados caracterizándolos con histogramas, tablas y estadísticas que correlacionan los picos y la información de los marcadores.

#### 3.4.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL QUIMERISMO

Se comparan los perfiles alélicos del donante y del receptor en las situaciones de pretrasplante y post-trasplante, definiéndose tres situaciones:

Quimera total, cuando la celularidad en el paciente transplantado es idéntica a la del donante

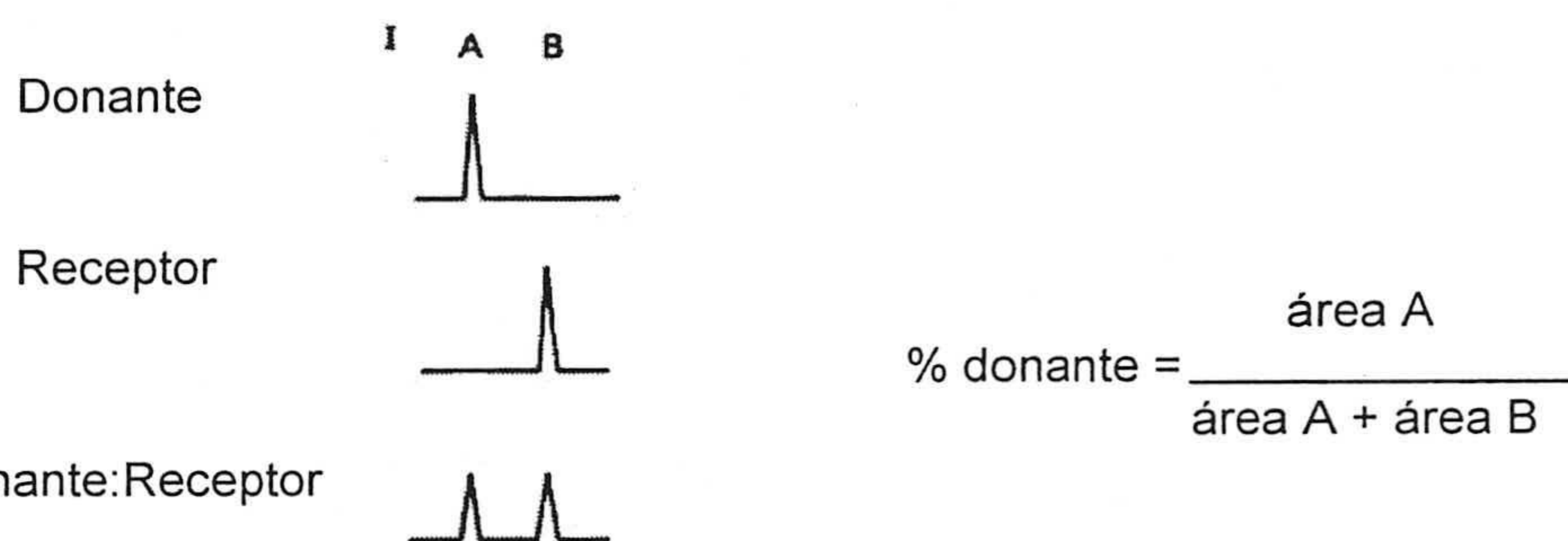
Quimera mixta, cuando coexisten la celularidad del donante y del receptor en distintas proporciones. Consideraremos quimera mixta cuando exista más de un 1% de celularidad del donante.

Ausencia de quimera, cuando la celularidad es la del receptor

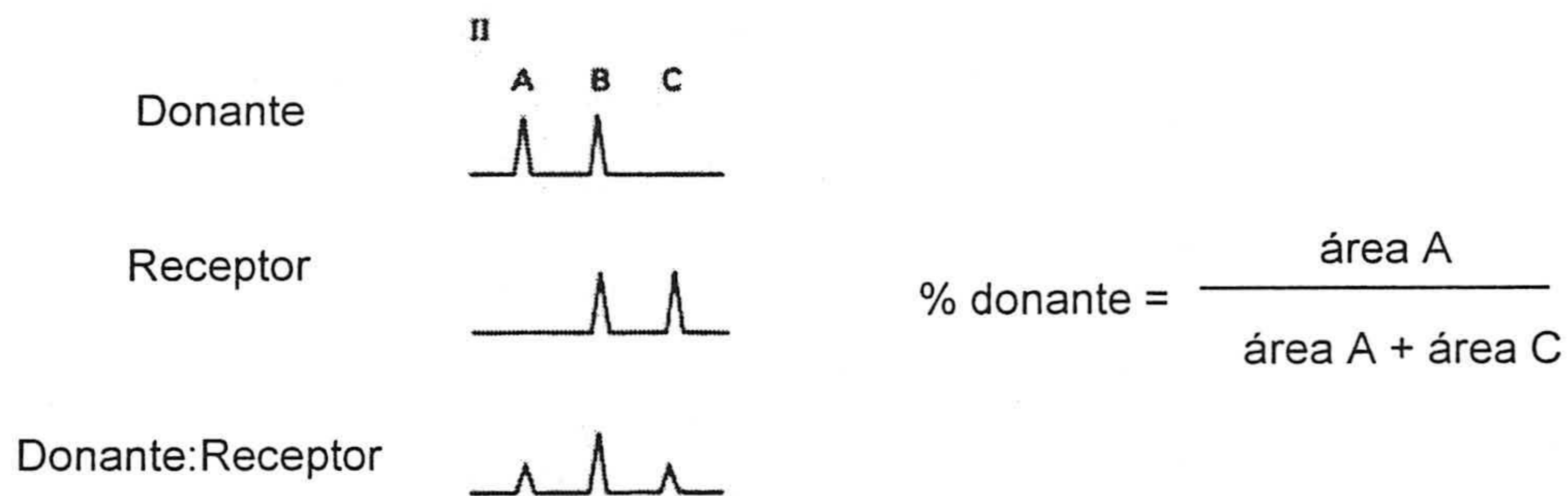
La cuantificación de la Quimera Mixta se realizó asumiendo que el DNA presente en la muestra refleja el contenido celular y que los alelos del donante y del receptor amplifican

en igual medida. El tanto por ciento de quimera será la proporción de las áreas de los picos que corresponden a los marcadores del donante comparadas a la suma de las áreas de los picos de los marcadores del donante y del receptor. Dependiendo del patrón de marcadores la fórmula utilizada fue:

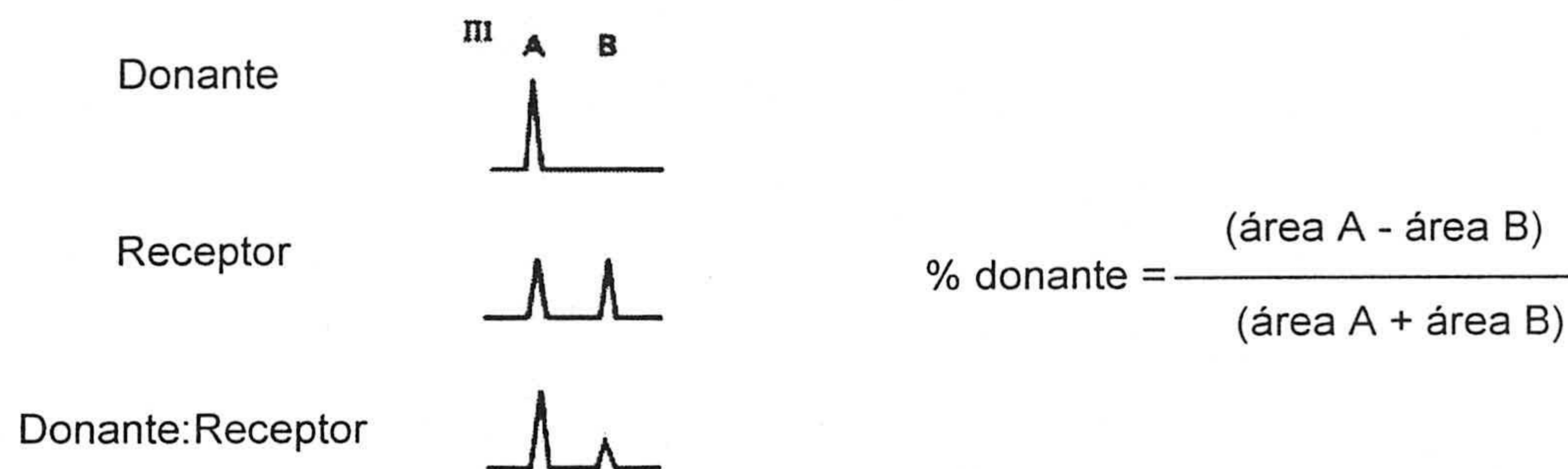
I. Donante y receptor no comparten ningún marcador



II. Donante y Receptor heterocigotos para los marcadores informativos y comparten un alelo



III. Donante homocigoto y Receptor heterocigoto (o viceversa) compartiendo un alelo del marcador informativo



### 3.4.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Los patrones de inestabilidad dependen del tipo de microsatélite:

BAT 26 y BAT 40: aparición de alelos con un tamaño menor al tamaño de los alelos de tejido normal.

BAX (G8): pérdida o ganancia de una base, pasando a ser G7 o G9.

TGF $\beta$ RII: pérdida de una o varias bases.

## 4 INMUNOFENOTIPAJE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

### 4.1 ESTUDIO DE LOS MARCADORES LEUCÉMICOS

#### 4.1.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

##### Materiales

- Anticuerpos monoclonales fluorescentes. (Becton Dickinson)
- Solución de Lisis (Ortho)

##### Método

- 1- Los marcadores monoclonales se utilizan por parejas, uno de ellos marcado con FITC y otro con PE. Añadir 3.5  $\mu$ l de cada marcador monoclonal a 30 $\mu$ l de sangre periférica o 10 $\mu$ l de médula ósea. Mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 20min a temperatura ambiente
- 2- Añadir aproximadamente 1 ml de solución de lisis, mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3- Introducir las muestras en el citómetro.

#### 4.1.2 ANÁLISIS

Utilizaremos una representación de puntos o escategrama, donde se enfrentan dos señales, la dispersión hacia delante y la fluorescencia. Cada punto representa una célula específica que muestra su tamaño y la fluorescencia asociada.

Paneles de marcadores utilizados:

- Leucemias Agudas: CD 45, CD 14, CD 15, CD 34, CD 33, CD 13, DR, CD 2, CD7, CD19, CD3, CD 10, CD 103, FMC-7
- Leucemias crónicas: CD 45, CD 14, CD 3, CD 19, CD 4, CD 8, CD 56/16, DR, CD 20, CD5, CD7, CD2, CD 22, CD 23
- Linfomas: CD 45, CD 14, CD 3, CD 19, CD 4, CD 8, CD 56/16, DR, CD7, CD2, CD 25, CD 11c, CD 20, CD5

## 4.2 ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE TCR

### 4.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Materiales

- Anticuerpos monoclonales fluorescentes.
- Solución de Lisis (Ortho)

Método

- 1- Preparar ocho tubos que contengan 3.5  $\mu$ l de marcador monoclonal CD4 y otros ocho con CD8. Añadir a cada tubo 3.5  $\mu$ l del trio de marcadores monoclonales de las familias V $\beta$  correspondientes, marcadas con fluorescencia PE, FITC y PE/FITC, y 30 $\mu$ l de sangre periférica o 10 $\mu$ l de médula ósea. Mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 20min a temperatura ambiente.
- 2- Añadir aproximadamente 1 ml de solución de lisis, mezclar homogéneamente mediante agitación e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3- Introducir las muestras en el citómetro.

### 4.2.2 ANÁLISIS

Una vez seleccionada la población de interés CD4 o CD8, se analiza el escategrama, las tres familias analizadas en cada caso se colocarán en los cuadrantes UL (arriba-izquierda), UR (arriba-derecha) y LR (abajo-derecha).

## 5 ESTUDIO DE LA REGIÓN CDR3 DEL TCR MEDIANTE RT-PCR

En la obtención del ARN no se realizó una separación de poblaciones CD4+ y CD8+ debido al pequeño número de células del que se disponía en determinados pacientes, añadiendo a esta razón las pérdidas adicionales asociadas a cualquier proceso de separación.

### 5.1 EXTRACCIÓN DE ARN

#### Materiales

- Solución desnaturizante
- $\beta$ -Mercaptoetanol
- Etanol (Merk)
- Acetato Sódico 2M
- Fenol
- Cloroformo-isoamílico
- Agua DEPC

#### Método

- Colocar cuatro tubos Eppendorf en una bandeja con hielo, añadir:
  - 200  $\mu$ l de muestra
  - 500  $\mu$ l de solución desnaturizante
  - 3,6  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol
  - 50  $\mu$ l de Acetato Sódico 2M
  - 500  $\mu$ l de fenol
  - 100  $\mu$ l de Cloroformo-isoamílico
- Agitar y centrifugar durante 15 min a 15 r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, evitando tocar la interfase y añadir un volumen igual de isopropanol, mezclar y centrifugar durante 20 min a r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C
- Decantar el sobrenadante. Añadir 1 ml de etanol al 75% con DEPC y centrifugar 15 min a 15 r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C
- Retirar el sobrenadante completamente. Secar a T<sup>a</sup> ambiente y resuspender con 10-15  $\mu$ l de agua DEPC.
- Chequear el RNA en un gel de agarosa al 1% y cuantificar en un espectrofotómetro a 260 nm.
- Almacenar a -80°C hasta su utilización.

## 5.2 SÍNTESIS DE cDNA

### Materiales

- $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Promega)
- Buffer 10 $\times$  (Promega)
- dNTPs 10 $\times$  (Promega)
- Rnasin (Promega)
- Oligo dt (Promega)
- Agua libre de RNasa

### Método

- Preparar la mezcla de PCR :
  - Nº de muestras  $\times$  4  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$
  - Nº de muestras  $\times$  2 $\mu\text{l}$  de Buffer 10 $\times$
  - Nº de muestras  $\times$  2 $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 $\times$
  - Nº de muestras  $\times$  0.5  $\mu\text{l}$  de RNasin
  - Nº de muestras  $\times$  2 $\mu\text{l}$  de oligo dt
  - Nº de muestras  $\times$  H<sub>2</sub>O hasta 20 $\mu\text{l}$
- Añadir el volumen adecuado de la mezcla a 1-2  $\mu\text{g}$  de RNA hasta un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ .
- Introducir en el ciclador

Protocolo de RT-PCR	
42°C	95°C
20min	5min

- Tras el programa de PCR introducir las muestras en hielo durante 5 min y posteriormente llevar a un volumen de 100 $\mu\text{l}$  con agua libre de RNasa. Se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.



### 5.3 AMPLIFICACIÓN DE $\beta$ -ACTINA

#### Materiales

- Kit LightCycler- FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)
- Light-cycler (Roche)
- Primers

CHO15 Fw	5'- GGC ATC GTG ATG GAC TCC G -3'
CHO16 Bw	5'- GCT GGA AGG TGG ACA GCG A-3'

#### Método

- Añadir 60 $\mu$ l de Light-Cycler-FastStart Reaccion Mix SYBR Green I a la enzima Light-Cycler FastStart. Mezclar suavemente.
- Preparar la mezcla de reacción con un volumen final de 10 $\mu$ l :  
 N° de muestras  $\times$  5.8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril  
 N° de muestras  $\times$  1.2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (4mM)  
 N° de muestras  $\times$  1 $\mu$ l de Primers (0.5  $\mu$ M, cada uno)  
 N° de muestras  $\times$  1  $\mu$ l de LyghtCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I
- Pipetear en cada capilar, previamente enfriado, 9  $\mu$ l de mezcla de reacción y 1  $\mu$ l de DNA (concentración final 10 ng/ $\mu$ l). Centrifugar durante 30s a 700g.
- Colocar los capilares en el rotor del Light-Cycler y proceder con el programa:

	40 CICLOS					
95°C	93 °C	65 °C	72 °C	65 °C	40 °C	
8 min	15 s	5 s	40 s	15 s	30 s	

#### Interpretación de los resultados

El SYBR Green es un marcador fluorescente específico para DNA de doble cadena. Durante las distintas fases de la reacción de PCR se une al amplificado permitiendo la detección del mismo, de modo instantáneo, al observarse un aumento de la fluorescencia según la reacción progresa. Tras la detección de la señal fluorescente mediante un fluorímetro de tres canales el instrumento obtiene la curva de melting mediante la

## 5 ESTUDIO DE LA REGIÓN CDR3 DEL TCR MEDIANTE RT-PCR

En la obtención del ARN no se realizó una separación de poblaciones CD4+ y CD8+ debido al pequeño número de células del que se disponía en determinados pacientes, añadiendo a esta razón las pérdidas adicionales asociadas a cualquier proceso de separación.

### 5.1 EXTRACCIÓN DE ARN

#### Materiales

- Solución desnaturalizante
- $\beta$ -Mercaptoetanol
- Etanol (Merk)
- Acetato Sódico 2M
- Fenol
- Cloroformo-isoamílico
- Agua DEPC

#### Método

- Colocar cuatro tubos Eppendorf en una bandeja con hielo, añadir:
  - 200  $\mu$ l de muestra
  - 500  $\mu$ l de solución desnaturalizante
  - 3,6  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol
  - 50  $\mu$ l de Acetato Sódico 2M
  - 500  $\mu$ l de fenol
  - 100  $\mu$ l de Cloroformo-isoamílico
- Agitar y centrifugar durante 15 min a 15 r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, evitando tocar la interfase y añadir un volumen igual de isopropanol, mezclar y centrifugar durante 20 min a r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C
- Decantar el sobrenadante. Añadir 1 ml de etanol al 75% con DEPC y centrifugar 15 min a 15 r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C
- Retirar el sobrenadante completamente. Secar a T<sup>a</sup> ambiente y resuspender con 10-15  $\mu$ l de agua DEPC.
- Chequear el RNA en un gel de agarosa al 1% y cuantificar en un espectrofotómetro a 260 nm.
- Almacenar a -80°C hasta su utilización.

## 5.2 SÍNTESIS DE cDNA

### Materiales

- $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Promega)
- Buffer 10 $\times$  (Promega)
- dNTPs 10 $\times$  (Promega)
- Rnasin (Promega)
- Oligo dt (Promega)
- Agua libre de RNasa

### Método

- Preparar la mezcla de PCR :
  - Nº de muestras  $\times$  4  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$
  - Nº de muestras  $\times$  2 $\mu\text{l}$  de Buffer 10 $\times$
  - Nº de muestras  $\times$  2 $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 $\times$
  - Nº de muestras  $\times$  0.5  $\mu\text{l}$  de RNasin
  - Nº de muestras  $\times$  2 $\mu\text{l}$  de oligo dt
  - Nº de muestras  $\times$  H<sub>2</sub>O hasta 20 $\mu\text{l}$
- Añadir el volumen adecuado de la mezcla a 1-2  $\mu\text{g}$  de RNA hasta un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ .
- Introducir en el ciclador

Protocolo de RT-PCR	
42°C	95°C
20min	5min

- Tras el programa de PCR introducir las muestras en hielo durante 5 min y posteriormente llevar a un volumen de 100 $\mu\text{l}$  con agua libre de RNasa. Se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### 5.3 AMPLIFICACIÓN DE $\beta$ -ACTINA

#### Materiales

- Kit LightCycler- FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)
- Light-cycler (Roche)
- Primers

CHO15 Fw	5'- GGC ATC GTG ATG GAC TCC G -3'
CHO16 Bw	5'- GCT GGA AGG TGG ACA GCG A-3'

#### Método

- Añadir 60 $\mu$ l de Light-Cycler-FastStart Reaccion Mix SYBR Green I a la enzima Light-Cycler FastStart. Mezclar suavemente.
- Preparar la mezcla de reacción con un volumen final de 10 $\mu$ l :  
 N° de muestras  $\times$  5.8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril  
 N° de muestras  $\times$  1.2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (4mM)  
 N° de muestras  $\times$  1 $\mu$ l de Primers (0.5  $\mu$ M, cada uno)  
 N° de muestras  $\times$  1  $\mu$ l de LyghtCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I
- Pipetear en cada capilar, previamente enfriado, 9  $\mu$ l de mezcla de reacción y 1  $\mu$ l de DNA (concentración final 10 ng/ $\mu$ l). Centrifugar durante 30s a 700g.
- Colocar los capilares en el rotor del Light-Cycler y proceder con el programa:

40 CICLOS					
95°C	93 °C	65 °C	72 °C	65 °C	40 °C
8 min	15 s	5 s	40 s	15 s	30 s

#### Interpretación de los resultados

El SYBR Green es un marcador fluorescente específico para DNA de doble cadena. Durante las distintas fases de la reacción de PCR se une al amplificado permitiendo la detección del mismo, de modo instantáneo, al observarse un aumento de la fluorescencia según la reacción progresa. Tras la detección de la señal fluorescente mediante un fluorímetro de tres canales el instrumento obtiene la curva de melting mediante la

monitorización del perfil de desnaturalización de los productos de PCR en presencia del marcaje de SYBRGreen. Para ello se adiciona un ciclo de fusión que consta de tres pasos: una rápida desnaturalización, un corto hold al óptimo de temperatura de annealing y una lenta desnaturalización. Durante este último paso la fluorescencia se mide continuamente para generar una curva de fusión de alta resolución. Esta curva determina la temperatura de fusión del producto que será característica del contenido GC, tamaño y secuencia pudiendo pues ser utilizada como identificación del producto. El programa informático del instrumento diferenciará automáticamente los datos de la curva y los presentará como picos. La  $\beta$ -actina se fusiona a una mayor temperatura que los primers dimers.

La combinación del marcaje y del análisis de la curva de Melting permite aumentar considerablemente la especificidad y sensibilidad de la reacción de amplificación en relación con métodos de detección y cuantificación clásicos como el chequeo en gel de agarosa.

El análisis de la curva de melting se realiza mediante un ajuste polinómico más background al ser este más robusto que el linear y compensar los efectos no específicos de la temperatura sobre la fluorescencia.

#### 5.4 REACCIÓN DE PCR

##### Materiales

- T-Cell Receptor 5'V $\beta$  Primers (Becton Dickinson)
- Primer fluorescente 3'V $\beta$  (Applied Biosystems)
- dNTPs
- Buffer con Mg<sup>2+</sup> 10  $\times$  (Roche)
- Taq DNA polimerasa (Roche)
- Primers

Primer	Secuencia
V $\beta$ 5'-primers	
V $\beta$ 1	5'-GCACAACAGTTCCTGACTTGAC-3'
V $\beta$ 2	5'-TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT-3'
V $\beta$ 3	5'-GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC-3'
V $\beta$ 4	5'-ACGATCCAGTGTCAAGTCGAT-3'
V $\beta$ 5.1	5'-ATACTTCAGTGAGACACAGAGA-3'
V $\beta$ 5.2	5'-TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG-3'
V $\beta$ 6	5'-AGGCCTGAGGGATCCGTCTC-3'
V $\beta$ 7	5'-CCTGAATGCCCAACAGCTCTC-3'
V $\beta$ 8	5'-ACTTTAACAACAACGTTCCGA-3'
V $\beta$ 9	5'-CTAAATCTCCAGACAAACGTCAC-3'
V $\beta$ 10	5'TCCAAAACTCATCCTGTACCT-3'
V $\beta$ 11	5'-TGTTCTCAAACCATGGGCCATGAC-3'
V $\beta$ 12	5'-GATACTGACAAAGGAGAAGTCTCAGAT-3'
V $\beta$ 13	5'-CTGCAGTGTGCCCAGGAT-3'
V $\beta$ 14	5'-ACCCAAGATACCTCATCACAG-3'
V $\beta$ 15	5'-AGTGTCTCTCGACAGGCACAG-3'
V $\beta$ 16	5'-GACCCAATTTCTGGACATGAT-3'
V $\beta$ 17	5'-TTTCAGAAAGGAGATATAGCT-3'
V $\beta$ 18	5'-AGCCCAATGAAAGGACACAGTCAT-3'
V $\beta$ 19	5'-ACCCCGAAAAAGGACATACT-3'
V $\beta$ 20	5'-CTCTGAGGTGCCCCAGAA-3'
V $\beta$ 21	5'-CGGAGCTTCTGGTTCAAT-3'
V $\beta$ 22	5'-ATGAAATCTCAGAGAAGTCT-3'
V $\beta$ 23	5'-GATCAGAGAAAAGAGGGAAAC-3'
V $\beta$ 24	5'-CTGCTGTTCCACTACTATGAC-3'
C $\beta$ 3'-primer*	5'-TTCTGATGGCTCAAACAC-3'

\* El primer C $\beta$  3' está marcado fluorescentemente con el fluorocromo FAM (azul)

**Método**

1. Preparar 24 tubos de PCR, añadir en cada uno de ellos 5  $\mu$ l de cDNA y 1  $\mu$ l de primer C $\beta$  5' correspondiente a cada familia.
2. Preparar la mezcla de reacción:
  - 5  $\mu$ l de Buffer(10  $\times$ ) con Mg<sup>2+</sup>  $\times$  24
  - 5  $\mu$ l de dNTPs  $\times$  24
  - 0.5  $\mu$ l Taq DNA polimerasa  $\times$  24
  - 32.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  $\times$  24
  - 1  $\mu$ l C $\beta$  3'-primer  $\times$  24
3. Añadir a cada tubo de PCR 44  $\mu$ l de la mezcla de reacción.
4. Introducir las muestras en el ciclador y ejecutar el programa:

HOLD	35 CICLOS			HOLD	HOLD
94°C	95°C	55°C	72°C	72°C	15°C
5 min	1min	1min	1 min	7 min	:

**5.5 ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

Se siguen las indicaciones descritas en el apartado 1.3.

**5.6 SECUENCIACIÓN****Material**

- Secuenciador ABI PRISM 310
- Sistema de filtrado microcom
- Big Dye
- Primers, concentración: 10 pmol/ $\mu$ l
- Columnas Centri-sep

**Método**

- Colocar el producto de PCR a secuenciar en el reservorio para la muestra del sistema de filtrado microcom, se lleva a un volumen de 500  $\mu$ l con agua y se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 8 min.
- Eluir el filtrado con  $\frac{1}{2}$  del volumen original del producto de PCR.
- Preparar la mezcla de reacción de secuenciación, por cada PCR se preparan dos mezclas, la primera con el primer en 3' y la segunda con el primer en 5':
  - 5  $\mu$ l de PCR purificada

- 4  $\mu$ l de Big Dye Mix
- 5  $\mu$ l de agua
- 1  $\mu$ l de primer
- Programa de secuenciación:

HOLD	25 CICLOS			HOLD
94°C	96°C	58°C	60°C	4°C
3min	10s	5s	4min	Forever

- Purificación del producto de secuenciación:
  - Rehidratar las columnas centri-sep añadiéndoles 800 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, homogeneizar cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire.
  - Dejarlas reposando 30 min. Una vez rehidratadas pueden guardarse a 4°C durante varios días.
  - Drenar las columnas mediante presión y dejar reposar 15 min.
  - Colocar las columnas en el tubo colector y centrifugar 2min a 3000 r.p.m.
  - Transferir 20 $\mu$ l del producto de secuenciación al centro de la columna evitando tocar el gel con la punta de la pipeta.
  - Colocar en un eppendorf y centrifugar 2min a 3000r.p.m.
  - Las muestras pueden guardarse congeladas hasta que se vayan a procesar.
  - Secar las muestras al vacío.
  - Reconstituir con 25 $\mu$ l de supresion reagent, dejar reposar 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
  - Desnaturalizar las muestras calentándolas a 95<sup>a</sup> 3 min y a continuación poniéndolas en hielo. Se mantendrán en el hielo hasta la hora de cargarlas en el secuenciador.
  - El secuenciador se prepara con la resina POP 6. La T<sup>a</sup> de secuenciación se fija en 50°C y se programan las muestras según las indicaciones del software.



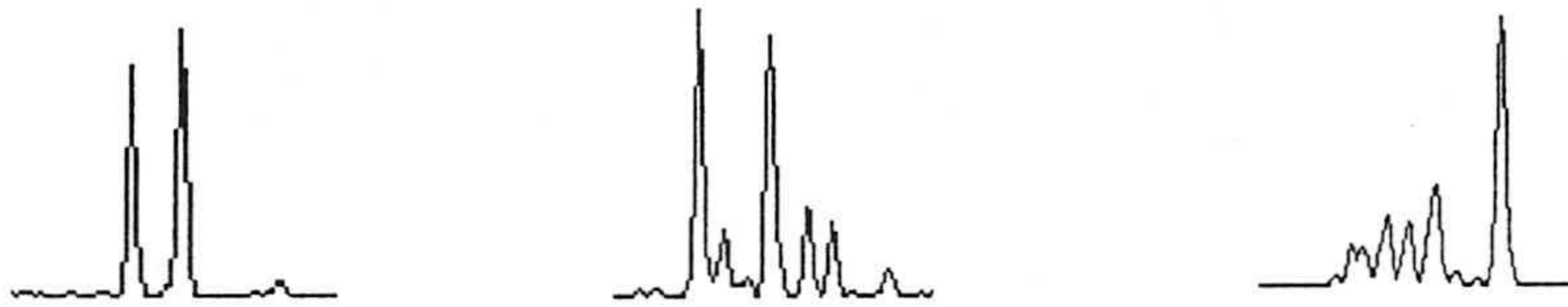
### 5.7 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las señales fluorescentes serán procesadas y analizadas por el programa GenScan, mostrando distintas situaciones dependiendo de la clonalidad de las familias. Los transcritos normales reflejan policlonalidad en el cDNA, mostrando una distribución gaussiana de al menos seis picos que difieren entre si 3 pb sin ningún hueco entre ellos:

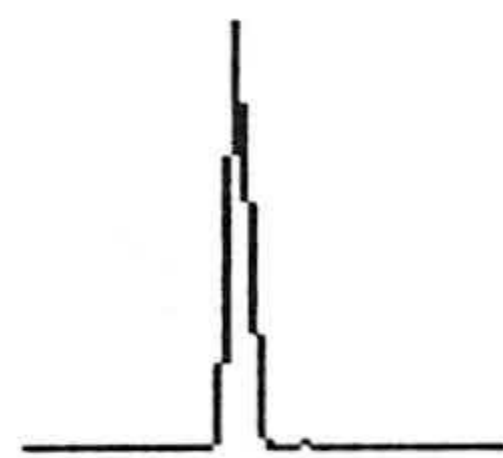


La aparición de picos dominantes indican la presencia de un exceso de cDNA de idéntico tamaño, sugiriendo la presencia de una población T oligoclonaal o monoclonal:

Ejemplo de policlonalidad



Ejemplo de monoclonalidad



La ausencia de picos tras la amplificación mediante PCR sugiere la ausencia de células T que contengan dicha subfamilia V $\beta$ .

Para realizar la valoración de la complejidad de los espectros encontrados se ha realizado la siguiente gradación de las subfamilias V $\beta$ , se asignará una puntuación de 0 si la familia no está presente, 1 si presenta un patrón monoclonal, 2 si presenta un patrón biclonal y así sucesivamente hasta la puntuación de 6 si la familia presenta un patrón policlonaal normal con una distribución Gaussiana. La complejidad global en una muestra normal será la suma del número de subfamilias estudiadas, 24 por su puntuación de complejidad, con una puntuación máxima de 144.

## 6 ANÁLISIS DE LOS REORDENAMIENTOS BCR-ABL Y PML-RAR MEDIANTE RT-PCR.

### 6.1 BCR-ABL

La traslocación recíproca t(9;22)(q34;q11) caracteriza al 80% de los casos de LMC y provoca la formación de un gen híbrido bcr/abl. En la mayoría de los casos el punto de ruptura del gen bcr ocurre en la región M-bcr ("major-break-point cluster region"). Dependiendo del punto de ruptura en la región bcr (ya sea en el extremo 3' o 5') se originan dos transcritos distintos, bcr2-abl2 o bcr3-abl2, al incorporarse o no el exón b3 del protooncogen bcr. La ruptura en el cromosoma 9 se produce en el protooncogen abl. El oncogen bcr/abl genera un ARNm quimérico el que a su vez da lugar a una proteína p210 con actividad tirosinquinasa que participa en el control del crecimiento y de la diferenciación celular.

Extracción de RNA se realizó según lo indicado en el apartado 5.1

Síntesis de cDNA según lo indicado en el apartado 5.2

Reacción de PCR: Se realiza una PCR anidada, para aumentar la sensibilidad

Se amplifica conjuntamente la secuencia abl para comprobar la integridad del cDNA.

- Primera amplificación:

	<b>abl</b>	<b>bcr-abl</b>
CDNA .....	35µl.....	35 µl
Buffer 10× .....	5µl.....	5 µl
dNTPs .....	4µl.....	4 µl
BCR 1 .....	---	2 µl
ABL 3 .....	2µl.....	---
ABL 1 .....	2µl.....	2 µl
Ampli Taq .....	0.5µl.....	0.5 µl
H <sub>2</sub> O .....	hasta 50µl.....	hasta 50 µl

## Programa del ciclador:

35 CICLOS					
94°C	94°C	65°C	72°C	72°C	4°C
5min	1min	1min	1min30s	10min	∞

- Segunda amplificación

	<b>abl</b>	<b>bcr-abl</b>
DNA 1ª amplificación.....	4µl.....	4 µl
Buffer 10× .....	5µl.....	5 µl
dNTPs .....	4µl.....	4 µl
BCR 2 .....	----	2 µl
ABL 4 .....	2µl.....	----
ABL 2 .....	2µl.....	2 µl
Ampli Taq .....	0.5µl.....	0.5 µl
H <sub>2</sub> O .....	hasta 50µl.....	hasta 50 µl

Se somete al mismo programa que la primera amplificación.

Análisis de los resultados

Las amplificaciones de la segunda PCR se chequean en un gel de agarosa al 3%, usando como marcador de peso molecular el PM: 6

Interpretación de los resultados

El amplificado del gen *abl* ha de aparecer en todas las muestras, observaremos una banda de 269 pb.

En las muestras positivas para *bcr* se podrán observar uno de estos dos amplificados dependiendo del tipo de reordenamiento existente:

- banda de 504 pb: reordenamiento *bcr2-abl2*
- banda de 579 pb: reordenamiento *bcr3-abl2*

## 6.2 PML-RAR

La traslocación t(15:17) es un rasgo específico y selectivo de las leucemias promielocíticas agudas, que representan el 10% de las leucemias mieloides agudas. Como consecuencia de esta traslocación se forma el gen quimérico PML/RAR $\alpha$ . El punto de corte en el gen RAR $\alpha$  tiene lugar siempre en el intrón 2, mientras que en el PML existen tres

puntos de ruptura que determinan la forma de tres tipos de transcritos: bcr1(intrón6) y bcr3 (intrón3), con una incidencia similar entorno al 45% y bcr2 (exón 6) con una incidencia del 5 al 10%. La detección de este reordenamiento tiene interés diagnóstico ya que permite evaluar el control de la terapéutica (Grimwade y cols, 1997) y sirve para detectar EMR en presencia de médula ósea aparentemente normal morfológica y citogenéticamente (Biondi y cols, 1992)

Extracción de RNA se realizó según lo indicado en el apartado 5.1

Síntesis de cDNA según lo indicado en el apartado 5.2

Amplificación de  $\beta$ -actina: para asegurar la integridad del cDNA. Según lo indicado en el apartado 5.3

Reacción de PCR: Se realizó una PCR a tiempo real con primers específicos y sondas fluorescentes en el ciclador Lightcycler.

Material:

- $Cl_2Mg$  25 mM
- Primers PML1, PML3 y RAR
- Sondas PMLRAR 3' FL y PMLRAR 5' LC
- Enzima: Light cycler Fast Start Hybridization Probes

Mezcla de reacción de PCR: V final = 10  $\mu$ l

	PML1	PML 3
H <sub>2</sub> O.....	4.8 $\mu$ l.....	4.8 $\mu$ l
Cl <sub>2</sub> Mg .....	1.2 $\mu$ l.....	1.2 $\mu$ l
RAR .....	0.5 $\mu$ l.....	0.5 $\mu$ l
PML1-2 .....	0.5 $\mu$ l.....	----
PML3 .....	----	0.5 $\mu$ l
PMLRAR3'FL.....	0.5 $\mu$ l .....	0.5 $\mu$ l
PMLRAR5'LC.....	0.5 $\mu$ l .....	0.5 $\mu$ l
Light Cycler Fast Start .....	1 $\mu$ l.....	1 $\mu$ l
Hybridization probes		
cDNA .....	1 $\mu$ l.....	1 $\mu$ l

Programa del ciclador:

El programa consiste en una desnaturalización inicial de 94°C durante 10 minutos para activar la Taq seguida de 45 ciclos consistentes en un anillamiento a 60°C durante 12 segundos con lectura efectuada en F2/F1, elongamiento a 72°C durante 12s, y desnaturalización de 94°C 0 segundos.

#### Interpretación de los resultados

El par de primers PML1-2/RAR amplifica bcr1/2 generando un amplicón de 200 pb para bcr1 y 170 para bcr2 y el par PML3/RAR amplifica bcr3 generando un amplicón de 150pb. Las dos sondas fluorescentes se sitúan sobre la secuencia común del gen RAR $\alpha$  espaciadas por un nucleótido. La primera sonda dadora de luz, marcada con fluoresceína (FI) y la segunda, aceptora (LC) marcada con Red640.

Durante la ejecución del programa se puede observar el proceso de amplificación de cada una de las muestras. Dado que las muestras hibridan con secuencias específicas se consideran positivas todas aquellas muestras en las que se haya detectado amplificación

## 7 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU

### Material

- Carnoy: Metanol:Acético, 7:3.
- Solución desnaturalizante: Formamida al 70%: 2 $\times$ SSC a pH 7.0-8.0 ajustado con ac. cítrico.
- Soluciones de lavado I: Formamida al 50%: 2 $\times$ SSC a pH 7.0-8.0 ajustado con ac. cítrico.
- Solución de lavado II: 2 $\times$ SSC: 0.1% NP40.
- Colorante de contraste Dapi-II

### Método

1. Limpiar los portas con detergente y sumergirlos en etanol al 70%, secar con papel de celulosa.
2. Preparación de la muestra:
  - a. Lavar los linfocitos con RPMI para retirar los restos de Ficoll, hematíes y evitar que las células se adhieran entre sí. Centrifugar 10 min a 1500 r.p.m.
  - b. Retirar el sobrenadante, resuspender el sedimento añadiendo lentamente KCl 0.075M (para 30 $\times$ 10<sup>6</sup> células 15 ml de KCl)
  - c. Incubar a 37° C durante 1h 30min, con objeto de lisar la membrana celular

- d. Centrifugar 10 min a 1500 r.p.m. y retirar el sobrenadante
  - e. Añadir Carnoy, 10 ml para  $30 \times 10^6$  células y mezclar cuidadosamente, de modo que los núcleos queden libres.
  - f. Realizar un segundo lavado, repitiendo los pasos d y e.
  - g. En este estadio la muestra puede conservarse congelada a  $-20^\circ\text{C}$  durante años.
3. Sobre un porta con fijador (Carnoy) colocar 1 ó 2 gotas de la muestra. Dejar a  $T^a$  ambiente hasta la evaporación del fijador
  4. Colocar los portas sobre una superficie seca dentro de un baño a  $60^\circ\text{C}$  durante 10 min. Este paso es optativo pero permite que los núcleos aumenten de tamaño.
  5. Dejar envejecer hasta el día siguiente sin aplicar horno de calor.
  6. Hibridación:
    - a. Preparación de la sonda: 7  $\mu\text{l}$  de solución de hibridación, 2  $\mu\text{l}$  de agua y 1  $\mu\text{l}$  de sonda. Manipular la sonda evitando en lo posible el contacto con la luz y en ambiente frío.
    - b. Añadir a los portas la solución desnaturalizante previamente atemperada a  $68-72^\circ\text{C}$ , dejar actuar 3-5 min.
    - c. Sumergir en etanol al 70% durante 1 min y durante otro minuto en etanol al 80%. Secar hasta que el etanol se haya evaporado completamente, sino se inhibiría la hibridación.
    - d. Desnaturalizar la sonda calentándola durante 5 min a  $68-72^\circ\text{C}$  y sumergiéndola a continuación en etanol al 100%. Una vez desnaturalizada, colocarla sobre un cubreobjetos.
    - e. Poner la muestra en contacto con el cubre y sellarla con parafina. Colocarla en una cámara húmeda a  $37^\circ\text{C}$ .
  7. Lavados post-hibridación:
    - a. Retirar el sellador y sumergir los portas en la solución de lavado I durante 20 minutos
    - b. Sumergir los portas en solución de lavado II. Cuando la muestra esté sumergida en cualquiera de las dos soluciones de lavado es aconsejable mover los portas suavemente para retirar los restos de sonda que no haya hibridado.
    - c. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de colorante de contraste en la zona de hibridación. Puede analizarse o bien conservarse congelado y protegido de la luz.

## 8. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó la aplicación informática STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc, Tulsa, USA).

### Test de homogeneidad de dos muestras cualitativas

Para este estudio se utilizó el test de  $\chi^2$ , y en caso de no cumplirse las condiciones de validez de dicho test, se aplicó el test exacto de Fisher de 2 colas.

### Test de homogeneidad de dos muestras cuantitativas

Se realizó aplicando el test no paramétrico de Wilcoxon.

# RESULTADOS



## 1. ESTUDIO DEL QUIMERISMO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

El estudio del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y distintas fracciones celulares se ha estudiado en función de la patología y del tipo de trasplante realizado.

En todos los pacientes se encontraron marcadores informativos que permitieron la evaluación cuantitativa del estado de quimerismo. Se consideraron marcadores informativos aquellos en los que al menos un alelo del receptor era único (no compartido con el donante). En los 21 pacientes estudiados se detectó una media de tres marcadores informativos siendo seis marcadores el número máximo y de dos el mínimo.

Nº	Evolución del quimerismo	
	< +4 meses	> +4 meses
1	QM → QT	QM → QT
2	QT	QT
3	QM → QT	QT
4	QM → QT	QT → QM
5	QM → QT	QT / QMg
6	QT	QT
7	QT	QT
8	QT	-
9	QT / QMm	-
10	AQ	AQ
11	QT	QT
12	QT	QM → AQ
13	QT	QT
14	QT	QT
15	QT	-
16	QM	QM → AQ
17	QT	QT
18	QT	QT
19	QT	-
20	QT	-
21	QT	-

Tabla 1: Evolución de la quimera en los pacientes durante el tiempo de estudio, diferenciamos entre menos de cuatro meses post-trasplante y más de cuatro con objeto de poder evaluar la situación del quimerismo en relación a la aparición de EICHa o EICHc (Figura 1 y Figura 2). QM : Quimera Mixta; QT: Quimera Total; QMg: Quimera Mixta ganglionar; QMm: Quimera Mixta medular; AQ: Ausencia de Quimera

### 1.1. QUIMERISMO Y APARICIÓN DE EICH

La aparición de una situación de quimera mixta se ha relacionado con una ausencia o bien presencia menos severa de EICH, el estudio de nuestros datos para EICa y EICHc dieron como resultado:

ESTADO DE QUIMERISMO	EICHa grado 0-1	EICHa grado 2-4
Quimera Total	69% (11)	31% (5)
Quimera Mixta	60% (3)	40% (2)

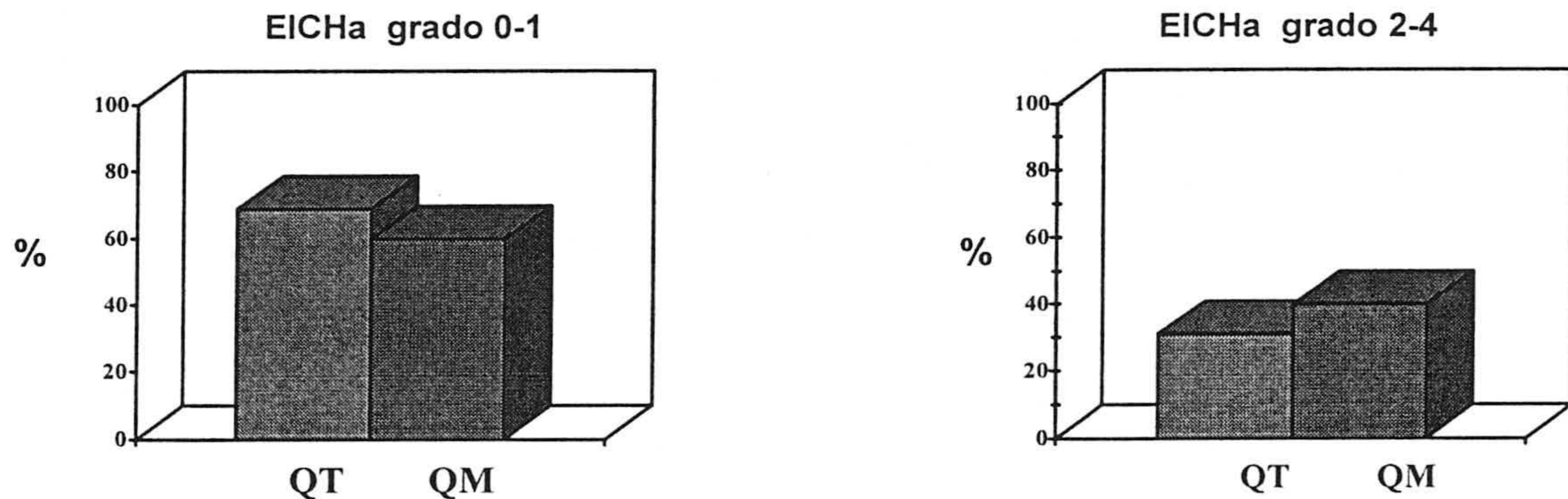
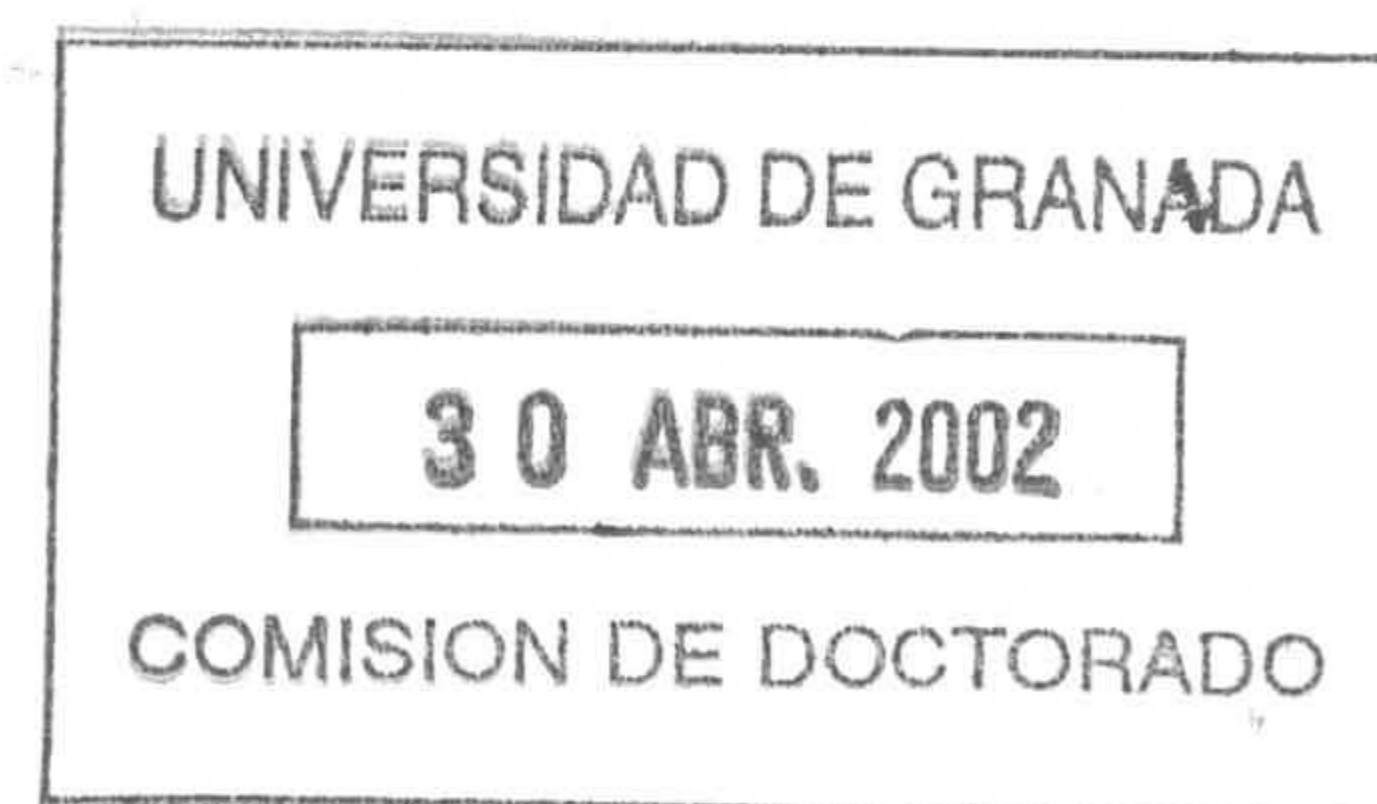


Figura 1: Estudio de la quimera y la aparición de EICH aguda, se valora el estado de quimerismo en fecha anterior a 4m post-trasplante.

Como se puede observar en la figura 1 y tras realizar el análisis estadístico, en nuestro grupo de estudio no hemos encontrado ninguna diferencia significativa en la frecuencia de aparición de EICHa dependiendo de si el paciente se encontraba en situación de QM o QT.



Realizamos el mismo estudio, en aquellos pacientes vivos en fechas posteriores a cuatro meses post-trasplante, de la frecuencia de aparición de EICHc dependiendo de la situación del estado del quimerismo. Los casos de quimerismo mixto ganglionar y medular de los pacientes 5 y 9 no han sido considerados como QM el estudio de la relación del quimerismo con la aparición de EICHa o EICHc, al considerarse representativos sólo de la población maligna y no de una hematopoyesis global.

