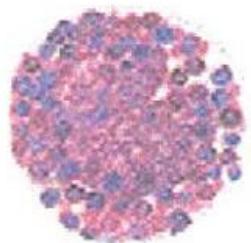
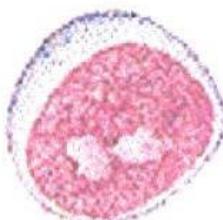


**ESTUDIO DEL QUIMERISMO Y DE LA
ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL POR
TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y DE FISH EN**



**PACIENTES AFECTOS DE
ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS SOMETIDOS A
UN
TRASPLANTE DE PROGENITORES
HEMOPOYÉTICOS**



FE DE ERRATAS

INTRODUCCIÓN

1) Página 151 tabla 1.10

- La fusión génica producida por la t(12;21) en adultos ha sido descrita en menos del **5%** de los casos, no en el 25-30? .

- Los puntos de rotura de la t(17;19) son (q22;**p13.3**) no (q22;**q13**).

- La fusión génica resultante de la t(11;14) es RHOMB2-TCR .

2) Página 25 el autor citado Haas 1992, es **Hann**.

RESULTADOS

1) En la pág 107 tabla 3.6 el caso 12 en la columna de TQ debería poner QM no QC.

2) En la pág 117 tabla 3.10 en la fila después del TPH en el apartado de fallo de implante en la columna de QM hay un 1 (10.0%) que corresponde ha fallecidos por otras complicaciones; y por lo tanto en el texto de la pág 116 y en la conclusión 5 pág 184 se ha de corregir la incidencia de fallo de implante en pacientes con QM de un **10%** a un **0%** y la incidencia de riesgo de muerte por causas relacionadas con el TPH de **0% a 10%**

3) El cariotipo del caso 3 descrito como der(1)t(1;?)(q25;?) en la pág 118 tabla 3.11 y pág 126 tabla 3.17, es más correcto según la ISCN describirlo como **add(1)(q25)**.

4) En el cariotipo del caso 9 en la recaída presenta una t(5;12) no una t(2;5) como se describe en la pág 137 tabla 3.21, además falta añadir un der(11)del(11)(q21) en la pág 125 figura 3.3 en la pág 126 tabla 3.17 y en la pág 137 tabla 3.21.

5) El cariotipo del caso 14 en recaída presenta una del(5) cuyos puntos de rotura son (**q12q33**) no (q?) como se describe en la pág 137 tabla 3.21

6) El cariotipo del caso 26 descrito como 48,XY,+t(1;16)(q11;q13).... debe corregirse como 48,XY,+**der(16)**t(1;16)(q11;q13).... ya que es una translocación desequilibrada, en la pág 120 tabla 3.14, en texto de la pág 133, en la pág 136 figura 3.7, en la pág 137 tabla 3.21 y en el texto de la pág 150. Tanto en la pág 135 tabla 3.20, como en la pág 137 tabla 3.21 además se ha de eliminar un q10 en el i(13) colocarlo delante de la del(14), y sustituir der(16)... por **add(16) (p12)**. Y en la pag 137 tabla 3.21 eliminar +del(14)(q22) en el cariotipo al diagnóstico y añadir 48,XY.....

7) El cariotipo del caso 33 está descrito como una translocación desequilibrada cuando es equilibrada, se ha de describir como t(3;6)(p21;q23) y eliminar el der(6), en la pág 119 tabla 3.12, en el texto en la pág 127 y en la pág 129 tabla 3.18. En la pág 137 tabla 3.21 presenta una del(6) que es no es correcta.

8) El cariotipo del caso 37 en la recaída presenta una t(3;4)(**p21**;q34) no (**q21**;q34) como se describe en el texto de la pág 127

9) En el seguimiento por citogenética del caso 40 de la pág 129 tabla 3.18 todos los controles son **46,XY** no 40,XY

10) El cariotipo del caso 44 descrito como der(19)t(1;19)(q23;q21) debe corregirse como der(19)t(1;19)(q23;**p13**) en la pág 118 en el texto y en la tabla 3.11 y en la pág 126 tabla 3.17.