ESTADO DE QUIMERISMO	Ausencia de EICHc o EICHc limitada	EICHc extensa
Quimera Total	55% (5)	45% (4)
Quimera Mixta	100% (4)	0% (0)

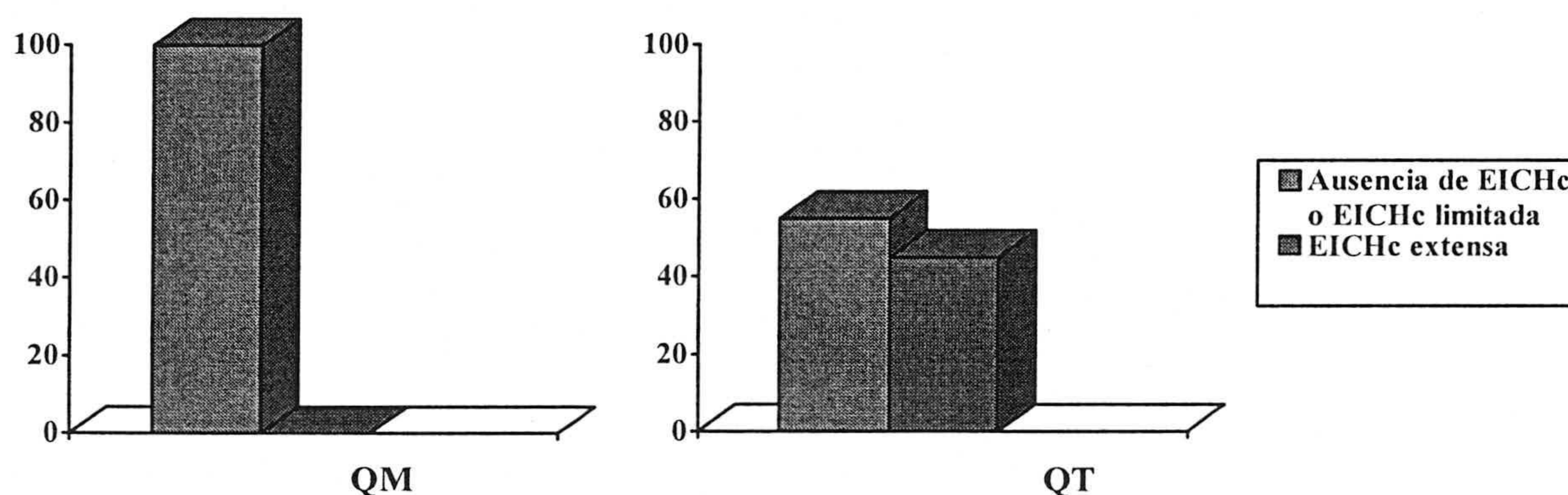


Figura 2: Clasificación de los pacientes según la gradación de la EICH crónica padecida por los pacientes y el estado del quimerismo, se valoran aquellos pacientes que presenten QM en fecha posterior a 4m post-trasplante

Como podemos ver en la figura 2, en nuestro grupo encontramos una menor incidencia de EICHc o una incidencia menos severa en el grupo de pacientes que presentan una situación de QM, aunque esta no alcanza significación estadística.

### 1.2 EICH Y TIPO DE TRASPLANTE

La aparición de EICH está también condicionada por el tipo de trasplante realizado es decir por el tipo de acondicionamiento y composición del inóculo.

En nuestro grupo encontramos según el tipo de trasplante la siguiente distribución de la aparición de EICHa:

TIPO DE TRASPLANTE	EICHa grado 0-1	EICHa grado 2-4
Selección +	100% (5)	0% (0)
Mini	63% (5)	37% (3)
Estándar	63% (5)	37% (3)

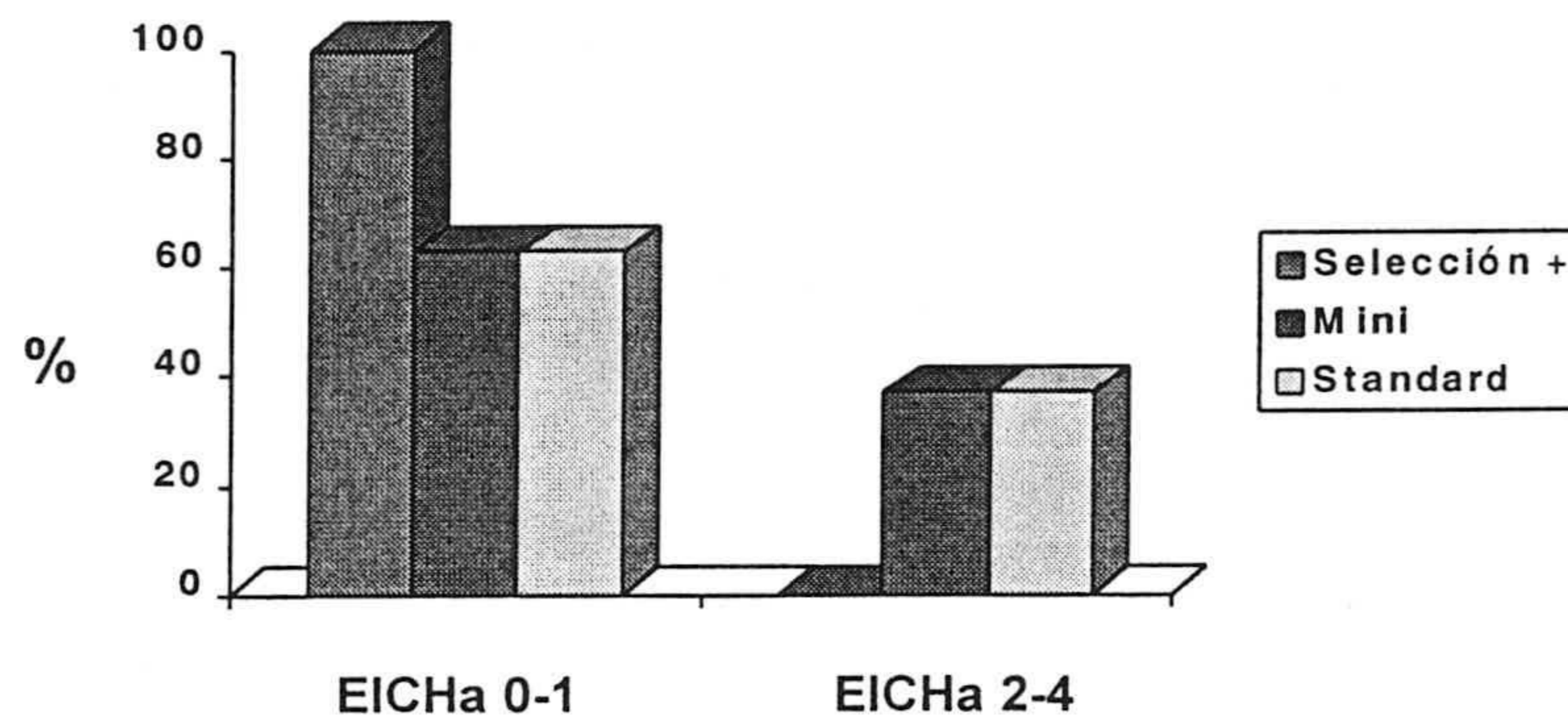


Figura 3: Frecuencia de aparición de EICHa según el tipo de trasplante

Realizamos el mismo estudio respecto a la aparición de EICHc

TIPO DE TRASPLANTE	Ausencia de EICHc o EICHc Limitada	EICHc extensa
Selección +	100% (3)	0% (0)
Mini	67% (4)	33% (2)
Estándar	75% (3)	25% (1)

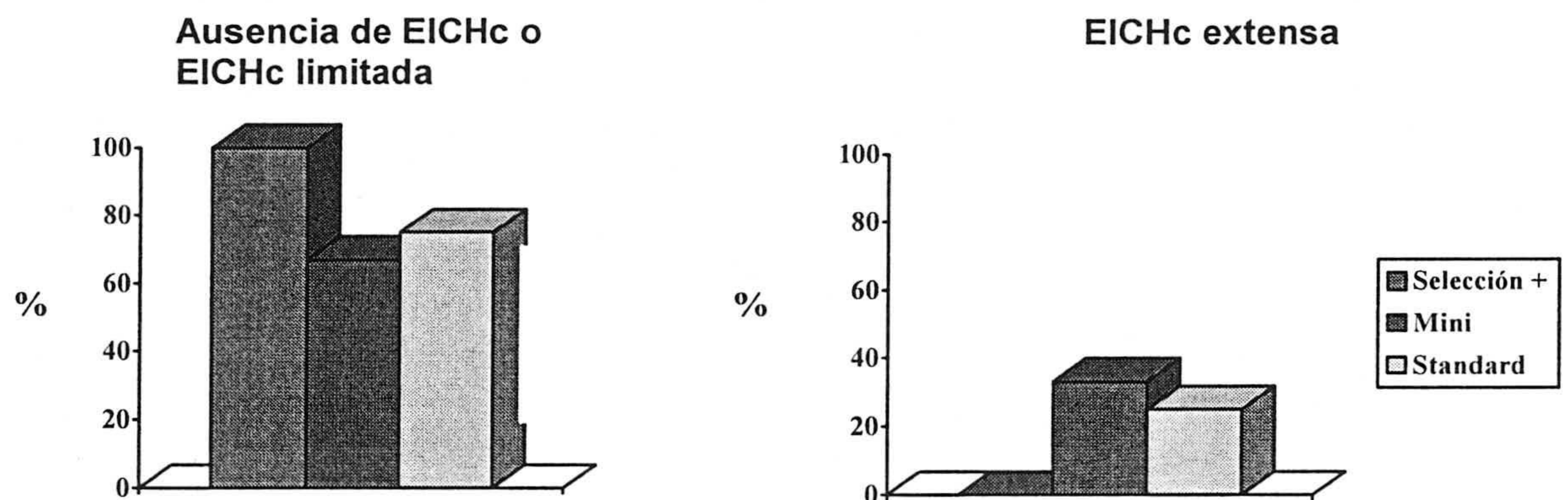


Figura 4: EICHc y tipo de trasplante

Como hemos podido observar en la figura 3 y la figura 4, no existe diferencia entre la aparición de EICH tanto aguda como crónica entre el trasplante estándar (acondicionamiento mieloablativo) y el trasplante mini (acondicionamiento no mieloablativo). En cambio si observamos una menor incidencia de ambas cuando se lleva a cabo un trasplante con selección positiva (inóculo con menor número de linfocitos T). Aunque el estudio estadístico no muestra diferencias significativas entre la utilización de los distintos tipo de trasplante agrupándolos bien por tipo de acondicionamiento (standard y selección positiva frente a mini-trasplante) o por tipo de inóculo (mini-trasplante y standard frente a selección positiva).

### 1.3. QUIMERISMO Y RECAÍDA

Una de las aplicaciones más interesantes del estudio del quimerismo post-trasplante es la predicción de la aparición de recaídas, por lo que estudiamos las características de los pacientes que recayeron.

Casos	Tipo de Trasplante	Quimerismo	EICH a/c
1.DMM	Selección +	QM	No/No
4.MRD	Mini	QM	II/L
5.IRV	Standard	QT (QMg)	III/E
9.MAML	Mini	QT(QMm)	III/-
16.EVC	Sandard	QM	No/No

Tabla 2: Relación entre quimerismo, tipo de trasplante, EICH en pacientes que sufrieron recaída

En el estudio sobre el global de pacientes, los casos de quimerismo mixto ganglionar y medular no han sido considerados como QM en el estudio de aparición de recaída, al considerarse representativos sólo de la población maligna en una localización determinada y no de una hematopoyesis global, detectable en sangre periférica, por lo tanto no comparable con el resto de los casos.

	Recaída	Sin Recaída
QM	75% (3)	25% (1)
QT	0% (0)	100% (15)

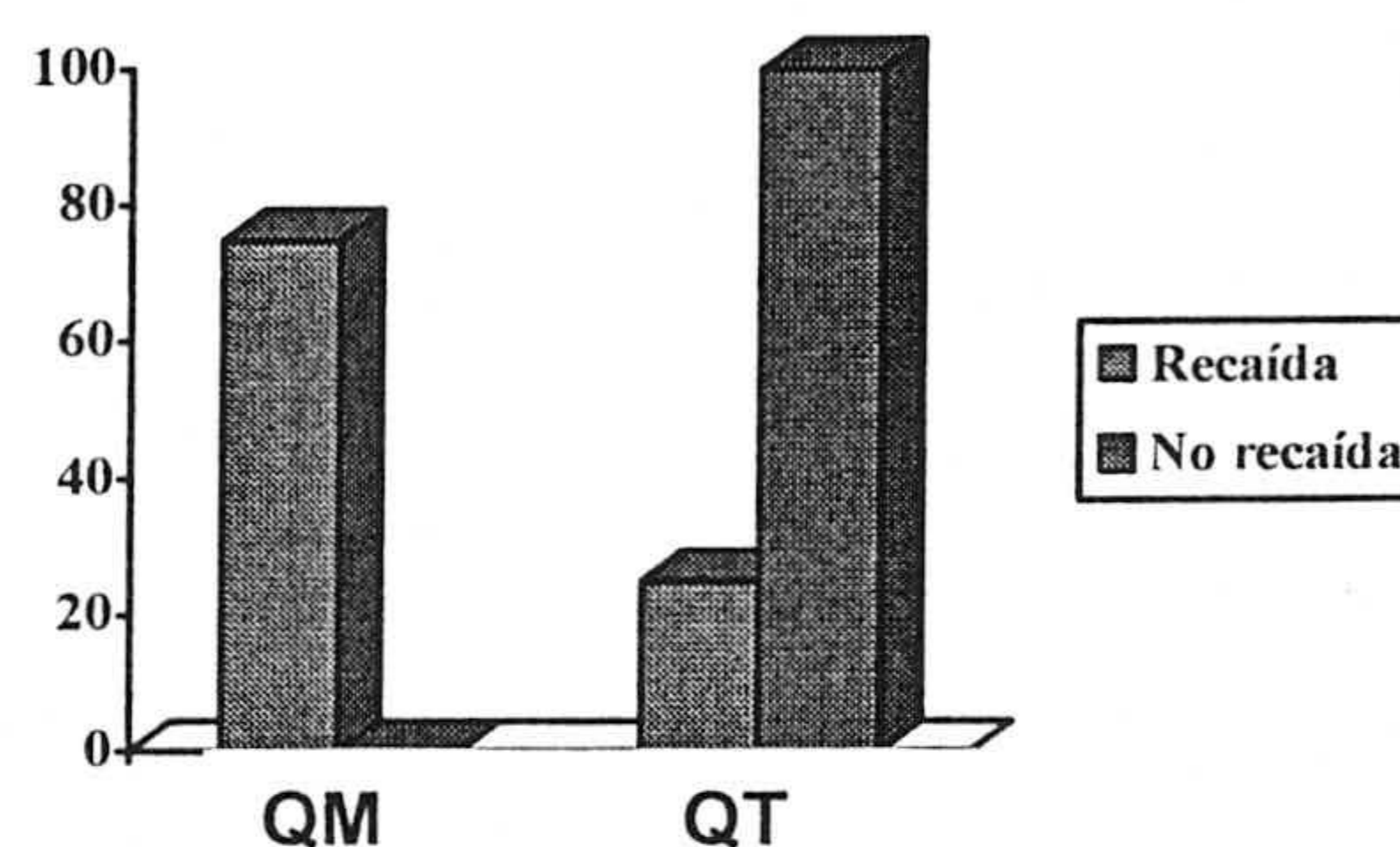


Figura 5: Aparición de recaídas en función de la situación de quimerismo.

En este caso si podemos observar una diferencia significativa ( $p=0.04$ ) entre aquellos pacientes que han sufrido una situación de quimera mixta y los que por el contrario se encontraron en una situación de quimera total. Siendo el hallazgo de quimerismo mixto indicativo de una mayor probabilidad de sufrir una recaída leucémica.

#### 1.4 QUIMERISMO Y TIPO DE TRASPLANTE

La instauración de una situación de quimera mixta o de quimera total se ha descrito que puede depender del tipo de trasplante realizado, es decir del tipo de acondicionamiento y de la composición del inóculo.

Del grupo total de pacientes se ha excluido el paciente nº 10 (AAO), ya que presentó recuperación autóloga, sin aparición de celularidad del donante en ninguno de los estudios de quimerismo realizados.

	QM	QT
Selección +	33%(1)	67%(2)
Standard	33%(3)	67%(6)
Mini	25%(2)	75%(6)

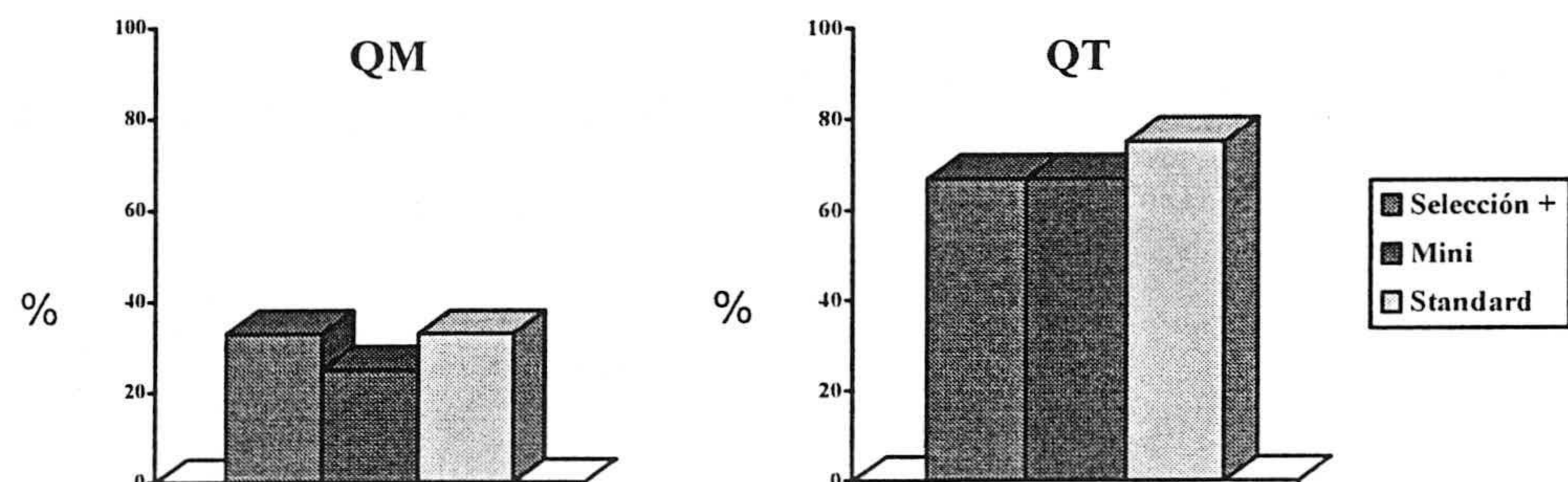


Figura 6: Aparición de QM o QT dependiendo del trasplante realizado

Como podemos ver en la figura 6 no encontramos diferencia significativa entre los distintos tipos de trasplante y la aparición de QM y QT. Podemos observar una tendencia en los tres tipos de trasplante de una mayor frecuencia de aparición de QT.

## 2. ESTUDIO DEL QUIMERISMO SEGÚN PATOLOGÍAS

### 2.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)

Se estudiaron tres pacientes con LMC

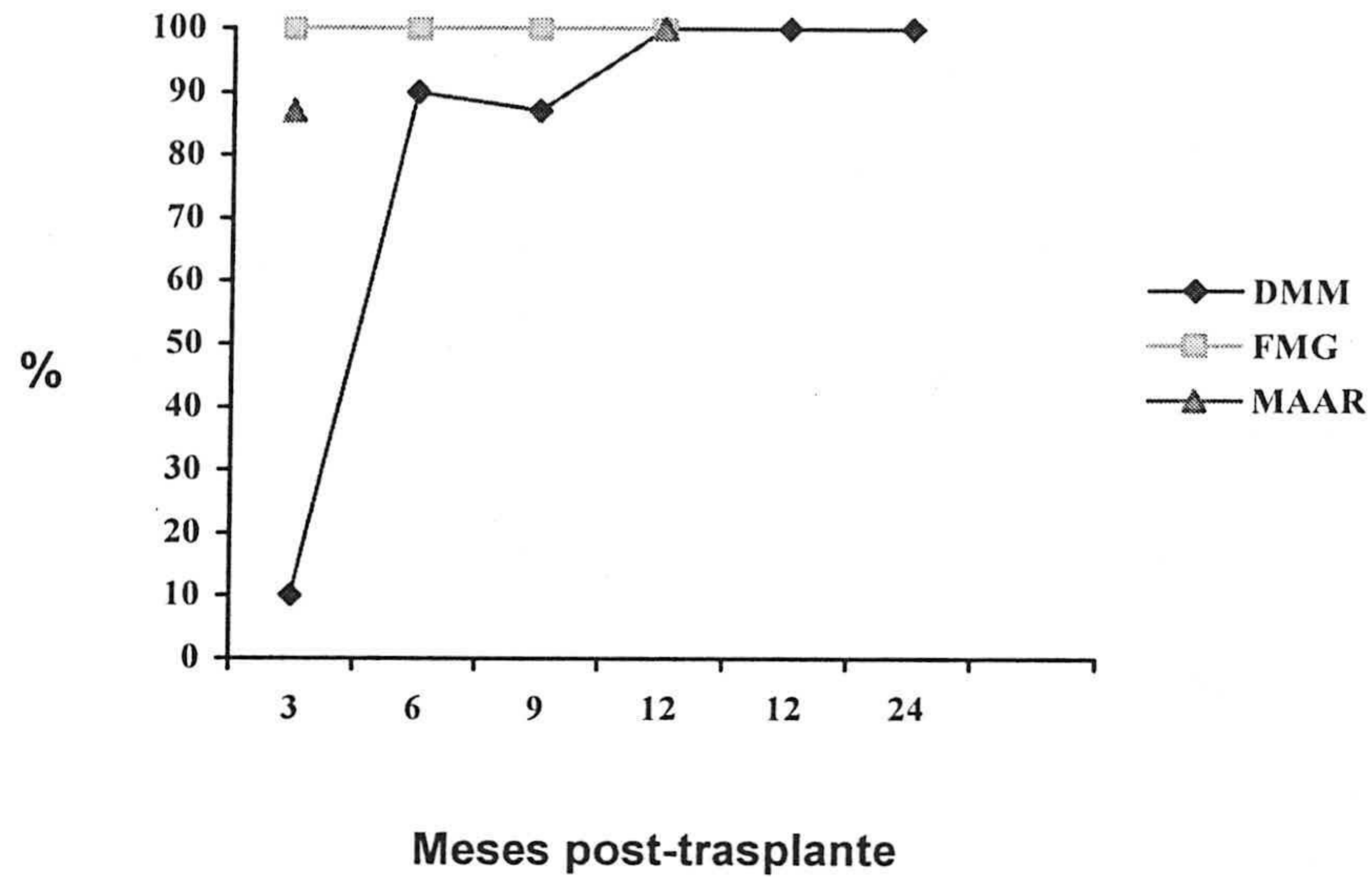


Figura 7: Evolución comparativa del quimerismo en sangre periférica (SP)

Caso 1 (DMM), paciente de 21 años al que se le realiza un trasplante con selección positiva en fase crónica de la enfermedad. Tras distintas situaciones de quimera mixta alcanzó una situación de quimera total coincidente con remisión hematológica y molecular tras una infusión de linfocitos del donante que perdura hasta la actualidad. Caso desarrollado en el apartado 3.2

Caso 2 (FMG), paciente de 31 años sometida a trasplante Standard en fase activa. Paciente con una situación de quimera total estable desde el momento del implante.

Caso 3 (MAAR), paciente de 60 años sometida a un mini-trasplante en fase crónica de la enfermedad. Tras una situación de quimera mixta alcanzó una situación de quimera total coincidente con remisión hematológica y molecular. Fallece por sinusitis por *Aspergillus* un año post-trasplante. Caso desarrollado en el apartado 3.2



## 2.2. LINFOMA NO-HODGKIN

### Caso 5 (IRM)

Paciente de 35 años diagnosticada en enero de 1999 de Linfoma no Hodgkin de células grandes. Fue sometida a trasplante estándar de médula ósea de hermana HLA- idéntica en fase quimiorresistente. La profilaxis para EICH se realizó con Ciclosporina y Metotrexato. La paciente sufrió EICH aguda grado III e EICH crónica extensa.

El estudio del quimerismo en sangre periférica dio como resultado un mes post-trasplante un 95% de QM, a los dos meses alcanzó una situación de quimera total que persistió hasta el éxitus.

A los cuatro meses post-trasplante presenta una recaída, el estudio de quimerismo en muestra ganglionar mostró la recuperación de la celularidad propia y la presencia de trisomía en el cromosoma 12 y una pérdida alélica en el cromosoma cuatro (Figura 8 y 9).

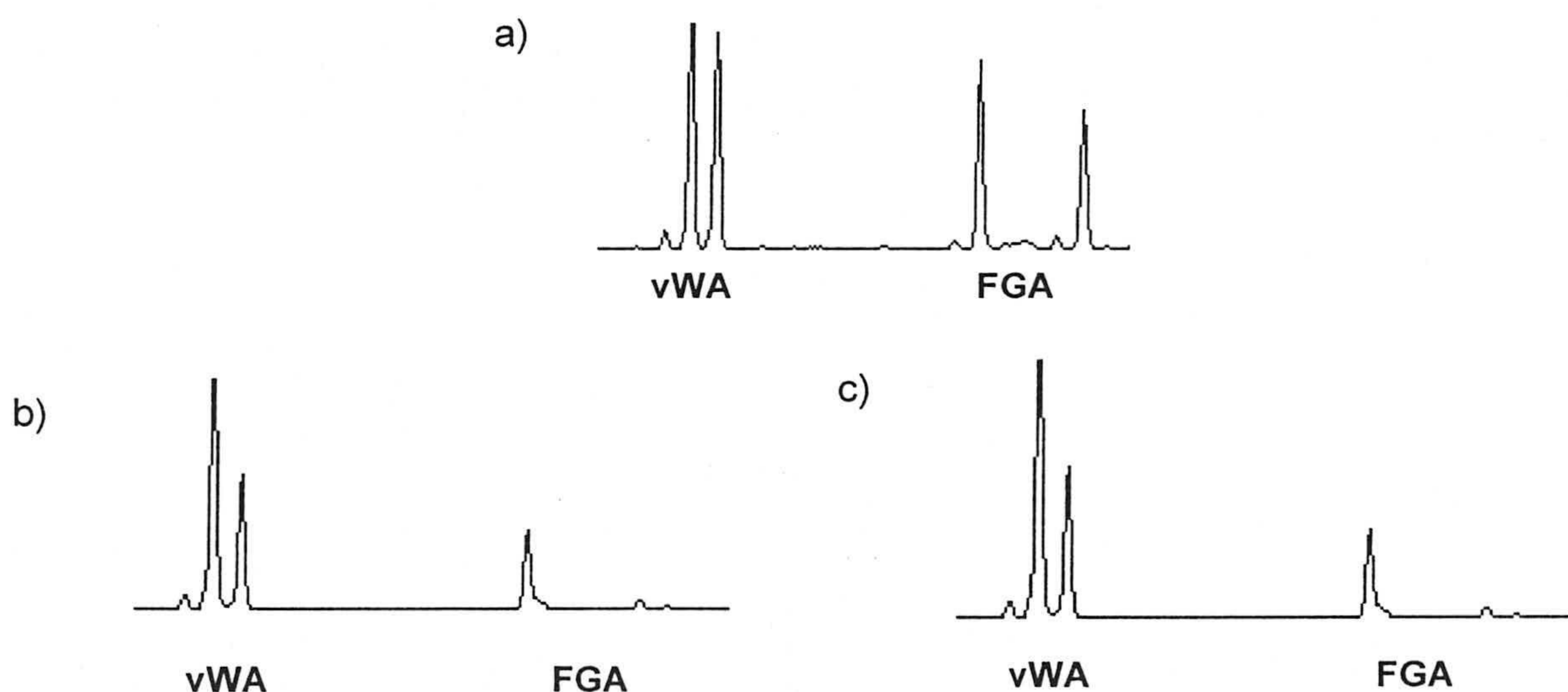


Figura 8: Marcadores vWA y FGA situados en el cromosoma 12 y en el 4 respectivamente, a) sangre periférica, b) ganglio izquierdo, c) ganglio derecho. En ambos ganglios se observa que las áreas de los alelos del marcador del cromosoma 12 están en relación 2:1 lo que nos indica una trisomía, en sangre periférica las áreas de los dos alelos están equilibradas. Observamos también la pérdida de uno de los alelos del marcador FGA del cromosoma cuatro en las muestras correspondientes a ambos ganglios.

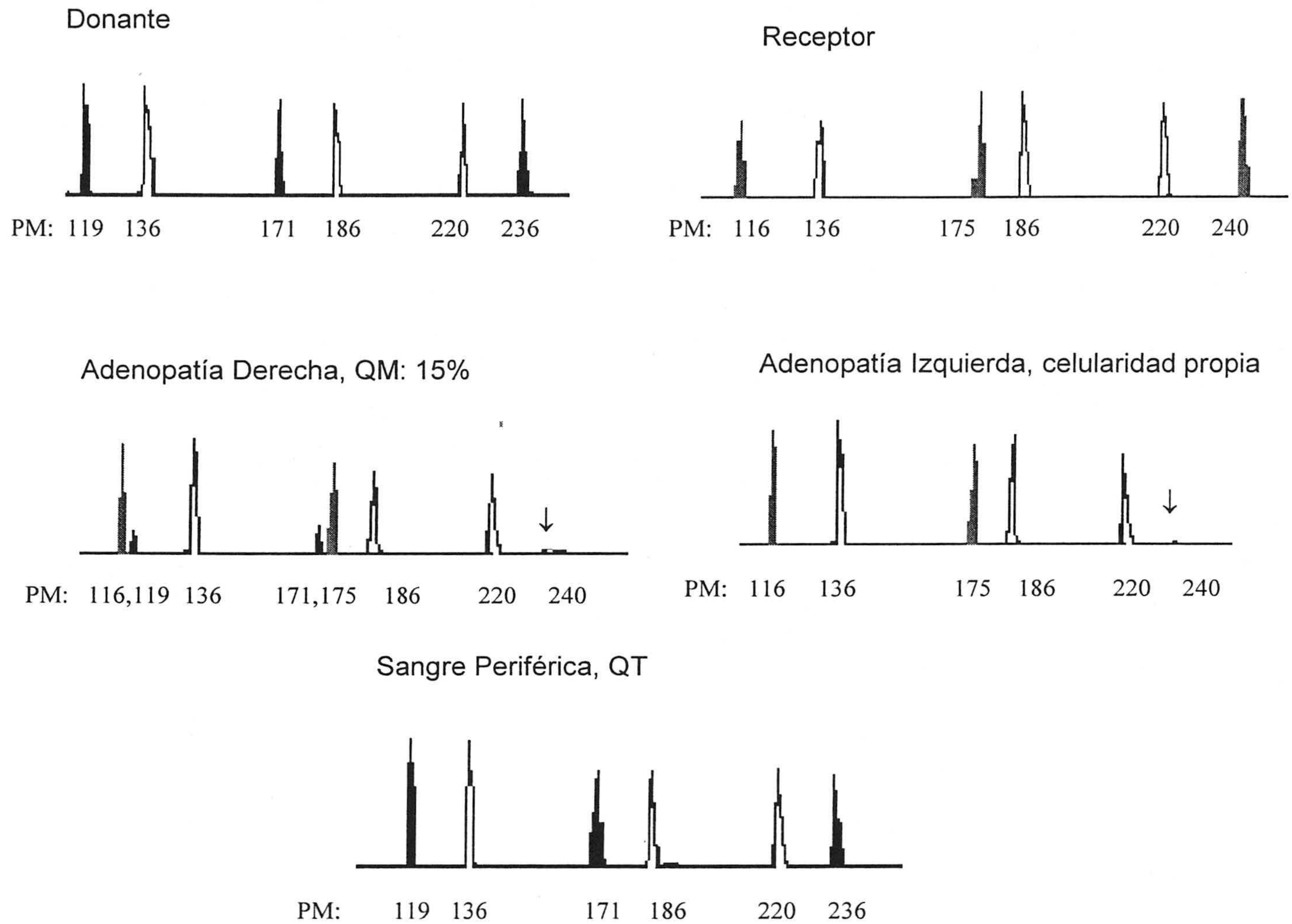


Figura 9: Marcadores informativos, los pertenecientes a la donante están coloreados en negro, los marcadores identificativos de la celularidad del receptor se presentan coloreados en rojo. Observamos una situación de quimera total en sangre periférica, mientras que en la muestra de la adenopatía derecha observamos una situación de quimera mixta del 15% y en la muestra procedente de la adenopatía izquierda la celularidad es propia del receptor. En ambos ganglios se observa la pérdida del marcador de PM 240 correspondiente al cromosoma 4 (señalado mediante una flecha)

Caso 6 (FPP), paciente de 41 años sometido a un Mini-trasplante de hermana HLA idéntica en segunda recaída.

Caso 7 (EVV), paciente de 45 años sometida a un Mini-trasplante de hermano HLA idéntico en segunda remisión completa.

En ambos casos se observó una situación de quimera total en sangre periférica tras el implante que se mantiene hasta la actualidad.

### 2.3. MIELOMA MÚLTIPLE

Caso 8 (JOB) paciente de 45 años sometido a un mini-trasplante de hermano HLA idéntico en fase quimio-resistente

Situación de quimera total tras el implante, falleció a los dos meses post-trasplante debido a EICHa.

Caso 9 (MAML) paciente de 51 años sometida a un mini-trasplante de hermano HLA idéntico en fase quimio-resistente

Se realizaron estudios de quimerismo +30, +66 y +77 días post-trasplante, encontrándose una situación de quimera total en sangre periférica en dichas fechas. Complementariamente en fecha + 77 se realizó un análisis de médula ósea encontrándose una situación de quimera mixta con un 75% de celularidad del donante, indicativo de recaída (figura 10). Paralelamente se realizó un estudio mediante inmunofenotipaje tanto en sangre periférica como en médula ósea en el que se detectó la aparición de un 15% de células plasmáticas en médula ósea y un 0.35 % en sangre periférica (figura 11). La paciente falleció en el día once días después por Distrés Respiratorio.

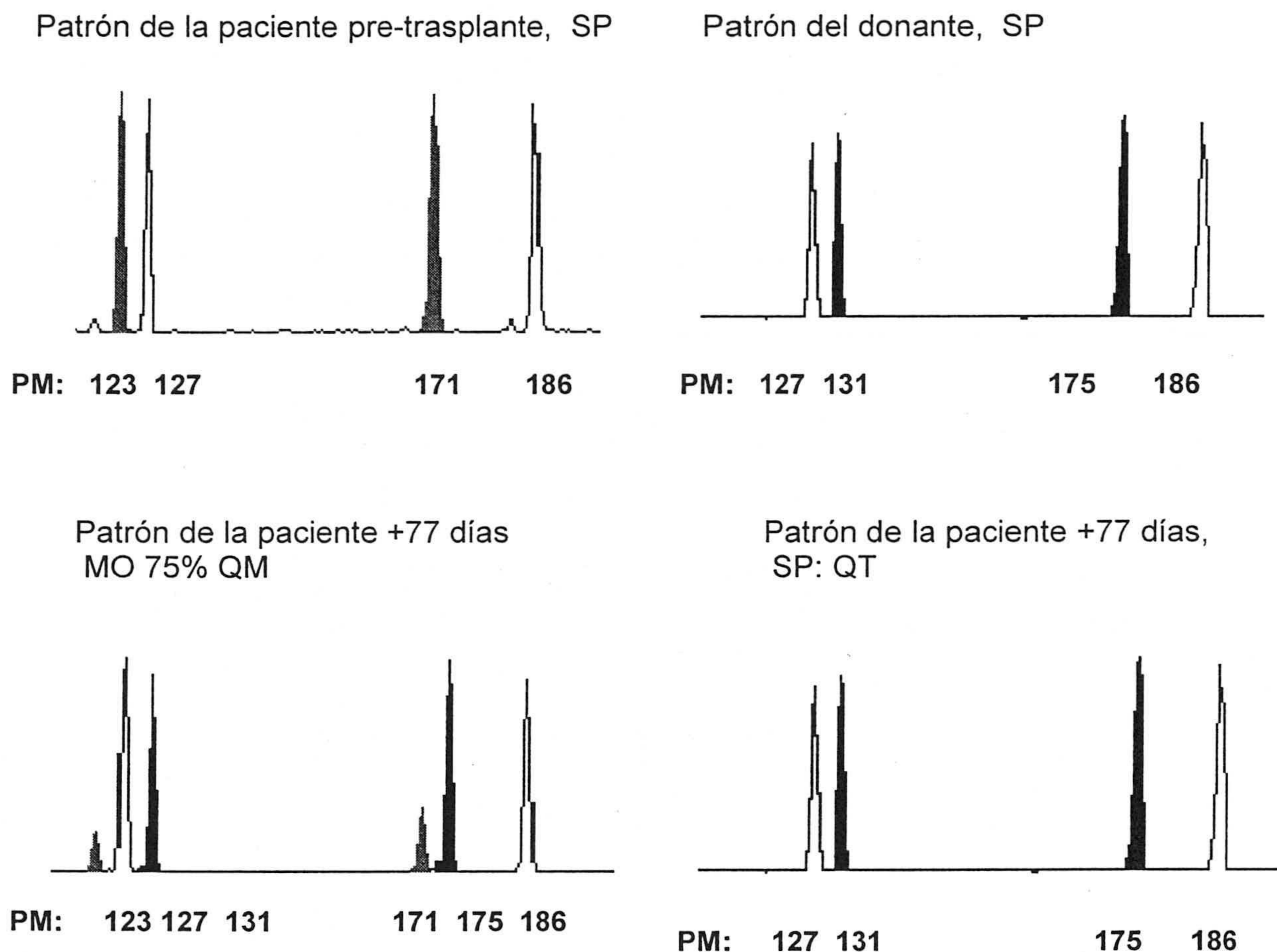


Figura 10: Marcadores informativos D3S1538 y vWA. Los alelos presentes únicamente en la receptora están coloreados en rojo y los alelos característicos del donante en negro. En el patrón obtenido el día +77 puede observarse la coexistencia de los alelos característicos de ambos indicando una situación de quimera mixta.

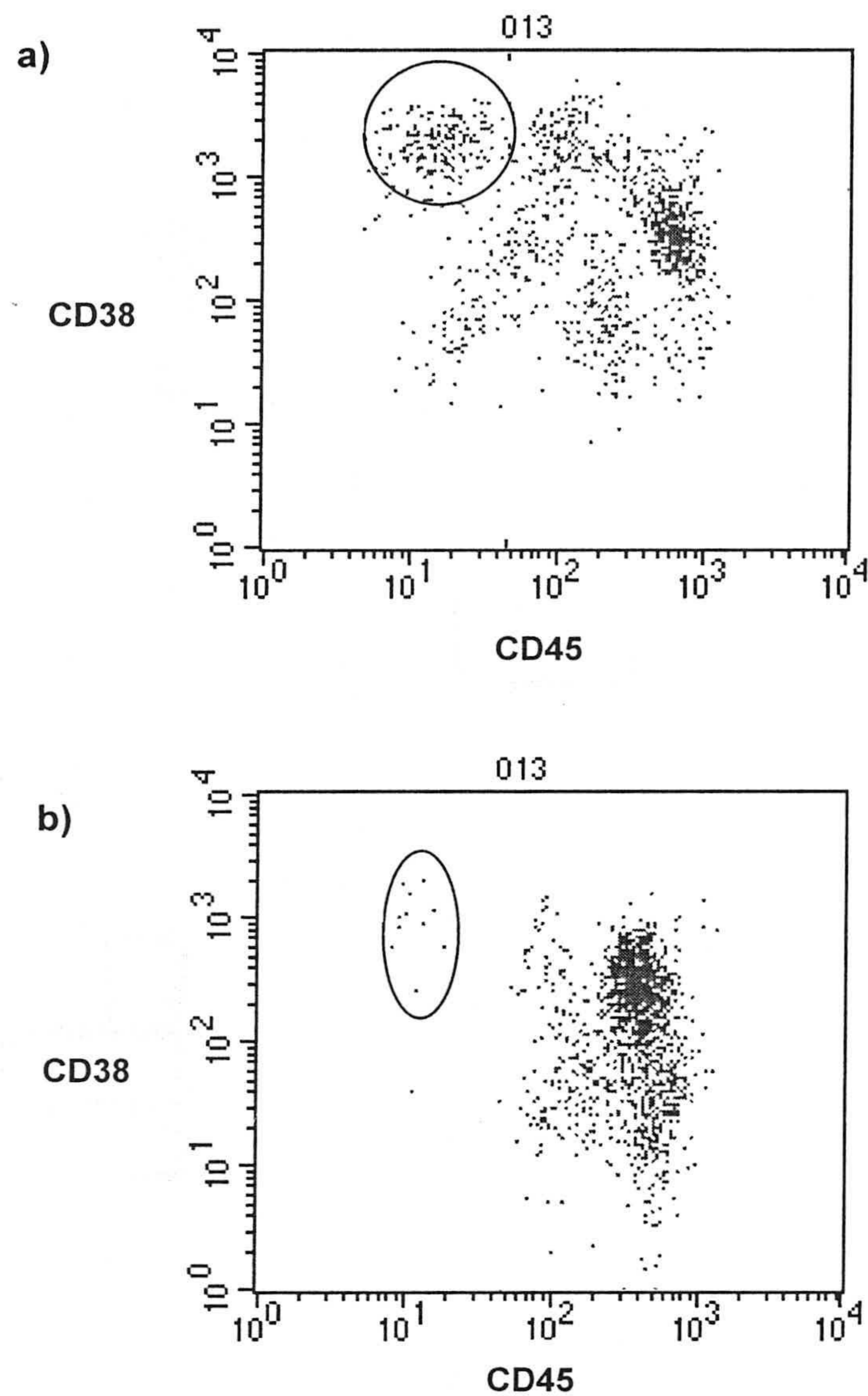


Figura 11: a) Inmunofenotipo en MO, presencia de un 15% de células plasmáticas CD38 positivas de alta expresión y CD 45 negativas, indicado por la flecha negra, paralelamente se encontró un 75% de QM.

b) Inmunofenotipo en SP, de la misma fecha que el estudio en MO, presencia de un 0.35% de células plasmáticas CD38 positivas de alta expresión y CD 45 negativas, indicado por la flecha negra, El estudio del quimerismo mostró una situación de QT.

## 2.4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

Se estudiaron siete pacientes con LMA.

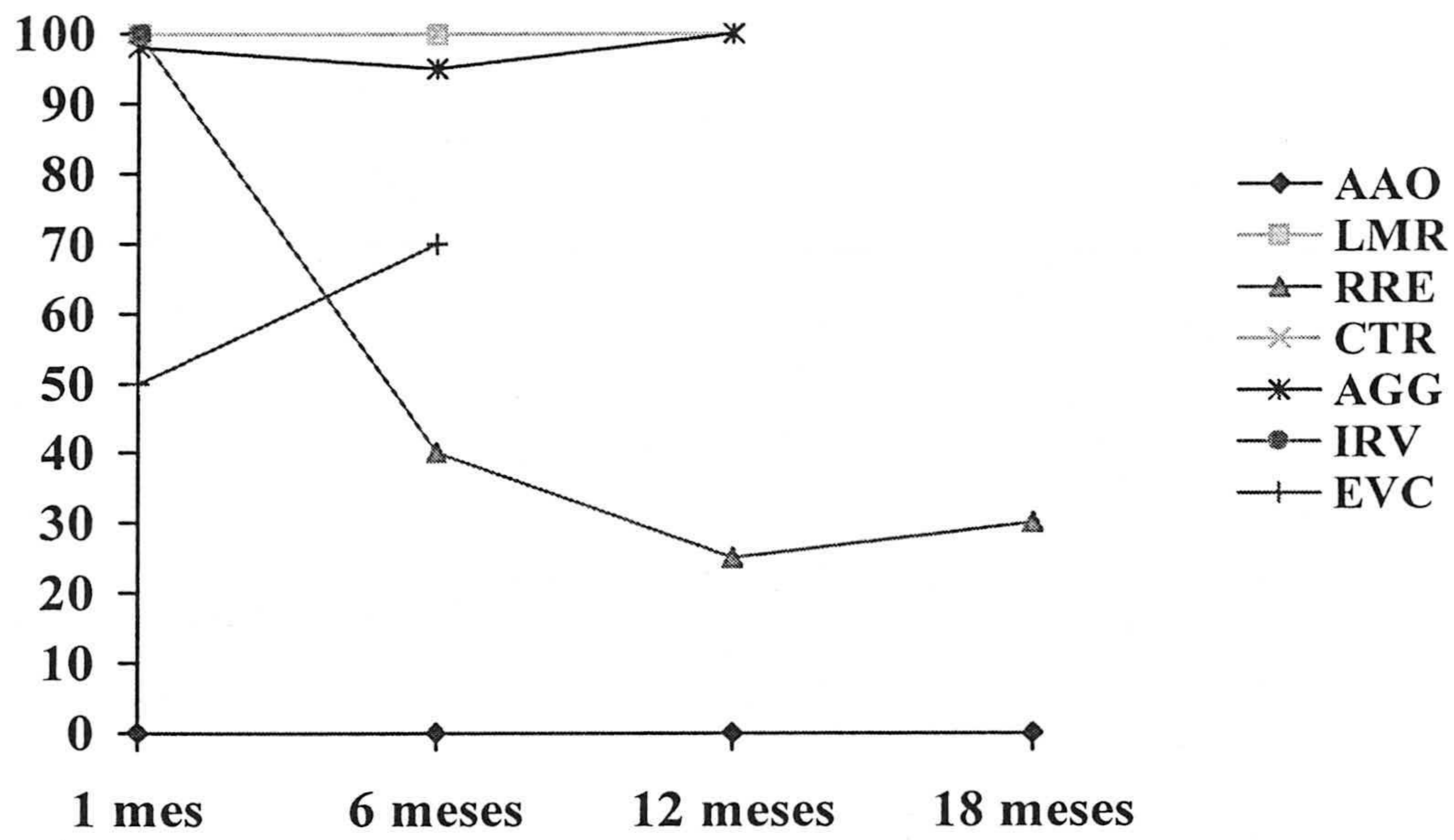


Figura 12: Evolución comparativa del quimerismo en sangre periférica

**Caso 10 (AAO)**

Paciente de 61 años sometida a un trasplante con selección positiva de hermana HLA idéntico en primera remisión completa.

Se produjo una recuperación autóloga. Se realizaron estudios de quimera en fechas +2 m, +12 m y +18 m post-trasplante, no observándose en ningún momento instauración de la hematopoyesis del donante(Figura 13).

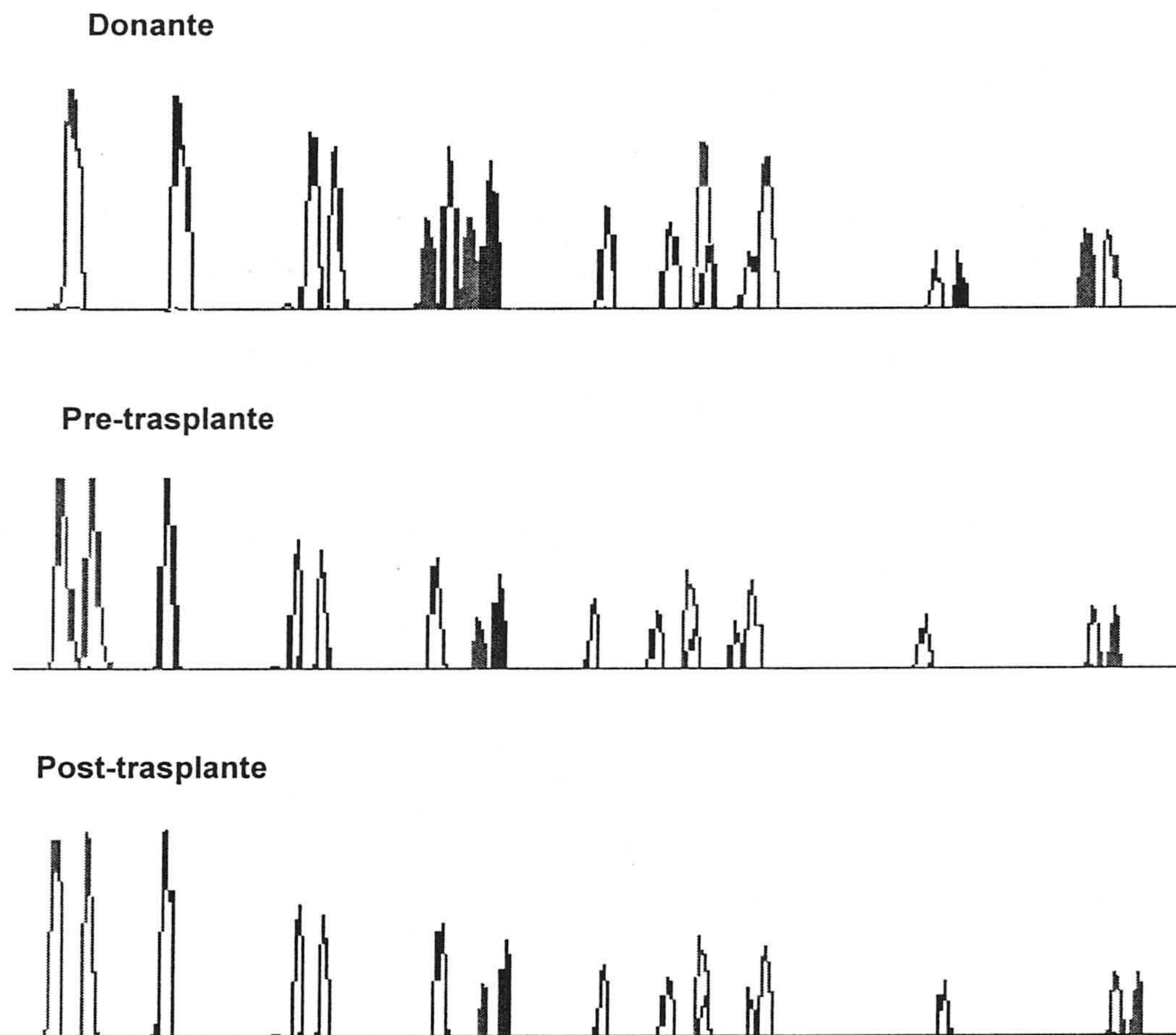


Figura 13: Patrón de marcadores, los marcadores coloreados son los informativos. Se observa que en la situación post-trasplante los marcadores son idénticos a los del receptor, no observándose marcadores del donante.