BIBLIOGRAFÍA

1) La referencia Ringden et al, 1994 no se encuentra en el texto, se refiere al régimen de acondicionamiento utilizado en las leucemias mieloblásticas agudas que finalmente no se ha incluido en la introducción.

2) En la figura 1.4 de la pág 22 se citan algunos autores cuyas referencias no se encuentran en la bibliografía, son las siguientes:

- Feig SA, Nesbit ME, Buckley J, Lampkin B, Bernstein ID, Kim TH, Piomelli S, Kersey JH, Coccia PF, O'Reilly RJ (1987). Bone marrow transplantation for acute non-lymphocytic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group of sixty-seven children transplanted in first remission. *Bone Marrow Transplant* 2:365-374

- Sanders JE, Thomas ED, Buckner CD, Flournoy N, Stewart PS, Clift RA, Lum L, Bensinger WI, Storb R, Appelbaum FR (1985). Marrow transplantation for children in first remission of acute nonlymphoblastic leukemia: an update. *Blood* 66:460-462

- Weisdorf DJ, McGlave PB, Ramsay NK, Miller WJ, Nesbit ME, Woods WG, Goldman AI, Kim TH, Kersey JH (1988). Allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia: comparative outcomes for adults and children. *Br J Haematol* 69:351-358

3) La referencia de Guilhot et al, es del año 1996 no del 1995.

4) En la pág 176 se cita a Ito et al, (1993) cuya referencia no sale en la bibliografía, es la siguiente:

- Ito Y, Wasserman R, Galili N, Reichard BA, Shane S, Lange B, Rovera G (1993). Molecular residual disease status at the end of chemotherapy fails to predict subsequent relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 11:546-553

AGRADECIMIENTOS

Pensaba que nunca llegaría este momento, y, de hecho, sus años me ha costado. Pero si de algo estoy contenta es de que tengo que dar las gracias a mucha gente que no solo me han ayudado, sino que me han regalado su confianza y su amistad.

A M^a Rosa por darme la oportunidad de realizar la tesis, por introducirme en el mundo de la citogenética, por formarme como profesional y como persona.

A M^a Dolors por sus conocimientos e inestimable ayuda, por su apoyo en todo momento, y por su cariño.

Al Dr Ortega por sus conocimientos, por introducirme un poquito en el mundo de la Hematología, por su ayuda.

A todo el equipo del Servicio de Hematología y Oncología Pediátrica del Hospital Vall d'Hebron, en especial a la Dra Olivé, a Julia, a Selma, y a Nieves. Y A la *Fundació per a la Recerca Biomèdica i Docència* del Vall D'Hebron, por su apoyo económico.

A Quico por su ayuda y por transmitirme su entusiasmo por la citogenética hematológica.

A toda la Unidad de Antropología, por su ayuda y su paciencia. En especial a Pilar, a Montse, a Gemma, a Paquito, a Pietat y a Prudent.

A Tomas y a Albert, por dedicarme parte de su tiempo.

A las chicas de Balagué, por su paciencia y por ayudarme en el tramo final.

A mis chicas, Susana y Yolanda, por aportar sus risas y su granito de arena.

A Mari, a Rubí, a Iolanda, a Juan, a Beatriz, a Juanma, a Alberto, a Maite, y a mis chicos del Norte, por los malos (pocos) y buenos (muchos) ratos.

A Carmen, por su paciencia y su apoyo, durante tantos años.

A Dori y Pepe por su interés y su cariño.

Y a mis padres y hermanos, a los Jaumes y al Xavi. Por estar ahí. Por quererme.

*Ésta es, señores, la verdadera historia de mi tragedia:
mirad y juzgad ahora.*

Don Quijote de la Mancha

*A Roberto, por ser
como es y al Boli,
claro*

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAA, anemia aplásica adquirida
AAS, anemia aplásica severa
ABD, anemia de Blackfan-Diamond
AF, anemia de Fanconi
Ag, antígeno
aloTMO, trasplante alogénico de CPHs de médula ósea
aloTPHSP, trasplante alogénico de CPHs de sangre periférica
AR, anemia refractaria
ARA-C, arabinósido de citosina
AREB, anemia refractaria con exceso de blastos
AREB-t, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
ARSA, anemia refractaria con sideroblastos en anillo
ASTA-Z, mafosfamida
ATG, globulina antitimocítica
ATMO, trasplante autólogo de CPHs de médula ósea
ATRA, ácido trans-retinóico
BCR, *breakpoint cluster region*
BU, busulfán
BUdR, bromodesoxiuridina
c-ABL, proto-oncogen de Abelson
CMV, citomegalovirus
CNK, células *natural Killer*
CPHs, células madre progenitoras hemopoyéticas o *stem cells*
Cs, ciclosporina
CY, ciclofosfamida
Dpl T, depleción de células T
EI, donante emparentado o familiar HLA idéntico
EICH, enfermedad del injerto contra el huésped
eICL, efecto del injerto contra la leucemia
EMR, enfermedad mínima residual
ENI, donante emparentado HLA no idéntico
ENN, enfermedad no neoplásica
EVOH, enfermedad veno-oclusiva hepática

FA, fase acelerada
FB, fase blástica
FC, fase crónica
FI, fallo de implante
FIP, fallo de implante precoz
FISH, hibridación *in situ* fluorescente
FIT, fallo de implante tardío
RFLP, fragmentos de DNA de restricción, de longitud polimórfica
GAL, globulina antilinfoцитaria
G-CSF, factor de crecimiento celular granulocítico
GETMON, grupo español de trasplantes de médula ósea en niños
GM, donante gemelo monozigótico
GM-CSF, factor de crecimiento celular granulo-macrofágico
HI, donante hermano HLA idéntico
HLA, sistema de antígenos de histocompatibilidad
HU, hidroxiurea
4-HC, 4-hidroxiciclofosfamida
IBMTR, registro internacional de trasplantes de médula ósea
ICT, irradiación corporal total
IDCS, inmunodeficiencia combinada severa
IFN, interferón
IgM, IgG o IgA, inmunoglobulinas M, G, o A
IL-2, interleuquina 2
ILD, infusión de linfocitos del donante
INT, irradiación nodal total
IT, irradiación toracoabdominal
LA, leucemia aguda
LAD, deficiencia de adhesión leucocitaria
LPA, leucemia promielocítica aguda
LHF, linfohistiocitosis hemofagocítica familiar
LLA, leucemia linfoblástica aguda
LM, leucodistrofia metacromática
LMA, leucemia mieloblástica aguda

LMC, leucemia mieloide crónica
LMMC, leucemia mielomonocítica crónica
LNH, linfoma no Hodgkin
MELF, melfalán
MO, médula ósea
MPS-I, mucopolisacaridosis tipo I
MTX, metotrexato
NEI, donante no emparentado HLA idéntico
NENI, donante no emparentado HLA no idéntico
PC, pintado cromosómico
PCR, reacción en cadena de la polimerasa
Ph, cromosoma *Philadelphia*
PRE, prednisona
QC, quimera o quimerismo completo del donante
QM, quimera o quimerismo mixto del donante y del receptor
QMe, quimerismo mixto estable
QMr, quimerismo mixto resurgente
QMt, quimerismo mixto transitorio
RA, recuperación autóloga
RC, remisión completa
RP, remisión parcial
SCU, sangre de cordón umbilical
SLE, supervivencia libre de enfermedad
SMD, síndrome mielodisplásico
SMP, síndrome mieloproliferativo
SP, sangre periférica
SWA, síndrome de Wiskott-Aldrich
TASPE, trasplante autólogo de CPHs de sangre periférica
TCR, receptores de células T
TPH, trasplante de progenitores hemopoyéticos
TSCU, trasplante alogénico de CPHs de sangre de cordón umbilical
URB, urbasón
VNTR, fragmentos de DNA de igual tamaño que se repiten en *tandem* en número variable
VP-16, etopósido