### Caso 11 (LMR)

Paciente de 19 años diagnosticada de LMA-M3, sometida a un trasplante estándar de hermana HLA idéntica en segunda remisión completa. La paciente presentó una situación de quimera total desde el implante hasta siete meses post-trasplante cuando falleció a causa de una neumonitis intersticial. Caso desarrollado en el apartado 3.3.

### Caso 12 (RRE)

Paciente de 46 años diagnosticada de LMA-M1, sometida a trasplante con selección positiva de hermano HLA idéntico.

El estudio de quimerismo en sangre total dio como resultado una situación de quimerismo total a los 20 días postrasplante. El estado de quimerismo evolucionó a una situación de quimera mixta que se mantiene desde el séptimo mes hasta un año y medio post-trasplante (figura 14 a). En fecha +16 meses se realiza una primera infusión de linfocitos del donante que no origina ningún cambio en la situación de la quimera. Un año y medio post-trasplante se produce una recuperación autóloga tras una segunda infusión de linfocitos del donante. En fecha 20 meses post-trasplante se observa una recuperación de la quimera mixta, con un 10% de celularidad del donante, 22 meses post-trasplante, fecha en la que se dio por terminado el estudio se encontraba en una situación de recuperación total de celularidad propia.

El estudio en las distintas subpoblaciones, en las fechas en las que existe una situación de quimera mixta en sangre periférica, nos muestra la existencia de una quimera mixta en la serie mieloide mientras que la celularidad mononuclear pertenece en su totalidad al receptor. El estudio de quimerismo en subpoblaciones, en la fecha de la recuperación autóloga (año y medio post-trasplante), muestra que no existen trazas de celularidad del donante. La recuperación de la quimera mixta en fecha 20 meses post-trasplante se produce en las dos series mononuclear y mieloide al mismo tiempo, con un 10% y un 15% de celularidad del donante respectivamente. 22 meses post-trasplante, fecha en la que se dio por terminado el estudio se encontraba en una situación de recuperación total de celularidad propia en todas las subpoblaciones (Figura 14b).

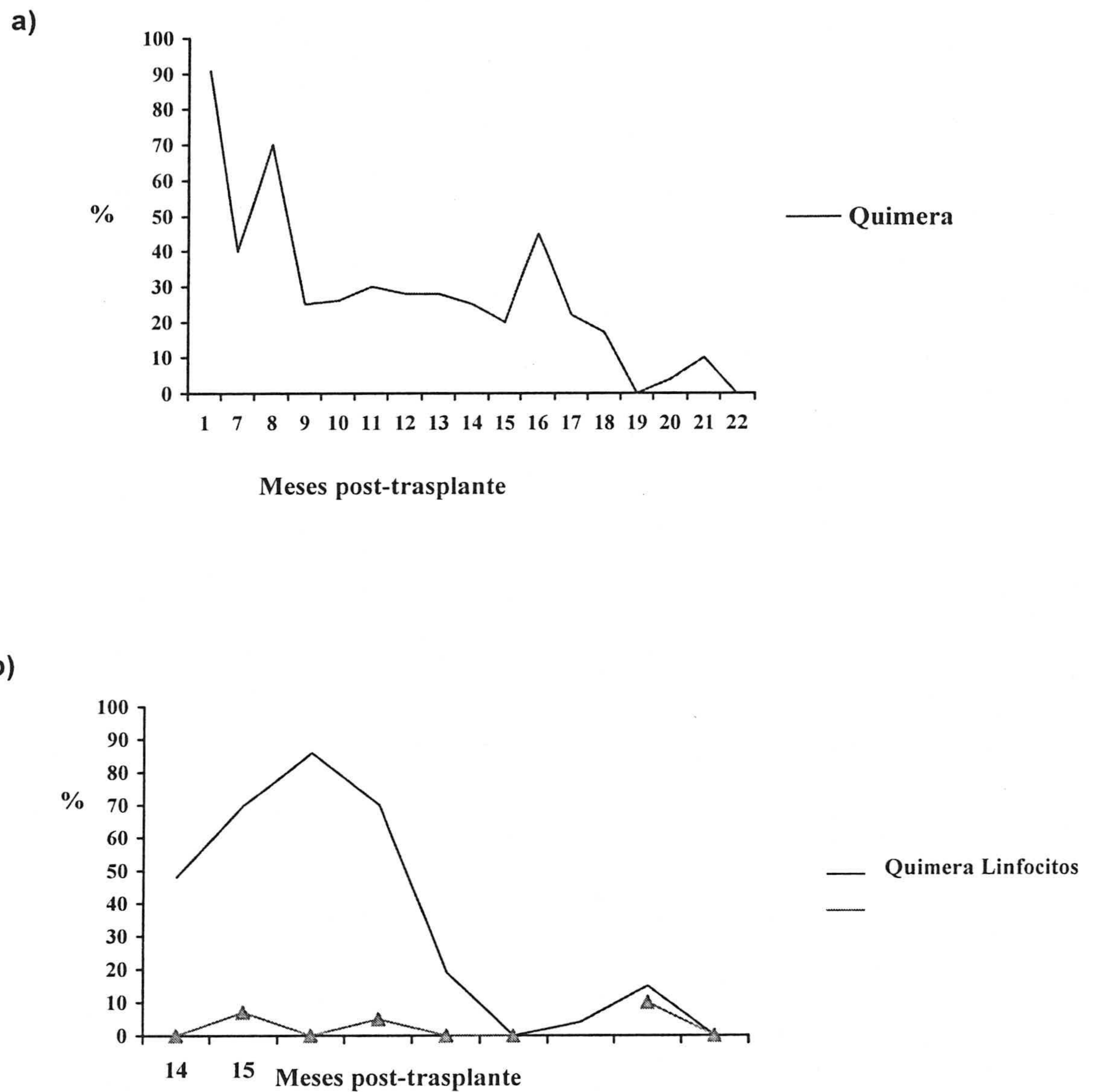


Figura 14: a) Evolución del quimerismo en SP; b) evolución del quimerismo en las distintas series leucocitarias

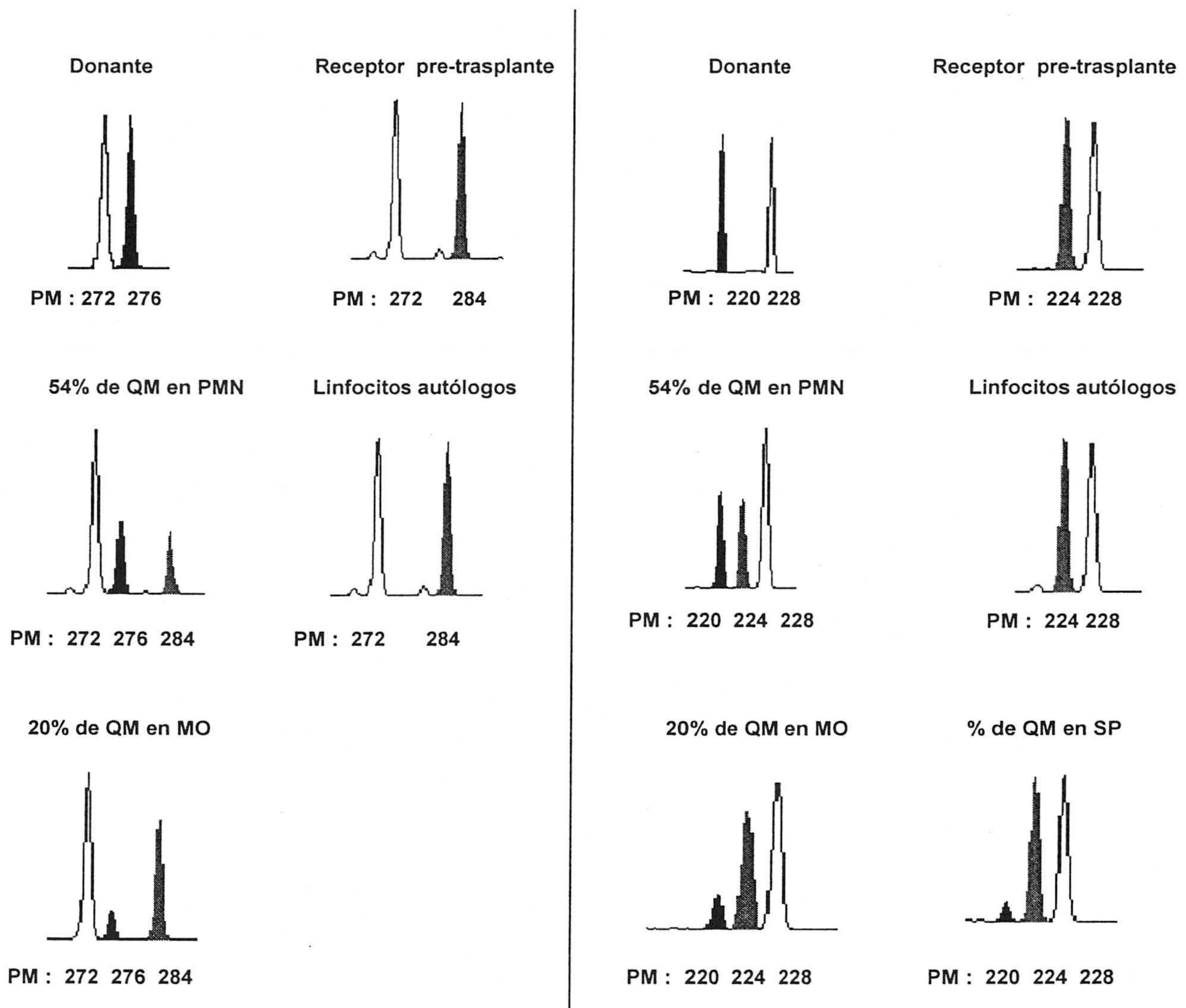


Figura 15: Paciente RRE. Situación del quimerismo en las distintas subpoblaciones leucocitarias, SP y MO año y medio post-trasplante. Marcadores informativos D7S820 y FGA, los alelos presentes únicamente en el receptor se presentan coloreados en rojo, los del donante en negro. Se observa una situación de quimera mixta en SP, MO y población polimorfo nuclear, la población linfocitaria presenta únicamente los marcadores propios de la paciente.

#### Caso 13 (CTR)

Paciente de 49 años sometido a un mini-trasplante en primera remisión completa de hermano HLA- idéntico. Presenta una situación de quimera total que se mantiene hasta la actualidad.

#### Caso 14 (AGG)

Paciente de 44 años sometido a un mini-trasplante en primera remisión completa de hermana HLA- idéntico. Presenta una situación de quimera total que se mantiene hasta la actualidad.

#### Caso 15 (IRV)

Paciente de 34 años sometido a un trasplante con selección positiva en segunda remisión completa de hermano HLA- idéntico. Presentó una situación de quimera total al implante que se mantuvo hasta el éxitus tres meses post-trasplante

#### Caso 16 (EVC)

Paciente de 33 años sometido a un trasplante estándar en primera recaída de hermana HLA- idéntica.

Se realizaron estudios de quimerismo +1, +2, +4, +5 meses post-trasplante en sangre periférica (S.P.), y en subpoblaciones leucocitarias (Figura 15). Paralelamente se realizaron estudios inmunofenotípicos y citogenéticos.

Un mes post-trasplante presenta una situación en S.P. de 80% QM, el estudio de las subpoblaciones muestra un 80% de QM en la población linfoide y QT en la población mieloide (Figura 16). Dos meses post-trasplante el paciente presentaba una situación en el estudio del quimerismo similar al mes anterior. Clínicamente se observa pancitopenia e instauración retardada del implante. No se evidenció la presencia de blastos ni por citología ni mediante inmunofenotipo. En fecha +3 meses sólo fue posible la realización de un estudio de quimerismo en SP que no mostró variación con respecto al del mes anterior. Cuatro meses post-trasplante el estudio de quimerismo muestra un descenso en el porcentaje de QM presentándose un 65% en S.P., dato que coincide con el porcentaje de QM en población linfoide, siendo imposible la amplificación de la serie mieloide. El paciente presenta un 1.2% de mieloblastos detectadas mediante inmunofenotipaje. Un mes después se observa una situación de QM (70%) en SP similar al mes anterior pero el

estudio por subpoblaciones nos muestra un descenso de la quimera mixta en serie linfoide, situándose en un 30% QM. Paralelamente se detecta la presencia de un 13% de blastos en SP mediante citometría de flujo. En la separación de las subpoblaciones, realizada con Ficoll, los blastos se encuentran en la fracción mononuclear, un descenso en la QM de dicha serie podría ser provocado por la presencia de celularidad leucémica del paciente, blastos mieloides.

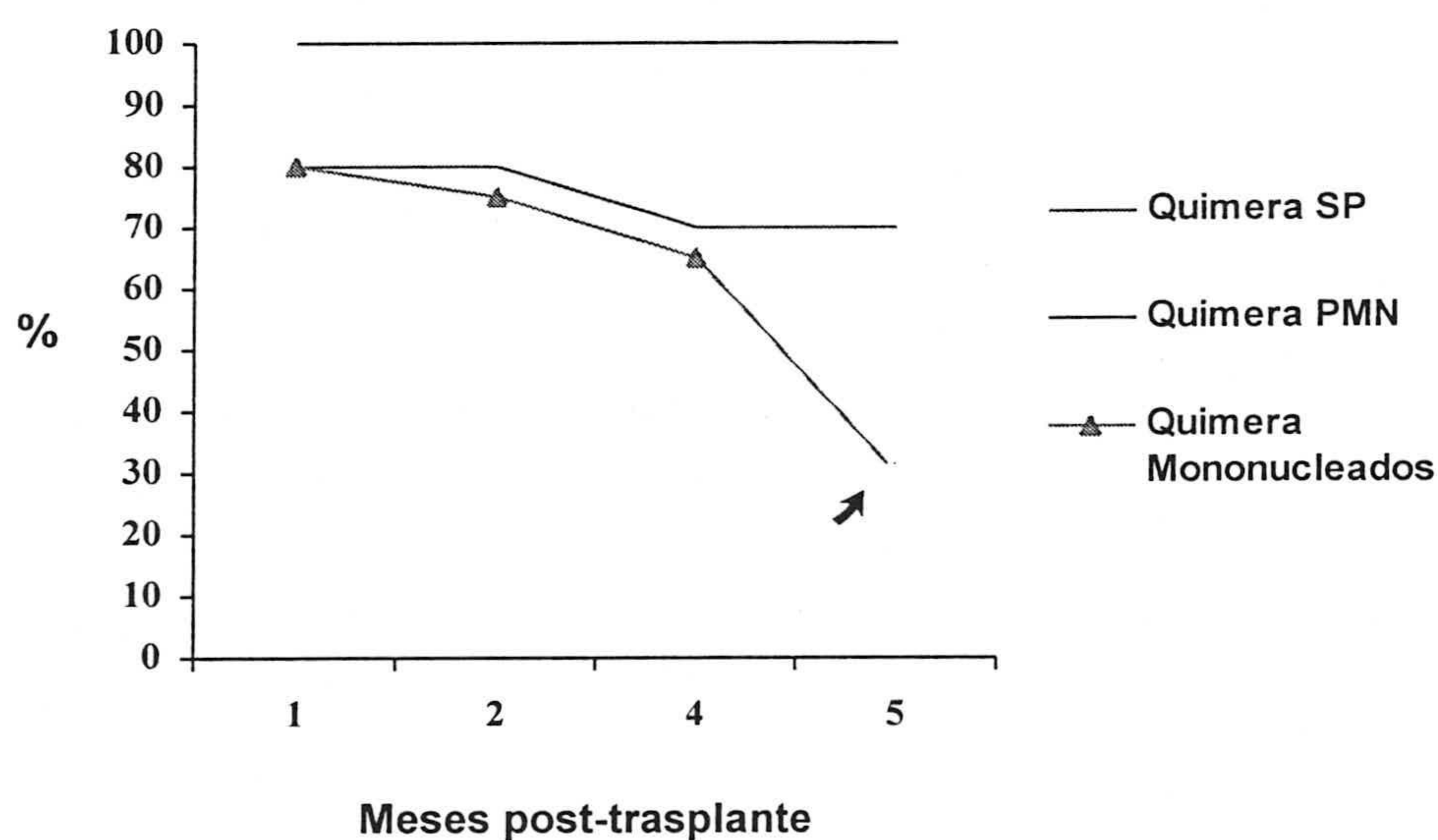


Figura 16: Evolución de la quimera en SP y subpoblaciones leucocitarias. La detección de blastos mediante inmunofenotipaje coincide con el descenso de la población mononuclear, señalado mediante una flecha negra.

## 2.5. SÍNDROME MIELODISPLÁSICO Y APLASIA MEDULAR

Caso 17 (MFG), paciente de 40 años sometido a un trasplante estándar de hermana HLA idéntica en fase de enfermedad activa. Quimera total al implante que se mantiene hasta la actualidad.

Caso 18 (ENC), paciente de 33 años sometida a un trasplante estándar de hermana HLA idéntica en fase de enfermedad activa. Quimera total al implante que se mantiene hasta la actualidad.

## 2.6. LEUCEMIA AGUDA LINFOIDE

Caso 19 (CGG),

Paciente de 34 sometida a trasplante con selección positiva de hermana HLA idéntica en fase quimio-resistente

Caso 20 (RLF)

Paciente de 37 sometido a trasplante estándar de hermana HLA idéntica en primera remisión completa

Caso 21 (MALG)

Paciente de 44 sometida a trasplante estándar de hermana HLA idéntica en fase quimio-resistente

En los tres casos se observó una situación de quimera total tras el implante. En los tres casos se produjo el éxitus dos meses post-trasplante debido a infecciones fúngicas.

### 3. EVALUACIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR) MEDIANTE EL ESTUDIO DEL QUIMERISMO

Para la evaluación del estudio de quimerismo como método de elección en la detección de enfermedad mínima residual se han realizado estudios paralelos mediante citometría de flujo (en casos de LLC-B, LMA y MM) y RT-PCR (en casos de LMA-M3 y LMC).

#### 3.1. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA CASO 4 (MRD)

Paciente de 55 años diagnosticado en Junio de 1993 de Leucemia Linfática Crónica B. En Marzo de 1.999 se realiza un minitrasplante alogénico de precursores de sangre periférica de hermano HLA idéntico con acondicionamiento no mieloablativo, en fase de recaída quimio-sensible. La profilaxis para EICH se realizó con Ciclosporina y Prednisona. El estudio de enfermedad mínima residual se ha realizado paralelamente mediante inmunofenotipaje y estudio de quimerismo. El estudio del paciente se ha completado con un análisis del repertorio de receptores de linfocitos T y FISH.

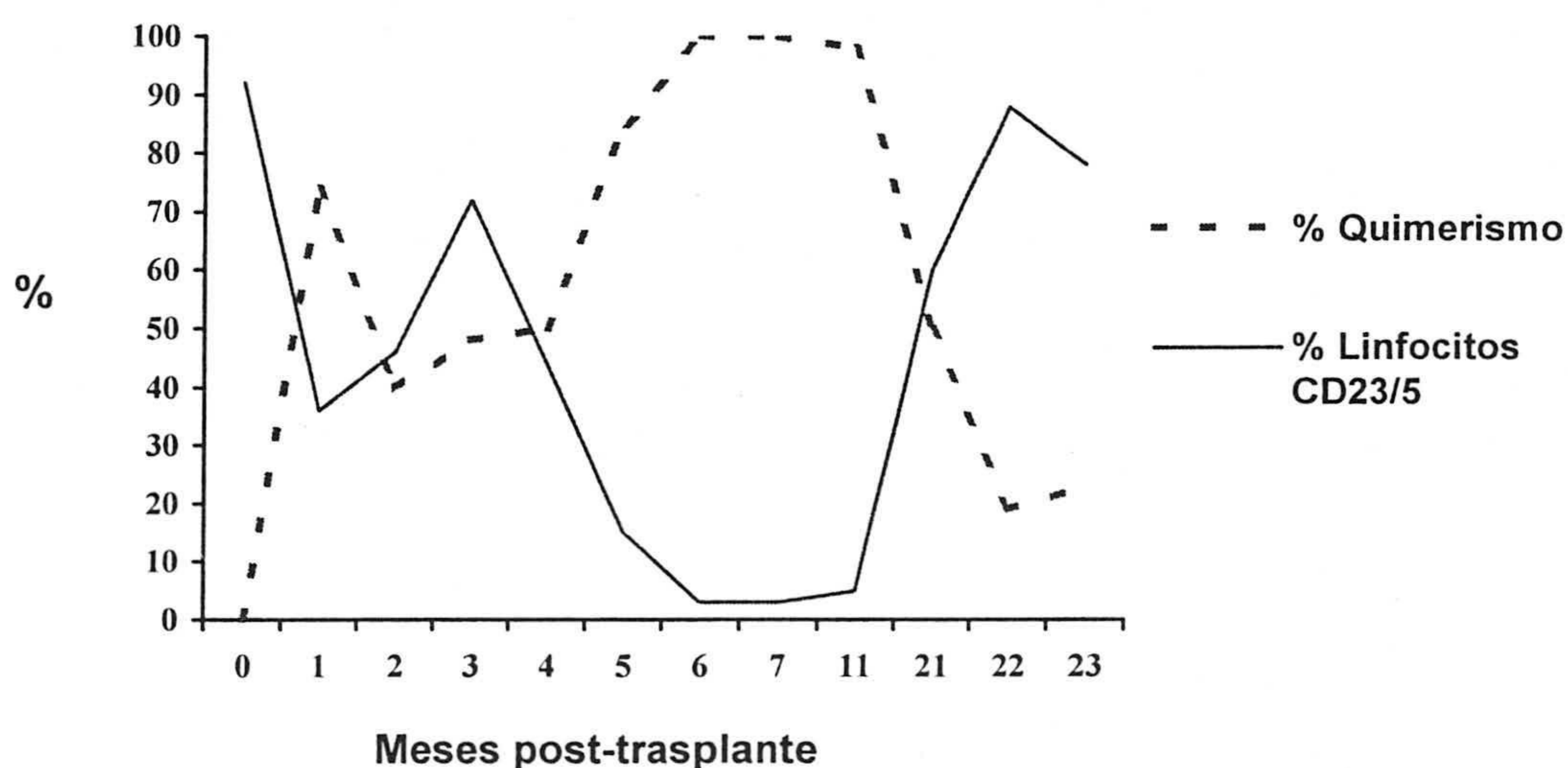


Figura 17: Evolución del quimerismo en SP

El día +14 post-trasplante se observa una recaída leucémica reflejada en un conteo de leucocitos de  $22 \times 10^9/L$  con un 77% de linfocitos B patológicos CD23/CD5 y un descenso del porcentaje de quimera. El paciente presentó EICH aguda grado II cutánea e intestinal a partir del día +30 que se trató con ciclosporina y esteroides. Tras la resolución de la EICH aguda la terapia inmunosupresora se reduce observándose paralelamente una mejoría hematológica en la que el número de leucocitos disminuye, a los 5 meses post-trasplante encontramos un 15% de LB patológicos (Figura 18) y dos meses más tarde la enfermedad mínima residual es menor de un 3% y se alcanza una situación de quimera total. En general hubo una buena correlación entre los resultados obtenidos entre el estudio del inmunofenotipo y los estudios de quimerismo.

A los once meses post-trasplante la terapia inmunosupresora se reanudó debido a la aparición de enfermedad injerto contra huésped crónica, estando el paciente en una situación estable con un recuento de leucocitos dentro de la normalidad.

A los veintiún meses post-trasplante se observa un incremento en el número de leucocitos con presencia de un 60% de linfocitos patológicos detectables por inmunofenotipaje (Figura 18), que provocan una disminución del porcentaje de quimera. Esta situación coincide con la detección de una clona trisómica no detectada en la situación pre-trasplante (desarrollado en el apartado 6). Se suprime la inmunosupresión con objeto de potenciar el efecto injerto contra leucemia, no observándose mejoría como sucedió en la primera recaída. Evolucionó a una linfocitosis progresiva que no respondió al tratamiento farmacológico.



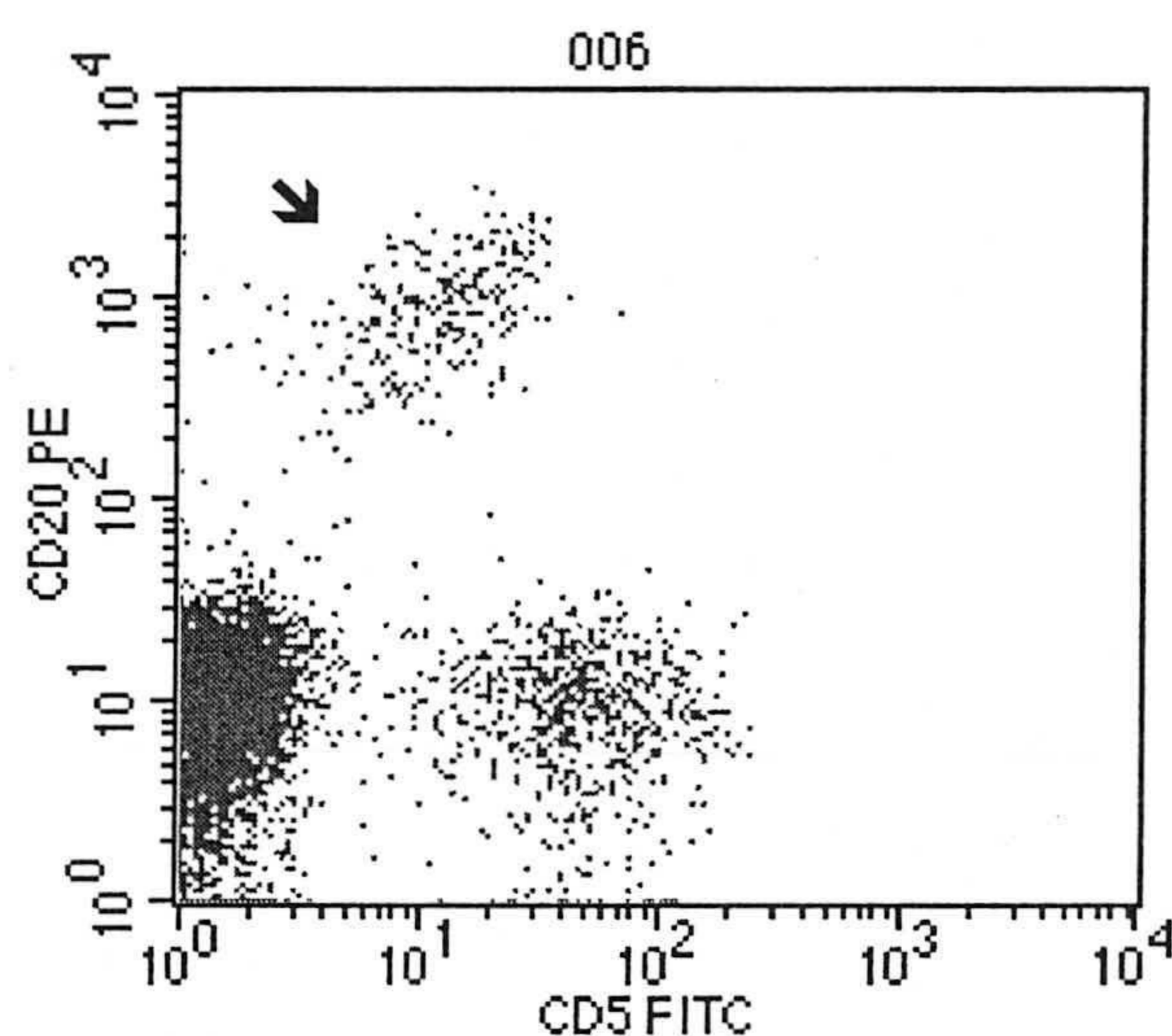


Figura 18: Resultado del inmunofenotipo 5 meses post-trasplante en el que se observa una población patológica 20/5 correspondiente a un 15% (indicado mediante una flecha negra), este inmunofenotipo coincide con una situación de quimerismo mixto del 85%.

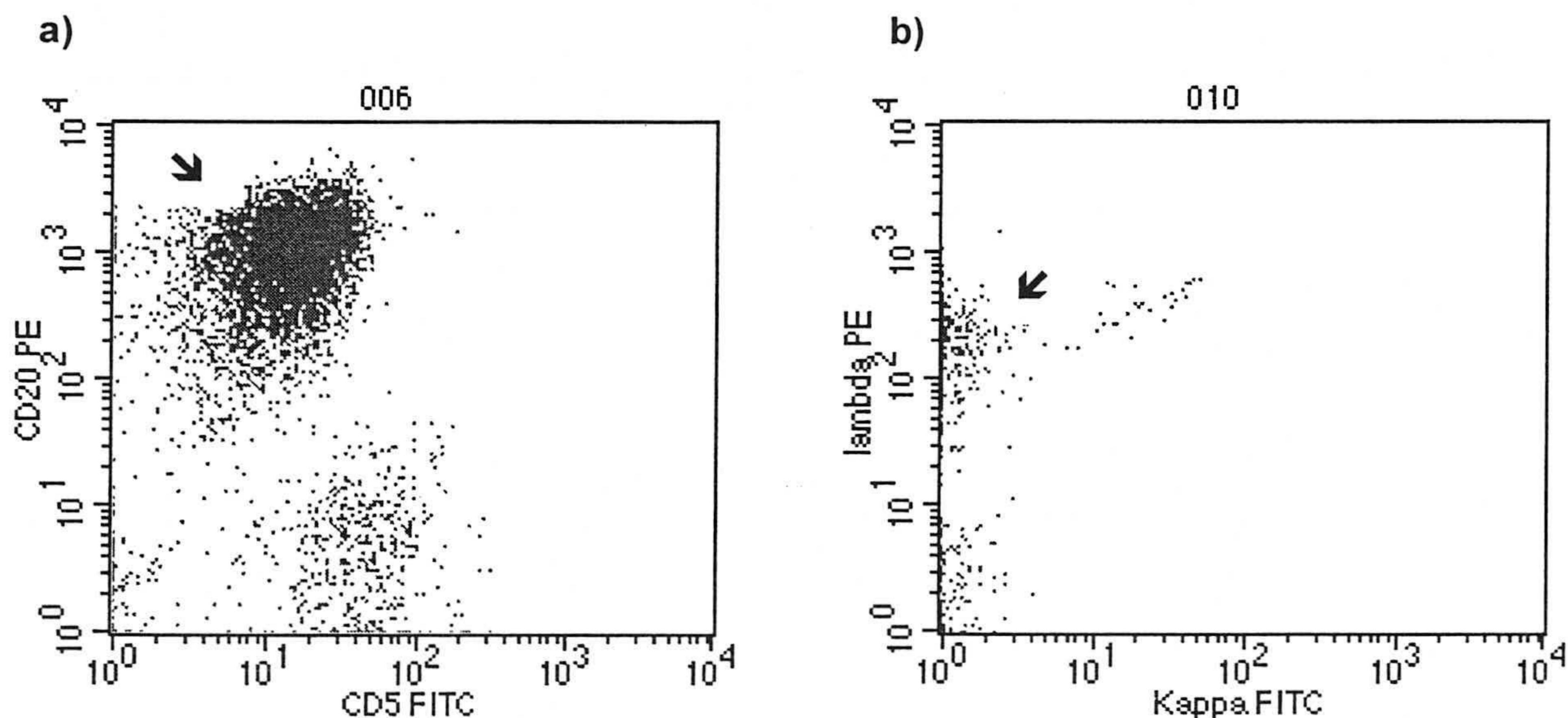


Figura 19: a) Inmunofenotipo 21 meses post-trasplante, el paciente se encuentra en recaída toda la población linfóide de estirpe B es leucémica con coexpresión de los marcadores de superficie CD20/CD5 (señalado con flecha negra), el estudio de quimerismo por subpoblaciones mostró que la población B era de origen del receptor. b) Monoclonalidad lambda de la población B patológica.

Se procedió al estudio del quimerismo en las distintas fracciones celulares, linfocitos T, linfocitos B y serie polimorfonuclear. Los datos cuantitativos mostraron que tanto la celularidad T como la polimorfonuclear presentaban los marcadores del donante, mientras que la celularidad B pertenecía prácticamente en su totalidad al receptor (Figura 20). Situación indicativa de recaída y no de fallo de injerto.

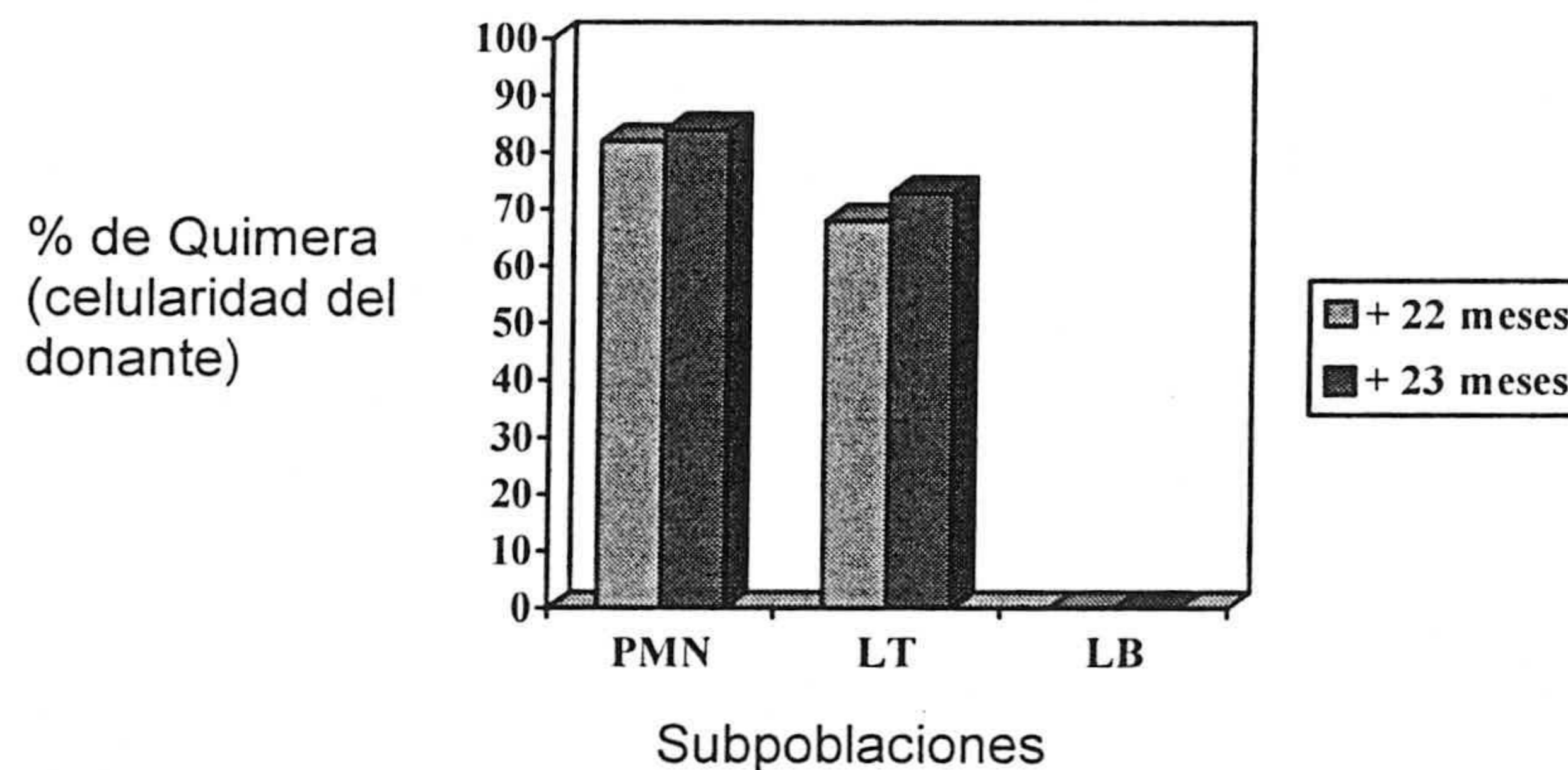


Figura 20: Estudio del quimerismo por subpoblaciones tras la recaída, podemos observar una ausencia total de quimera en la subpoblación B, lo que indica un dominio de celularidad del receptor en dicha estirpe.

El paciente falleció a los 23 meses post-trasplante.

### 3.2. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Estudio comparativo con RT-PCR.

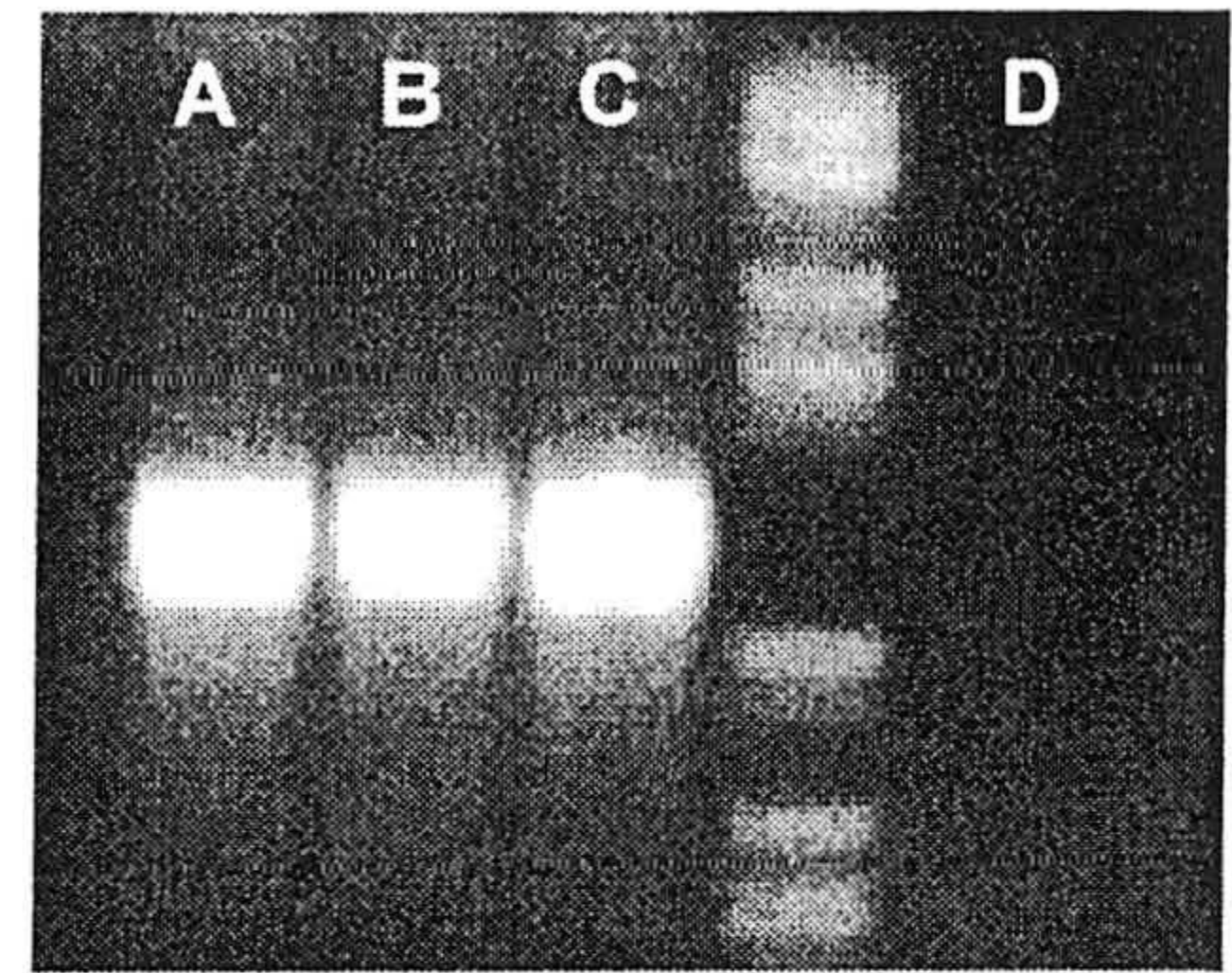
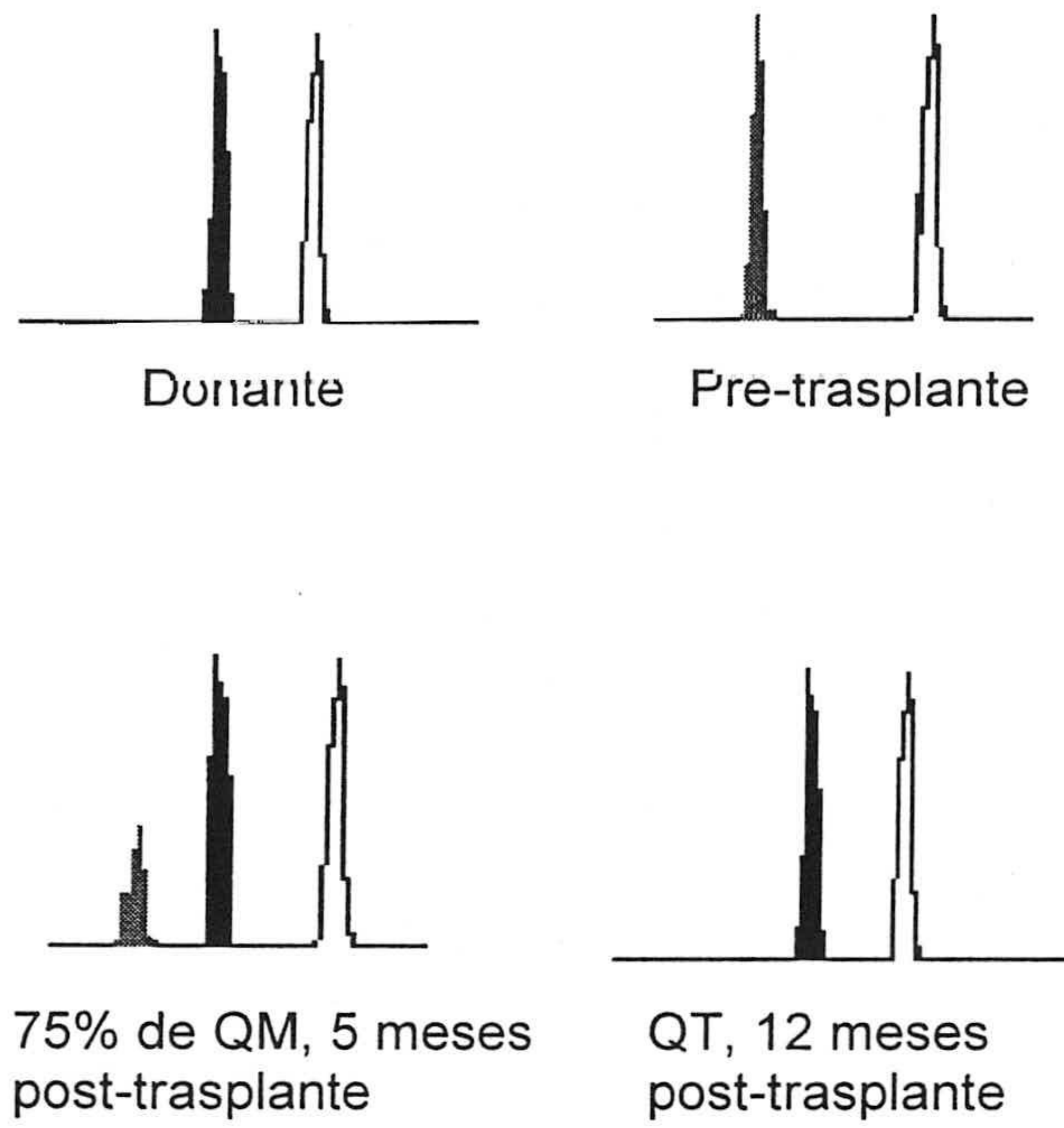
#### CASO 1 (DMM)

Paciente de 21 años diagnosticado en enero de 1998 de LMC, fué sometido en septiembre del mismo año a un trasplante alogénico con selección positiva de hermano HLA idéntico en fase crónica. La profilaxis para EICH se realizó con Ciclosporina. Sufrió EICH crónica limitada.

El seguimiento de la enfermedad mínima residual se llevó a cabo paralelamente mediante análisis por RT-PCR del reordenamiento Bcr-abl y estudio del porcentaje de quimera en sangre periférica.

El estudio del quimerismo mostró una situación de quimera mixta que evoluciona a una situación de quimera total que se mantiene en la actualidad. Seis días post-trasplante observamos una situación de un 10% de quimera mixta indicativo de la

progresión del injerto, a los cinco meses post-trasplante presenta una situación de quimera total. Cuatro meses más tarde, en el noveno mes post-trasplante se detectó una pérdida de la quimera instaurándose una situación de quimera mixta del 75% y de un 80% en el décimo mes. En dichas fechas el estudio del reordenamiento Bcr-abl era positivo. En el duodécimo mes tras realizarse una infusión de linfocitos se recuperó una situación de quimera total, a la vez que se observa una negativización del marcador molecular (Figura 21). Esta situación se ha mantenido hasta la actualidad. El estudio de las subpoblaciones muestra también una situación de quimera total.



A: Control positivo  
 B: Pre-trasplante  
 C: 5 meses post-trasplante  
 D: 12 mese post-trasplante

Figura 21: Izquierda: resultados del estudio del quimerismo, marcador informativo vWA (FAM), en rojo el alelo característico del receptor (PM: 167), en negro el del donante (PM: 176). Derecha: Análisis del reordenamiento bcr-abl

Caso 3 (MAAR),

Paciente de 60 años sometida a un mini-trasplante en fase crónica de la enfermedad. Un mes post-trasplante presenta una situación de QM con un 85% de celularidad perteneciente al donante, el estudio molecular de enfermedad mínima residual realizado en la misma fecha muestra un resultado positivo con reordenamiento bcr/abl 2. La paciente evoluciona a una situación de quimera total y negativización del marcador molecular. Fallece por sinusitis por Aspergillus un año post-trasplante.

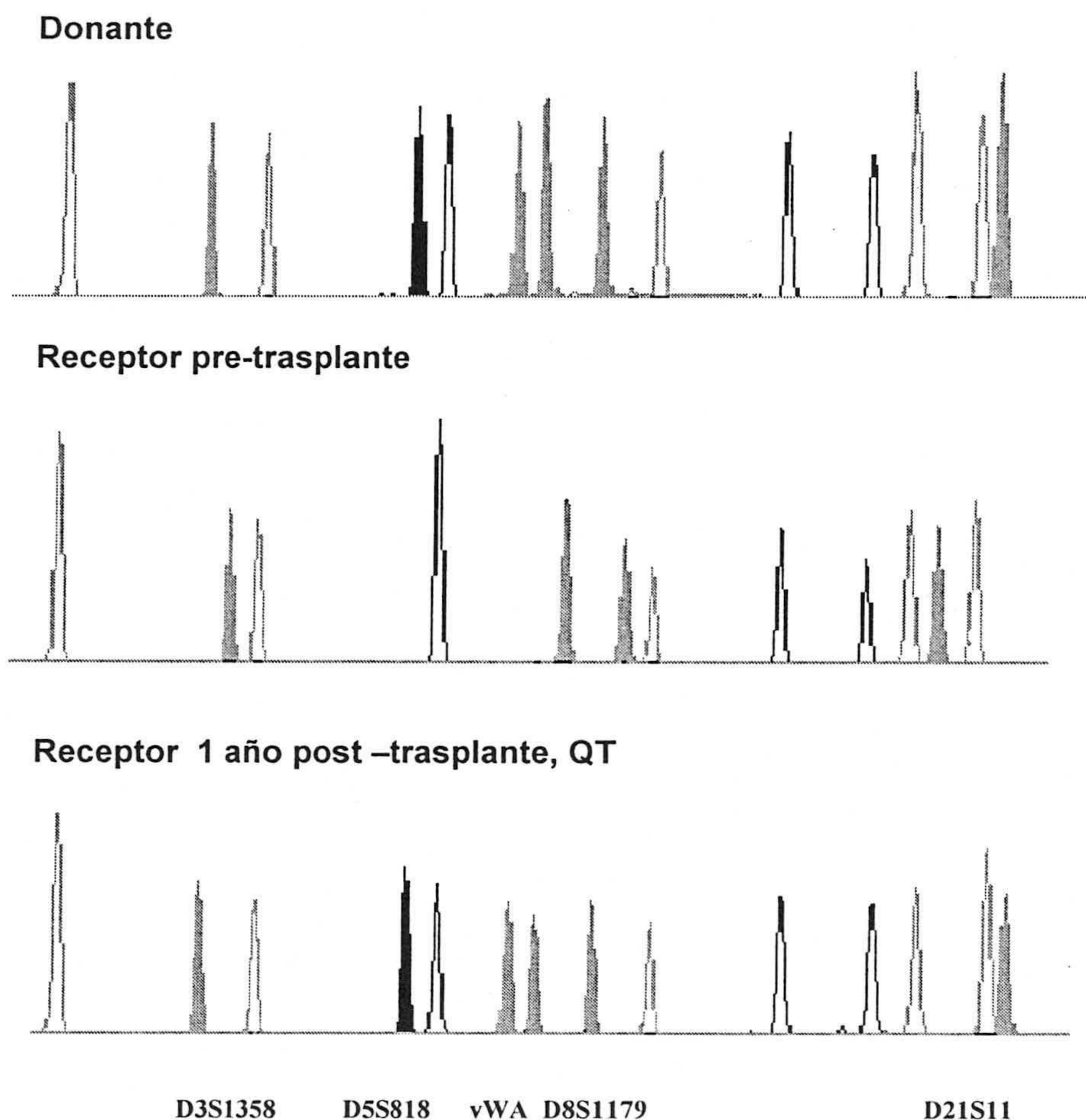


Figura 22: Marcadores del donante y del paciente en las distintas situaciones pre y post-trasplante. Los alelos informativos de los marcadores D3S1358 (azul), D5S812 (negro), vWA (azul), D8S1179 (verde) y D21S11 (verde), el resto de marcadores son iguales en ambas hermanas.

### 3.3. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA PROMIELOCÍTICA M3

#### CASO 11(LMR)

Paciente de 19 años sometida a un trasplante estándar de hermana HLA idéntica en segunda remisión completa. La paciente presentó una situación de quimera total desde el implante hasta siete meses post-trasplante cuando falleció a causa de una Neumonitis intersticial.

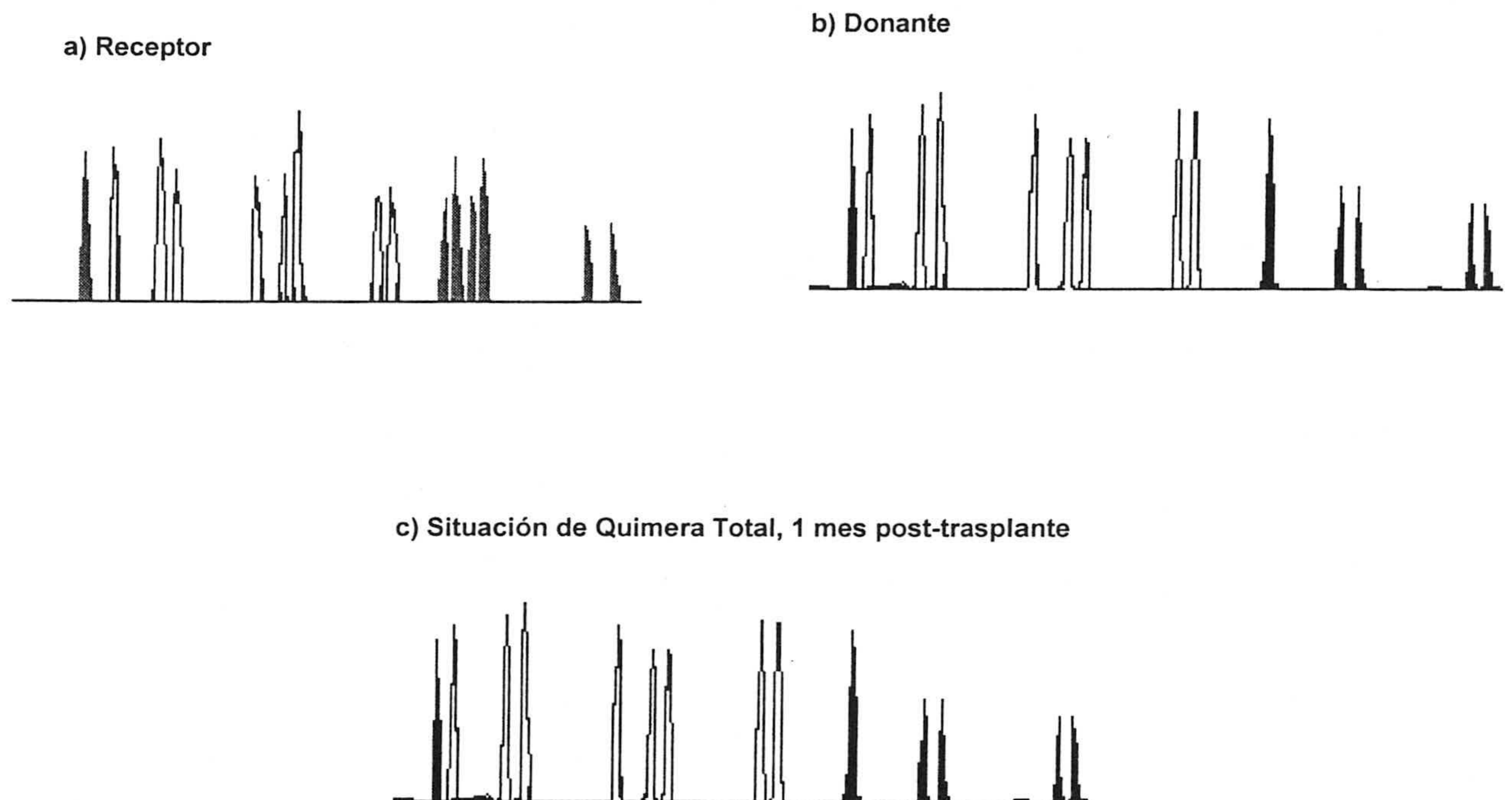


Figura 23: Patrón de nueve marcadores, los alelos informativos se encuentran coloreados, el resto son marcadores compartidos por donante y receptor; a) receptor pre-trasplante, b) donante, c) receptor 1 mes post-trasplante en situación de quimera total; d) negativización del marcador molecular PML-RAR $\alpha$  simultáneamente a la instauración de la quimera total.

#### 4. RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR T POST-TRASPLANTE, ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS RECEPTORES $\beta$ (TCRs).

En nuestro grupo de estudio 7 o 9 (dep del Dist.Resp) de los 21 pacientes fallecieron por complicaciones infecciosas, independientemente del éxito de la instauración del injerto y la instauración de una situación de quimerismo total. Todos estos procesos infecciosos están relacionados con déficit de la inmunidad celular T. Por todo esto hemos estudiado en algunos pacientes el grado de reconstitución de la inmunidad celular T, mediante el estudio de la complejidad del repertorio TCR, valorando conjuntamente el estado de quimera y el tipo de trasplante realizado.

Existen dos técnicas que se emplean en la evaluación del grado de complejidad de la celularidad T. No de ellos mide la frecuencia o representación cuantitativa de las subpoblaciones, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la parte variable de la cadena  $\beta$  de los TCRs. Esta técnica permite la detección de expansiones sugerentes de monoclonalidades, también pone de manifiesto la ausencia de una o varias subpoblaciones, lo que sería indicativo de un déficit en la reconstitución del repertorio T. La otra técnica, RT-PCR, mediante la utilización de un primer en la zona constante 3' y distintos primers específicos de cada subfamilia en 5', nos permite evaluar el grado de complejidad de las distintas fracciones, aunque no ofrece una visión global de la representatividad de las familias  $V\beta$ .

##### 4.1. ESTUDIO DE LA COMPLEJIDAD DEL TCR EN RELACIÓN A LA TÉCNICA DE TRASPLANTE UTILIZADO

###### 4.1.1. ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS FAMILIAS $V\beta$ MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Previamente a la puesta en marcha del estudio con los pacientes se realizó la determinación de los valores normales en nuestra población sana.

CD 4				CD 8			
TCRs	$\chi$	$\sigma$	$\chi \pm 3 \sigma$	TCRs	$\chi$	$\sigma$	$\chi \pm 3 \sigma$
V $\beta$ 5.3	1.22	0.38	(0.08-2.36)	V $\beta$ 5.3	3.17	1.87	(<0 - 8.78)
V $\beta$ 7.1	2.31	0.77	(0-4.62)	V $\beta$ 7.1	3.30	0.54	(1.68-4.92)
V $\beta$ 3	4.78	2.31	(<0-11.71)	V $\beta$ 3	4.69	2.07	(<0-10.90)
V $\beta$ 9	4.71	1.80	(<0-10.11)	V $\beta$ 9	2.62	1.52	(<0 - 7.18)
V $\beta$ 17	4.20	1.14	(0.78-7.62)	V $\beta$ 17	3.63	1.98	(<0 - 9.57)
V $\beta$ 16	1.15	0.51	(<0-2.68)	V $\beta$ 16	1.76	1.57	(<0 - 7.47)
V $\beta$ 18	1.57	0.78	(<0-3.91)	V $\beta$ 18	0.64	0.48	(<0 - 2.08)
V $\beta$ 5.1	6.08	2.03	(0-12.17)	V $\beta$ 5.1	3.24	1.42	(<0-7.50)
V $\beta$ 20	2.22	1.10	(<0-5.52)	V $\beta$ 20	1.79	1.39	(<0 - 5.96)
V $\beta$ 13.1	4.47	3.00	(<0 - 13.47)	V $\beta$ 13.1	5.51	1.77	(0.14-10.82)
V $\beta$ 13.6	1.96	0.61	(0.13-3.79)	V $\beta$ 13.6	1.65	0.96	(<0 - 4.53)
V $\beta$ 8	3.22	0.53	(1.63-4.81)	V $\beta$ 8	1.87	1.49	(<0 - 6.34)
V $\beta$ 5.2	1.12	0.45	(<0-2.47)	V $\beta$ 5.2	1.33	0.35	(0.28-2.38)
V $\beta$ 2	8.79	1.60	(3.99-13.59)	V $\beta$ 2	4.57	1.72	(<0-9.73)
V $\beta$ 12	2.37	1.60	(<0- 7.17)	V $\beta$ 12	1.52	1.14	(<0 - 4.94)
V $\beta$ 23	0.65	0.37	(<0-1.76)	V $\beta$ 23	2.66	1.72	(<0 - 7.82)
V $\beta$ 1	3.06	0.74	(0.84-5.19)	V $\beta$ 1	3.45	1.22	(<0-7.11)
V $\beta$ 21.3	2.42	0.43	(1.13-3.65)	V $\beta$ 21.3	3.06	1.52	(<0-7.62)
V $\beta$ 11	0.82	0.52	(<0 -2.38)	V $\beta$ 11	1.58	1.17	(<0 - 5.09)
V $\beta$ 22	4.06	2.05	(<0 - 10.21)	V $\beta$ 22	3.01	1.44	(<0-7.33)
V $\beta$ 14	2.41	0.73	(0.22-4.60)	V $\beta$ 14	2.81	1.07	(<0-6.02)
V $\beta$ 13.2	3.95	4.45	(<0 - 17.30)	V $\beta$ 13.2	2.84	1.46	(<0 - 7.22)
V $\beta$ 4	2.01	0.51	(0.48-3.54)	V $\beta$ 4	1.11	0.85	(<0 - 3.66)
V $\beta$ 7.2	1.3	0.22	(0.64-1.96)	V $\beta$ 7.2	1.31	0.97	(<0 - 4.22)
Clas/ $\mu$ l	849 - 1313			Clas/ $\mu$ l	310 - 674		

Tabla 3: Valores normales obtenidos a partir del análisis de 15 muestras de personas sanas.



Familia V $\beta$	CTR Mini	FMG Standard	RRE DeplecciónT
5.3	1.75	1.75	2.00
7.1	2.50	1.48	1.60
3	5.08	4.90	2.20
9	3.00	3.12	2.53
17	4.63	3.35	2.81
16	1.95	1.27	0.84
18	1.00	1.44	0.00
5.1	8.40	5.23	7.69
20	3.60	1.61	0.00
13.1	7.39	2.82	7.24
13.6	3.36	1.41	3.07
8	3.81	3.36	5.48
5.2	<b>8.57</b>	1.23	0.77
2	<b>71.43</b>	<b>14.35</b>	9.95
12	1.43	1.08	2.11
23	1.27	1.60	1.02
1	<b>6.62</b>	2.31	6.56
21.3	1.55	2.51	1.84
11	0.34	0.34	0.00
22	3.22	3.09	4.24
14	3.50	2.06	4.24
13.2	3.68	2.40	3.59
4	1.56	1.00	0.60
7.2	0.84	0.89	0.60
Células/ $\mu$ l	<u>752</u>	1071	<u>113</u>
% de V $\beta$ alterados	13	4	0

Tabla 4: Resultados en población CD4 en seis pacientes un año y medio post-trasplante. Los valores superiores en tres desviaciones estándar se presentan en negrita y los inferiores subrayados.

Familia V $\beta$	CTR Mini	FMG DeplecciónT	RRE DeplecciónT
2.5	0.94	1.14	0.56
7.1	<b>6.17</b>	1.28	<b>5.06</b>
3	3.12	4.47	3.93
9	0.98	2.15	3.46
17	6.84	<b>21.78</b>	7.58
16	3.28	2.77	0.87
18	0.15	0.77	0
5.1	1.06	3.28	3.28
20	0.68	0.33	0.23
13.1	4.00	2.36	3.93
13.6	<b>11.56</b>	2.43	0.99
8	0.44	1.39	0.95
5.2	0.88	0.84	0.95
2	0.50	3.48	0.95
12	0.75	0.45	2.86
23	0.64	2.78	1.75
1	2.79	6.50	3.51
21.3	2.07	0.62	0.35
11	0.40	0.67	0
22	1.6	1.98	0.42
14	0.87	1.84	0.21
13.2	0.64	2.72	3.89
4	0.40	0.49	1.01
7.2	0.48	1.38	0.64
Células/ $\mu$ l	<b>803</b>	<b>1543</b>	339
% de V $\beta$ alterados	8	4	4

Tabla 5: Resultados en población CD8 en seis pacientes un año y medio post-trasplante. Los valores superiores en tres desviaciones estándar se presentan en negrita y los inferiores subrayados.

#### 4.2.2. ESTUDIO CUALITATIVO DE LA COMPLEJIDAD DE LOS TCRS MEDIANTE RT-PCR

Se realizó un patrón control, con 10 cDNAs correspondientes a pacientes sanos. Los transcritos normales reflejan policlonalidad en el cDNA, mostrando una distribución gaussiana de al menos seis picos que difieren entre si 3 pb sin ningún hueco entre ellos

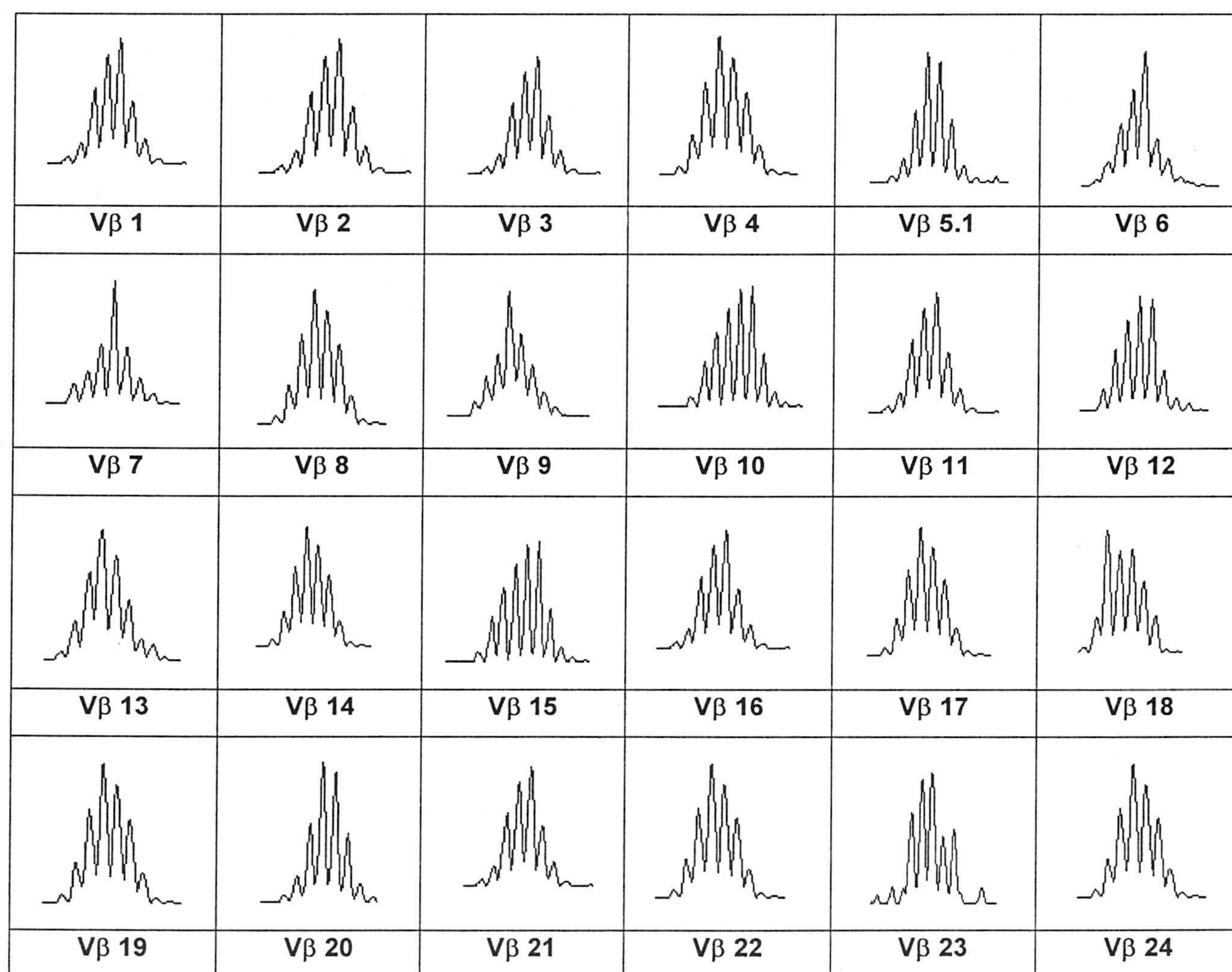

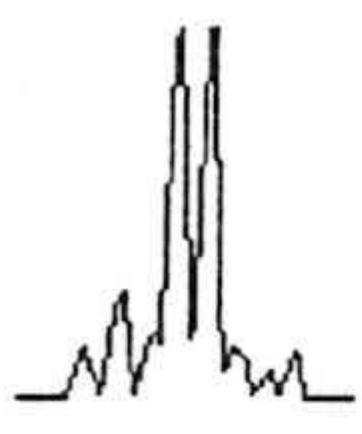
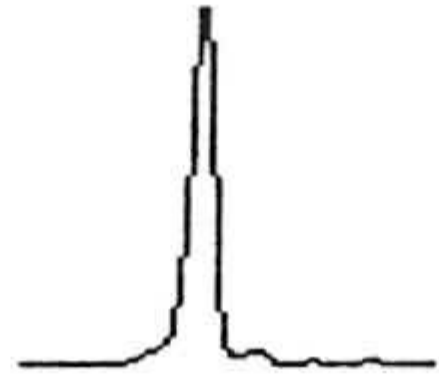
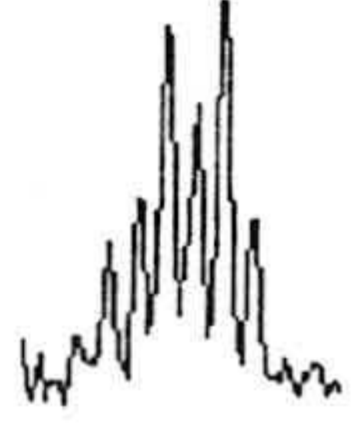
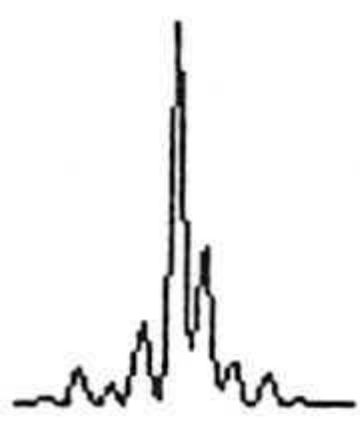

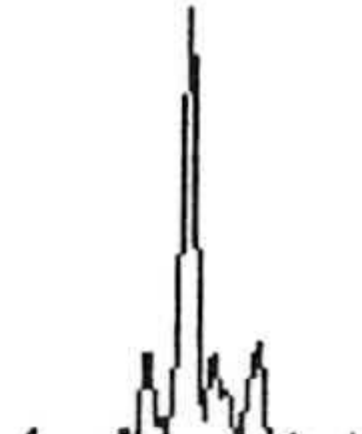
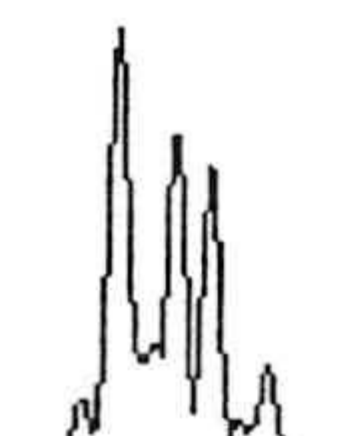
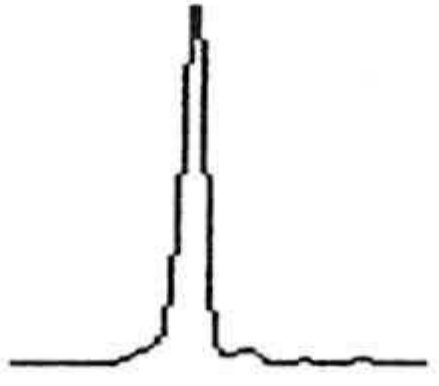

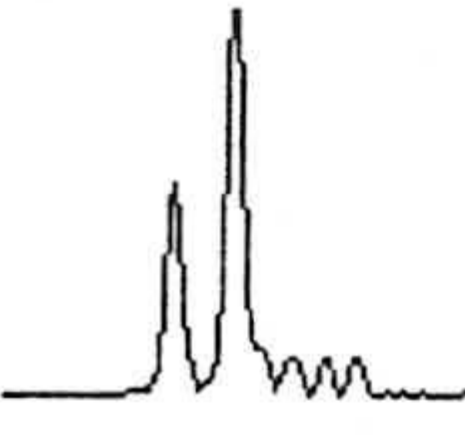
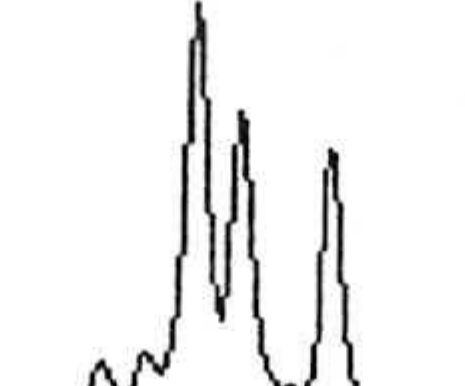
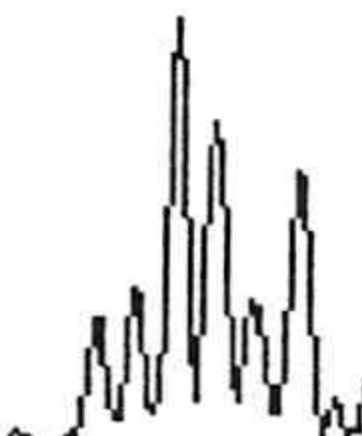
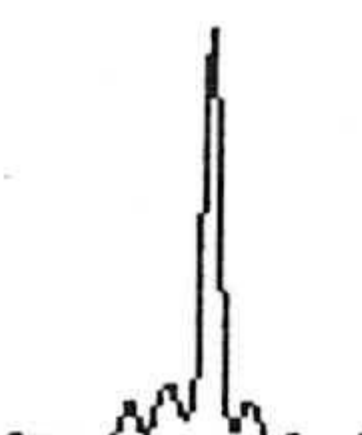
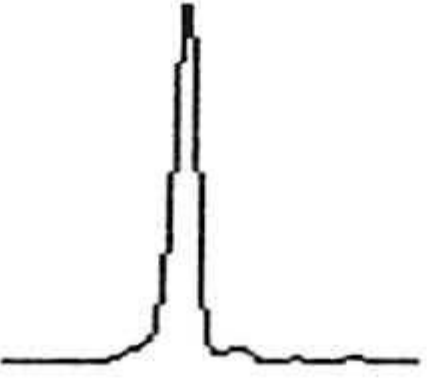
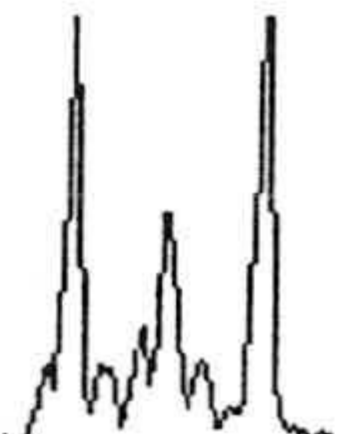

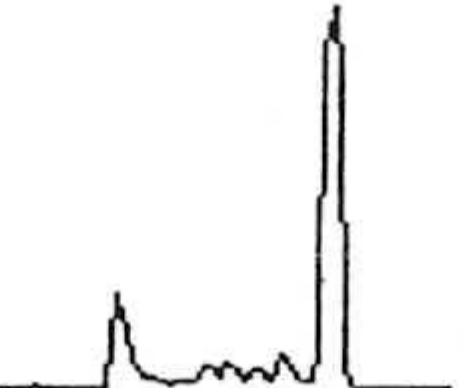
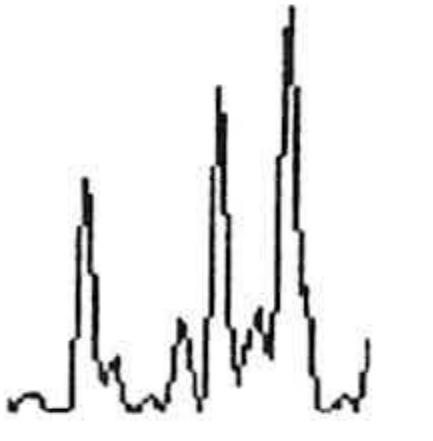
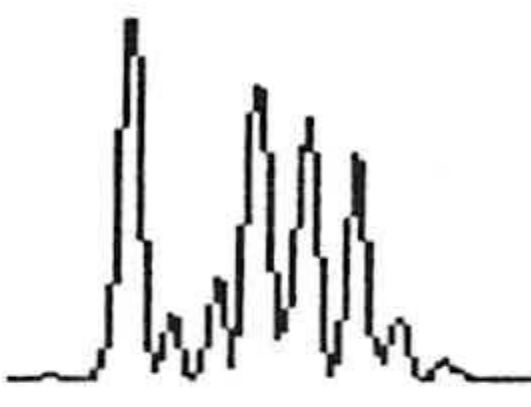
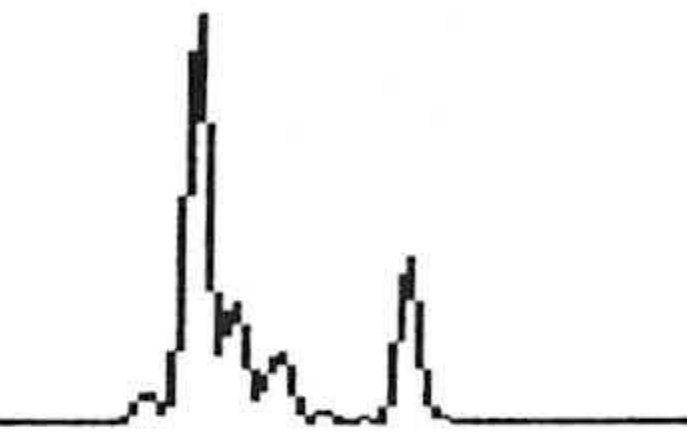


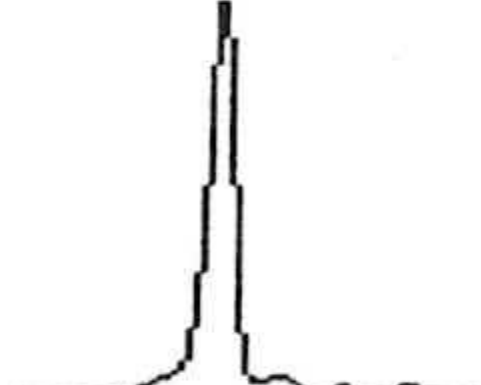
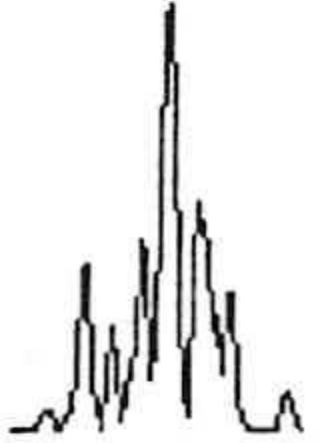
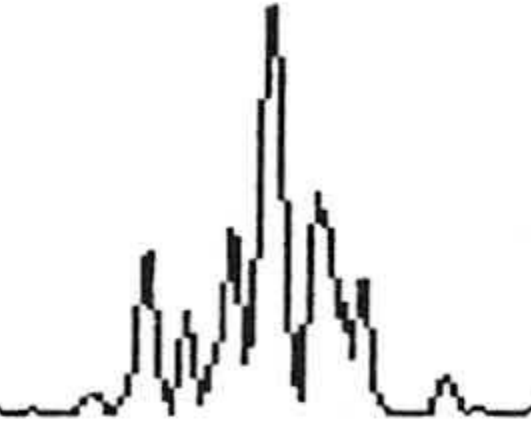
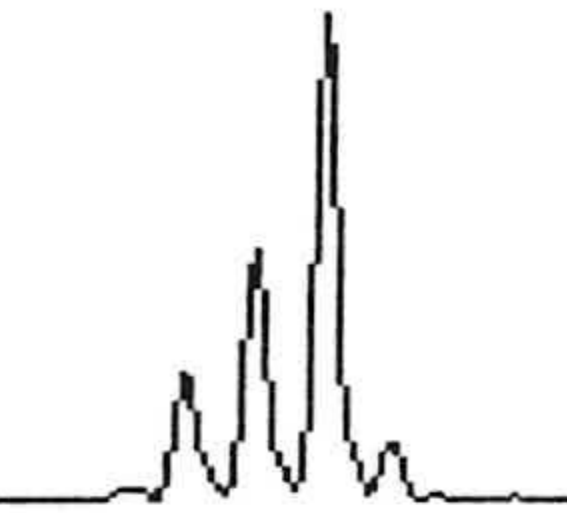
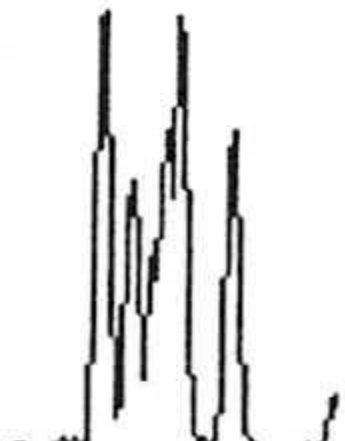
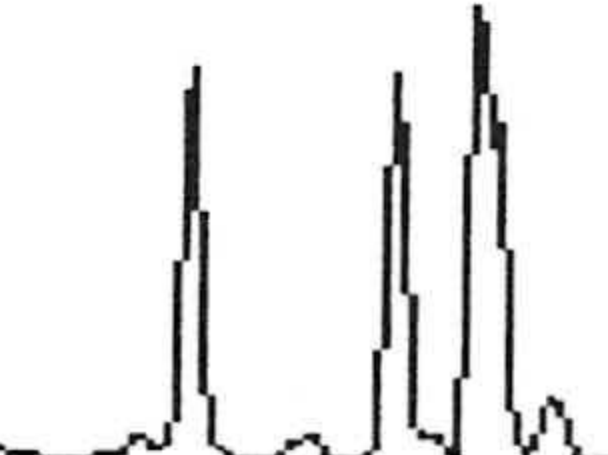
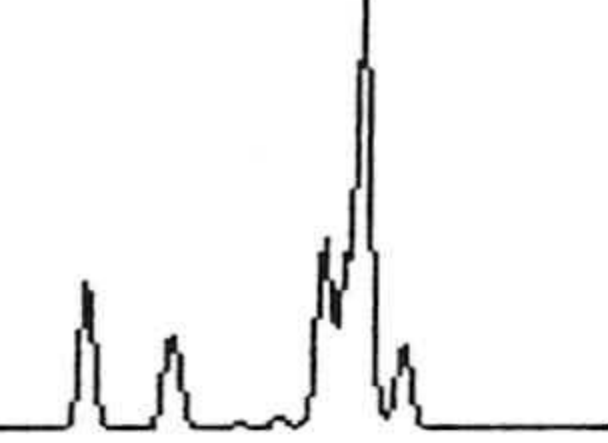
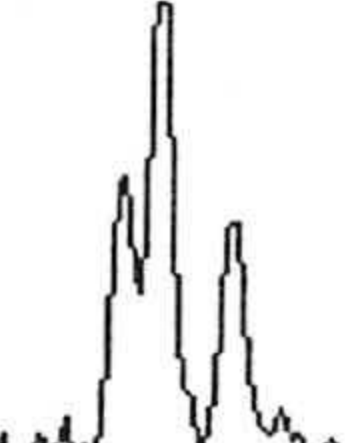

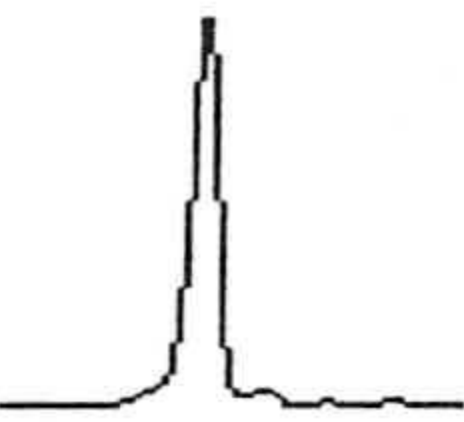
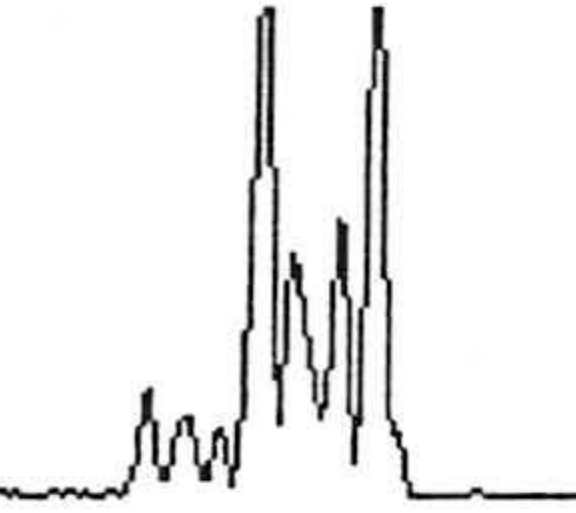
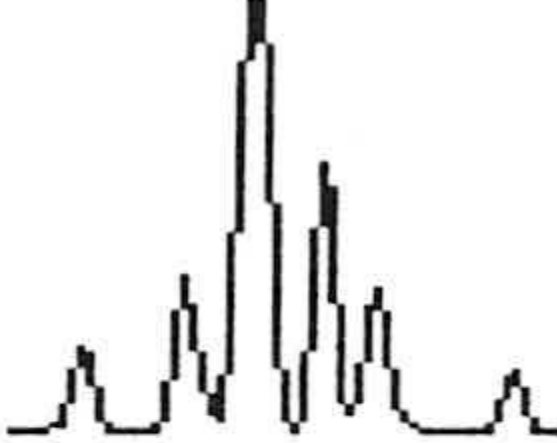



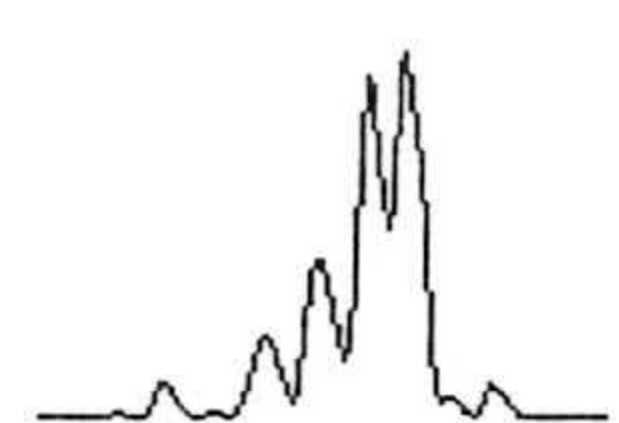
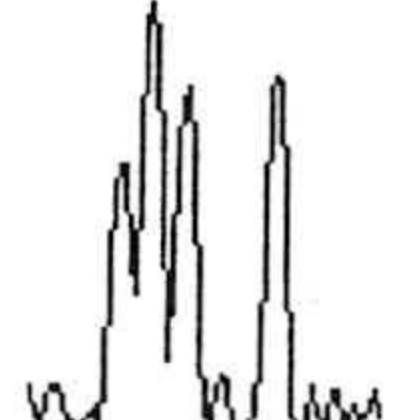
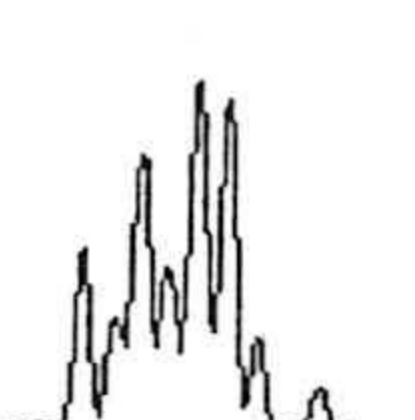
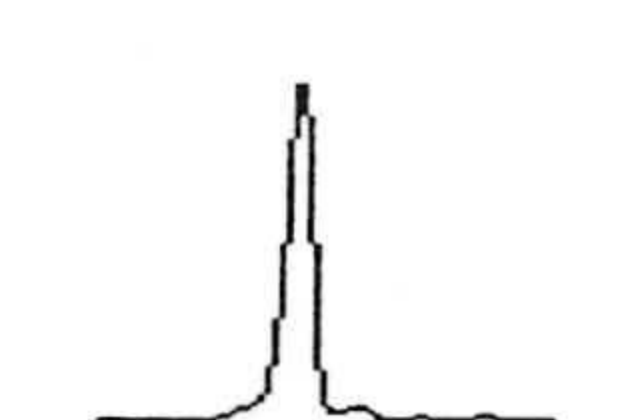
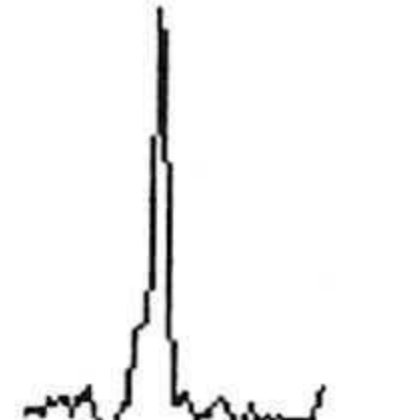
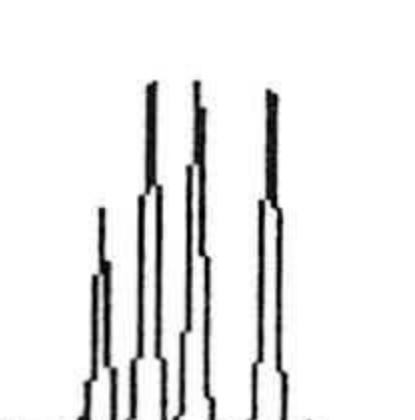
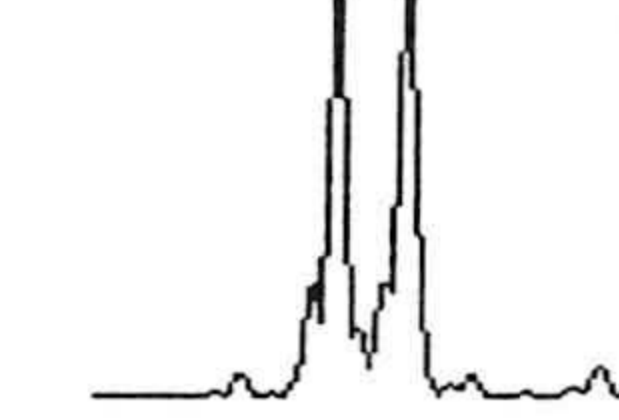
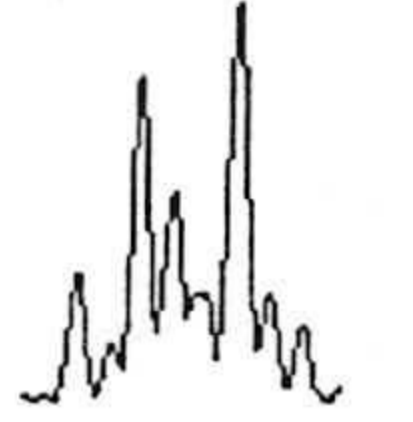
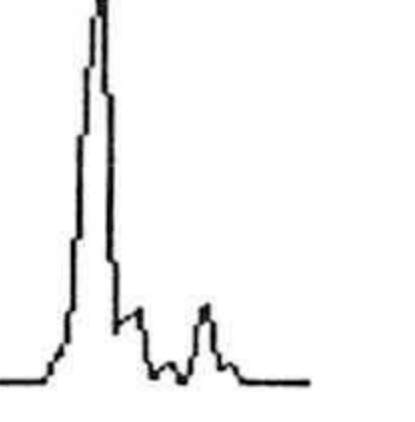

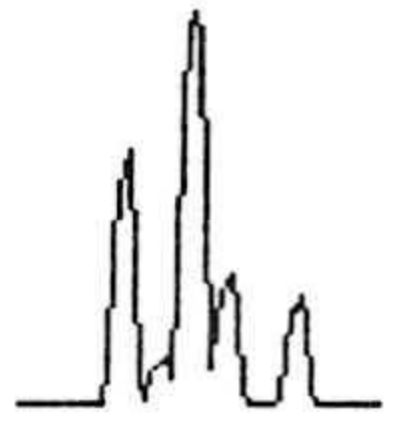
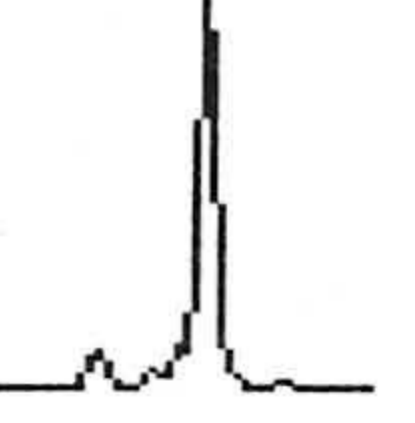
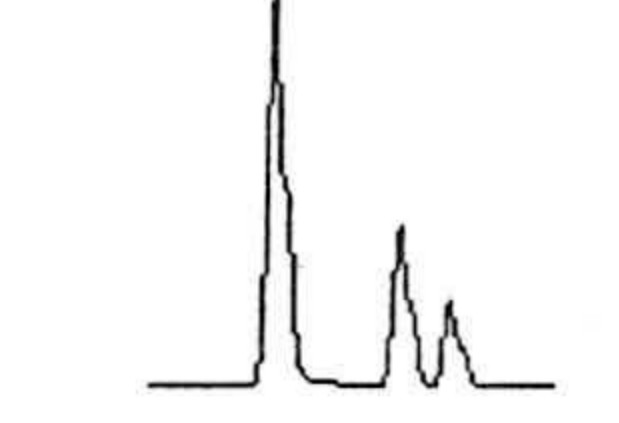


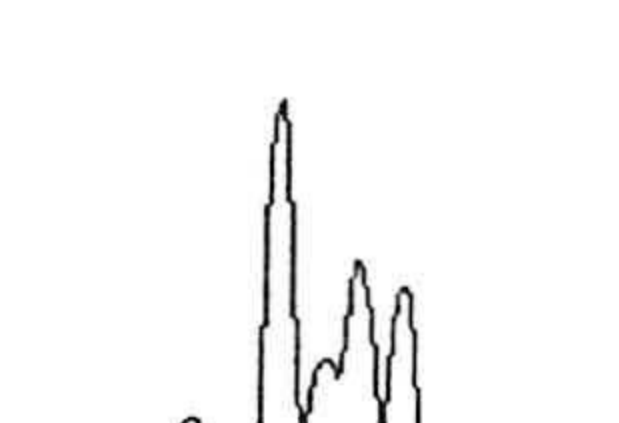


Tabla 6: Patrón de TCRs normal

La recuperación del repertorio T, depende entre otros factores del tiempo transcurrido desde el injerto y del tipo de trasplante realizado, hemos querido valorar la reconstitución del repertorio en pacientes con distinto tipo de trasplante, encontrándose todos en la misma fecha post-trasplante, +18 meses. La aparición de picos dominantes indican la presencia de un exceso de cDNA de idéntico tamaño, sugiriendo la presencia de una población T oligoclonal o monoclonal. Para realizar la valoración de la complejidad de los espectros encontrados se ha realizado la siguiente gradación de las subfamilias V $\beta$ , se asignará una puntuación de 0 si la familia no está presente, 1 si presenta un patrón monoclonal, 2 si presenta un patrón biclonal y así sucesivamente hasta la puntuación de 6 si la familia presenta un patrón policlonal normal con una distribución Gaussiana. La complejidad global en una muestra normal será la suma del número de subfamilias estudiadas, 24 por su puntuación de complejidad, con una puntuación máxima de 144.

V $\beta$	CTR Mini	FMG Estándar	RRE DeplecciónT
1			
2			
3			
4			
5			
6			

V $\beta$	CTR Mini	FMG Estándar	RRE DeplecciónT
7			
8			
9			
10			
11			
12			

Vβ	CTR Mini	FMG Estándar	RRE DeplecciónT
13			
14			
15			
16			
17			
18			

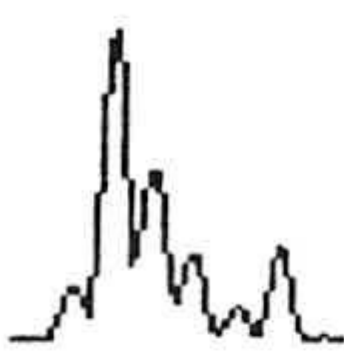

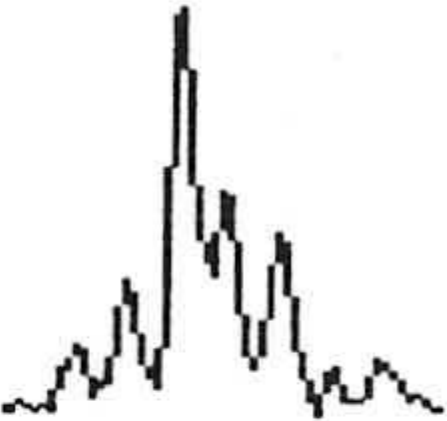

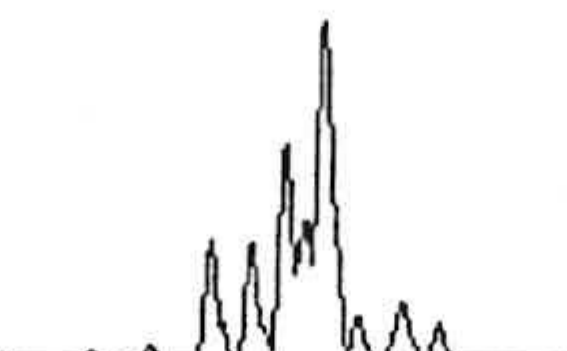

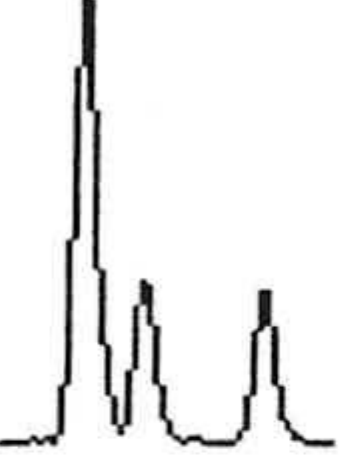
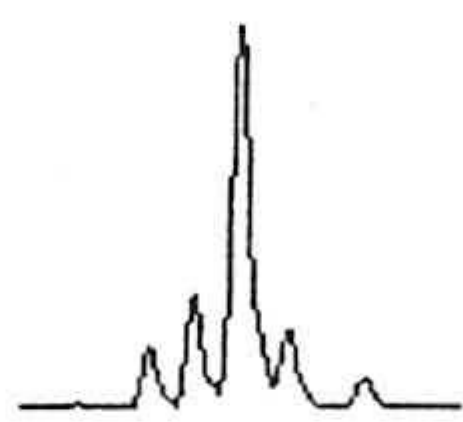
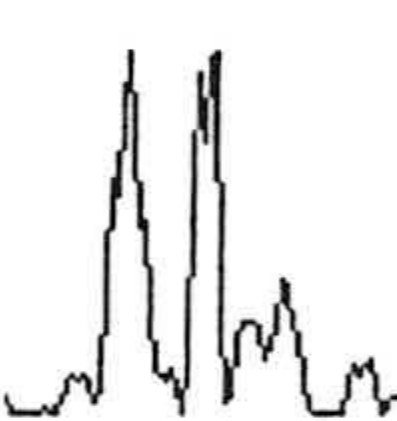

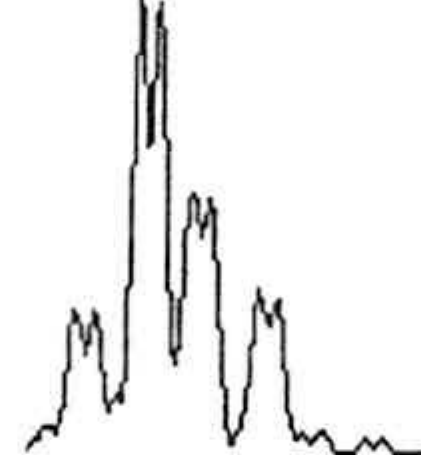
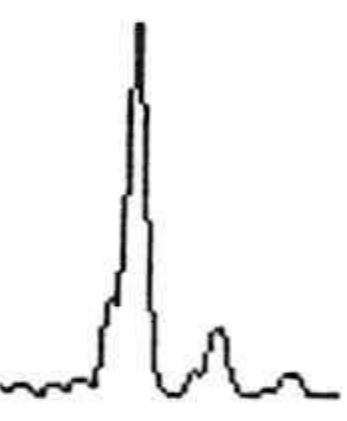
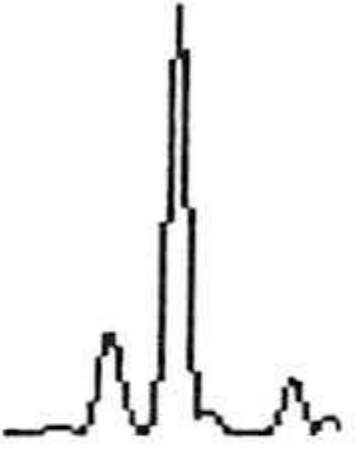
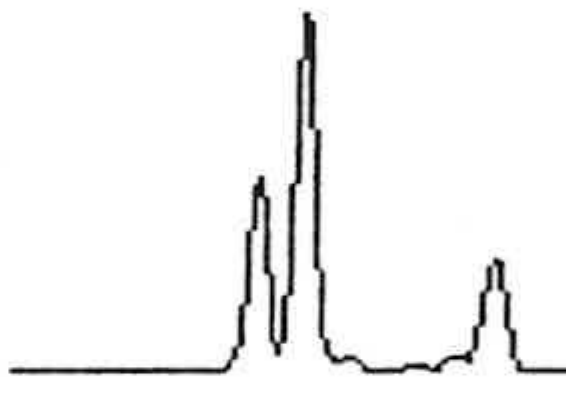
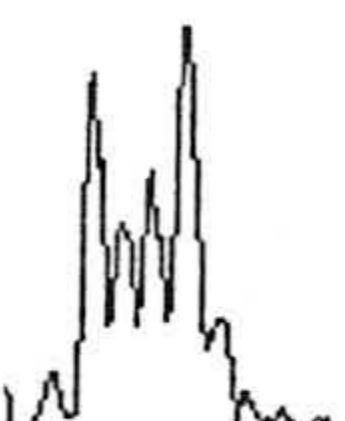
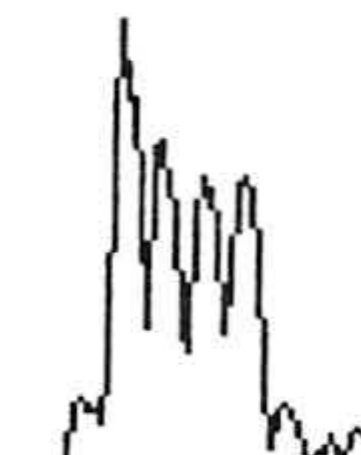
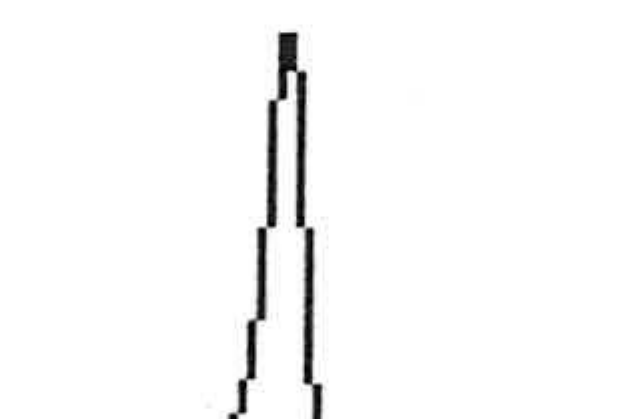
V $\beta$	CTR Mini	FMG Standard	RRE DeplecciónT
19	&		
20			
21			
22			
23			
24			
IC	79	75	43

Tabla 7: Patrones de TCRs dependiendo del tipo de trasplante realizado, en fecha +18 meses post-trasplante

Como podemos observar comparando los perfiles normales de la tabla 6 y los obtenidos en los pacientes post-trasplantados en la tabla 7, los patrones de complejidad son mucho más sencillos en estos últimos.