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Trasplante de progenitores hemopoyético.....	2
1.1.1 Tipos de trasplantes de progenitores hematopoyéticos.....	4
1.1.2 Fuentes de células progenitoras hemopoyéticas.....	7
1.1.3 Regímenes de acondicionamiento.....	9
1.1.4 Complicaciones post-trasplante.....	10
1.1.5 Indicaciones y resultados clínicos.....	16
1.1.5.1 TPH en neoplasias hematológicas.....	16
1.1.5.1.1 TPH en la leucemia linfoblástica aguda.....	16
1.1.5.1.2 TPH en la leucemia mieloblástica aguda.....	21
1.1.5.1.3 TPH en linfomas.....	24
1.1.5.1.4 TPH en los síndromes mielodisplásicos y en los síndromes mieloproliferativos crónicos.....	25
1.1.5.1.5 TPH en tumores sólidos.....	28
1.1.5.2 TPH en enfermedades no neoplásicas.....	29
1.1.6 Tratamientos de rescate post-trasplante. Infusión de linfocitos del donante.....	31
1.2 Concepto de quimerismo.....	33
1.2.1 Técnicas para la detección del quimerismo.....	35
1.2.1.1 Estudio del Fenotipo eritrocitario.....	35
1.2.1.2 Estudio de los cromosomas sexuales.....	36
1.2.1.4 Estudio de polimorfismos de DNA por <i>Southern Blotting</i> y PCR.....	37
1.2.2 Factores asociados al desarrollo de un quimerismo mixto	39
1.3 Enfermedad Mínima Residual.....	41
1.3.1 Técnicas para la detección de la EMR.....	42
1.3.1.1 Análisis citogenético.....	44
1.3.1.2 Técnicas de hibridación <i>in situ</i> fluorescente.....	45
1.3.1.3 Citometría de flujo.....	47
1.3.1.4 Amplificación de ácidos nucleicos (PCR y RT-PCR).....	49

1.4 Objetivos.....	55
--------------------	----

II MATERIAL Y MÉTODOS.....

2.1 Material biológico.....	57
2.2 Pacientes.....	57
2.2.1 Tratamientos.....	58
2.2.2 Protocolo de seguimiento.....	63
2.3 Material de laboratorio.....	66
2.3.1 Aparatos y material fungible.....	66
2.3.2 Productos.....	68
2.3.3 Soluciones.....	70
2.4 Metodología.....	74
2.4.1 Cultivo celular.....	75
2.4.1.1 Extracción del cultivo.....	75
2.4.2 Bandas G.....	76
2.4.3 Técnicas de Hibridación “In situ” fluorescente.....	77
2.4.3.1 Pintado cromosómico.....	77
2.4.3.2 Hibridación “In situ” con la sonda BCR/ABL.....	85
2.4.3.3 FISH con sondas correspondientes a los cromosomas sexuales.....	88
2.4.4 Análisis estadístico.....	92

III RESULTADOS.....

3.1 Estudio del quimerismo.....	94
3.1.1 Estudio control para la detección del quimerismo.....	96
3.1.2 Seguimiento del quimerismo según la patología.....	98
3.1.2.1 Pacientes con enfermedades neoplásicas.....	98

3.1.2.1.1 Seguimiento en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.....	98
3.1.2.1.2 Seguimiento en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda y con Leucemia Mieloide Crónica.....	103
3.1.2.2 Seguimiento en pacientes con enfermedades no neoplásicas.....	106
3.1.2.2.1 Seguimiento en pacientes afectos con Anemia de Fanconi	108
3.1.3 Evolución del quimerismo mixto.....	110
3.1.4 Quimerismo y parámetros clínico-biológicos.....	112
3.1.4.1 Tipos de quimerismo y evolución post-trasplante.....	112
3.1.4.2 Correlación entre los parámetros clínico-biológicos y el tipo de quimerismo observado.....	115
3.2 Estudio de la Enfermedad Mínima Residual.....	118
3.2.1 Estudio citogenético al diagnóstico de la enfermedad.....	118
3.2.2 Aplicabilidad de las técnicas citogenéticas y de FISH en el estudio de la Enfermedad Mínima Residual.....	121
3.2.3 Estudio control y detección de la reorganización BCR/ABL....	122
3.2.4 Seguimiento de la Enfermedad Mínima Residual en las diferentes patologías.....	123
3.2.4.1 EMR en pacientes afectos de Leucemia Linfoblástica Aguda.....	123
3.2.4.2 EMR en pacientes afectos de Leucemia Mieloblástica Aguda.....	127
3.2.4.3 EMR en pacientes afectos de LMC.....	130
3.2.4.4 EMR en pacientes afectos de un Síndrome Mielodisplásico.....	133
3.2.5 Valoración de las técnicas citogenéticas y de FISH en el estudio de la Enfermedad Mínima Residual.....	137