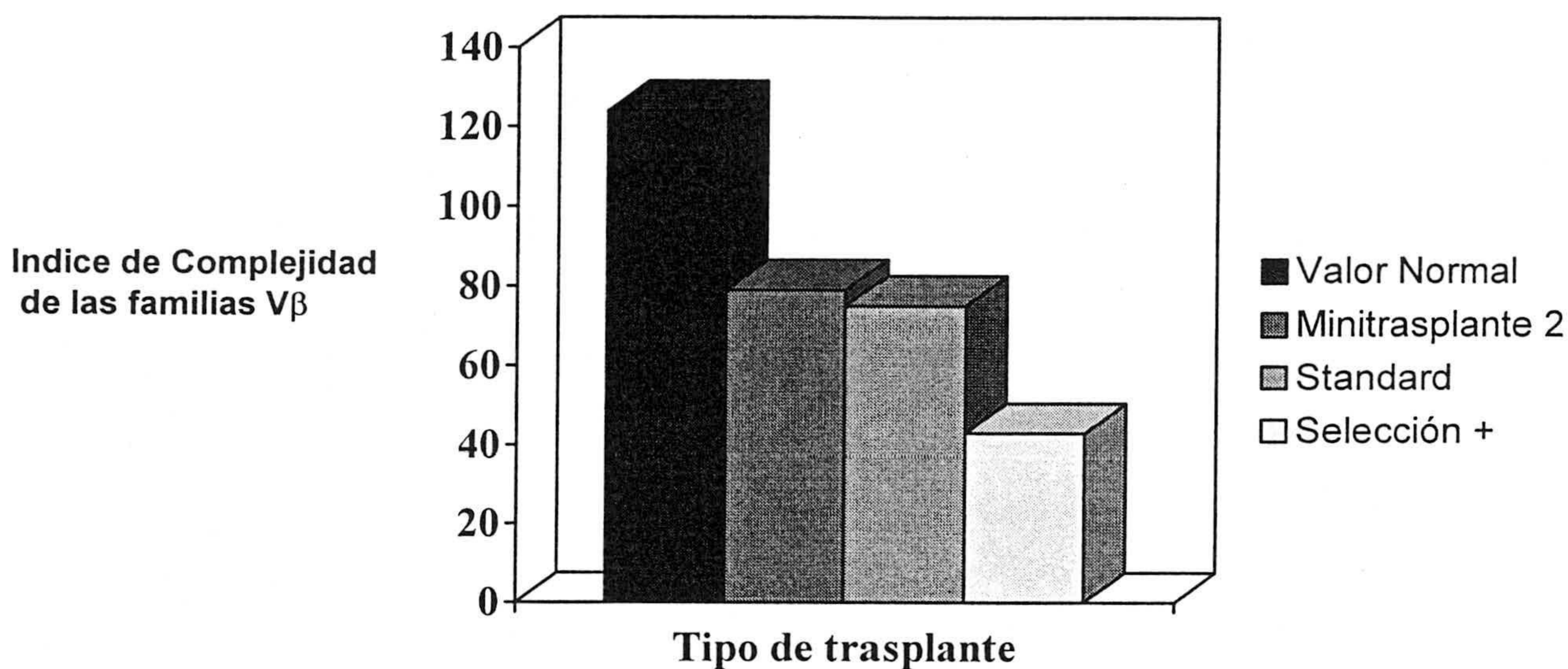


Figura 24: Índice de complejidad de las familias V $\beta$  en los distintos tipos de trasplante tras año y medio post-trasplante.

En los tres casos encontramos una disminución respecto a los valores normales, siendo esta mucho más acusada en el caso de trasplante tras selección positiva es decir con un inóculo deficitario en linfocitos T.

	% de familias V $\beta$ alteradas			Indices de complejidad V $\beta$
	CD4	CD8	CD3	
CTR-Mini	13	8	21	79
FMG-Estandar	4	4	8	75
RRE-selección +	0	4	4	43

Tabla 8: Relación entre el estudio inmunofenotípico y mediante RT-PCR de la diversidad del repertorio T de los pacientes tras someterse a distinto tipo de trasplante

Como podemos observar en la tabla 8 los resultados de la valoración cuantitativa de las familias V $\beta$  no se corresponden con la recuperación de complejidad del repertorio T. La utilización aislada de la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales puede llevar a interpretaciones confusas, ya que como podemos observar en la tabla 8, la paciente con el repertorio de complejidad T más pobre es la que presenta menos alteraciones cuantitativas.

## 4.2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE TCRs Y EL ESTADO DE INMUNOCOMPETENCIA DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS

### 4.2.1 MENOS DE UN AÑO POST-TRASPLANTE

#### 1. CASO nº 15 (IRV)

Paciente de 32 años diagnosticada en diciembre de 1998 de Leucemia Aguda Mieloblástica. En marzo de 2001 es sometida a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos sangre periférica con selección positiva CD 34 + (con el método Isolex) de un hermano con una incompatibilidad en HLA-B. La profilaxis de injerto contra huésped se realizó con Ciclosporina.

Los estudios de quimerismo en los días +10, +27, +79 postrasplante mostraron una situación de quimera total, tanto en sangre total como en las distintas subpoblaciones estudiadas (polimorfonucleados y mononucleados).

En el día +79 el número absoluto de linfocitos CD4 (128) y CD8 (286) era inferior a los límites de normalidad. El estudio complementario de diversidad de TCRs en linfocitos T CD4 mediante inmunofenotipo mostró una expansión de la familia V $\beta$  22 y la desaparición de las familias V $\beta$  5.3, V $\beta$  7.1, V $\beta$  3, V $\beta$  16, V $\beta$  21.3, V $\beta$  11, V $\beta$  14, V $\beta$  7.2 (Figura 24). El análisis mediante RT-PCR de las distintas familias V $\beta$  mostraron la falta de policlonalidad de todas las familias presentes (Figura 25). La familia expansionada mostró un perfil monoclonal comprobado mediante secuenciación (Figura 26). Se objetivó la ausencia de las siguientes familias V $\beta$  11, V $\beta$  15, V $\beta$ 16, V $\beta$  24. Las familias V $\beta$  3 y V $\beta$  14, no detectables mediante citometría, sí mostraron amplificado cuando se analizaron mediante RT-PCR.

La paciente falleció tres meses post-trasplante debido a complicaciones infecciosas. En este caso la supervivencia post-trasplante se vio comprometida por la falta de recuperación de diversidad del repertorio de celularidad T, ya que el implante se realizó sin ningún problema, encontrándose la paciente en situación de quimera total en el momento del fallecimiento y sin señal alguna de recaída.

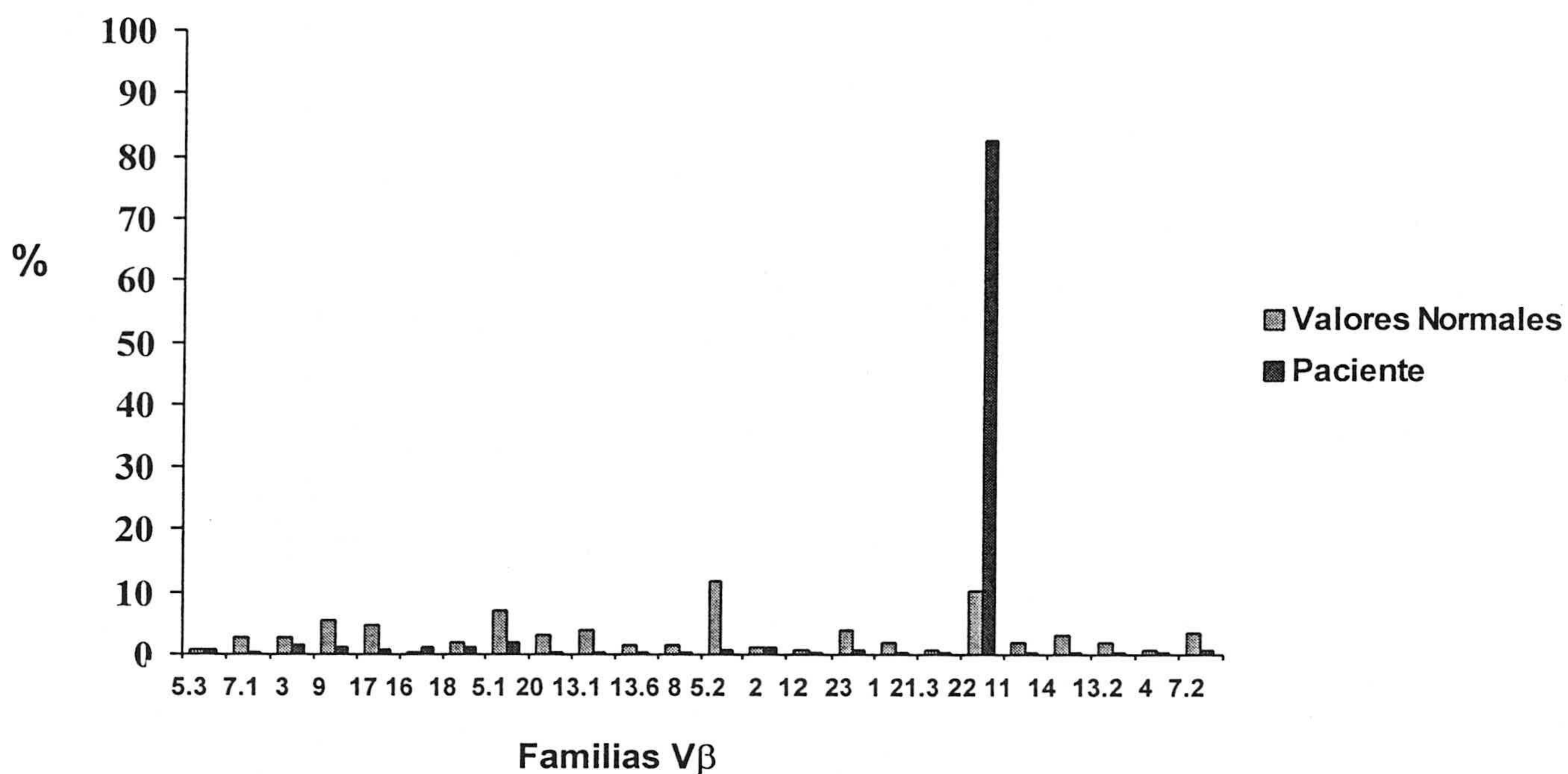


Figura 25: Gráfico de los resultados del estudio mediante inmunofenotipo de las familias Vβ de la paciente vs los valores normales. Puede observarse una expansión de la familia Vβ 22 y una disminución del resto de familias.

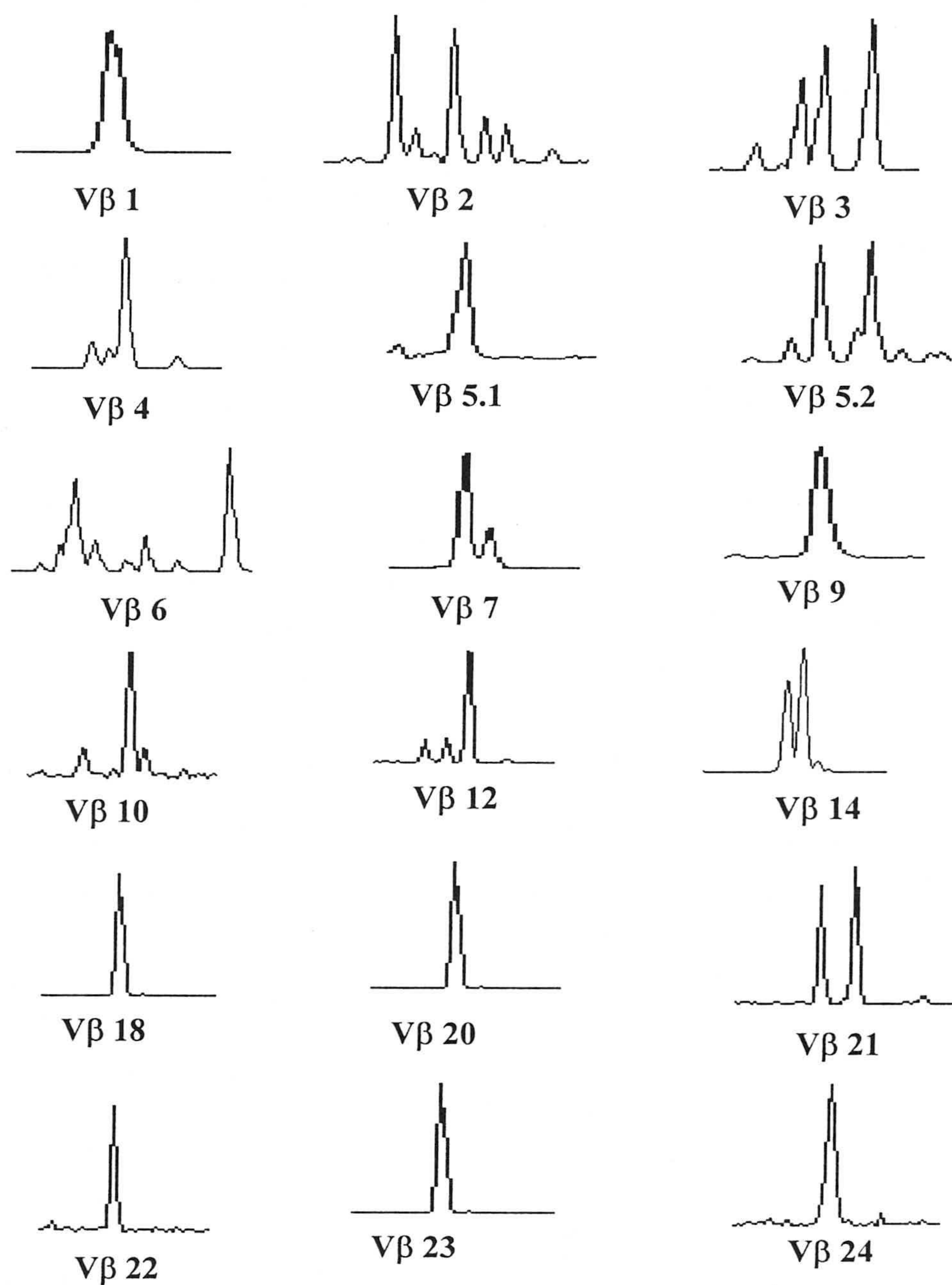


Figura 26: Análisis de complejidad de los receptores de linfocitos T, se observan patrones mono y oligoclonales. No existiendo ninguna familia que presente un perfil normal de policlonalidad. Están ausentes seis familias Vβ.

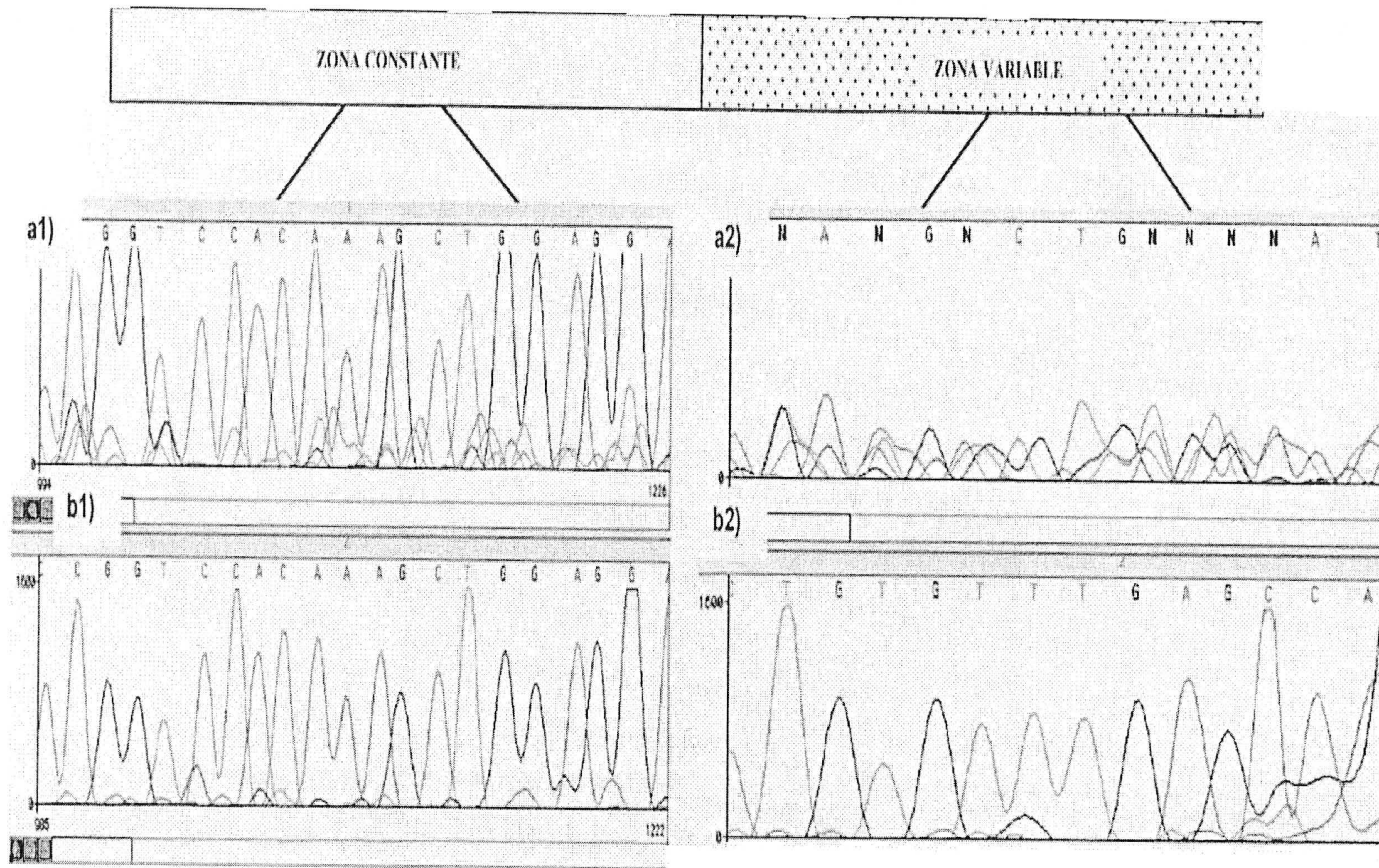


Figura 27: Secuenciación de la familia expansionada Vβ 22. a1) y a2) muestran, respectivamente, la zona constante y la zona variable de la familia vb22 en un paciente sano, la existencia de polimorfismos en los TCRs se ve reflejada por la aparición en la secuenciación de la letra N, que nos indica la existencia de más de una base en dicha posición, es decir la existencia de distintas secuencias como corresponde a una situación de policlonalidad. b1) y b2) muestran respectivamente la zona constante y la zona variable de la familia vb22 de la paciente en estudio, en la zona variable se puede observar la presencia de una sola secuencia indicativa de la monoclonalidad de esta familia

## 2. CASO nº 11, LMR

Paciente de 19 años sometida a un trasplante con selección positiva de hermana HLA idéntica en segunda remisión completa de LMC-M3. La paciente presentó una situación de quimera total desde el implante hasta siete meses post-trasplante cuando falleció a causa de una neumonitis intersticial. Tras el trasplante se observó negativización del marcador molecular Pml-Rar  $\alpha$ , no existiendo recaída en el momento del fallecimiento.

El estudio de la diversidad de TCRs, un mes y seis meses post-trasplante muestra una dramática disminución del número de familias V $\beta$  presentes (Figura 28), coincidente con el empeoramiento de la situación clínica de la paciente y su posterior fallecimiento.

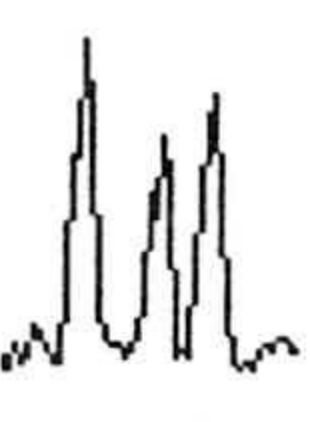
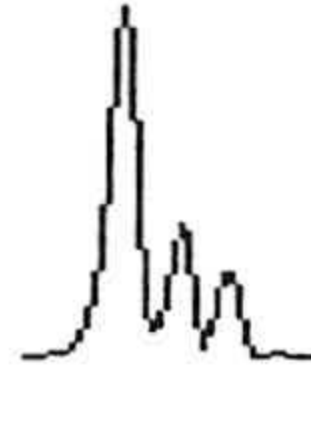

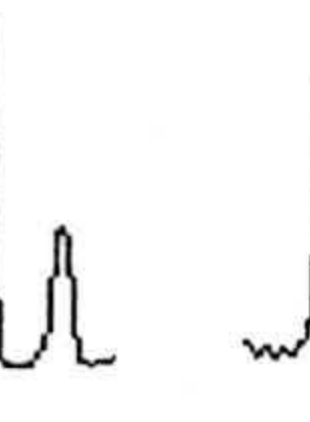
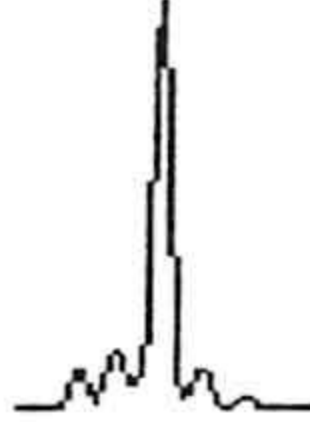

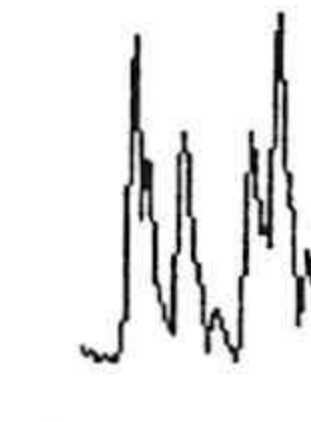
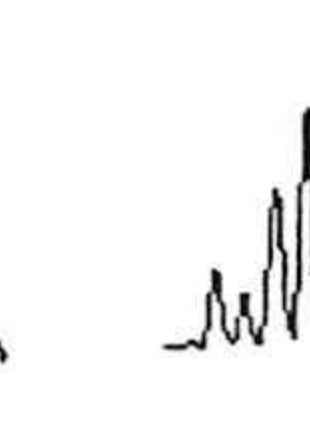
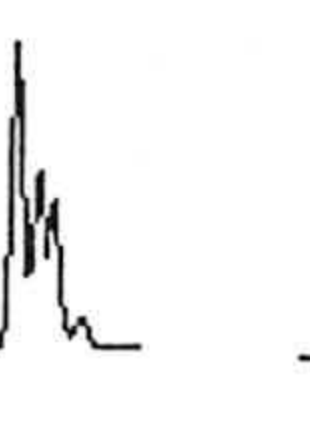
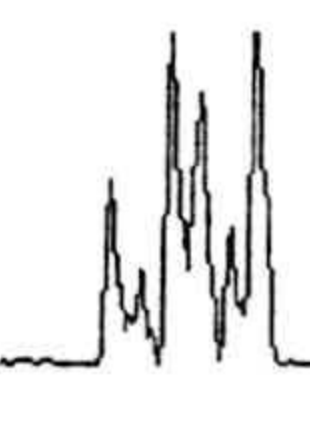



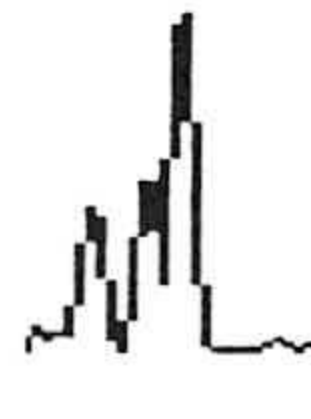


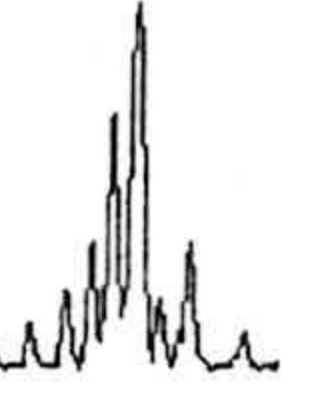
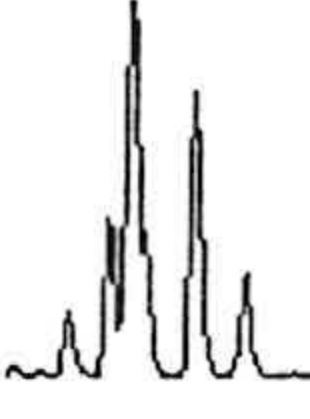


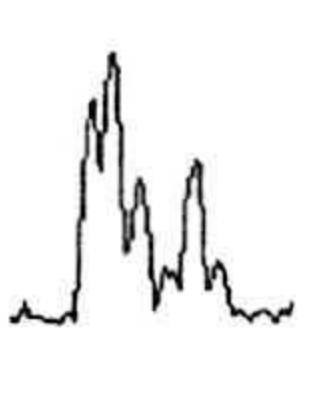

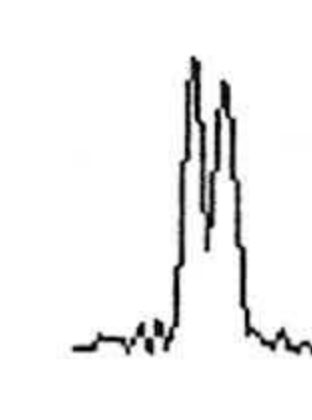

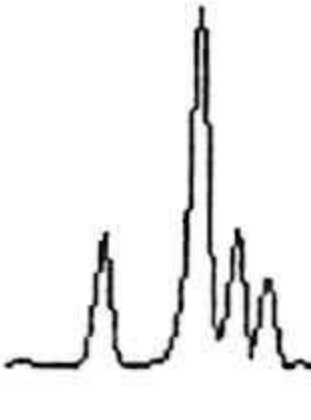
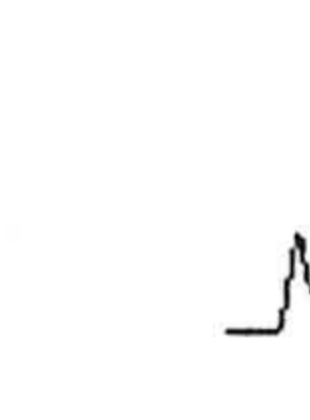
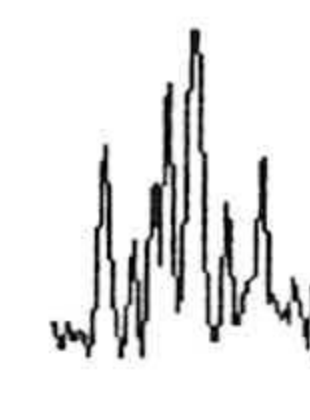
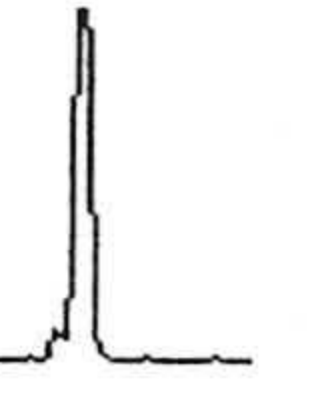
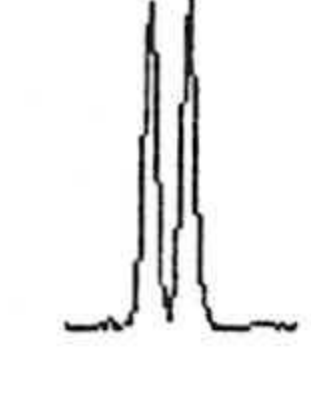

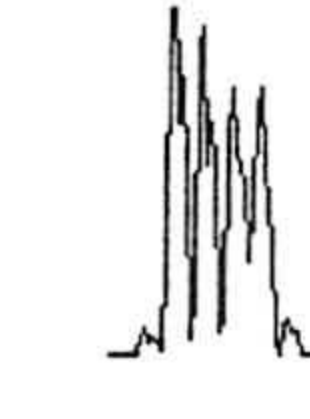
1 mes post-trasplante				6 meses post-trasplante			
 Vβ1	 Vβ2	 Vβ3	 Vβ4	&	&	&	 Vβ4
 Vβ5	 Vβ6	 Vβ7	 Vβ8	&	 Vβ6	 Vβ7	 Vβ8
 Vβ9	 Vβ10	 Vβ11	 Vβ12	 Vβ9	 Vβ10	&	 Vβ12
 Vβ13	 Vβ14	 Vβ15	&	&	&	 Vβ15	&
 Vβ17	 Vβ18	&	 Vβ20	&	 Vβ18	&	&
 Vβ21	 Vβ22	&	 Vβ24	&	 Vβ22	&	&
Vβ21	Vβ22	Vβ23	Vβ24	Vβ21	Vβ22	Vβ23	Vβ24

Figura 28: Situación de las familias Vβ un mes post-trasplante y 6 meses post-trasplante fecha del fallecimiento de la paciente. & indica que no existe amplificado. & : ausencia de amplificado, las PCRs fueron realizadas por duplicado para descartar error metodológico.

4.2.2 MÁS DE UN AÑO POST-TRASPLANTE

1. Caso 16 (ENC),

Paciente de 33 años sometida a un trasplante estándar de hermana HLA idéntica en fase de enfermedad activa. Quimera total al implante que se mantiene hasta la actualidad. El estudio de la diversidad del repertorio de celularidad T mostró tras cuatro años post-trasplante una situación de complejidad limitada, con sobreexpresión de algunas familias y disminución e incluso ausencia de otras (Figuras 27 y 28). La paciente en dicha fecha fue diagnosticada de Enfermedad de Graves Basedow.

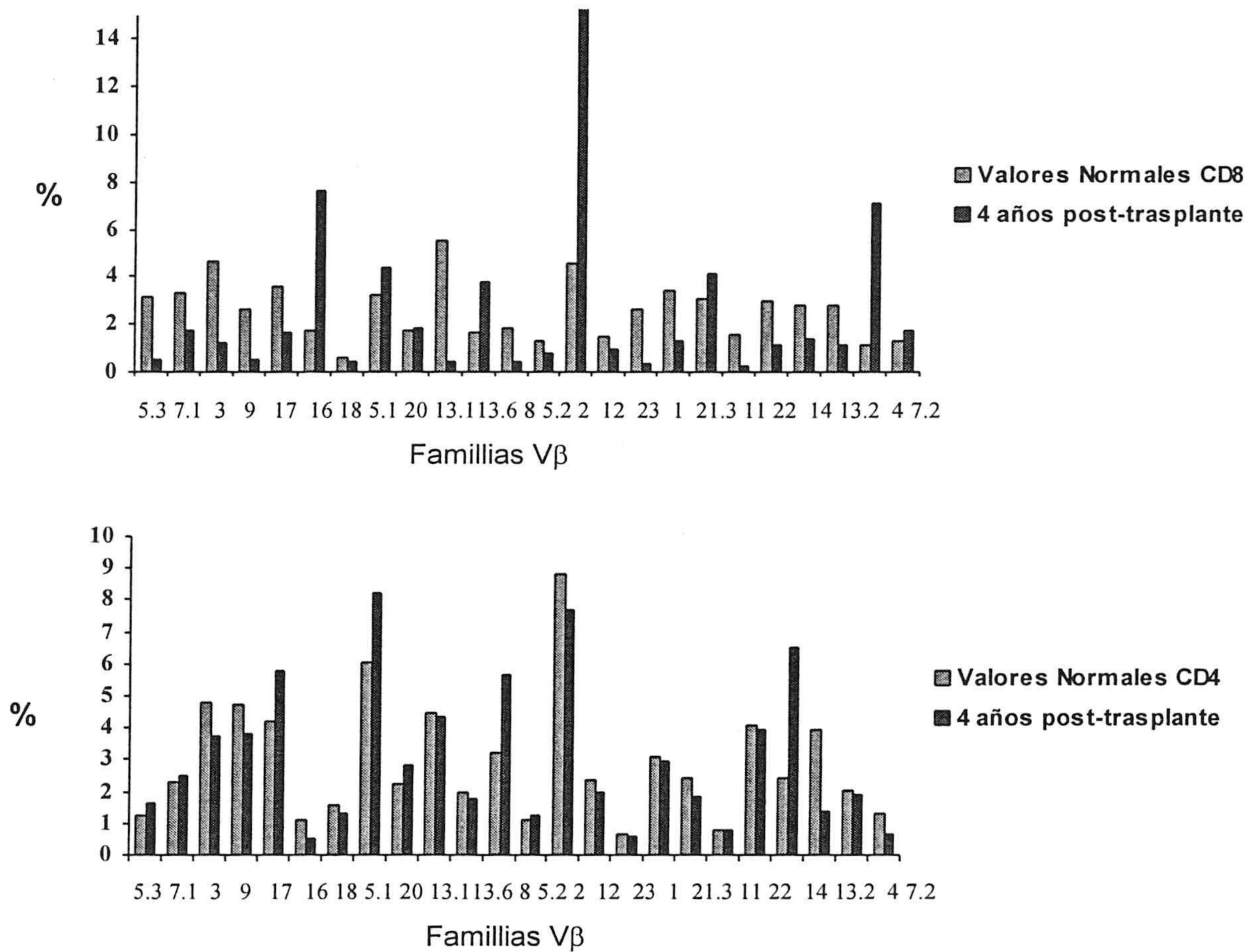


Figura 29: clonotipaje mediante citometría de flujo de las distintas subfamilias Vβ en las poblaciones CD4+ y CD8+. Se observa una importante expansión de la familia Vβ2 a expensas del resto de familias.



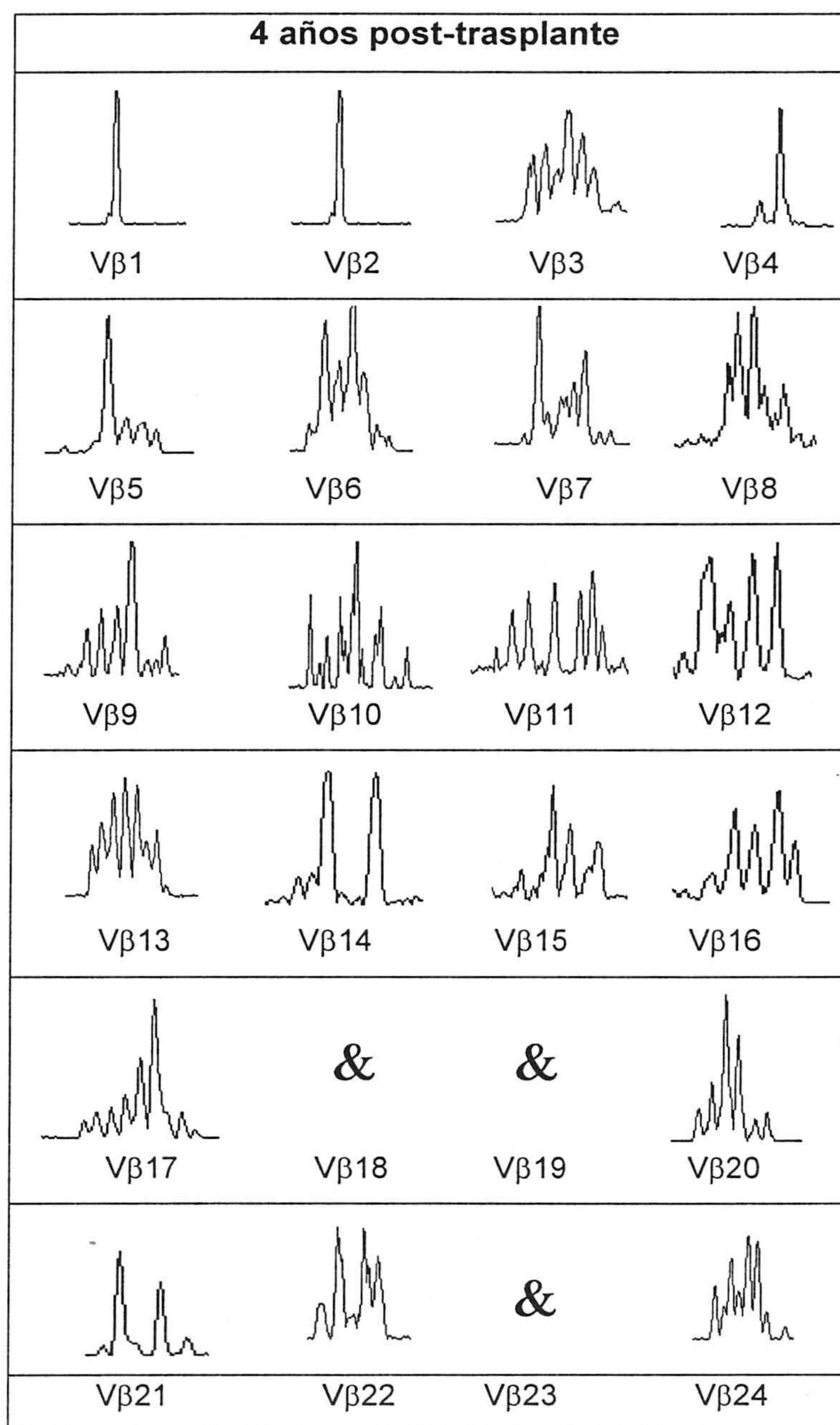


Figura 30: Patrones de las familias V $\beta$  de la paciente. &: No amplificación, las PCRs se realizaron por duplicado para descartar errores metodológicos.

## 2. Caso 1 (DMM)

Paciente de 21 años diagnosticado en enero de 1998 de LMC, fué sometido en septiembre del mismo año a un trasplante alogénico con selección positiva de hermano HLA idéntico en fase crónica. Tres años post-trasplante se encuentra en una situación de remisión molecular y hematológica, con una quimera total. Sufre EICHc.

Tanto el estudio por Citometría de Flujo como el estudio mediante RT-PCR del polimorfismo de receptores de celularidad T muestra una situación prácticamente dentro de la normalidad, con recuperación de la policlonalidad de las distintas familias (Figuras 31 y 32).

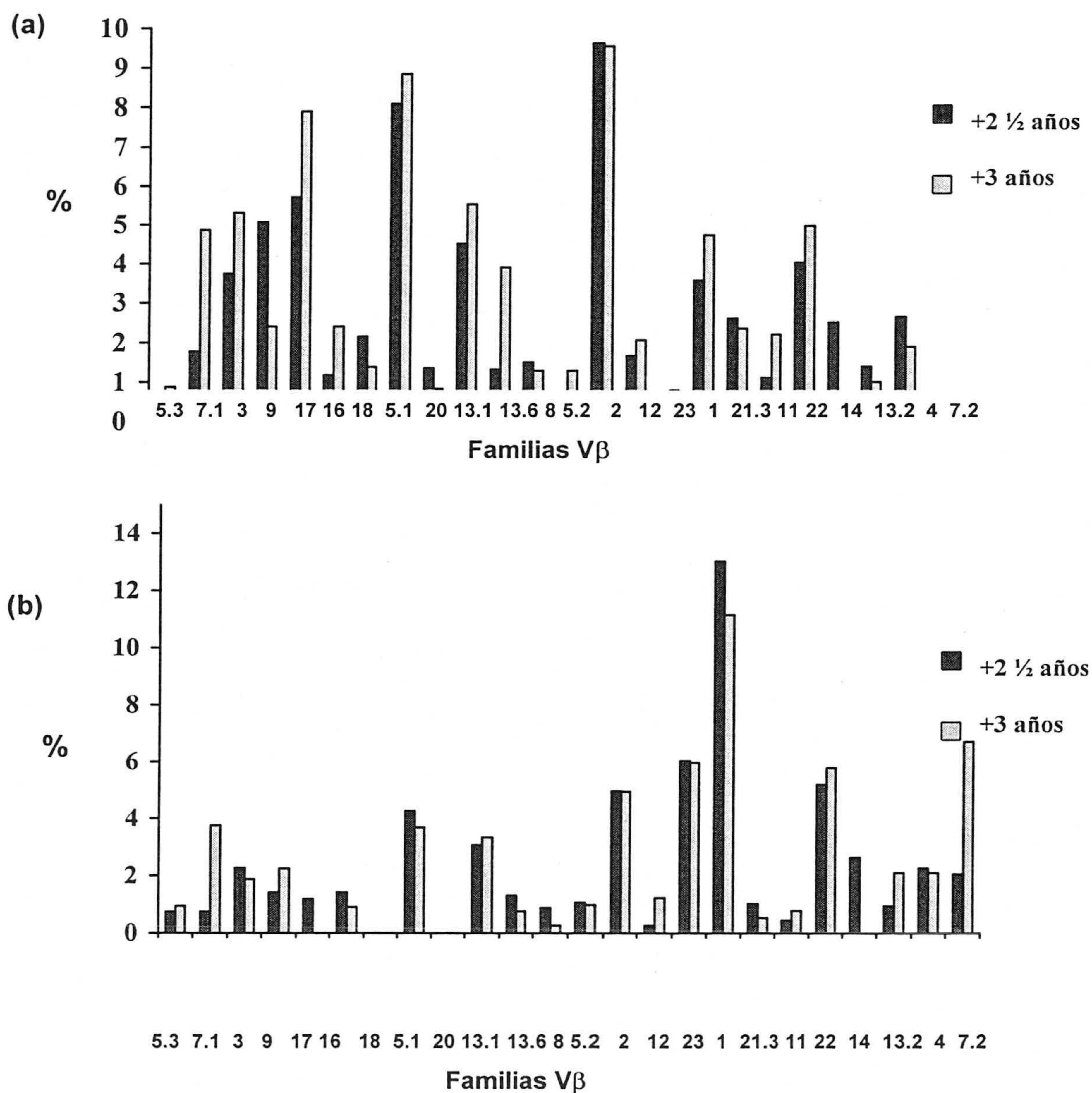


Figura 31: Resultados del clonotipaje de linfocitos (a)CD4<sup>+</sup> y (b)CD8<sup>+</sup>. Observamos un patrón normal en todos los marcadores, salvo una discreta expansión de la familia Vβ 1 en linfocitos CD8<sup>+</sup>.

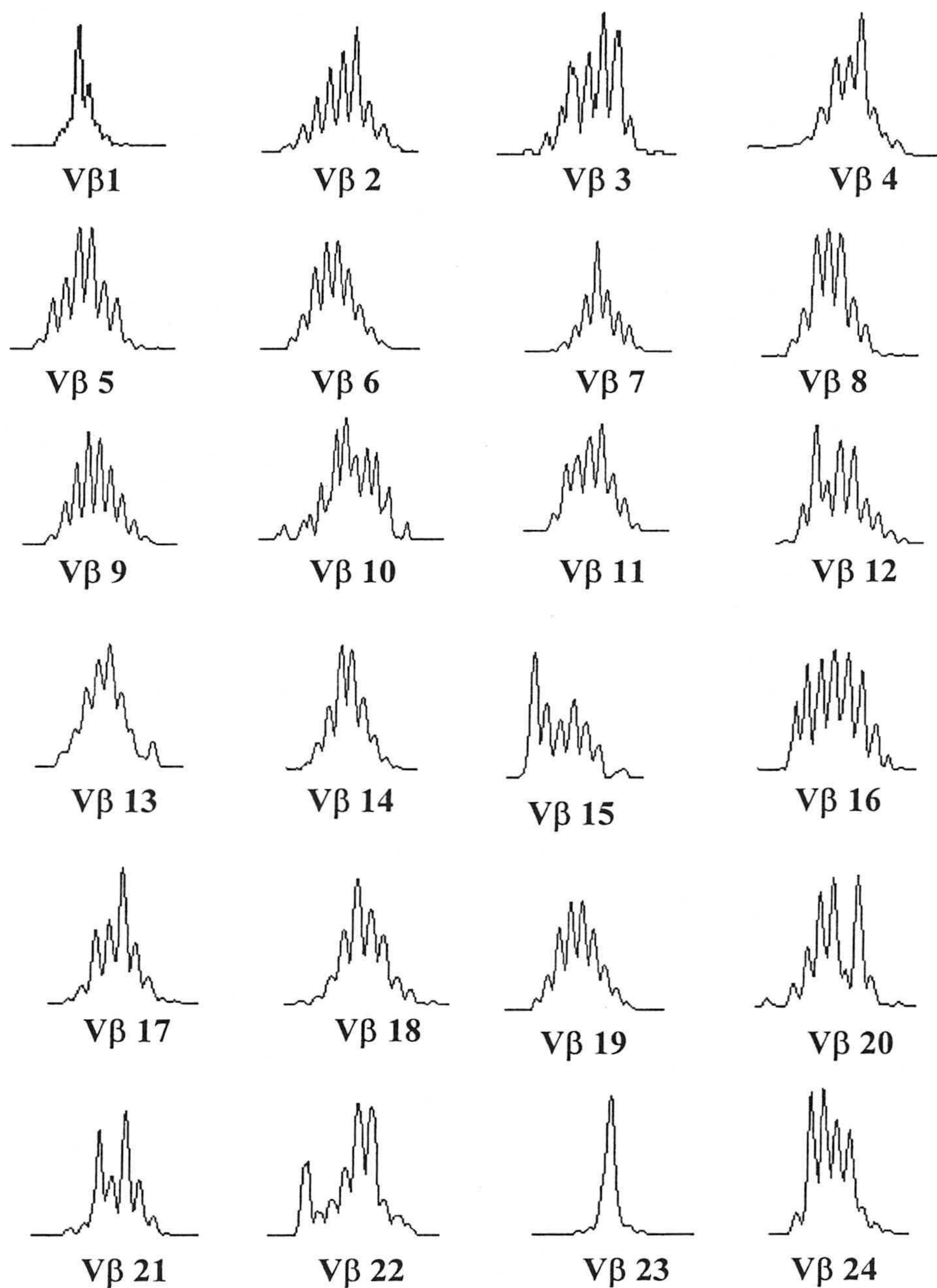


Figura 32: Estudio mediante RT-PCR fluorescente de la clonalidad de las familias V $\beta$  de los receptores de la celularidad T, tres años post-trasplante. Observamos que la familia V $\beta$  1 (expansionada) presenta un patrón casi monoclonal.

## 5. TRISOMÍA 12 Y LINFOCITOSIS PROGRESIVA EN LLC-B.

En el transcurso del estudio del quimerismo, se observaron situaciones de interés en algunos pacientes que podían explicar su evolución. Por ejemplo en el caso de MRD se detectó un cambio dramático en el estado de la quimera y la evolución de la linfocitosis en fecha +21 meses post-trasplante (Figura 17). En la primera fase post-trasplante se produjo una recaída que fue superada mediante la eliminación de la inmunosupresión, posiblemente debido a una reacción injerto contra leucemia (Figura 34a). Esta situación no se repitió a los 21 meses post-trasplante, en la segunda recaída (Figura 34b). El estudio por subpoblaciones, en fecha de la segunda recaída, reveló que no existía pérdida de injerto ya que la población mieloide y la de linfocitos T eran de origen del donante (Figura 20). En el estudio de la subpoblación de linfocitos B se pudo observar una situación de desequilibrio entre los alelos del marcador vWA correspondiente al cromosoma 12, situación que se corresponde con la presencia de una trisomía y no una quimera mixta al no presentar esta anomalía ningún otro marcador. La situación de desequilibrio se produce debido a que la cantidad de amplificación (representada por el área de los picos) es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra, así si de un alelo existe doble cantidad, debido a una duplicación del mismo, esto se reflejará en un pico con un área doble respecto al otro pico o alelo. Este resultado fue confirmado mediante FISH (figura 33).

Cromosoma	% Quimera en SP	% Quimera en LT
3	20	83
12	8	80
8	29	84

Tabla 9: En el análisis del quimerismo la trisomía provoca una disminución del % de quimera del marcador 12 frente al resto de marcadores informativos:

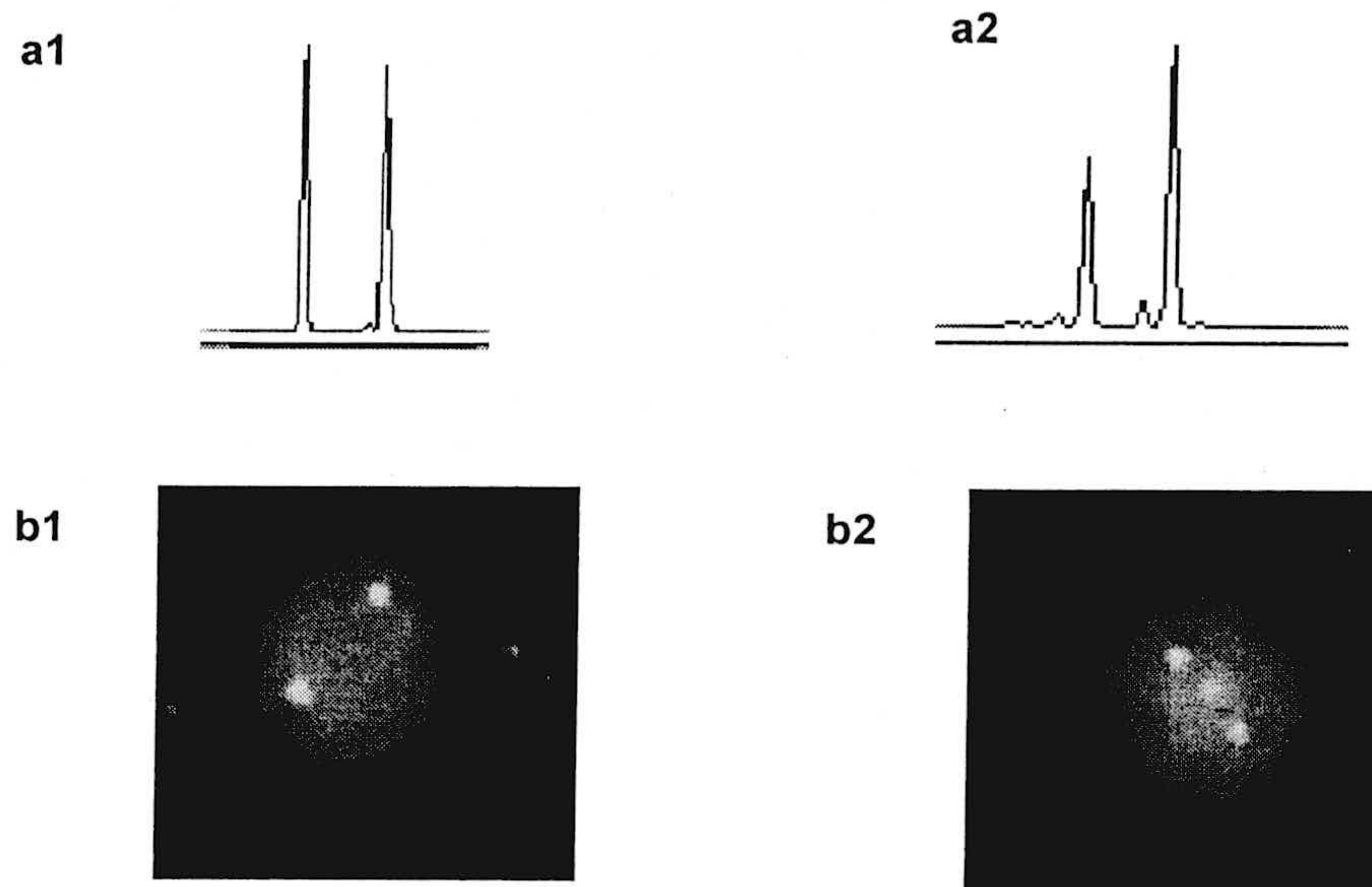


Figura 33: Izquierda: a1 alelos del marcador vWA en linfocitos B pretrasplante; b1 imagen FISH las señales fluorescentes corresponden a los dos cromosomas 12. Derecha: a2 alelos del marcador vWA en proporción 2:1 indicativo de trisomía; b2 imagen FISH que confirma la presencia de tres cromosomas 12 en la nueva clona.

La aparición de esta clona trisómica no detectada en la situación pretrasplante, coincidió con la aparición de recaída fármaco resistente y que tampoco remitió ante la supresión de la inmunoterapia para potenciar el efecto injerto contra leucemia, como sucedió con la primera recaída del paciente 15 días tras el trasplante (Figura 32). Esto supuso el fallecimiento del paciente 23 meses post-trasplante.

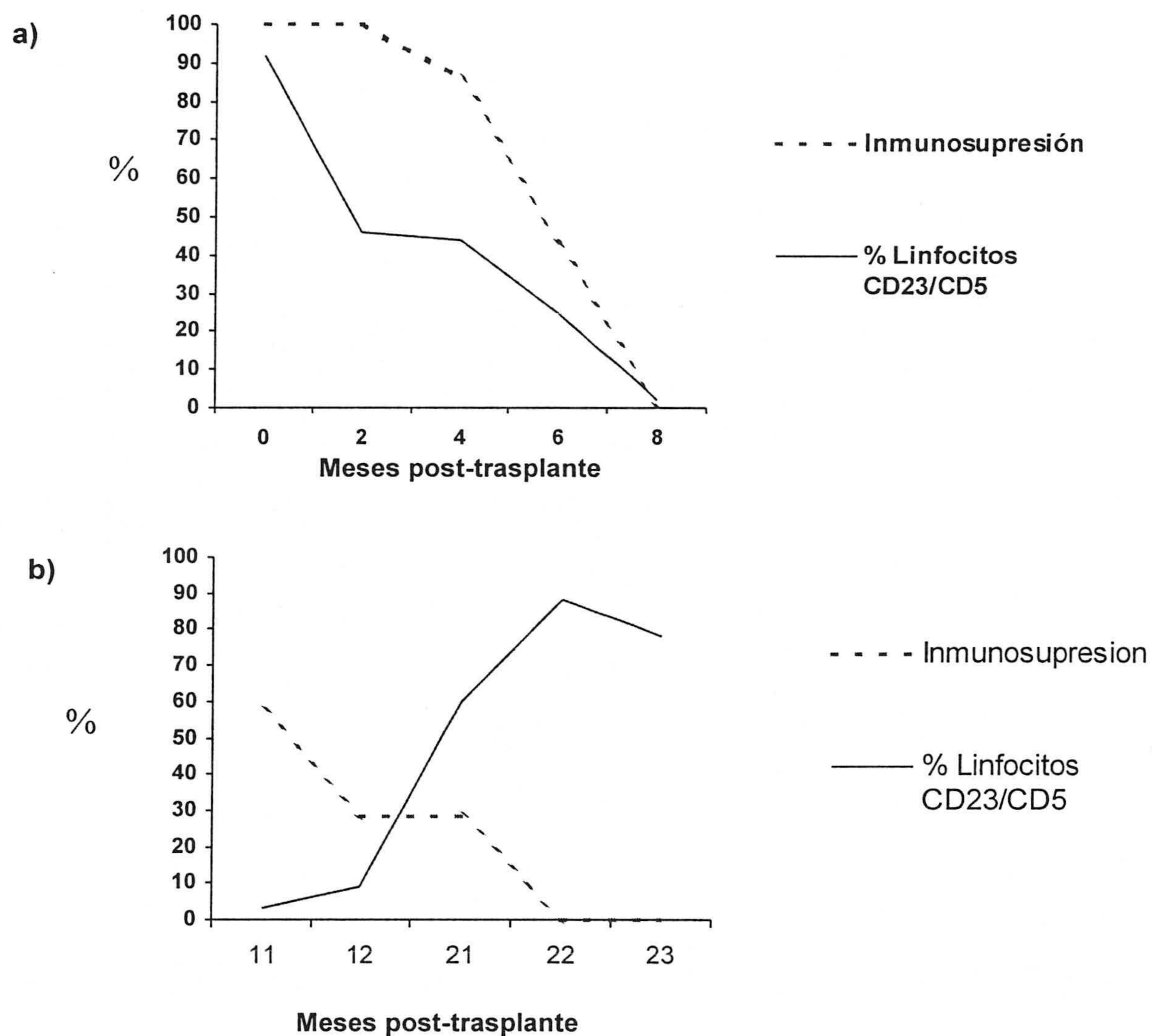


Figura 34: Evolución de la linfocitosis con la inmunosupresión. a) respuesta positiva, al disminuirse el tratamiento inmunosupresor la linfocitosis disminuye por acción del efecto injerto contra leucemia, en la primera recaída post-trasplante, b) pérdida de la respuesta ante la aparición de la expansión de la clona trisómica, en la segunda recaída post-trasplante.

6. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TUMORACIONES COLORRECTALES

6.1. ESTUDIO DEL PANEL DE MICROSATÉLITES ELEGIDO, MEDIANTE LÍNEAS CELULARES DE INESTABILIDAD CONOCIDA.

Con objeto de optimizar las condiciones de reacción se utilizaron como controles positivos las líneas de colon Dld, Sw48, Hct, Lovo y la línea prostática Du145.

Línea	BAT 26	BAT 40	BAX	TGFβII
Dld	Inestable	Inestable	Estable	Estable
Sw 48	Inestable	Inestable	Inestable	Estable
Hct	Inestable	Inestable	Estable	Estable
Lovo	No amplifica	Inestable	Inestable	Inestable
Du 145	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable

Tabla 10: Resultados en líneas control

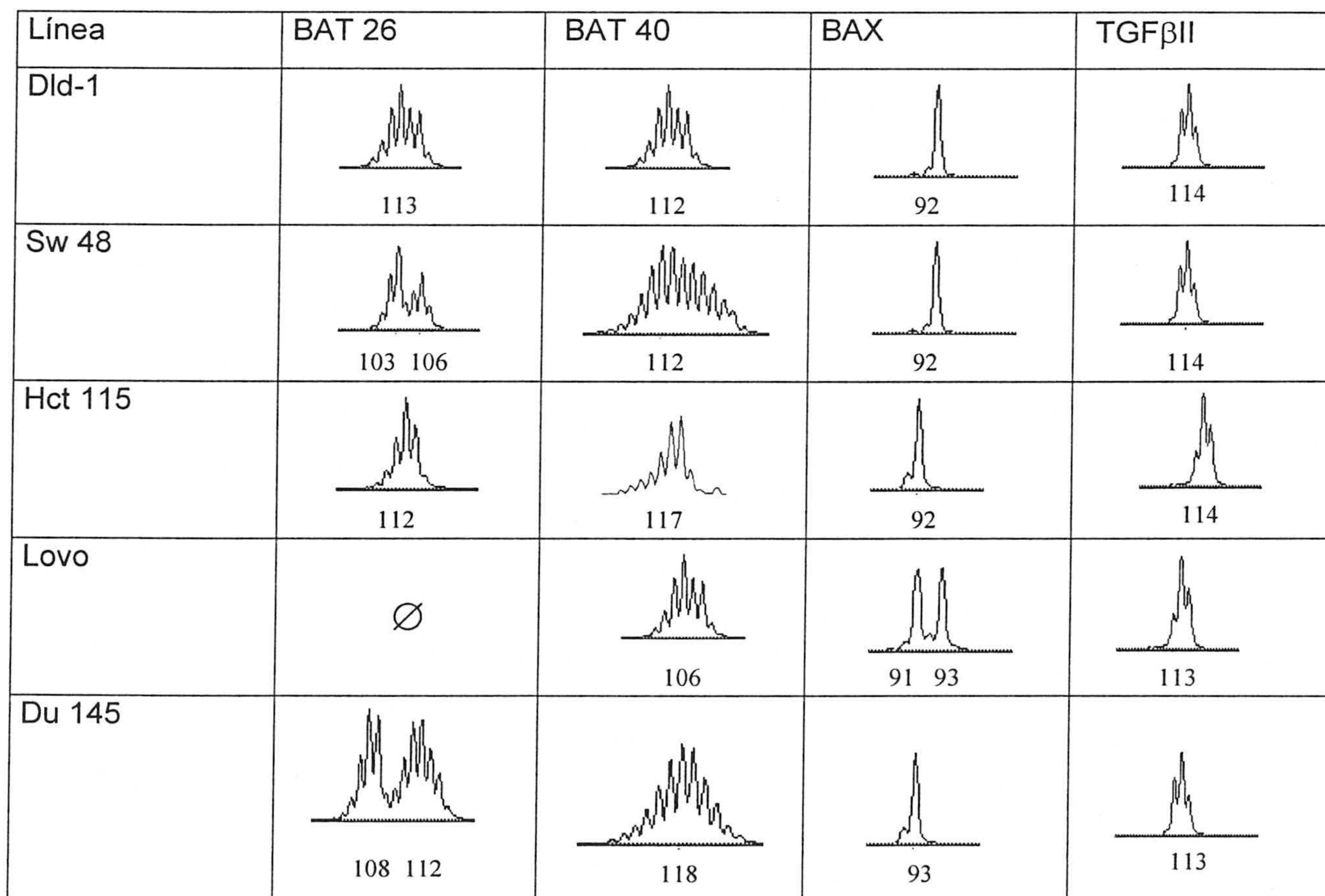


Figura 35: Patrones de inestabilidad

Liu B y cols, 1995; Hoang JM y cols, 1997; Rampino y cols, 1997; Jiménez y cols, 2001



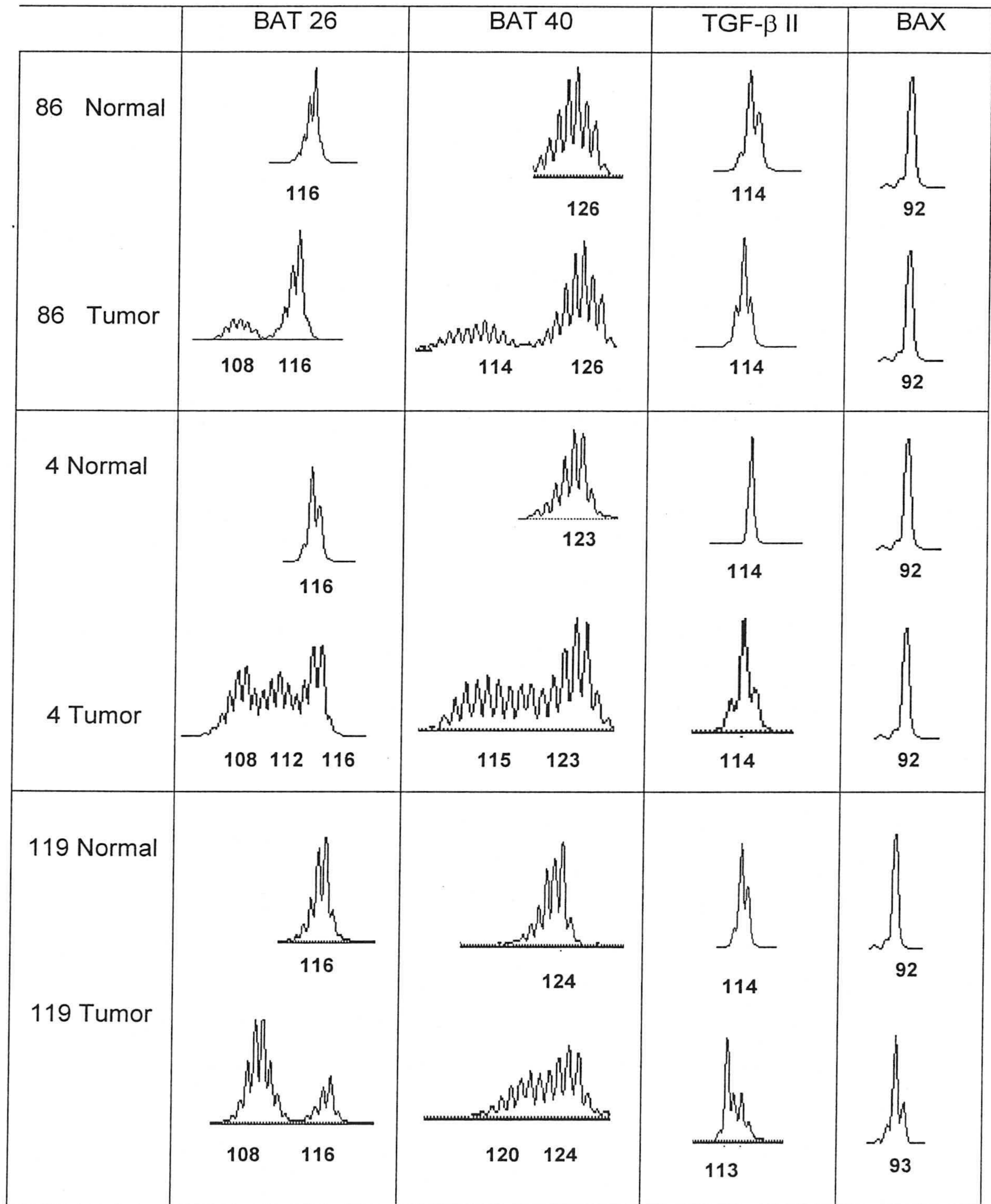
## 6.2 CASOS DE TUMORES COLORRECTALES CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

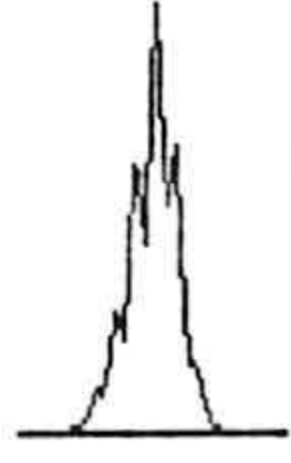


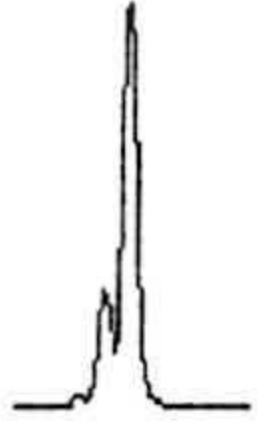
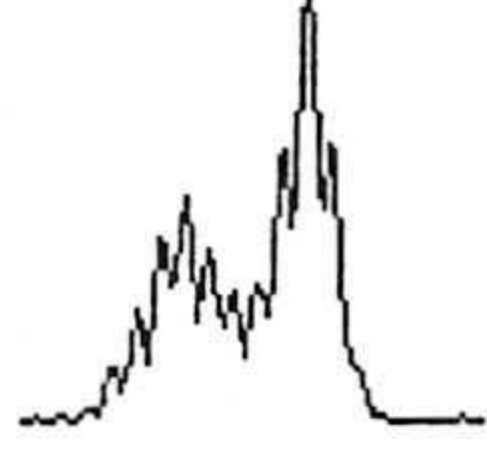
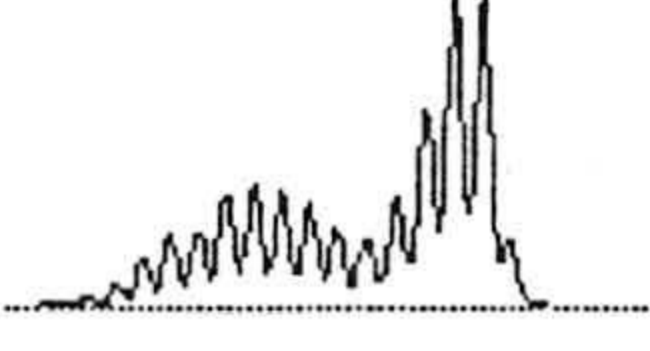

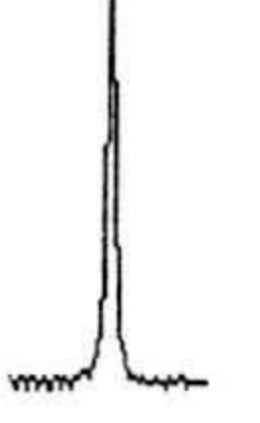
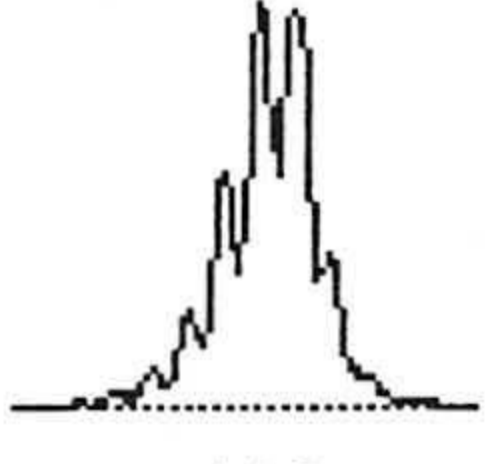
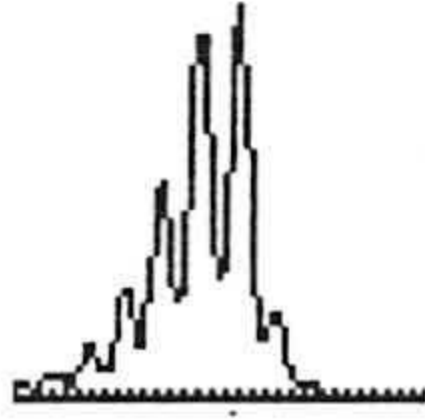
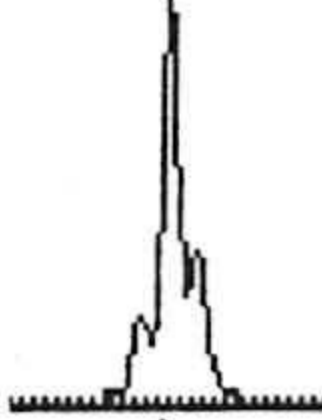

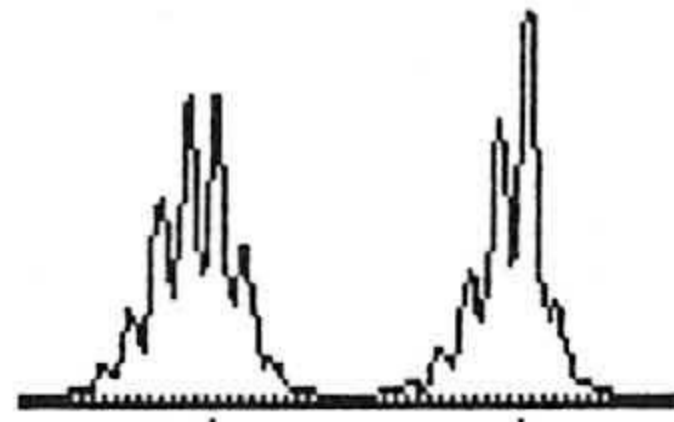
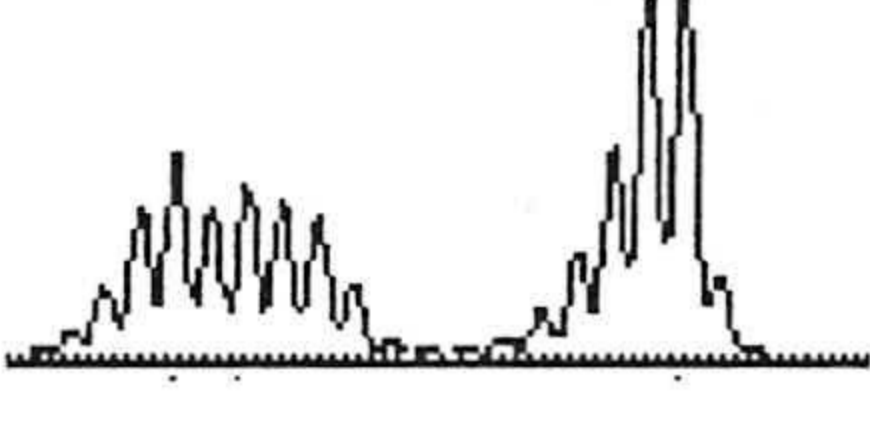
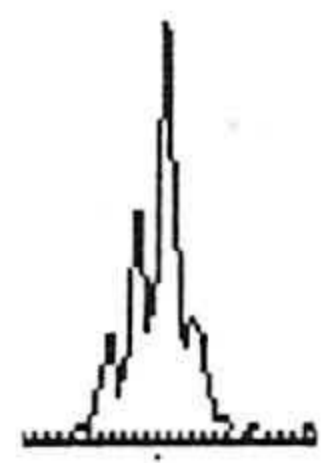

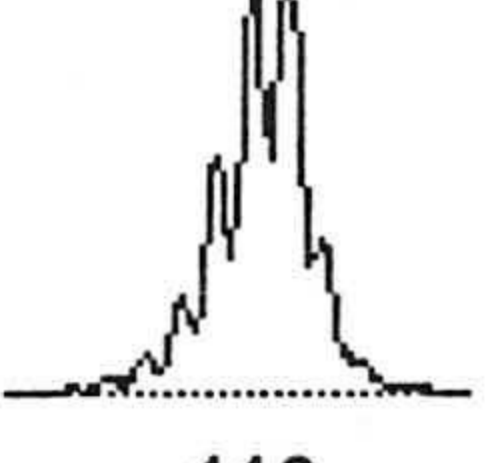
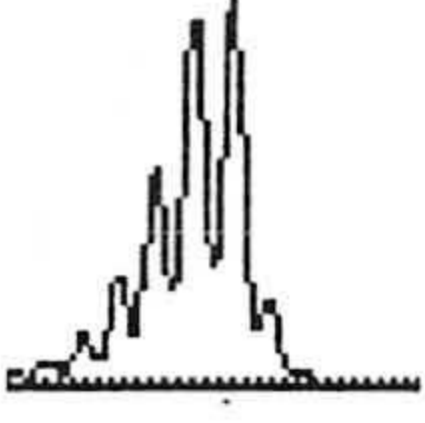
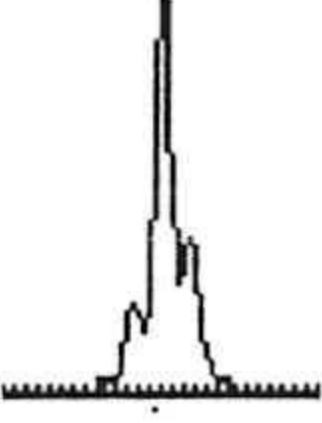

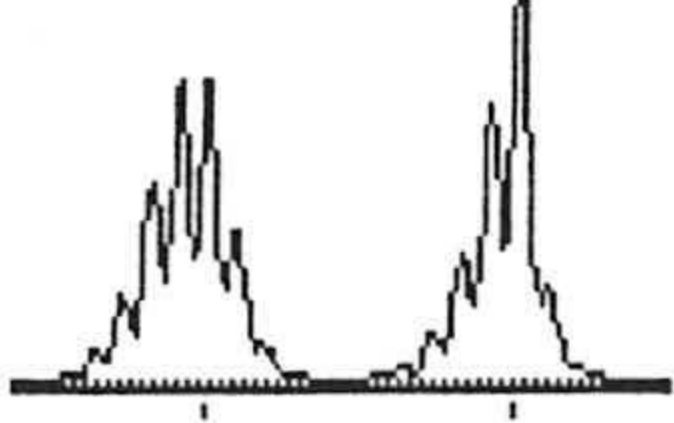
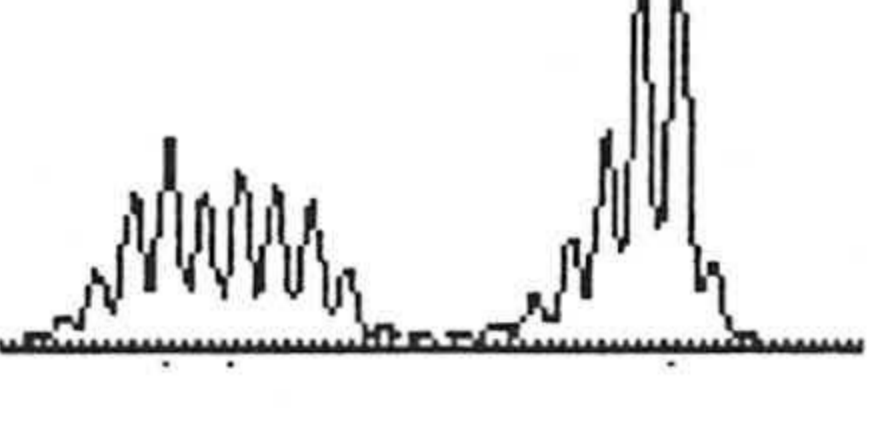

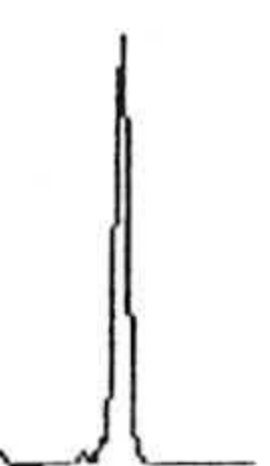
Se analizaron un grupo de 131 muestras de adenocarcinomas de colon enviados desde el servicio de digestivo del Hospital Virgen de las Nieves, sin ningún tipo de selección previa. Para la realización de un primer cribaje se extrajo el ADN de las muestras sin realizar microdissección. A cada una de ellas se les realizó un estudio de inestabilidad de microsatélites con los marcadores, BAT 26, BAT 40, TGF $\beta$ RII y BAX. Encontramos nueve casos con inestabilidad. El resto de adenocarcinomas estudiados no presentó inestabilidad en ninguno de los cuatro marcadores. Estudios paralelos con marcadores de dinucleótidos (DS6311, DS6 291, DS6237, DS& 265, DS6105, DS6276, C12C,C12S, D15S126,D15S209) no han mostrado ninguna discrepancia con los resultados obtenidos con nuestro panel de cuatro mononucleótidos.

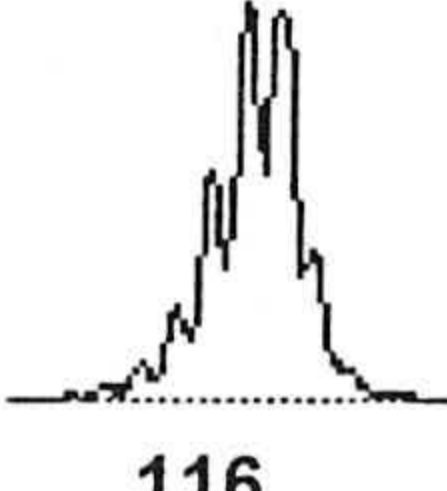
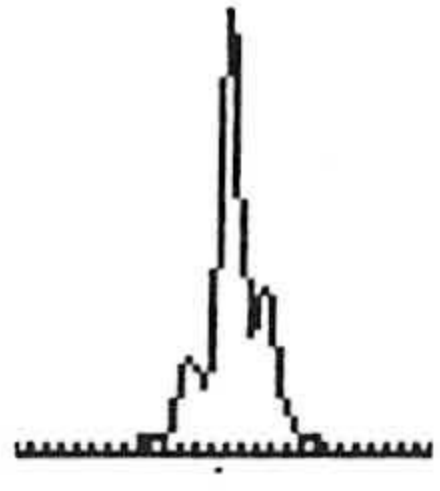
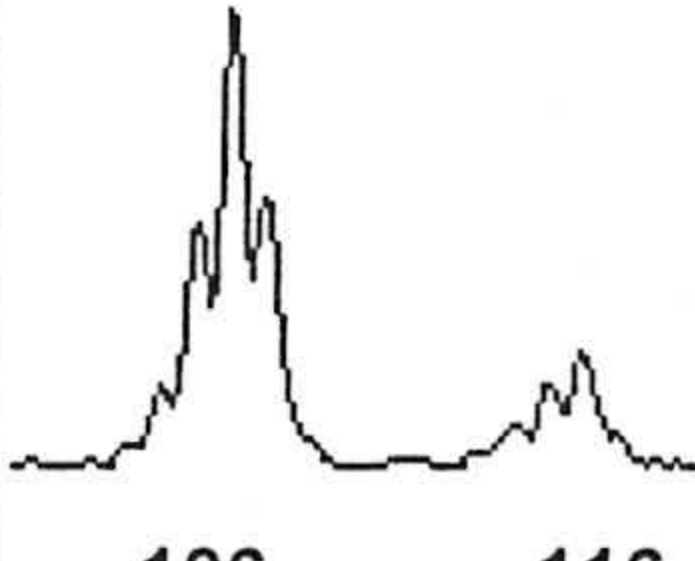
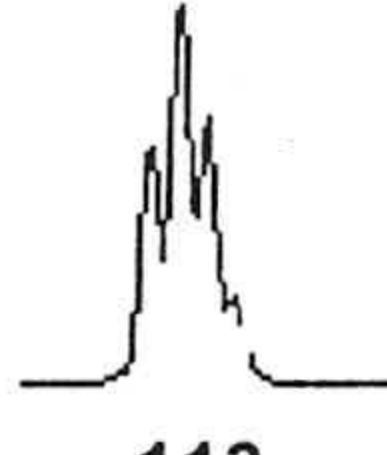
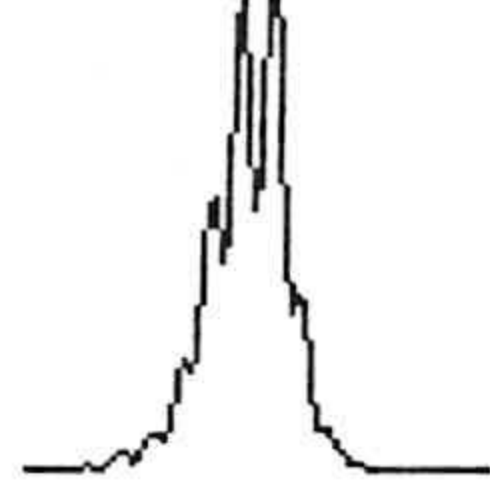
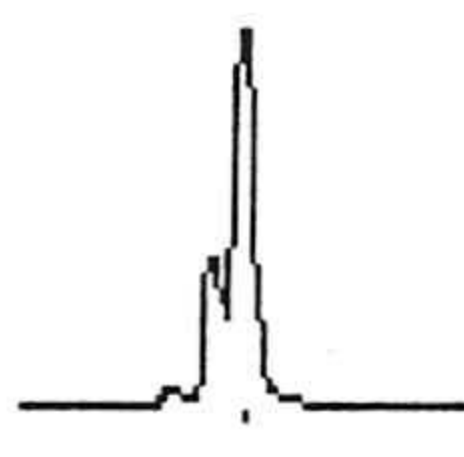
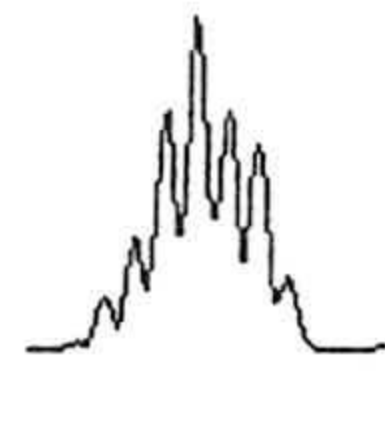
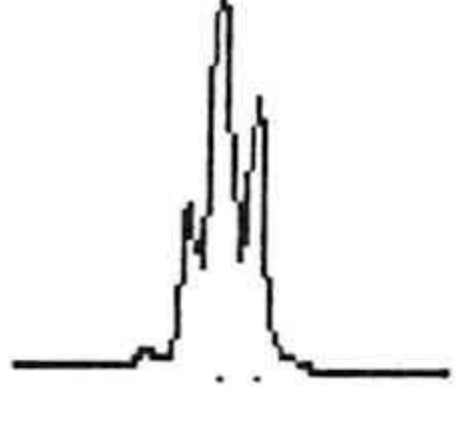
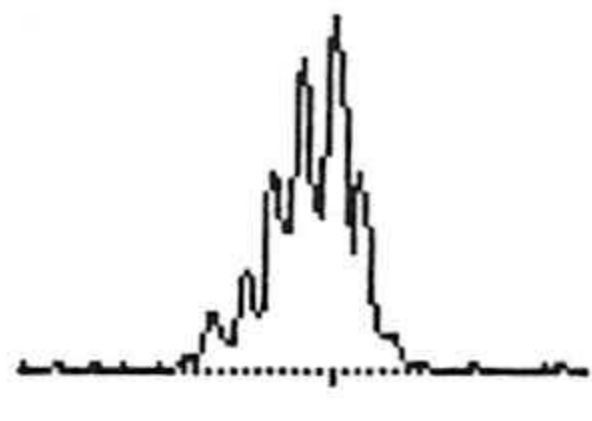
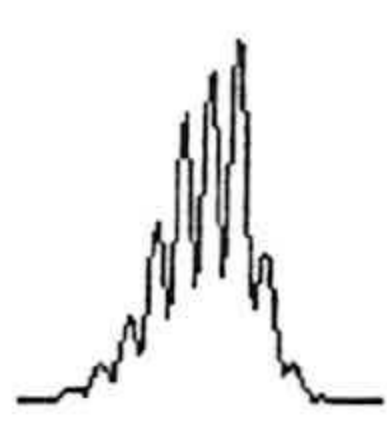
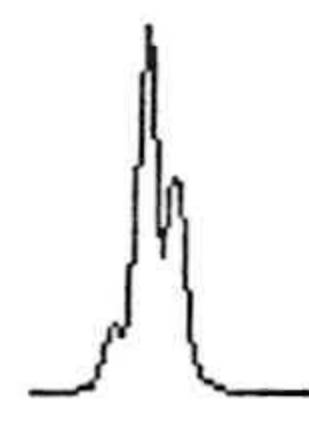
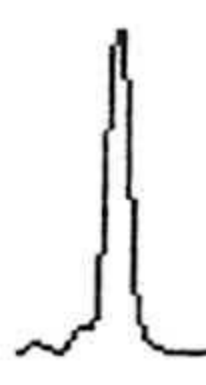
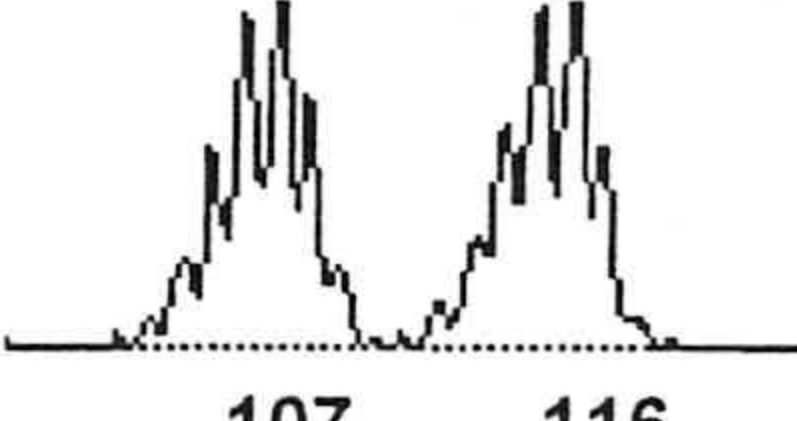
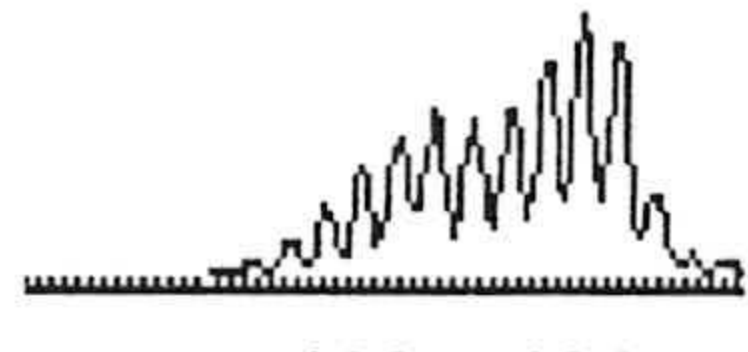
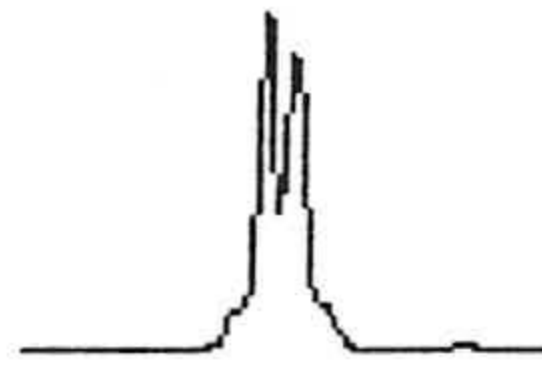
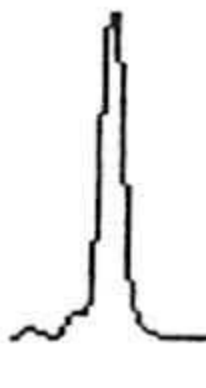
Bat 26		Bat 40	
Alelos normales	Alelos inestables	Alelos normales	Alelos inestables
114	105	109	105
115	108	115	107
116	109	120	112
117	110	122	114
	112	124	116
		128	

Tabla 11: Tamaños encontrados en las muestras analizadas. Podemos observar, en el caso del BAT 40, que el rango de los tamaños de los alelos inestables se solapan con el rango de los alelos normales.

Figura 36: Resultados de los casos positivos para inestabilidad



<p>123 Normal</p>	 <p>116</p>	 <p>120</p>	 <p>114</p>	 <p>92</p>
<p>123 Tumor</p>	 <p>112 116</p>	 <p>112 120</p>	 <p>113 114</p>	 <p>92</p>
<p>132 Normal</p>	 <p>116</p>	 <p>121</p>	 <p>114</p>	 <p>92</p>
<p>132 Tumor</p>	 <p>106 116</p>	 <p>107 121</p>	 <p>113 114</p>	 <p>92</p>
<p>135 Normal</p>	 <p>116</p>	 <p>121</p>	 <p>114</p>	 <p>92</p>
<p>135 Tumor</p>	 <p>106 116</p>	 <p>107 121</p>	 <p>113 114</p>	 <p>92</p>

1 Normal	 116	∅	 114	∅
1 Tumor	 106 116	∅	 113	∅
117 Normal	 116	∅	∅	 92
117 Tumor	 108	∅	∅	 92 93
Co A Normal	 116	 124	 114	 92
Co A Tumor	 107 116	 120 124	 113,114	 92

∅ = Imposible realizar la amplificación por falta de muestra

Tras la localización de los tumores inestables se realizó microdissección en aquellos de los que se disponía material suficiente. En la amplificación de los marcadores TGFRII $\beta$  y BAX los resultados a partir de DNA total sin microdissección podemos observar que la presencia del alelo salvaje en la celularidad del tejido normal enmascara en gran medida la señal del alelo inestable perteneciente al tejido tumoral. Amplificando el DNA de la microdissección con los mismos marcadores pudimos observar claramente la presencia del alelo inestable

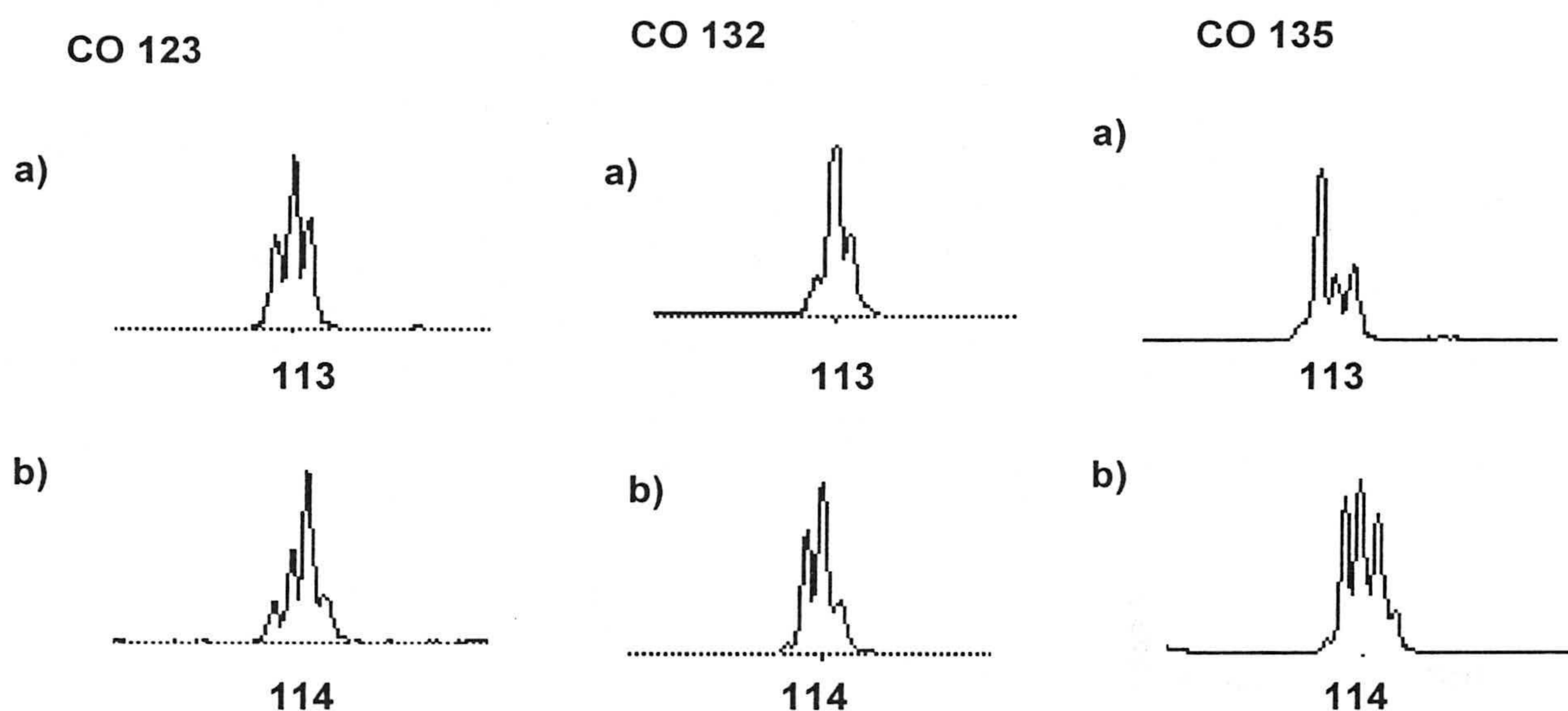
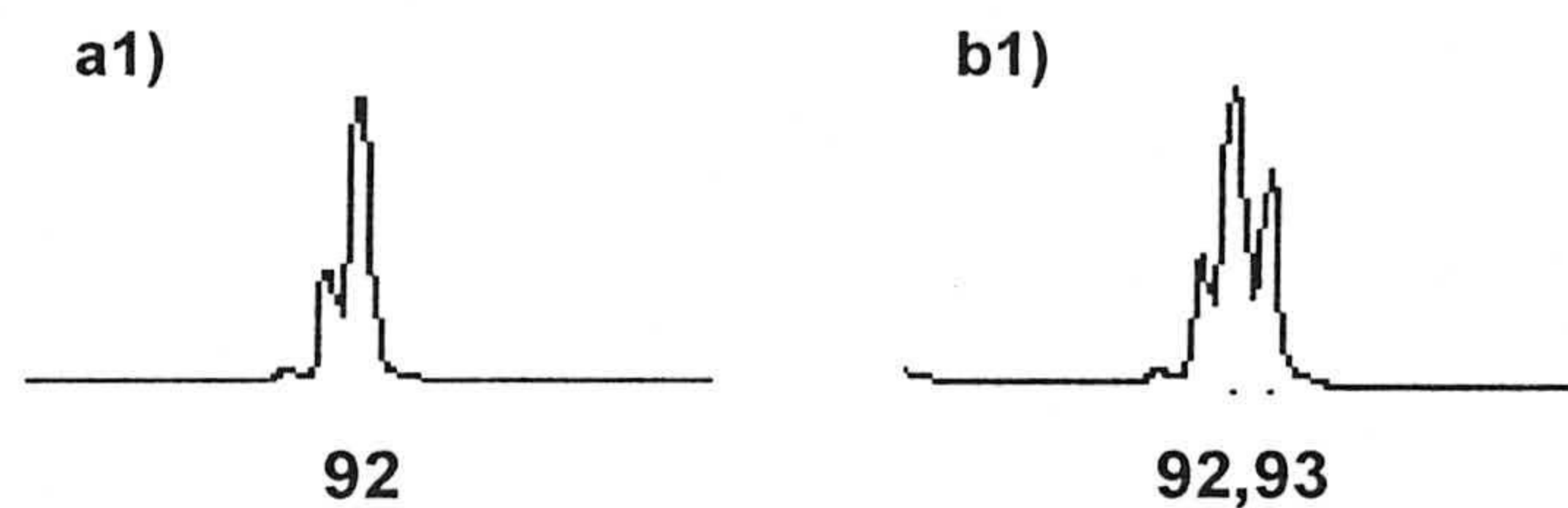
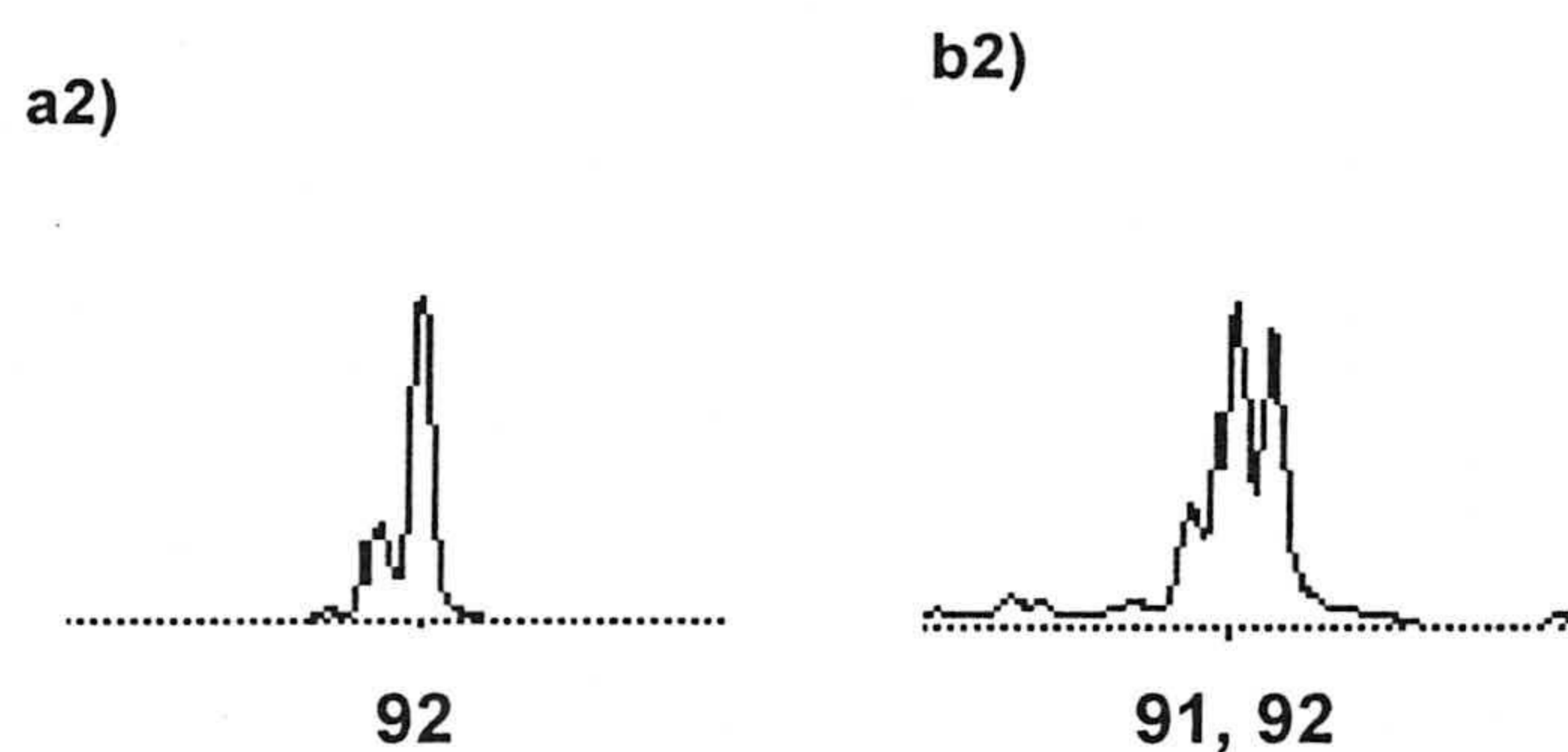


Figura 37: a) microsatélite TGFRII $\beta$  amplificado en ADN tumoral tras microdissección, la inestabilidad en los tres casos se produce por pérdida de una base b) microsatélite TGFRII $\beta$  amplificado de ADN tumoral sin microdissección

CO 117



CO 123



CO 132

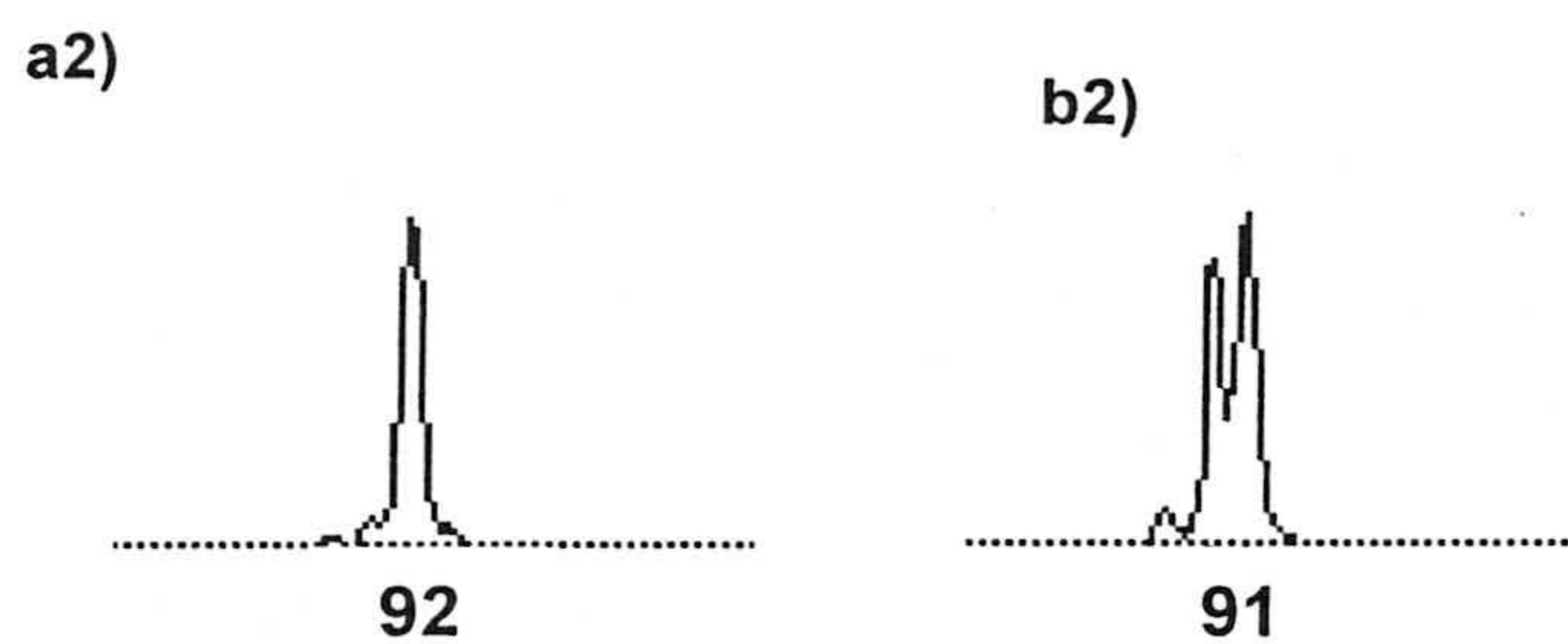


Figura 38: Resultados del análisis del microsatélite BAX: a1) y a2) muestran los resultados obtenidos a partir de ADN total; b1) y b2) resultados tras microdissección, en el caso del CO-117 podemos observar la aparición de un alelo inestable por adición de una base- Bax G (9)-, en los caso CO-123 y CO-132 vemos la parición de inestabilidad por delección de una base-Bax G(7)-. El alelo salvaje de peso molecular 92 corresponde al microsatélite Bax-G(8)

Los pacientes con cánceres colorrectales que presentan inestabilidad de microsatélites presentan unas características fenotípicas características, por lo que consultamos las Historias Clínicas, en aquellos casos en los que fue posible.

Caso	BAT 26	BAT 40	TGF $\beta$ II	BAX	Edad	TNM	Grado de diferenciación	Localización
CO1	I	∅	I	∅	81	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	PD	Derecha
CO 86	I	I	E	E	40	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	MD	Derecha
CO 119	I	I	I	I	51	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	PD	Derecha
CO 123	I	I	I	Im	46	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	MD	Derecha
CO 132	I	I	I	Im	45	T <sub>4</sub> N <sub>3</sub> M <sub>0</sub>	MD	Derecha
CO 135	I	I	I	E	79	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	PD	Derecha
CO A	I	I	I	E	31	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	PD	Derecha
CO 4	I	I	E	E	-	-	-	-
CO 117	I	∅	∅	I	-	-	-	-

Tabla 13: Datos clínicos de los casos con inestabilidad. I = Inestable; E = Estable; Im = Inestable, localizado tras realizar microdissección; ∅ = Imposible realizar la amplificación por falta de muestra; MD = Moderadamente diferenciado; PD = Pobremente diferenciado. En el caso CO-4 y CO- 117 no fue posible localizar las historias clínicas.

La comparación de las características clínicas estos casos que presentaban inestabilidad con el resto de casos estudiados dio como resultado una diferencia significativa en cuanto a la edad de aparición ( $p < 0.001$ ), eliminando del estudio los casos CO1 y CO135 correspondientes a casos de cáncer colorrectal esporádicos, en cuanto a su localización ( $p < 0.001$ ) en la zona derecha y el grado de diferenciación ( $p = 0.009$ ) ya que los únicos casos encontrados definidos como pobremente diferenciados se encuentran en el grupo de los casos con inestabilidad. No hemos encontrado diferencia significativa en el estudio del estadiaje TNM.

### 6.3 CONTROLES MEDIANTE ANÁLISIS DEL MICROSATÉLITE BAT 26 EN EL SEGUIMIENTO DE LA PACIENTE CO-A

Tras la realización de la colectomía y la clasificación del tumor como perteneciente a la vía mutadora se analizaron las distintas muestras extraídas en las endoscopias de control. En una de ellas cuyo informe anatomopatológico describía la muestra como "mucosa intestinal sin alteraciones morfológicas significativas", se detectó la aparición de un alelo inestable.

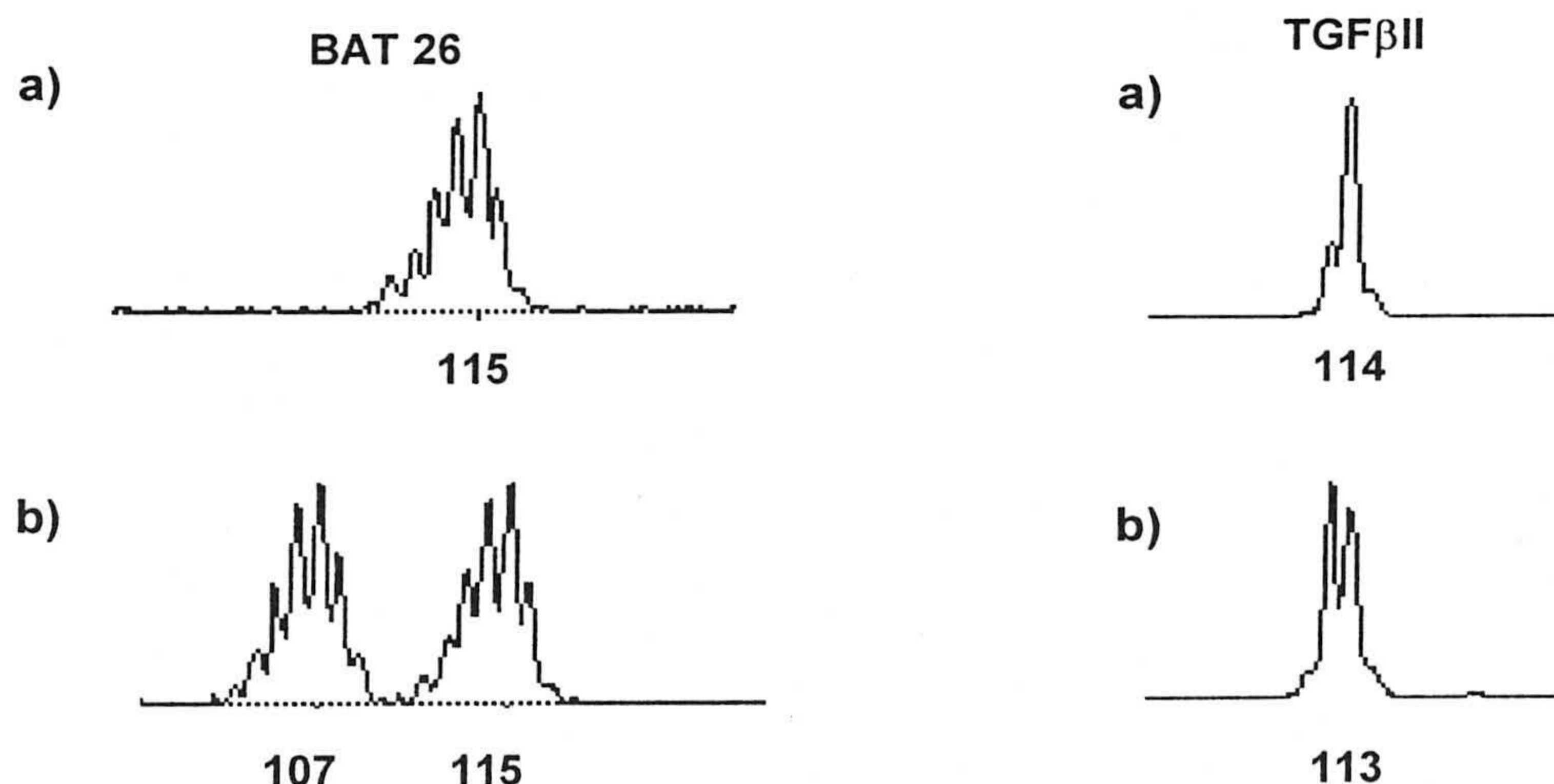


Figura 39: a) mucosa normal del primer control, b) mucosa inestable del siguiente control realizado, descrita anatomopatológicamente como normal.

### 6.4 ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TUMOR GÁSTRICO DEL PACIENTE CO-123

La presencia de tumores, sincrónicos o asincrónicos, en otras localizaciones características del espectro Lynch son habituales en pacientes con inestabilidad. El paciente CO 123 además de la metaplasia teletípica de ángulo hepático derecho, fue también intervenido de por metaplasia teletípica antro gástrica. Tras analizar la muestra gástrica tumoral pudimos comprobar la presencia de inestabilidad.

Figura 40: a) Mucosa normal, b) Estudio en pieza de tumoración gástrica





## DISCUSIÓN

## 1. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES EN EL SEGUIMIENTO EVOLUTIVO DE LOS PACIENTES TRAS TPH.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) representa actualmente una de las terapias más útiles en el tratamiento de múltiples enfermedades hematológicas malignas y no-malignas. Siendo un procedimiento ampliamente utilizado en todo el mundo, en el año 2001 se realizaron en España un total de 1492 trasplantes (ONT 2001). En los trasplantes alogénicos convencionales es necesaria la realización de un acondicionamiento previo mieloablatoivo, que consiste en la aplicación de altas dosis de agentes quimioterapéuticos con o sin irradiación total, con objeto de erradicar la enfermedad subyacente en el paciente y de suprimir la respuesta inmune del mismo, evitando así el rechazo del injerto. El injerto compensará los efectos letales que el régimen de acondicionamiento tiene sobre la médula, por lo que la intensidad de la terapia de acondicionamiento vendrá limitada por la toxicidad sobre otros órganos como intestino, pulmón, riñones, hígado y corazón. Dicha toxicidad ha limitado la realización de trasplantes a pacientes jóvenes y en relativo buen estado de salud. Al ser la media de edad de aparición de enfermedades como las leucemias mieloides agudas, leucemias mieloides crónicas, leucemias linfáticas crónicas, linfomas no-Hodgkin y mielomas múltiples, de 65-70 años, el TPH convencional beneficia solamente a una minoría dentro de los pacientes que sufren enfermedades susceptibles de resolverse mediante la realización de un trasplante. Se están llevando a cabo nuevas estrategias de trasplante que intentan evitar las desventajas y riesgos del procedimiento clásico. Principalmente dos observaciones son las que han llevado a la búsqueda de procedimientos alternativos. Primero se observó que muchos cánceres hematológicos no podían ser siempre erradicados con un acondicionamiento con altas dosis de quimioterapia, incluso cuando la intensidad se aumenta hasta niveles en los que la toxicidad en otros órganos es muy elevada. (Thomas ED y cols, 1999). La segunda, que muchas de las recuperaciones observadas tras la realización de un TPH son probablemente debidas a las reacciones inmunológicas del injerto contra el tumor (MacSweeney PA y cols, 2001). Estas observaciones junto con un mejor conocimiento sobre el funcionamiento y control de la función inmune tanto del donante como del receptor llevaron a la realización de trasplantes no mieloablatoivos, en los que regímenes de acondicionamiento menos intensivos permiten potenciar el efecto antileucémico del sistema inmune del donante

para la erradicación del tumor. Esta nueva estrategia permite el tratamiento de pacientes con edades avanzadas o con una peor situación clínica (Rainer F, 2001).

Una de las principales causas de mortalidad en el TPH convencional es la aparición de EICHa y EICHc (Sullivan y cols, 1984) Especialmente en el caso de pacientes de edades avanzadas o cuando donante y receptor no son HLA idénticos (Ringden 1985). Los efectores de las reacciones de EICH son los linfocitos T, por lo que se procedió a la realización de trasplantes en los que el injerto está depleccionado de células T maduras inmunocompetentes. La realización de este tipo de trasplantes requiere llegar a una situación de compromiso entre el número de células T necesarias para que simultáneamente al efecto protector frente a la EICH se eviten situaciones de rechazo del injerto, recaídas leucémicas y desarrollo de desórdenes linfoproliferativos relacionados con el virus de Epstein-Barr, todos estos procesos dependientes de la presencia y actuación de linfocitos T.

Estas nuevas estrategias se ven acompañadas de un riesgo aumentado de rechazo del injerto y recaída leucémica, por lo que cada vez se hace más importante el control de la dinámica del quimerismo, especialmente para la programación de decisiones terapéuticas. Por este motivo, hemos analizado varios de los factores que pueden explicar no sólo la situación del trasplante, sino también la evolución de los pacientes a medio y largo plazo, como son la evolución del quimerismo y la reconstitución de la inmunidad T tras el trasplante. En este sentido se han evaluado muchas de las cuestiones planteadas en la actualidad y no definitivamente resueltas, como si la medida del estado del quimerismo puede predecir la aparición de EICH, recaídas y como la recuperación de la diversidad del repertorio T se ve influida por el tipo de trasplante realizado y a su vez cómo influye en la supervivencia del paciente post-trasplante.

En nuestro estudio hemos utilizado marcadores de microsátélites para el estudio del quimerismo. Los marcadores genéticos y los métodos de laboratorio utilizados para el estudio del quimerismo han evolucionado mucho a lo largo de la historia del trasplante. En los primeros estudios se utilizaron antígenos presentes en los hematíes (Thomas ED, 1957) pero los resultados obtenidos eran en muchos casos confusos debido a las interferencias producidas por las transfusiones recibidas por los pacientes antes y tras el trasplante, en otros casos la hemólisis causada por incompatibilidades ABO podían retrasar la parición de eritrocitos del donante en pacientes en los que el injerto de la serie mieloide se había producido sin complicaciones. Más tarde fueron utilizados marcadores

citogenéticos (Petz LD y cols, 1987) y polimorfismos presentes en enzimas (Meera y cols K, 1987), ambas son técnicas muy laboriosas sometidas a múltiples errores potenciales en la manipulación de la muestra. Siendo además en el caso de los marcadores citogenéticos muy difícil la localización de marcadores informativos en el caso de que la pareja donante/receptor sean del mismo sexo, salvo en los casos en los que se presente una alteración citogenética propia de la enfermedad en el receptor. Durante los años 80 las técnicas de biología molecular revolucionaron el uso de marcadores genéticos en el seguimiento del TPH. Se empezaron a utilizar técnicas basadas en polimorfismos en la longitud de los sitios de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein y cols, 1980), esta técnica presenta varias desventajas ya que requiere la realización de ensayos de Southern Blot que son complejos y laboriosos, necesitándose, para obtener una sensibilidad máxima del 10%, la utilización de sondas radioactivas, finalmente la valoración cuantitativa de los resultados es muy difícil.

Los dos test más ampliamente utilizados hoy en día son hibridación in situ con sondas específicas de los cromosomas X e Y y el tipaje de polimorfismos de secuencias repetitivas de ADN. La técnica de hibridación fluorescente in situ o FISH, a pesar de permitir una valoración cuantitativa del estado del quimerismo y de existir procedimientos comerciales estandarizados que nos permiten y aseguran la comparación de resultados entre distintos centros (Dewald y cols, 1998), presenta la gran desventaja de sólo poder utilizarse cuando existe diferencia de sexo entre donante y receptor. De nuestro grupo de 21 pacientes, 10 son parejas de hermanos de idéntico sexo, por lo que esta técnica no hubiera podido ser aplicable en casi la mitad de los casos estudiados mediante PCR.

Los procedimientos basados en la amplificación de secuencias de DNA polimórficas para el estudio del quimerismo en el trasplante tanto de parejas donante/receptor de igual como de distinto sexo, presenta muchas ventajas y ha sido ampliamente utilizado. En un principio se utilizaron como marcadores los minisatélites o marcadores de repetición en tandem de longitud variable (VNTR- variable number of tandem repeat), siendo sustituidos en posteriores aplicaciones por los marcadores de microsatélites o STR (short tandem repeat), de menor tamaño y con un polimorfismo mayor. En todos los pacientes de nuestro grupo de estudio se encontraron marcadores informativos que permitieron la evaluación cuantitativa del estado de quimerismo. Se detectó una media de tres marcadores informativos siendo seis marcadores el número máximo y de dos el mínimo.

La utilización de estos marcadores de microsatélites resuelve muchos de los problemas que presentan otras técnicas, ya que permite el análisis a partir de pequeñas cantidades, presenta una mayor robustez frente al estado de degradación de la muestra, no es un método laborioso y reduce considerablemente el tiempo de análisis. Otra de las ventajas de la utilización de marcadores de microsatélites es la posibilidad de realizar PCR multiplex con la que se puede amplificar varios loci simultáneamente a partir de una muestra mínima (Figura 13).

La mayoría de los procedimientos de PCR de VNTRs o STRs publicados hasta el momento permiten sólo una valoración cualitativa o semicuantitativa del grado de quimerismo, también requieren la realización de tests y validaciones laboriosas de los patrones de marcadores de cada pareja donante/receptor con objeto de encontrar una combinación informativa. Suelen ser métodos propios de cada institución, lo que impide la posibilidad de comparación de resultados y la estandarización de los mismos. Con la adaptación de nuestro procedimiento, previamente diseñado y validado para análisis forense (Frégeau & Forurney, 1993; Kimpton y cols, 1993; Urquhart y cols, 1995), y su aplicación clínica al análisis de quimerismo, hemos podido superar todas estas limitaciones (Figura 1, Material y Métodos)

La aplicación de estos sistemas comerciales de amplificación multiplex de microsatélites, al diagnóstico clínico está en discusión debido a la sensibilidad alcanzada. En nuestra práctica habitual hemos fijado la cantidad de ADN a amplificar en 5ng y la sensibilidad alcanzada considerando el conjunto de marcadores informativos de cada paciente nos ha permitido detectar situaciones de quimerismo mixto entre un 95-99% de celularidad del donante (Figura 12, AGG un mes post-trasplante y Figura 7, MRD once meses post-trasplante), lo que nos indica una sensibilidad del 1-5% para la aparición de marcadores propios del receptor. Resultados similares han sido encontrados por Millson y cols, 2000 y por Thiede y cols, 2001, estos últimos utilizando nuestro mismo conjunto de marcadores.

Las posibilidades de cuantificación y sobre todo la rapidez en la obtención de los datos, junto con una sensibilidad aceptable para sus objetivos clínicos, hacen de esta metodología la técnica de elección para su instauración en laboratorios donde se realicen seguimientos del estado del quimerismo tras TPH de manera rutinaria. Un aumento de sensibilidad supondría un coste en material, tiempo y personal innecesarios porque nunca podrían alcanzarse sensibilidades como la de la RT-PCR (sensibilidades de un

0.0001% (Roth y cols, 1992)) en un laboratorio de rutina. Con lo que su utilidad es la complementación de las técnicas ya establecidas de detección de enfermedad mínima residual.

Los resultados obtenidos de un estudio de quimerismo en un paciente post-trasplantado deberán interpretarse siempre en función de su estado clínico y teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica. El hecho de que no detectemos celularidad de uno u otro origen no significa necesariamente que esta no exista, así la ausencia de marcadores pertenecientes al donante en un paciente con aplasia medular nos indican un rechazo del injerto, pero el mismo hallazgo podría ser causado por la presencia masiva de células del receptor en un paciente leucémico que enmascaren a la celularidad del donante, esta última situación la podemos observar en la recaída leucémica del paciente nº4 (MRD), en la que en sangre periférica observamos una situación de predominio de celularidad del receptor debido al elevado número de linfocitos B patológicos, pero el análisis por subpoblaciones nos muestra que tanto en la serie mieloide como en los linfocitos T existe celularidad del donante, reflejando pues no una pérdida de injerto sino una recaída (Figura 20). En estas situaciones el estudio del quimerismo en subpoblaciones puede suponer un aumento de sensibilidad.

Como ventaja adicional esta técnica nos permite detectar anomalías cromosómicas cuantitativas, aparición o desaparición de cromosomas enteros o parte de ellos, ya que asumimos que la cantidad de ADN presente en la muestra refleja el correspondiente contenido celular y que todos los alelos amplifican por igual. Así en una muestra con aneuploidía encontraremos un área alélica proporcional a la duplicación, triplicación, etc alélica, como en el caso nº 4 (MRD) y en el nº5 (IRM) donde se detectó una trisomía 12 (Figuras 33 y 8, respectivamente) en las que observamos que el área del alelo duplicado es el doble que el otro. En una delección observaremos la no amplificación o desaparición de la señal como en el caso nº 5 (IRM) (Figuras 8 y 9) donde se ha producido la pérdida de uno de los alelos del cromosoma 4. Esta posibilidad ofrece al ensayo una atractiva alternativa para la detección de EMR.

En nuestro estudio hemos querido también analizar la relación existente entre la instauración de una situación bien de quimera mixta o total con la aparición de EICH tanto aguda como crónica y si existe relación con el tipo de trasplante realizado y por lo tanto con el acondicionamiento utilizado y la composición celular del inóculo.

Se ha postulado que una situación de quimera mixta se asocia con una menor incidencia de EICH y de efecto injerto contra leucemia, una mayor frecuencia de recaídas y una supervivencia libre de enfermedad limitada. En contraste, una situación de quimera total se relaciona con una frecuencia mayor de EICH y de mayor severidad, con una menor tasa de recaídas y periodos de supervivencia libres de enfermedad prolongados (Barta A y cols, 2000).

En nuestro grupo no hemos encontrado diferencia significativa entre la incidencia de EICHa en los pacientes que se encontraban en situación de quimera mixta y aquellos con quimera total. Los porcentajes de incidencia son similares tanto para la EICHa grado 0-I (60%/69%), como para la EICHa grado II-IV (40%/31%), entre ambos grupos (Figura 1). Estos datos contrastan con los encontrados por otros autores como Mattsson y cols, 2001, en los que sí encuentran que una situación de quimerismo mixto, especialmente de la subpoblación T se correlaciona significativamente con un riesgo menor de sufrir EICH de moderada a grave. Las diferencias encontradas pueden ser debidas a que en nuestro estudio el número de pacientes es menor.

En contraste a este resultado, la situación de quimerismo mixto, en fechas posteriores a cuatro meses post-trasplante, si presenta una tendencia a la no aparición de EICHc o con una aparición limitada de la misma, no existiendo ningún caso de EICHc extensa entre los pacientes con quimera mixta, a pesar de que no alcance diferencia estadísticamente significativa, posiblemente debido al pequeño tamaño muestral (Figura 2).

El análisis de esta relación entre quimera mixta y aparición de EICH puede estar relacionado con el tipo de trasplante y por lo tanto de acondicionamiento realizados. Recientemente se han desarrollado nuevos métodos de trasplante alogénico como alternativa a los métodos hasta ahora establecidos de trasplante de médula ósea y de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (PHSP). Uno de estos nuevos métodos es la utilización de PHSP tras acondicionamientos no mieloablativos (Slavin y cols, 1998). La técnica óptima que llegue a una situación de compromiso entre la aceptación del injerto, la maximización del efecto injerto contra leucemia y la minimización de las complicaciones inherentes al trasplante no ha sido aún definida. Para su evaluación será necesario caracterizar la cinética de la recuperación de las poblaciones celulares mieloides y linfoides. Además la medida del quimerismo tras el trasplante es necesario para la adecuación del tratamiento inmunosupresor bien

mediante la eliminación del tratamiento con ciclosporina o la infusión de linfocitos del donante. En pacientes sometidos a este tipo de trasplante es de esperar una aparición de situaciones de quimera mixta con una mayor frecuencia que en pacientes sometidos a acondicionamiento mieloablativo. En nuestro grupo de pacientes ocho de ellos fueron sometidos a acondicionamiento no mieloablativo, seis de ellos (75%) presentaron una situación de quimera total un mes post-trasplante, los dos restantes (25%) desarrollaron situaciones de quimera mixta (Figura 5). Estos resultados muestran una rápida instauración de la situación de quimera total comparada con la observada en otros estudios también basados en el tratamiento con Fludarabina (Giralt y cols, 1997, Slavin y cols, 1998 y Hhoury y cols, 1998) aunque coincidentes con los datos recientemente publicados por Wäsch y cols en el año 2000. Este último estudio fue realizado con 21 pacientes que sufrían distintas patologías y sometidos a un acondicionamiento no mieloablativo con fludarabina, carmustina y melfalan. Una rápida instauración de una situación de quimera total está relacionada tanto con un efecto de injerto contra leucemia como de injerto contra huésped aguda (Bertheas y cols, 1991; Hill y cols, 1986). En nuestro grupo de pacientes esta situación es distinta a la descrita por Wäsch y cols que encuentran un 62% de pacientes que sufren EICH agudas grado II-IV, y por Badros y cols, 2002 que encuentran un 58% de EICHa tras acondicionamiento no mieloablativo, mientras que nosotros observamos un 37% de EICH agudas (Figura 3). Los cuatro pacientes vivos presentaron situación de quimera total desde la instauración y no presentaron EICH aguda. Estos datos parecen estar en concordancia con el hecho de que en nuestro grupo de pacientes no observamos que la situación de quimera total tras el implante signifique una desventaja ante la aparición de EICHa en comparación con la aparición de quimera mixta.

Otra de las innovaciones en el trasplante es la utilización de células progenitoras hematopoyéticas CD34-positivas altamente purificadas que a la vez de proporcionar un injerto enriquecido de células progenitoras elimina las células CD3-positivas, responsables de la aparición de EICH aguda post-trasplante, es otra de las metodologías de reciente implantación. En nuestro estudio cinco pacientes fueron sometidos a trasplante con deplección de células T, como era de esperar ninguno sufrió EICHa grados II-IV o EICH extensa (sólo uno sufrió EICHc limitada, el resto no presentaron EICHc) (Figuras 3 y 4), al ser los linfocitos T los principales efectores de la EICH.



Como hemos podido observar el estado del quimerismo puede ser uno de los factores que dirigen la aparición de EICH, también parece ser que puede influenciar el curso del periodo post-trasplante en relación con la aparición o no de recaídas y en el desarrollo de la reacción injerto contra tumor o leucemia. (Barta A, 2000). Así el estudio del quimerismo como marcador de EMR o predictivo de recaídas tienen gran importancia.

La finalidad de la detección de existencia de EMR es poder diferenciar a los pacientes con células leucémicas que van a sufrir una recaída de aquellos con una EMR estable o decreciente. Una vez identificados los pacientes con un alto riesgo de recaída podrán someterse a terapia adicional, mientras que la enfermedad permanece en unos niveles varios órdenes de magnitud menor que en la situación de franca recaída.

Existen diferentes técnicas de detección de EMR que presentan distintos grados de sensibilidad, variando su utilidad de unas enfermedades hematológicas a otras. El examen morfológico de la médula es la metodología estándar de evaluación de leucemia residual tras la terapia. La sensibilidad se ve limitada y viene definida por el criterio de menos de un 5% de blastos en médula con un recuento normal en sangre periférica. Esta técnica nos permite definir una recaída pero no predecirla. Las metodologías más comúnmente utilizadas en la predicción y detección de EMR se basan en la citogenética básica, FISH, citometría de flujo, ensayos clonogénicos y estudios moleculares mediante PCR. La citogenética convencional podrá ser utilizada siempre que el clon leucémico presente una anomalía cromosómica tal como la pérdida o ganancia de un cromosoma o una traslocación (Arthur CK y cols, 1988). Esta técnica se ve limitada por el número de metafases que pueden analizarse de manera rutinaria y por el tipo de células en división que pueden no representar a la totalidad del clon leucémico, su sensibilidad varía entre un 1-5%. La utilización de técnicas de citogenética molecular, FISH, permite alcanzar una mayor sensibilidad,  $10^{-1}$ -  $10^{-3}$  dependiendo de la anomalía cromosómica estudiada. En general la sensibilidad de detección de ganancias o pérdidas cromosómicas es mayor que la de detección de traslocaciones (Bernell P y cols, 1996). Las principales limitaciones técnicas de la utilización de FISH son la necesidad de sondas específicas para cada paciente, los falsos negativos debido a un fallo en la hibridación, la superposición de las señales en el caso de células diploides y los casos de falsos positivos debido a la señal de fondo provocada por la hibridación no específica de la sonda. En el caso del paciente nº4(MRD) se utilizó esta técnica para comprobar la presencia de trisomía 12 en el clon leucémico, previamente detectada por nuestro

sistema de análisis al detectarse un desbalanceo en el marcador correspondiente al cromosoma 12 (Figura 31).

La citometría de flujo utiliza la expresión de antígenos de superficie aberrantes en las células leucémicas para su detección (Figuras 10 y 17). Aunque el hallazgo de un antígeno específico de una tumoración concreta es raro, se ha detectado que las células malignas expresan en su superficie distintos patrones antigénicos que las células normales (Sievers y cols, 1996). Utilizando un panel de marcadores suficientemente amplio esta técnica puede alcanzar sensibilidades de 0.1 a 1%. Es una técnica rápida, aunque la interpretación de los resultados no es sencilla requiriendo personal cualificado y con experiencia.

Los ensayos clonogénicos aunque han sido utilizados en la detección y cuantificación de progenitores leucémicos mediante su crecimiento en cultivos, presentan grandes desventajas para su utilización en un laboratorio de rutina, son costosos en cuanto a tiempo y esfuerzo, además de no ser fiables en todos los casos ya que algunas clonas leucémicas no crecen en cultivo.

La técnica más sensible de las hasta ahora aplicadas al estudio de la enfermedad mínima residual es la PCR en la que una secuencia específica de ADN o ARN es amplificada (Figura 20). En el caso de trabajar con ARN se requiere un paso previo de retrotranscripción, en el que se sintetiza la hebra de ADN complementario que luego se amplificará, en este caso la técnica se denomina RT-PCR. Se alcanzan sensibilidades entre 0.0001-0.1%. Sus mayores desventajas son la posibilidad de contaminaciones que provocarían falsos positivos, y la dificultad de cuantificación.

Ninguna de estas técnicas es perfecta, complementándose unas a otras en el estudio de EMR en las distintas patologías hematológicas. El estudio del quimerismo tanto en sangre periférica como en subpoblaciones mediante el análisis de microsatélites se presenta como una opción válida, tanto en coste, rapidez y sensibilidad como complemento básico en el estudio de EMR.

La LMC fue la primera leucemia asociada con una aberración cromosómica específica (Nowell PC, 1960) el reordenamiento bcr-abl, siendo este uno de los primeros en poder ser amplificado mediante PCR (Lee MS, 1988). Distintos estudios han demostrado que la detección del reordenamiento tiene significado pronóstico (Miyamura, 1994; Radich JP, 1995). Todos los estudios parecen estar de acuerdo en el hecho de que pacientes que presentan resultados negativos en el estudio del reordenamiento tienen

mucho menor riesgo de recaída, pero existe controversia entre el valor pronóstico de un resultado positivo ya que dentro del grupo de pacientes que presentan el marcador positivo existe un subgrupo que permanece en remisión citogenética durante años sin sufrir recaída (Román J, 2000). Es importante la diferenciación entre estos dos grupos de pacientes, los que presentando el reordenamiento son susceptibles de sufrir recaída de los que no, con objeto de poder aplicar las terapias adicionales pertinentes, como puede ser la infusión de linfocitos del donante, la administración de  $\alpha$ -interferón o STI.

La utilización del estudio del quimerismo puede ser aplicable en apoyo de la RT-PCR cualitativa, para la evaluación, mediante la dinámica de evolución de la quimera, de la actividad del clono leucémico. Solventándose todos los problemas técnicos y de estandarización de la RT-PCR cuantitativa (Federl S, 1999).

En nuestro grupo de pacientes con LMC, en el caso nº2 (FMG) nos encontramos con una negativización del marcador molecular y una situación de quimera total, la paciente se encuentra actualmente en remisión y en buen estado de salud. La presencia de un marcador positivo con una disminución de la quimera mixta (es decir un aumento del porcentaje de la celularidad autóloga) está fuertemente relacionado con el riesgo de recaída y nos delimitaría el grupo de pacientes en los que sería necesaria una intervención terapéutica adicional, esta evolución la podemos observar en nuestro caso nº1 (DMM) en la que una infusión de linfocitos, realizada ante una situación de marcador molecular positivo y pérdida de QT, con cifras de QM mixta en descenso, resultó en la recuperación del paciente, negativización del marcador e instauración de quimera total que se mantiene hasta la actualidad (Figuras 7 y 21). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio de Román J y cols, 2000, en el que muestran, en un grupo de 49 pacientes sometidos a trasplante convencional, que la unión del estudio del estado del quimerismo y del reordenamiento bcr-abl mediante RT-PCR muestran una buena correlación con el pronóstico de recaída

El papel del quimerismo en la predicción de recaídas en leucemias agudas está todavía en discusión. En nuestro estudio se incluyen diez pacientes con leucemias agudas, 3 con LLA y 7 con LMA (Figura 12). Los tres pacientes con LLA presentaron QT al implante, pero el seguimiento fue imposible al fallecer a los pocos meses debido a infecciones. Cuatro de los siete pacientes con LMA que presentaron QT no presentaron recaídas (casos 11-LMR-, 13-CTR-, 14-AGG-, 15-IRV-). De los otros tres, el caso nº10 (AAO) presentó recuperación autóloga sin instauración de la hematopoyesis del donante

en ningún momento (Figura 13), los dos pacientes restantes (nº11-RRE- y nº16-EVC-), evolucionaron de una situación de quimera mixta a una situación de desaparición de la quimera (Figuras 12, 14). En el caso nº16 (EVC) se observa que el estudio por subpoblaciones permitió detectar una reducción en la quimera de la población mononuclear, donde se sitúan los blastos, mientras que la serie mieloide permanecía en situación de quimera total (Figura 16). Esta evolución de la quimera en serie mononuclear (no observable en SP) nos indica una recaída, que fue confirmada por inmunofenotipaje. El estudio del quimerismo por subpoblaciones puede pues aumentar la sensibilidad del método, permitiéndonos detectar situaciones que en sangre total se ven enmascaradas por el resto de series hematológicas.

Existen varios estudios que sugieren una correlación entre el aumento de la quimera mixta y la aparición de recaídas (Ramírez, 1996; Bader y cols, 1997b y 1998), mientras que otros no observan dicha relación (Serrano y cols, 1999). Recientemente Choi S y cols (2000) concluyeron en un estudio sobre 30 pacientes (15 con LMA y 15 con LLA) que la recaída no se puede predecir mediante el seguimiento mensual del quimerismo, ni que una situación de quimera total excluya de la posibilidad de aparición de recaída. Los conflictos existentes en la literatura sobre la utilidad del quimerismo en leucemias agudas pueden verse influenciados también por el hecho de generalmente las recaídas en este tipo de leucemia se desarrollan en un periodo de tiempo menor en comparación con los casos de leucemias crónicas. Por lo que los estudios con intervalos relativamente largos entre estudios pueden no detectar la situación crítica y transitoria de quimera mixta. Se han descrito distintos intervalos de tiempo (P Bader y cols, 1998), en nuestro estudio hemos podido observar con un seguimiento mensual la evolución del paciente EVC y la predicción de la recaída. Ante la aparición de una quimera mixta o una evolución dentro de una situación de la misma sería interesante intensificar el estudio. Ya que existen estudios en los que se han prevenido recaídas hematológicas mediante la iniciación temprana de inmunoterapia adicional (suspensión de la inmunosupresión o infusión de linfocitos) basándose en dicho incremento del quimerismo mixto. (Bader y cols, 1997a; Formánková R y cols, 2000).

La detección de blastos perteneciente al receptor mediante el estudio por subpoblaciones, como en el caso descrito del paciente nº 16, (EVC) podría también aplicarse al caso de LLA ya que se ha observado que en pacientes pediátricos con LLA, linfoblastos neoplásicos pueden ser morfológicamente similares a células linfoides

inmaduras y expresar el CD10 y TdT (deoxinucleotidil transferasa terminal) como los linfocitos inmaduros normales (Anastasi y cols, 1991) y la existencia de un quimerismo mixto no estable en la fracción mononuclear nos indicaría una posible recaída.

Aún no existen muchos estudios sobre el estado molecular y de EMR de los pacientes que sufren mieloma múltiple tras trasplante alogénico. Aunque en los alotrasplantes para mieloma múltiple existe una mortalidad relacionada con el trasplante se han observado menor número de recaídas que en los trasplantes autólogos. Las ventajas del trasplante alogénico son una fuente de progenitores libres de células tumorales y el efecto del injerto contra las células del mieloma. En nuestro estudio se incluyen dos pacientes con mieloma múltiple, el caso 8 (JOB) falleció por complicaciones relacionadas con el trasplante y el caso 9 (MAML) sufrió una recaída fatal. El estudio del quimerismo en ambos casos dio como resultado en el primer post-trasplante quimera total. La recaída se detectó al analizar una muestra de médula ósea (Figuras 10 y 11). Se han descrito casos (Orsini y cols, 2000) en los que tras una aparente remisión, la recaída se produce sin una etapa previa de quimerismo mixto, lo que indica que el resto de celularidad del receptor si son eliminadas por el efecto injerto contra leucemia, mientras que las células del mieloma son resistentes a la destrucción inmune, quedando acantonadas en la médula hasta el momento de la recaída, pero sin que esto suponga una recuperación de la hematopoyesis del receptor. El estudio de quimerismo en mielomas debería pues llevarse a cabo en médula ósea y tras separación de subpoblaciones para aumentar la sensibilidad. La utilidad del estudio por subpoblaciones para la detección de expansión de clonas que conllevan recaída y no de presencia de fallo de implante se observó, al igual que en este caso de mieloma, en el paciente nº4 con la expansión de la clona trisómica (Figura 20).

En nuestro estudio se incluyen tres pacientes con LNH, dos con linfoma agresivo de células grandes (IRM y FPP) y uno con linfoma indolente folicular (EVV). FPP y EVV alcanzaron una situación de quimera total tras el injerto, al finalizar el estudio se encontraban en remisión y en buen estado de salud. IRM presentó una situación de quimera mixta tras el implante que evolucionó a quimera total, sufrió una recaída a los cuatro meses, en sangre periférica seguía mostrando una quimera total mientras que en una de las muestras de las adenopatías se observó una quimera mixta y la recuperación de la celularidad propia en la otra (Figura 8).

Además de cómo marcador complementario de EMR el estado del quimerismo puede ser un factor predictivo frente a la aparición de recaídas.

Podemos observar en la figura 5 que todos los pacientes que presentaron quimera mixta recayeron, con excepción de una paciente que sufrió una recuperación autóloga. Entre el grupo de pacientes con quimera total en sangre periférica podemos observar que las únicas dos recaídas se produjeron en dos pacientes que sufrían LNH y MM, patologías que se detectan respectivamente en ganglios linfáticos y médula ósea, localizaciones en las que si encontramos una situación de quimerismo mixto.

Debido al reducido número de pacientes que se encontraron en una situación de quimera mixta, la relación con el tipo de trasplante no se pudo realizar. Aún así, según lo descrito por Elmaagacli y cols (2001) que confirman la existencia de un riesgo de recaída mayor para los pacientes que sufren LMC trasplantados con PHSP CD 34+ que en pacientes tras trasplante de PHSP sin manipular, en nuestro caso los resultados del análisis de la evolución del quimerismo del paciente nº1 se correlacionan perfectamente con estas observaciones ya que presenta una situación de quimera mixta transitoria que se convierte en quimera total tras infusión de linfocitos y que presenta una supervivencia libre de enfermedad superior a la media. Esta desventaja representada por el menor efecto antileucémico del trasplante con PHSP CD34+ se ve compensada por la baja mortalidad relacionada con el tratamiento y la elevada respuesta a posteriores infusiones de linfocitos del donante.

En nuestro estudio hemos querido complementar el estudio del estado del quimerismo con el estudio de la regeneración del repertorio de la celularidad T, al ser este un factor fundamental en la recuperación de los pacientes post-trasplantados ya que la generación y el mantenimiento de la diversidad del repertorio de celularidad T es un elemento crítico de la inmunocompetencia. Este proceso parece depender del tipo de trasplante realizado y verse influenciado por el curso del periodo post-trasplante como puede ser la aparición de EICH, infecciones o estado del quimerismo (Wu y cols, 2000; Fujimaki y cols, 2001). En situaciones normales el procesamiento tímico de los progenitores de células T resulta en un amplio espectro de células T nativas que permanecen presentes durante casi toda la vida de un individuo. Aunque se considera que el procesamiento tímico continua en los adultos, en todos los individuos ocurre una involución del timo que resulta en una marcada disminución del procesamiento y

generación de células T nativas. El modo en que el repertorio T se genera y mantiene tras la realización de un TPH no es bien conocido.

Debido a que las células T juega un papel importante en muchas situaciones clínicas, como son la respuesta a superantígenos bacterianos o víricos, en aloinmunidad incluyendo el rechazo de injertos, la enfermedad injerto contra huésped e injerto contra tumor/leucemia y en la inmunidad humoral, el conocimiento y control del desarrollo de la celularidad T tras el implante es de gran importancia para la práctica de los TPH. Después de un trasplante convencional con un número relativamente alto de linfocitos normales del donante, la reconstitución de la celularidad T se deriva en parte de la expansión de células T maduras del donante. Pero no es este el único mecanismo de recuperación existente pues también se ha observado la reconstitución de la celularidad T tras un trasplante con deplección de linfocitos T que contiene muy pocas o ninguna célula T. En ambos casos la función de las células T permanece comprometida por largos periodos de tiempo, lo que sugiere que el proceso de regeneración de un repertorio de celularidad T diverso es relativamente lento en adultos.

La diversidad de los receptores de células T maduras se determina principalmente por las regiones determinantes complementarias de los TCRs o CDR3. El CDR3 juega un papel clave en la definición de la especificidad frente al antígeno pues estas regiones forman el sitio de contacto para la unión con el complejo mayor de histocompatibilidad expresados por las células presentadoras de antígeno.

Aunque la valoración cuantitativa mediante inmunofenotipaje de las familias  $V\beta$  ofrece ventajas, como la posibilidad de calcular el porcentaje de células que poseen una familia  $V\beta$  determinada y la de separación de las poblaciones de interés para posteriores caracterizaciones, en pacientes trasplantados no es suficiente para el estudio de la recuperación de la variabilidad ya que hemos observado que familias que cuantitativamente se encuentran dentro de la normalidad (caso de RRE, tablas 4 y 5) presentan patrones alterados de mono y oligoclonalidad (tabla 7). La detección de disminuciones es difícil debido a que en muchas de dichas familias el valor 0 entra dentro de los rangos de normalidad, como podemos observar en la tabla 3. Sólo en casos extremos en los que haya una desaparición de las familias más abundantes hemos detectado disminuciones como en el caso nº5 (IRM) (figura 25). Además la presencia de series sobrerrepresentadas tampoco tiene una clara relación con el estado clínico del paciente (Villers y cols, 1994), salvo que se alcancen valores extremos, en cuyo caso

deberíamos investigar su clonalidad. Los incrementos encontrados en nuestros pacientes van desde valores cercanos a la normalidad hasta dramáticos incrementos como el de la paciente nº5 (IRM) en el que el 88% de la celularidad era V $\beta$ 22, pudimos comprobar la monoclonalidad de dicha expansión (Figura 26).

En los primeros meses post-trasplante la diversidad del repertorio T está dramáticamente disminuida con predominio de patrones mono y biclonales y la ausencia de determinadas subfamilias (Catherine J y cols, 2000; Verfuert y cols, 2000) independientemente del tipo de trasplante realizado. Tras seis meses post-trasplante empiezan a recuperarse patrones más complejos. Nosotros hemos escogido una fecha intermedia, 18 meses, en la que se supone que ya han entrado en funcionamiento los dos mecanismos de recuperación de la diversidad, el periférico y el tímico, para evaluar la recuperación del repertorio T tras los distintos tipos de trasplante realizados en nuestro grupo de pacientes (tablas 4, 5 y 7). Los resultados cuantitativos mediante inmunofenotipaje no tienen ninguna relación con el estudio de la complejidad mediante RT-PCR. Como podemos observar en la tabla 8 una de las pacientes que menor complejidad presenta (43 vs 124 que es valor normal) sólo presenta un 4% de las familias V $\beta$  alteradas cuantitativamente, mientras que la paciente que se encuentra más cerca de la normalidad en cuanto a diversidad de TCRs es la que mayores alteraciones cuantitativas presenta. Hecho que ratifica nuestra observación de que una valoración cuantitativa aislada de las familias V $\beta$  no es útil en el seguimiento de pacientes post-trasplantados. Aunque el repertorio empieza a normalizarse, la diversidad aún no alcanza valores normales en ninguno de los pacientes. Siendo este hecho mucho más acusado en el caso de trasplante tras deplección, como se muestra en la gráfica de la figura 23. Una de las razones de este lento e incompleto desarrollo es la reducida función tímica de los adultos. Además en los trasplantes tras deplección T también se ve reducida la otra fuente de diversidad, según Roux y cols, que es la expansión de los linfocitos infundidos con el injerto.

La reconstitución del sistema inmune es un componente importante dentro de la realización de un TPH, ya que las infecciones tanto víricas como bacterianas y fúngicas contribuyen significativamente a la morbilidad y mortalidad tras el implante. En un estudio reciente, se documentó que las infecciones oportunistas fatales aparecían en un 12-28% de los receptores de trasplantes alogénicos no relacionados y en un 41% de los trasplantes alogénicos relacionados (Small y cols, 1999).



Los resultados obtenidos en las pacientes IRV y LMR (figura 25 y tabla 9, respectivamente), nos muestran que una disminución de la complejidad del repertorio y la desaparición de varias de las familias conllevaron posiblemente a un fallo del funcionamiento del sistema inmune ya que ambas fallecieron debido a infecciones. El conocimiento de la complejidad del repertorio de celularidad T sería un dato interesante, que complementaría al estudio del quimerismo en el seguimiento de la evolución del paciente post-trasplantado y en la toma de decisiones en la administración de terapias de prevención.

Está descrito que tras un año post-trasplante se produce una mejora dentro de los patrones de complejidad de los TCRs (Vertfuerth y cols, 2000), que coincide con la normalización de los cocientes CD4+/CD8+ y con el periodo en los que los pacientes post-trasplantados son menos susceptibles a infecciones oportunistas (Atkinson, 1990). Pero al igual que lo observado por Vertfuerth y cols, en nuestro grupo de pacientes el repertorio de TCRs no se normalizó completamente incluso tras varios años post-trasplante, dicha normalización parcial fue muy variable entre pacientes y entre las distintas subfamilias V $\beta$  en el mismo paciente. Este hecho lo hemos podido comprobar no sólo en pacientes sometidos a un trasplante tras deplección de linfocitos T, sino también tras trasplante estándar y mini. Por lo que la sugerencia de Gorski y cols, 1994 de utilizar unas familias V $\beta$  concretas y en nº limitado como guía del estado inmune del paciente no es viable.

Sólo un tercio de los pacientes, en el estudio de Vertfuerth y cols, lograron una reconstitución completa. En nuestro caso de los seis pacientes en estudio sólo el paciente nº 1 (DMM) presenta un repertorio más cercano a la normalidad con un índice de complejidad de 114 (VN: 124), sin ningún tipo de expansión mayor del 20%, 3 años post-trasplante (Figura 30). Este paciente sólo presenta dos familias oligoclonales que pueden ser debidas a que clínicamente presenta una EICH crónica en el momento del estudio.

En el estudio mencionado en aproximadamente dos tercios de los pacientes, algunas familias permanecieron con un patrón anormal tras varios años post-trasplante. A pesar de este restringido repertorio, no mostraron pruebas de una función inmune deficiente, como puede ser una mayor susceptibilidad a las infecciones. Nuestro grupo de estudio la paciente nº 18 (ENC) presenta, tras cuatro años post-trasplante, oligoclonalidad en la mayoría de las familias pero no sufre ningún tipo de complicación debido a infecciones recurrentes. En el momento del estudio la paciente desarrolló la

enfermedad autoinmune de Graves Basedow, lo que quizás pudo afectar a la reconstitución de su repertorio V $\beta$ . Puede ser que la extensión en la que la selección tímica se encuentra presente en adultos se vea limitada y sea variable dependiendo del paciente. Además el hecho de que algunas familias se normalicen mientras otras permanecen alteradas en un mismo paciente, sugiere que otros factores también juegan un papel importante en la construcción del repertorio TCR, como pueden ser las infecciones sufridas tras el trasplante, la activación por aloantígenos la aparición de enfermedad injerto contra huésped y el tratamiento con drogas inmunosupresoras. Ya que todos estos procesos tienen un papel inhibitor sobre los linfocitos (Lum LG, 1987).

Finalmente, durante el estudio del quimerismo encontramos datos complementarios de interés para la evolución de los pacientes, como la relación encontrada entre la aparición simultánea de la clona leucémica con trisomía 12 y la recaída con linfocitosis progresiva que llevó al fallecimiento del paciente. El significado de células con trisomía 12 en LLC-B es controvertido ya que se han descrito resultados contradictorios (García-Marco y cols, 1996, Koski y cols, 2000). Nuestros resultados mostraron que la expansión de las células trisómicas se asoció con la progresión de la enfermedad y el fallo de respuesta a la retirada de la inmunosupresión y al posterior tratamiento farmacológico. La figura 34a muestra como ante la aparición de una primera recaída, la retirada de la inmunosupresión conllevó probablemente la aparición de una reacción injerto contra leucemia que acabó con la resolución de la recaída, como ha sido previamente descrito por Rondon y cols, 1996 y posteriormente por Mattson y cols, 2000. Mientras que en la aparición de la segunda recaída no existió tal respuesta (Figura 34b), coincidiendo con la detección de la clona trisómica. La trisomía 12 ha sido asociada con un alto grado de proliferación y progresión de la enfermedad (García-Marco y cols, 1996), probablemente debido a la influencia de esta aberración sobre la replicación génica y el control del ciclo celular (Amiel y cols 2001). Esta aberración cromosómica pudo ser adquirida *de novo* (Hjalmar y cols, 2001) o bien ser una expansión de un clono que existía en un pequeño porcentaje no detectable mediante análisis de microsatélites. Nuestros resultados también muestran que el nivel de células trisómicas no es constante como ha sido previamente publicado por Garcia-Marco y cols, 1996.

## 2. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN CANCER COLORRECTAL

La inestabilidad de microsatélites, evento característico de los cánceres colorrectales asociados con HNPCC, ha sido también descrita en formas esporádicas. Diversos estudios han sugerido similitudes fenotípicas entre ambos cánceres, por lo que el análisis de inestabilidad de microsatélites puede contribuir a la identificación de nuevas clases de tumores colorrectales con un comportamiento biológico diferente o incluso de nuevas familias que no cumplieran con los criterios de Amsterdam (Vasen, 1991). Por ello en nuestro estudio hemos cogido un grupo de tumores colorrectales sin realizar ningún tipo de cribaje previo, para poder detectar todas las muestras con inestabilidad. En nuestro grupo hemos encontrado un 8% de casos con inestabilidad de microsatélites. El porcentaje de casos de cánceres colorrectales que presentan inestabilidad de microsatélites, en estudios realizados sin previa separación entre cánceres esporádicos o hereditarios, previa al análisis molecular como el nuestro, varía desde un 12% en el estudio de Ionov 1993 y Slovaara, 2000 hasta un 28% en el de Alexander J y cols, 2001.

Aunque los criterios de Amsterdam definen una población homogénea adecuada para estudios de investigación, en la práctica clínica estos criterios son muy restrictivos, ya que como ha sido previamente sugerido, algunas familias con HNPCC pero con una historia hereditaria de cáncer de colon menos patente pueden perderse (Lynch y cols, 1997; Muta, 1996). A este hecho puede añadirse que actualmente las unidades familiares son cada vez más reducidas por lo que se dificulta la realización de una historia familiar lo suficientemente amplia para cumplir los criterios de inclusión. Por lo que es necesaria una herramienta diagnóstica con un espectro más amplio. El cribaje mediante el análisis de la inestabilidad de microsatélites parece ser la técnica más adecuada para la realización de este diagnóstico diferencial de los cánceres colorrectales de la vía mutadora.

Existe controversia entre el número de marcadores de microsatélite apropiado para ser utilizado en un panel de cribaje y el tipo de marcador a utilizar (repeticiones de mono o dinucleótidos). Los marcadores de repetición de mononucleótidos se encuentran mutados (normalmente sufren disminución de tamaño) sólo en tumores con inestabilidad de microsatélites, mientras las repeticiones de di, tri y tetranucleótidos pueden también verse alteradas (aumentos y disminución de tamaño) en tumores que no presentan inestabilidad genómica. Esto es debido a la mayor frecuencia intrínseca de mutación

espontánea de estas repeticiones y a la naturaleza monoclonal de la mayoría de los tumores (Weber y Wong, 1993). En 1997 el Workshop internacional sobre fenotipos mutadores e inestabilidad de microsatélites en detección del cáncer y predisposición familiar propuso un panel de cinco marcadores de microsatélite. Se recomendaron dos repeticiones de mononucleótidos (BAT 25 y BAT 26) y tres marcadores con repetición de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250) (Boland y cols, 1998). El uso de los marcadores de dinucleótidos de este panel, también llamado panel Bethesda, conlleva dificultades técnica, necesidad de reamplificaciones, discrepancias entre los investigadores en la valoración de los marcadores dinucleótidos, y por otra parte, la interpretación de estos marcadores de dinucleótidos no puede nunca llevarse a cabo sin el estudio paralelo del ADN normal del paciente, ni siquiera para descartar los casos estables. Por ello nosotros hemos seleccionado un panel de cuatro marcadores mononucleótidos, dos localizados en ADN no codificante, BAT 26 y BAT 40, y dos localizados en genes codificantes relacionados con el control del crecimiento celular BAX y TGF $\beta$ RII.

El BAT 26 es una secuencia poly (A) localizada en el quinto intrón del gen hMSH2 (Liu y cols, 1994). Estudios previos han sugerido que el microsatélite Bat-26 puede ser el marcador de elección que sustituiría a un panel de marcadores poly(CA) (Hoang y cols, 1997; Cravo y cols, 1999). Ya que aporta una mayor y más específica correlación entre el estado de inestabilidad y las variables clínicas y patológicas como la edad de los pacientes, la localización del tumor y la producción de mucina extracelular. No observándose la presencia de falsos positivos. Debido a su carácter casi monomórfico, no presenta variaciones de tamaño alélico importantes salvo en tumores de la vía mutadora y en algunas líneas celulares (Jean-Marc Hoang y cols, 1997). Se consideran como inestables aquellos alelos con acortamientos entre 3 y 15 pb (Cravo y cols, 1999; Lacopetta y cols, 1999). En nuestro grupo de pacientes hemos encontrado que el tamaño de los alelos estables pertenece al rango 114-116pb, comprobándose su carácter casi monomórfico y en ninguno de los casos inestables encontramos solapamiento con los rangos normales. Wade y cols, 1999 encontraron un 0.08% (1 paciente-hispano- de los 1235 estudiados) de casos, sobre población americana caucásica, que sí presentaron solapamiento entre los valores de los alelos normales patológicos, este hallazgo es debido posiblemente al mayor número de casos estudiados. La presencia de casos heterocigotos en nuestro grupo es de un 2%, porcentaje similar al encontrado por

Schneider y cols, 2000, para población caucásica, aunque en ninguno de los casos hubo solapamiento con los valores de los alelos inestables (tabla 11). Gracias a este comportamiento una vez definidos los rangos normales, en nuestra población y con nuestro sistema de análisis, la utilización de tejido normal (salvo en la comprobación de los casos en los rangos de inestabilidad), con lo que se reduciría el volumen de trabajo. Con este marcador se realizó un análisis rápido y sin dudas en la interpretación. Además de su carácter casi monomórfico, hemos podido comprobar que para su análisis no es necesaria la utilización de muestra microdisectada, en todos los casos hemos apreciado la aparición del alelo alterado independientemente de la presencia del alelo salvaje. Este hecho refleja la alta reproducibilidad (100%) de este marcador en las diferentes regiones de una misma pieza tumoral tal como describe el trabajo de Samowitz y Slattery, 1999. Por otro lado como hemos podido comprobar en el caso del CO-A, la utilización del BAT 26 en el análisis de muestras posteriores a la extracción del carcinoma, puede ser de gran importancia, ya que en una muestra de tejido anatomopatológicamente informado como normal detectamos la presencia de inestabilidad (Figura 39), lo que puede alertar al clínico sobre la reactivación de procesos cancerígenos en la mucosa, y la realización de un seguimiento más exhaustivo de la paciente.

También ha sido propuesta la utilización conjunta del microsatélite Bat 40 (Grady y cols, 1998) para la evaluación de la inestabilidad de pequeños tumores o de piezas microdisectadas donde no existe suficiente ADN para ser amplificado con grandes paneles de microsatélites. El microsatélite Bat 40 es una secuencia poly(A) localizado en intrones del gen 3- $\beta$ -hidroxiesteroide desoxigenasa (Parsons y cols, 1995). Este microsatélite presenta un polimorfismo mayor que el BAT 26 en ADN normal. En nuestro grupo hemos encontrado un 33% de heterocigotos, tasa inferior a la descrita por Zhou X y cols, 1997, que encuentran un 72% de heterocigosidad para un grupo similar al nuestro. En estos casos que presentaban heterocigosidad para el marcador se ha encontrado un solapamiento entre el tamaño de los alelos encontrados en tejido/linfocitos normales y los inestables (tabla 11), no es pues un marcador de elección para la realización de un cribaje rápido en el caso de que no dispongamos de muestra normal. Este marcador también fue informativo en todos los casos sin necesidad de microdisección, aunque en algunos casos las interpretaciones fueron menos claras que con el marcador BAT26 necesitándose reamplificaciones.

El receptor del gen transformante del crecimiento beta tipo 2 (TGF $\beta$ II) fue el primer gen tumoral en el que se demostró una vinculación a la ruta mutadora (Markowitz, 1995). Este gen posee un poly(A)<sub>10</sub>, está descrito que sufre mutaciones entre un 70-90% de los tumores de colon de la ruta mutadora, dependiendo del estudio (Akiyama, 1996; Parsons, 1995). En nuestro estudio aparece mutado en un 75% de los casos inestables. Aunque en un principio la microdissección no es esencial en la detección del alelo inestable (Figura 36, casos 123 y 132), este se aprecia más claramente tras amplificar DNA microdisectado (Figura 37). Estas mutaciones están ausentes en los tumores de las rutas supresoras. En la mayoría de los casos se produce inactivación de ambos alelos por la existencia de mutaciones que cambian el marco de lectura, produciéndose una proteína truncada que tienen como resultado la pérdida de función TGF- $\beta$ RII (Akiyama, 1996). A la superfamilia de TGF- $\beta$ RII pertenecen proteínas con distintas funciones biológicas, entre ellas el control del crecimiento y la diferenciación celular, la morfología embrionaria y la inmunidad. Cuando los defectos somáticos en los genes reparadores del ADN afectan al gen TGF- $\beta$ RII provocando una mutación de cambio de lectura y por lo tanto la formación de una proteína truncada, la inhibición sobre el crecimiento de las células epiteliales se pierde permitiendo la progresión celular hacia la formación de neoplasias (Yoshimitsu y cols, 1996).

El microsatélite Bax es una secuencia poly(G)<sub>8</sub> situada en el tercer exón codificante desde el codon 38 al 41 (ATG GGG GGG GAG) del gen BAX (Oltvai y cols, 1993), que sufre deleciones o inserciones de un nucleótido en la mitad de los cánceres de colon de la ruta mutadora (Rampino y cols, 1997), dato coincidente con nuestro estudio donde en el 50% de los casos inestables aparece mutado. La detección del alelo inestable salvo en el caso CO 119 (Figura 36) precisó la realización previa de microdissección, ver resultados en figura 38, donde apreciamos la aparición del alelo inestable en los casos CO 117, CO 123 y CO 132. El gen BAX pertenece a la familia de las proteínas Bcl-2 y juega un papel fundamental en la apoptosis (Reed, J(1997), Chao y Korsmeyer(1998)). Mantiene un equilibrio antagónico con el gen Bcl-2, este equilibrio regula la entrada de la célula en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (Oltvai y cols, 1993). El aumento de expresión de BAX induce apoptosis, así las mutaciones inactivadoras de este gen impiden la apoptosis. Esta inestabilidad ayuda a explicar la asociación negativa de los tumores de la ruta mutadora con mutaciones del gen supresor p53 (transactivador del BAX, al reconocer una señal de daño genómico). La

inactivación mutacional del gen BAX hace innecesaria la mutación del gen p53, puesto que la cadena de eventos moleculares que conduce a la apoptosis está rota en un eslabón inferior (Rampino y cols, 1997).

Existen diversas opiniones sobre el papel que juegan las mutaciones tanto en TGF $\beta$ -RII como en Bax. Ambas han sido relacionadas con el proceso de transición de adenomas a carcinomas invasivos, (Grady et al, 1998; Yagi y cols, 1998), otro estudio relaciona la aparición de mutaciones en TGF $\beta$ -RII en estadios precoces (Akiyama y cols, 1997). Iino y cols (2000) describen que ambas mutaciones no siguen procesos secuenciales sino que aparecen simultáneamente en adenomas que muestran alto grado de inestabilidad (inestabilidad en más de dos marcadores de microsatélites) y de displasia. Así aunque los pacientes con HNPCC tienen la misma posibilidad que las personas sanas de desarrollar un adenoma, estos cuando aparecen tienen una mayor propensión a malignizarse (adenoma agresivo) (Ahlquist, 1995).

El análisis de las mutaciones de los genes reparadores permite la detección de portadores con un alto riesgo de sufrir cáncer colorrectal, lo que es de gran importancia para el control médico de los pacientes y de sus familiares. El análisis de mutaciones es una tarea laboriosa con elevado coste económico y personal, además el número de casos de HNPCC con relación al número de casos de cánceres colorrectales total no es muy elevado por lo que es necesario la realización de un cribaje sencillo sin muchos costes, pero con elevada efectividad. Por todo esto existe un gran interés en la detección de parámetros predictivos y orientativos sobre la existencia de mutaciones en los pacientes de cánceres colorrectales. Este cribaje se veía hasta ahora muy reducido por los estrictos criterios de inclusión, que en muchos casos son imposibles de cumplimentar debido a la dificultad o imposibilidad de obtener una historia familiar completa, y por el coste y las dificultades técnicas que supone la utilización de paneles con un número elevado de marcadores, o el estudio de las mutaciones. Nuestros resultados indican que la utilización del marcador BAT-26 como marcador de cribaje en primera instancia tiene la sensibilidad necesaria para detectar tanto casos familiares como esporádicos, hecho apoyado por trabajos como el de Loukola y cols, 2001. El estudio estadístico nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo de tumores con inestabilidad y el resto cuando consideramos los parámetros clínicos, localización derecha y menor grado de diferenciación. En el caso de la edad, sin previa discriminación entre supuestos casos

familiares y esporádicos no encontramos diferencia significativa, tal como describe Alexander y cols, 2001. Separando los casos con criterios de ser considerados esporádicos como mayor edad de aparición y menor grado de diferenciación (Jass y Cols, 1998; Young y cols, 2001) la diferencia por edades de aparición sí que adquiere significación estadística. Así una vez clasificado el tumor como inestable, mediante el cribaje con el marcador BAT 26, la consulta de las características clínicas nos orientará hacia la clasificación como esporádico o familiar, hecho que se ha sugerido significativo a la hora de la búsqueda de las mutaciones germinales, ya que en los tumores esporádicos normalmente existe una silenciación transcripcional del promotor del gen hMLH1 por metilación (Cunningham y cols, 1998; Herman y cols, 1998). Así la utilización de criterios clínicos como los de Amsterdam, la edad de aparición, la prevalencia de cáncer endometrial, bien de manera independiente o conjunta para la detección de los casos que pasarían a un estudio de la mutación del gen reparador se ha comprobado que presenta una menor sensibilidad y selectividad que la utilización de marcadores de microsatélites ((Liu T y cols, 2000). Este hecho se ve apoyado por el reciente estudio realizado por Loukola y cols, 2001 en el que detecta el 97% de los casos con alta inestabilidad y el 100% de los casos con mutaciones en MLH1/MSH2 utilizando el marcador BAT 26. Ya que en la mayoría de las familias con HNPCC las mutaciones se presentan en estos dos genes reparadores, siendo muy pocas las mutaciones descritas en los otros tres genes PMS1, PMS2 y MSH6. El conocimiento de la mutación familiar nos permitirá la detección de los familiares de riesgo a los que se les someterá a un control más exhaustivo, ya que está demostrado que la extirpación de adenomas y carcinomas en estadios precoces mejora considerablemente la esperanza de vida (Järvinen y cols, 2000).

Por otra parte la identificación de tumores colorrectales con el fenotipo de inestabilidad puede tener implicaciones tanto en el pronóstico como en el tratamiento de pacientes y familiares de riesgo de los mismos. Tendencias quirúrgicas que recomiendan la colectomía segmental frente a la total como cirugía primaria en pacientes con HNPCC, requieren del diagnóstico preciso del subtipo molecular del paciente con cáncer colorrectal (Rodríguez-Bigas y cols, 1997). Además recientemente un trabajo publicado por Zhang y cols muestra el papel del gen BAX en la apoptosis inducida por drogas, usadas en el tratamiento habitual de los cánceres de colon, en líneas celulares colorrectales humanas. En este trabajo se observa que la ausencia de Bax anula la



respuesta a agentes quimiopreventivos (antiinflamatorios no esteroideos como el Sunlindac) utilizados en el tratamiento de pacientes con predisposición a sufrir cánceres colorrectales. Actualmente la quimio-prevención parece ser la mejor opción para el tratamiento no quirúrgico de estos paciente con riesgo, siendo la forma más común de dicha predisposición la HNPCC. Así que le estudio del gen BAX (incluido en nuestro panel de marcadores) tiene implicaciones clínicas en relación con la resistencia al tratamiento que su ausencia provoca en células epiteliales humanas. Otros estudios como los de Fink y cols en 1999 y los de Crethers y cols en el 2000, muestran la resistencia de líneas colorrectales con presencia de mutaciones en el sistema de reparación del ADN al tratamiento con distintos agentes quimioterapéuticos, una detección indirecta y rápida de dichas mutaciones es el análisis de inestabilidad de microsatélites.

Existen pues distintas razones por las que es necesaria la clasificación de un carcinoma de colon como perteneciente a la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites:

- el síndrome HNPCC es el síndrome colorrectal hereditario más común, los pacientes se ven altamente beneficiados frente a un diagnóstico precoz, ya que las muertes se ven claramente reducidas por el hecho de eliminación temprana de adenomas y carcinomas en estadios precoces.
- oportunidad de descubrir síndromes hereditarios con probabilidad de desarrollar carcinomas colorrectales que hasta ahora habían sido obviados por los estrictos criterios clínicos.
- posibilidad de predecir el pronóstico
- influencia potencial en la terapia.

## CONCLUSIONES

1. El estudio del quimerismo mediante microsatélites permite un análisis fiable y preciso del curso del trasplante. Si bien, por la sensibilidad de la técnica, el estudio del quimerismo en sangre periférica total, aunque se relaciona significativamente con la incidencia de recaídas, no es sustituto de los métodos de estudio de enfermedad mínima residual, su utilidad puede circunscribirse al estudio del proceso de injerto, de la predicción de recaídas y de enfermedad mínima residual cuando no sean aplicables ni el estudio de RT-PCR ni el inmunofenotipaje.
2. El establecimiento de la quimera en subpoblaciones no sólo aumenta la sensibilidad de la técnica, sino que permite también, discriminar entre fallo de implante y recaída leucémica y por tanto adoptar precozmente estrategias terapéuticas.
3. Una baja complejidad en la región CDR3 se asocia a una severa inmunodeficiencia y la aparición de infecciones oportunistas sobre todo en trasplantes previamente manipulados. Por este motivo, el estudio del quimerismo debería complementarse con el estudio de la diversidad T.
4. Hemos encontrado que la expansión de células con trisomía 12 en un paciente con LLC-B se asoció a linfocitosis progresiva y pérdida de efecto antileucémico tras supresión de quimioterapia inmunosupresora. Esta fracción de células puede no permanecer estable como se había sugerido en el transcurso de la LLC-B y por el contrario reflejar una clona celular con un fenotipo más agresivo.
5. El microsatélite BAT 26 es el marcador de elección para la realización del cribaje clínico de pacientes con HNPPC debido a su elevada sensibilidad y carácter cuasi-monomórfico.

6. El estudio de inestabilidad de microsatélites junto con la edad de aparición de cáncer colorrectal permiten clasificar a las familias susceptibles de padecer HNPCC y por lo tanto de incluirse en un estudio genético. Diferenciándolas de los casos de cáncer colorrectal con fenotipo MIN y del resto de tumores de la vía supresora, tanto esporádicos como familiares.
  
7. Los tumores con fenotipo MIN parecen presentar un perfil específico de mutaciones en genes implicados en la apoptosis y en el reconocimiento inmunológico. Estas mutaciones que se concentran en microsatélites de pequeño tamaño e infrecuentes, se seleccionan de forma homogénea, reflejando etapas en la historia natural del tumor que supusieron ventajas selectivas claves para su progresión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen *et al* (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, (Washington DC) **260**: 812-816.
- Abad, A. (2000) "Oncología Clínica y Molecular" Capítulo 29. 1ª Ed. Arán, España.
- Akiyama Y, Iwanaga R, Ishikawa T, Sakamoto K, nishi N, Nihei Z, Iwama T, Saithon K, Yuasa Y. (1996). Mutations of the transforming growth factor- $\beta$  type II receptor gene are strongly related to sporadic proximal colon carcinomas with microsatellite instability. *Cancer*, December 15, **78**:2478-2484.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994). "Molecular biology of the Cell" 3ª Ed. Garland Publishing, New York.
- Amiel A, Elis A, Sherker S, Gaber E, Manor Y, Fejgin MD. (2001). The influence of cytogenetic aberrations on gene replication in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet*. Mar; **125**(2):81-6.
- Anastasi J, Vardiman JW, Rudinsky JR, *et al*. (1991) Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridisation: An analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; **77**: 2456-2462.
- Armour JA, Jeffreys AJ. (1992). Biology and applications of human minisatellite loci. *Curr Opin Genet Dev*; **2**:850-856.
- Arthur CK, Apperley JF, Guo AP, Rassool F, Gao LM, Goldman JM. (1988) Cytogenetic events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemias in chronic phase. *Blood*; **71**:1179-1186.
- Atkinson K (1990) Reconstitution of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*; **5**: 209-226.

Bader P, Beck J, Schlegel PG, Handgretinger R, Niethammer D, Klingebiel T. (1997a). Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse?. *Bone Marrow Transplantation*; **20**:79-81.

Bader P, Hölle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J.(1997b). Mixed haematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant*; **19**: 697-702.

Bader P, Beck J, Frey A *et al.* (1998) Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*: **22**(1): 487-495.

Badros A, Balogie B, Siegel E, Cottler-Fox M, Zangari M, Fassas A, Morris C, Anaissie E, Van Rhee F, Tricot G.(2002) Improved outcome of allogeneic transplantation in high-risk multiple myeloma patients after non-myeloablative conditioning. *J Clin Oncol*; **20**(5): 1295-303.

Barbara Pertl, Susanne Kopp, Peter M.Kroisel, Martin Häusler, John Sherlock, Raimund Winter and Matteo Adinolfi. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex (1997). *Am J Obstet Gynecol*: 899-906.

Barta y cols. (2000). Immunological importance of chimerism in transplantation: new conditioning protocol in BMT and the development of chimeric state. *Human Immunology*; **61**: 101-110.

Bennet P. (2000) Demystified...Microsatellites. *Mol pathol*; **53**: 177-183.

Bensinger W, Storb R.(2001) Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol*. Jun; **5**(2): 67-86.

Bernell P, Arvidsson I, Jacobsson B, Hast R. (1996) Fluorescence *in situ* hybridisation in combination with morphology detects minimal residual disease in remission and heralds relapse in acute leukemia. *Br J Haematol*; **95**: 666-672.

Bertheas M, Lafage M, Levy P *et al.*(1991). Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood*; **78**: 3103-3106.

Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, Lo Coco f, Diverio D, Pogliani EM, Lanzi EM, Mandelli F, Masera G, Barbui t, Pellicci PG(1992). Molecular monitoring of the mly/retinoic acid receptor  $\alpha$  fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polimerase chain reaction. *Blood*; **80**:492-497.

Bodmer, W., Bishop, T., and Karran, P. (1994). Genetic steps in colorectal cancer. *Nature Genet.* **6**, 217-219

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

Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL.(1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*; **368**:455-457.

Breivik, J., *et al.* (1997). Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int.J. Cancer* **74**, 664-669.

Britten RJ, Kohne DE. (1968). Repeated sequences in DNA. Hundred of thousand of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*; **161**:529-540.

Broner *et al.* (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature (london)* **386**:258-261.



Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CGT) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*; **68**: 799-808.

Brookes AJ. (1999) The essence of SNPs. *Gene*; **8**: 177-186.

Carethers J, Dharam P, Chaunan D, Fink D, Nebel S, Robert S, Stephen B Boland R. (1999). Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*; **117**: 123-131.

Casarino L, Carbone C, Capucci MA, Izza T, Ferrera GB (1992). Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant*. **10**(2): 165-170.

Cawkell L, Bell SM, Lewis FA, Dixon MF, Taylor GR, Quirke P. (1993). Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br J of Cancer*; **67**: 1262-1267.

Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. (1998) Double identity for proteins of the Bcl-2 family *Annu Rev. Immunol*; **16**: 385-419.

Childs R, Clave E, Contentin N *et al.* (1999) Engraftment kinetic after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes allo immune responses. *Blood*; **94**: 3234-3241.

Chotia C, Boswell DR, Lesk AM (1998). The outline structure of the T cell receptor  $\alpha\beta$  receptor. *EMBO J*; **7**: 3745-3749

Collins C, Norris S, McEntee G, Traynor O, Bruno L, von Boehmer H, Hegarty J, O'Farrelly C. (1996) RAG1, RAG2, and pre-T cell receptor  $\alpha$  chain expression by adult human hepatic T cell: evidence for extrathymic T cell maturation. *Eur J Immunol* **26**: 3114-3124.

Cooper DN, Krawczak M. (1999) Human Gene Mutation. *New York Academic Press*.

Craig JIO, Turner ML, Parker AC. Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Reviews*; **6**: 59-67.

Cravo M. Et al.(1999) Bat-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J. Pathol.***188**:252-257.

Cunningham J, Ghristensen E, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN (1998). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* **58**:3455-3460.

Cutler C, Giri S, Jeyapalans S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH.(2001) Acute and chronic graft-versus-host-disease after allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation: a meta analysis. *J Clin Oncol.* Aug 15; **19(16)**:3685-91.

David B, Bernard D, Navenot JM, Muller JY, Blanchard D (1999). Flow cytometric monitoring of red blood cell chimerism after bone marrow transplantation. *Transfus Med*; **9(3)**:209-17.

Dawkins, R.(1989) "The selfish Gene", 2ª Ed. Oxford University Press, London.

Deininger PL, Batzer MA.(1999). Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab.* Jul; **67(3)**:183-93.

Dewald G *et al* (1998) A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y- chromosome probes. *Am J Genet*; **76**: 318-326.

Diez-Martín JL, Llamas P, Gosalvez J, López-Fernandez C, Polo N, de la Fuente MS, Buno I.(1998).Conventional cytogenetics and FISH evaluation of chimerism after sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) and donor leukocyte infusion(DLI). *Haematologica*; **83(5)**: 408-415.

Dunlop M.(1992). Screening for large bowel neoplasms in individuals with a family history of colorectal cancer.*Br J Surg.* **79**,488

Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*; **49**: 746-756.

Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N, Opalka B, Trenschele R, Seeber S, Schaefer UW. (2001). A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase. *Bone Marrow Transplantation*; **27**: 809-815.

Eshleman JR, Markowitz SD,. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Curr Opin Oncol*, **7**:83-89.

Exner BG, Domenick MA, Bergheim M, Mueller YM, Ildstad ST.(1999). Clinical applications of mixed chimerism. *Ann N Y Acad Sci*, **872**:377-85.

Fink D, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Kin HK, Haas M, Howell SB (1998). The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells. *British journal of Cancer*, **77**: 703-708.

Finnegan, D.J. (1985). Trasposable elements in eukaryotes. *Int Rev Cytol.* **93**, 281-326.

Fishel,R., Lescoe, M., Rao,M., Copeland, N., Jenkins,N., Garber, J., Kane ,M., Kolodner,R. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, **75**: 1027-1038.

Fishel,R. And Kolodner,R.D. (1995).Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**:383-395

Fleming ID, Cooper JS, Henson DE y cols. (1997) AJCC cancer staging manual. 5ch ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins:83-90.

Formánková R, honzátková L, Sieglová Z, Starý J, Sedláček P, Brdicka R.(2000). Detailed monitoring of haematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*; **25**: 453-456.

Frederick R.Appelbaum. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy (2001) *Nature*; vol 411 17 MAY: 385-389.

Fregeau & Fourney. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. (1993) *Biotechniques*. Jul;**15(1)**:100-19.

Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, Kanamori H, Ishigatsubo Y. (2001) *Bone Marrow Transplantation*; **27**: 1275-1281.

García-Marco J, Price CM, Ellis J, Morey M, Matutes E, Lens D, Colman S, Catovsky D. Correlation of trisomy 12 with proliferating cells by combined immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridisation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10:1705-11.

Gemke R, Kanhai H, Overbeeke M, et al. ABO and Rhesus phenotyping of fetal erythrocytes in the first trimester of pregnancy (1986) *Br J Haematol*; **64**:689-697.

Gorski J, Yassai M, Zhu X, et al (1994). Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping: correlation with immune status. *J Immunol*, **152**:5109-5119.

Grady W, Rajput A, Myeroff L, Liu D, Kwon K, Willis J, Marckowitz S.(1998). Mutation of the type II transforming growth factor- $\beta$  receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. (1998). *Cancer Research* **58**; 3101-3104.

Grimwade *et al.* (1997). Characterization of cryptic rearrangements and variant translocation in acute promyelocytic leukemia. *Blood*; **90**: 4876-4885

Henke J, Fimmers R, Baur MP, *et al.* (1993). DNA minisatellite mutations- recent investigations concerning distributions and impact on parentage testing. *Int J Legal Med*; **105**: 217-222.

Herman J *et al.* (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci Usa*; **95**: 6870-6875.

Hess AD, Thoburn CJ.(1997). Immunobiology and immunotherapeutic implications of syngeneic 7autologous graft-versus-host disease. *Immunol Rev. Jun*; **157**: 111-23.

Hill RS, Petersen FB, Storb *et al.* Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*; **67**: 811-816.

Hjalmar V, Hast R, Kimby E. Sequential fluorescence in situ hybridation analyses for trisomy 12 in chronic leukemic B-cell disorders (2001). *Haematologica*; **86**: 174-80.

Hoang,J., Cottu, P., Thuille, B., Salmon, R., Thomas, G., Hamelin, R. (1997). Bat-26, as indicator of replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer research*; **57**: 300-303.

Hohoff C y Brinkmann B.(1999). Human identity testing with PCR-based systems. *Mol Biotechnol*; **13**: 123-126.

Horowitz M *et al.* (1990). Graft-Versus-Leukemia Reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, **75**: 555-562.

Hows JM.(2001) status of umbilical cord blood transplantation in the year 2001. *J Clin Pathol. Jun*; **54 (6)**: 428-34.

Iacopeta B, Soong R, House A, Hamelin R.(1999) Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF- $\beta$  type II receptor, IGFII receptor, and bax genes. *J Pathol*; **187**: 428-432.

Ionov, Y., Peinado, M., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*; **363**: 558-561.

Järvinen H, Aarnio M, Mustoen H, Aktan-Collan K, Aaltonen L, Peltomäki P, de la Chapelle A, Mecklin J-P.(2000). Controlled 15-years trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, **118**: 829-834.

Jass J, Do K, Simms L, Iino H, Wynter C, Pillay S, Searle J, Radford-Smith G, Young J and Leggett B (1998). Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut*, **42**: 673-679.

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

Kimpton CP, Gill P, Walton a, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci.PCR. (1993) *Methods Appl. Aug*; **3(1)**:13-22.

Klein, G. (1998). Adv. BCL-2 family: regulators of cell death. *Cancer Res.* **72**, 1-23.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al.(1995). Graft-versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patient. *Blood*; **86**: 2041-2050.

Kolb HJ, Poetscher C.(1997) Late effects after allogeneic bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol*; **4**: 401-407.

Korbling M, Fliedner TM.(1994) History of blood stem cell transplantats. Blood stem transplants. En : Gale RP, Juttner CA, Henon P (eds.) Peripheral Blood Stem cell Autografts. Cambridge University Press, New York; pág.:9-13.

Koski T, Karhu R, Visakorpi T, Vilpo L, Knuutila S, Vilpo J. (2000). Complex chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia are associated with cellular drug and irradiation resistance. *Eur J Harmatol* Jul; **65**(1): 32-39.

Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Rish N. (1993). An association between the risk of cancer and mutations in the hras 1 minisatellite locus. *N Engl J Med*; **329**: 517-523.

Lander ES, Schork NJ. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science*,**265**: 2037-2048.

Laughlin MJ.(2001) Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplantation*;**27**: 1-6.

Lawley, P.D. (1994). From fluorescence spectra to mutational spectra, a historical overview of DNA-reactive compounds. *IARC Sci Publ.* 1994;(125):3-22. Review.

Leach, F *et al.* (1993). Mutation of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*,**75**:1215-1225.

Lee MS, Chang KS, Friederich EJ, *et al.* (1988) Detection of minimal residual *bcr/abl* transcripts by a modified polymerase chain reaction. *Blood*;**72**:893-897.

Levine, A., Wu, M., Chang, A., silver, A., Attiyeh, E., Lin, J., and Eipstein, C.(1995) *Ann. N.Y.Acad. Sci.* **768**,111-128.

Liu, B., Parson, R., Hamilton, S., Petersen, G., Lynch, H., watson, P., Markovitz, S., Wilson, J., Green,J., de la Chapelle, A., Kinzler, K., and Volgestein, B. (1994). hMSH2

mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res.*, **54**: 4590-4594.

Liu B, Nicolaides N, et al.(1995)Mismatch repair genes defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*;**9**: 48-55.

Liu T, Wahlberg S, Burek E, Lindblom P, Rubio C, Lindblom E (2000). Microsatellite instability as a predictor of a mutation in DNA mismatch repair gene in familial colorectal cancer. *Genes, chromosomes and Cancer*; **27**: 17-25.

Lothe R, et al .(1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res.*, **53**:5849-5852.

Luhm RA, Bellissimo DB, Uzgiris AJ, Drobyski WR, Hessner MJ.(2000) Quantitative evaluation of post-bone marrow transplant engraftment status using fluorescent-labeled variable number of tandem repeats. *Mol Diagn*; **5(2)**:129-38.

Lum LG. (1987). The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood*; **69**: 369-380.

Lundqvist C, Baranov V, Hammarstrom S, Athlin L, Hammarstrom M. (1995). Intra epithelial lymphocytes, evidence for regional specialisation and extrathymic maturation in the human gut epithelium. *Int Immunol*; **7**: 1473-1479.

Lynch, H.T. et al. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An update review. *Gastroenterology* **104**, 1535-1549.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J.(1997). An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet*;**93**: 84-89.

Mackall CL, Feisher TA, Brown MR, et al. (1995) Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*;**332**: 143-149.



Mackall CL, Bare CV, Granger La, Sharrow SO.(1996) Thymic independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cell resulting in a repertoire that is limited and prone to skewing. *J Immunol* **156**: 4609-4619.

Mackall CL, Hakin FT, Gress RE. (1997). T cell regeneration: All repertoires are not created equal. *Immunol Today* **18**: 245-248.

Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly RJ. (1994). Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell quimerismafter bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*; **83**: 3409-3416.

Margolis J., Vogelsang G.(2000). Chronic graft-versus-host disease. *J Hematother & Stem Cell Res*; **9**: 339-346.

Maris M, Sandmaier BM, Maloney DG, McSweeney PA, Woolfrey A, Chauncey T, Shizuru T, Niederweiser D, Blumek G, Forman S, Strob R. (2001). Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Clin Biol*. Jun; **8(3)**: 231-4.

MarkowitzS. Wang J. Myeroff L. Parsons R. Sun L. Lutterbaugh J. Fan RS. Zborowska E. Kinzler KW. Vogelstein B. et al (1995). Inactivation of the type II TGF- $\beta$  Receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, **268**, 1336-1338.

Martín-Henao GA, Picón M, Amill B, Querol S, Ferrá C, Grañena A, García J. (2001). Combined positive and negative cell selection from allogeneic peripheral blood progenitor cells(PBPC) by use of immunomagnetic methods. *Bone Marrow Transplantation*: **27**, 683-687.

Mattson J, Uzuel M, Remberger M, Ljungman P, Kimby E, Ringdén O, Zetterquist H. (2000) Minimal Residual Disease is common after allogeneic stem cell transplantation in patients with B chronic lymphocytic leukaemia and may be controlled by graft-versus-host disease. *Leukemia*; **14**: 247-254.

Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O.(2001) T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*; **71(3)**:433-439.

Meera Khan P, Wijnen JT, Hagenbeek A, Vossen JM. Isoenzymes as host-donor blood cell "tracers" in bone marrow transplantation. (1987). Isoenzymes: *Current topics in biological and medical research*, vol 16. New York: Alan R Liss;125-144.

Millson AS, Spangler FL, Wittwer CT, Lyon E.(2000)comparison of automated short tandem repeat and manual variable number of tandem repeat analysis of chimerism in bone marrow transplant patients. *Diag Mol Pathol*; **9(2)**:91-7.

Murnane, J.P. (1995). Cell cycle regulation in response to DNA damage in mammalian cells: a historical perspective (1995). *Cancer Metastasis Rev.* Mar; **14(1)**:17-29. Review

Muta H, Noguchi M, Perucho M, Ushio K, sugihara K, Ochiai a, Nawata H, Hirohashi S.(1996) Clinical implications of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer.* Jan; **77(2)**: 265-270.

Nicolaides et al (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, (Lond.) **371**:75-80.

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. (1992). A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science*; **285**: 67-86

Nowell PC, Hungeford DA.(1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemias. *Science*; **14**:97

ONT (Organización Nacional de Trasplantes). (2000). Actividad de donación y trasplante de progenitores hematopoyéticos. Actividad del REDMO España.

ONT (Organización Nacional de Trasplantes). (2001). Actividad de donación y trasplante de progenitores hematopoyéticos. Actividad del REDMO España. Datos preliminares.

Oltvai, Z, Milliman, S., Korsmeyer, J., (1993). *Cell*, **74**:609-619

Palka G, Stuppia L, Di Bartolomeo P, Morizio E, Peila R, Franchi PG, Calabrese G (1996). Fish detection of mixed chimerism in 33 patients submitted to bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*; **17(2)**:231-236.

Pallavicini MG, Langlois RG, Reitsma M, Gonzalvo M, sudar D, Montoya T, Weier HU, Haendel S (1992). Comparison of strategies to detect and quantitate uniquely marked cells in intra- and inter-species hemopoietic chimeras. *Cytometry*; **13(4)**: 356-67.

Papadopoulos, N *et al* (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*(Washington DC) **263**: 1625-1629.

Parsons, R. *Et al.* (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* **75**, 1227-1236.

Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, *et al.* (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*; **55**: 5548-50.

Pawelec G (1995) Molecular and cell biological studies of ageing and their application to considerations of T lymphocyte immunosenescence. *Mech Ageing Dev* **79**:1-8

Peltomäki, P *et al* (1993). Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* **260**: 810-812.

Petz LD, Yam P, Wallace RB, *et al.* Mixed haematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for haematological malignancies. *Blood*; **87**:818-826.

Przepiorka D, Anderlini P, Saliba R, Cleary K, Mehra R, Khouri I, Huh Y, Giralt S, Braunschweig I, van Beisen K, Champlin R. (2001). Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood*, **98(6)**: 1695-1700.

- Pschera H.(2000). Stem cell therapy in utero. *J. Perin Med.***28(5)**:346-54.
- Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J & Perucho M. (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, **275**,967-969.
- Reed, J.C. (1997) Foulds' dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later. *Nature (London)* **387**: 773-776.
- Richards RI, Sutherland GR. (1994). Simple repeat DNA is not replicated simply. *J Pathol*; **176**: 11-18.
- Ringden O, Nilsson B. (1985). Death by graft-versus-host disease associated with HLA mismatch, high recipient age, low marrow cell dose, and splenectomy. *Transplantation*; **40**:39-44.
- Robers AB, Sporn MB. (1990) The transforming growth factor- $\beta$ s. Sporn MB, robers AB, editors. *Growth factors and their receptors*. Volume 1. Berlin: Springer-Verlag: 419-472.
- Rodriguez-Bigas MA *et al* (1997) Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International collaborative group of HNPCC. *Ann Surg*; **225**: 202-207.
- Rondon G, Giralt S, Huh Y, Khouri I, Andersson B, Andreef M, Champlin R. (1996) Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. Sep; **18(3)**: 669-72
- Roth Ms, Antin JH, Ash R *et al* (1992). Prognosis significance of Philadelphia chromosome-positive cell detected by the polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transpplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood*; **79**: 276-282.

Roux e, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. (1996) Analysis of T cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood*; **87**:3984-3992.

Samowitz WS, Slattery ML. (1999).Regional reproducibility of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*; **26(2)**:106-14.

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML.(2001) Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; **10** (9): 917-23.

Sanchez, Y., and Elledge, S.J. (1995). Stopped for repairs. *Bioessay* 17, 545-548

SantosGW. (1983). History of bone marrow transplantation. *Clin Hematol*; **12**:611-639.

Scheider B, Bravo J, Roa J, Roa I, Kim M, Lee K, Plaisance K, McBride C, Mera R.(2000). Microsatellite instability, prognosis and metastasis in gastric cancers from a low-risk population. *Int. J. Cancer*, **89**: 444-452.

Schouten HC, Sizoo W, van Veer MB, Hagenbeek A, Lowenberg B. Incomplete chimerism in erythroid, myeloid and B lymphocyte lineage after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. (1988) *Bone Marrow Transplnt*; **3**:407-412.

Shackney, S.E., and Shankey, T.V. (1997). Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* 29, 1-27. Sep 1;29(1):1-27. Review.

Shriver MD, in L, Chakraborty R, Boerwinkle E.(1993). VNTR allele frequency distributions under the step-wise mutation model: a computer simulation approach. *Genetics*; **134**: 983-993.

Sievers EL, Lange BJ, Buckley JD, *et al.* (1996). Prediction of relapse of pediatric acute myeloid leukaemia by use of multidimensional flow cytometry. *J Natl Cancer Inst*; **88**: 1483-1488.

Simnett SJ, Steward LA, Sweetenham J, Morgan G, Johnson PW. (2000) Autologous stem cell transplantation for malignancy: a systematic review of the literature. *Clin Lab Haematol. Apr*; **22** (2): 61-72.

Silber JL, Goldberg J. (1993). Infectious complications of bone marrow transplantation. *N J Med. Apr*, **90**(4): 303-306.

Singer MF (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol*; **76**: 67-112.

Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F *et al.* (1999) Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*; **3**: 467-480.

Smith A., Martin P. (1999) Analysis of amplified variable number tandem repeat loci for evaluation of engraftment after haematopoietic stem cell transplantation. *Reviews in immunogenetics*; **2**: 255-265.

Spakers MC, Crist ML, Spakers RS, Gale RP, Feig SA. The UCLA transplantation group. Gene markers in Human bone marrow transplantation (1977). *Vox Sang*; **33**: 202-205.

Storek J, Witherspoon RP, Storb R. (1995). T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* ; **16**: 413-417.

Stringer CB, Andrews P. (1998). Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science*; **239**: 1263-1268.

Sullivan KM, Deeg HJ, Sanders JE, *et al.* (1985). Late complications after marrow transplantation. *Semin Hematol*; **21**: 53-63.

Sullivan KM, Storb R, Buckner CD et al. (1989). Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. *New Engl J Med*; **320**: 828-834.

Tauz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleid Acid Res*; **17**: 6436-6471.

Terdiman J, Gum J, Conrad P, Miller G, Weinberg V, Crawley s, Levin T, Reeves C, Schmitt A, Hepburn M, Sleisenger M, Kim Y. (2001). Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumour microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology*; **120**: 21-30.

Thiede C et al (2001) Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* **15**: 293-302.

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemoteraphy (1957).*N.engl J Med*; **257**: 491-496.

Tyler Smith C, willard HF.(1993). Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev*; **3**: 390-397.

Urquhart A, Oldroyd NJ, Kimpton CP, Gill P. Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. (1995). *Biotechniques*. Jan;**18(1)**:116-8.

Vasen HFA, Mecklin Jp, Kahn PM, Lynch HT. (1991). Hereditary non-polyposis colorectal cancer (1991). *Lancet*; **338**: 877-881.

Verfuerth S, Peggs K, Vyas P, Barnett L, O'Reilly R, Mackinnon S(2000) Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. *Blood*; **12**: 3990-3995.

- Villers D, Milpied N, Gaschet J, Davodeau F, Hallet M, Boneville M, Vié H.(1994) Alteration of the T cell repertoire after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*; **13**: 19-26.
- Volgestein, B., Fearon ER, Kern SE, et al. Allelotype of colorectal carcinomas (1989). *Science*; **244**: 207-211.
- Vogelstein B & Kinzler KW.(1993)The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* Apr; **9(4)**:138-41. Review.
- Walters MC, Patience M, Leisenring W, et al. (1996). Bone marrow transplantation for sickle cell disease. *N. Engl. J.Med.***335**: 369-376.
- Warthin, A.S.(1913) Hereditary with reference to carcinoma: As shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, *Arch. Intern. Med*; **12**:546-555.
- Wäsch, R et al. (2000) Rapid achievement of complete donor chimerism and low regimen-related toxicity after reduced conditioning with fludarabine, carmustine, melphalan and allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplantation*; **26**: 243-250.
- Weber JL, Wong C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Mol Genet*; **2**:1123-1128.
- Weissenbach J, Gyapay , Dib C, et al.(1992). A second generation linkage map of the human genome. *Nature*; **359**: 794-801.
- Wilborn F, Schmidt CA, Siegert W (1993). Demonstration of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation by polymerase chain reaction of Y-chromosome-specific nucleotide sequences characterization of a new technical approach. *Leukemia*; **7(1)**: 140-3.



Wilson RK, Lai E, Concannon P, Barth RK, Hood LE.(1988). Organization, structure and polymorphism of murine and human T cell receptor  $\alpha\gamma$   $\beta$  chain gene families. *Immunol Rev*; **101**: 149-152.

Wu C, Chillerni A, Alyea E, Orsini E,Neuberg D, Soiffer R, Ritz J. (2000). Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood*; **95(1)**: 352-359.

Yam Py, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, stock AD, de Lange G, Brown VA, Donis-Keller H, Blume KG.(1987)Use of DNA restriction fragment length polymorphism to document marrow engraftment and mixed haematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation*; **43(3)**: 399-407.

Yamamoto, H., Sawai, H. & Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Research*; **57**: 4420-4426.

Young et al. (2001) Features of colorrectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings. *American Journal of Pathology*; **159**:2107-2116.

Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al.(1991) Fragile X genotype characterised by an unstable region of DNA. *Science*; **252**: 1179-1181.

Zahn L, Yu J, Park B, Kinzler K, Vogelstein B. (2000).Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*; **290**: 989-992.

Zhou X, Hoang J, cottu P, Thomas G, Hamelin R (1997). Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorrectal tumors with and without replication errors. *Oncogene*; **15**:1713-1718.

Ziegle JS, Su Y, Corcoran KP, et al.(1992). Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*; **2**: 273-279.

**GLOSARIO**

AM: Aplasia medular  
ATG: Globulina antitímocítica  
CsA: Ciclosporina A  
EICHa: Enfermedad de injerto contra huésped aguda  
EICHc: Enfermedad de injerto contra huésped crónica  
G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas  
HLA: antígenos leucocitarios humanos  
HNPCC: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico  
LAL: Leucemia aguda linfoblástica  
LAM: Leucemia aguda mieloide  
LLC-B: Leucemia linfocítica crónica, estirpe celular B  
LMC: Leucemia Mieloide Crónica  
LNH: Linfoma no-Hodgkin  
MTX: Metotrexato  
PH: Progenitores Hematopoyéticos  
PRD: Prednisona  
PSP: Progenitores de sangre periférica  
RFLP: Fragmentos de restricción polimórficos en longitud  
SMD: Síndrome mielodisplásico  
TNM : Gradación de tumoraciones colorrectales, Tumor-Nódulo-Metástasis  
TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.