3.3 Correlación entre el cariotipo y la evolución post-TPH.....	139
3.3.1 Influencia del cariotipo en la supervivencia global, en la supervivencia libre de enfermedad y en la recaída.....	139
3.3.1.1 Supervivencia global y la Supervivencia Libre de Enfermedad según el tipo de cariotipo observado al diagnóstico de la enfermedad.....	140
3.3.1.2 Supervivencia global y la Supervivencia Libre de Enfermedad en pacientes en primera remisión completa según el tipo de cariotipo.....	142
3.3.1.3 SG y SLE en pacientes sometidos a un TPH alogénico.....	143
3.3.1.4 Estimación de la proporción de recaídas según el tipo de cariotipo.....	146
3.3.2 Relación entre pronóstico de las alteraciones cromosómicas y la evolución post-trasplante.....	148
3.3.2.1 Influencia del pronóstico del cariotipo en la supervivencia global y la supervivencia Libre de Enfermedad.....	150
3.3.2.2 Supervivencia global y la supervivencia Libre de Enfermedad en pacientes trasplantados en primera RC.....	151
3.3.2.3 Supervivencia global y la supervivencia Libre de Enfermedad en función del tipo de trasplante.....	152
3.3.2.4 Proporción de recaídas según el pronóstico del cariotipo.....	154
3.3.2.4.1 Proporción de recaídas en función del pronóstico del cariotipo y del tipo de trasplante.....	156
IV DISCUSIÓN.....	158
4.1 Quimerismo.....	159
4.1.1 Quimerismo mixto e intervalos de confianza.....	159
4.1.2 Valoración de las técnicas utilizadas el seguimiento del quimerismo.....	160
4.1.3 Evolución del quimerismo post-TPH.....	161

4.1.4 Factores asociados a la persistencia de un quimerismo mixto o completo.....	163
4.1.5 Valor pronóstico del quimerismo en la evolución post-trasplante.....	165
 4.2 EMR.....	171
4.2.1 Valoración de la eficacia de las técnicas utilizadas en el seguimiento de la Enfermedad Mínima Residual.....	171
4.2.3 Enfermedad Mínima Residual pre-trasplante.....	172
4.2.4 Enfermedad Mínima Residual post-trasplante.....	173
 4.3 Cariotipo y evolución post-trasplante.....	178
4.3.1 Estudio citogenético post-trasplante.....	178
4.3.2 Valor pronóstico post-TPH del cariotipo.....	180
 V CONCLUSIONES.....	183
 VI BIBLIOGRAFÍA.....	187

I. INTRODUCCIÓN

1.1 TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS

En condiciones fisiológicas normales, las células maduras del sistema hemopoyético se renuevan continuamente a partir de un reducido número de células indiferenciadas o células madre progenitoras hemopoyéticas (CPH, *stem cells*). Éstas son capaces de renovarse por división no madurativa y de adoptar cualquiera de las líneas de diferenciación celular que tienen su origen en la médula ósea (Figura 1.1). El proceso de la hemopoyesis está regulado por señales ambientales que operan principalmente a través de células integradas en el estroma medular. Estas células delimitan microambientes dentro de la médula ósea, mediante la liberación local de citoquinas, estimulantes o inhibidoras de la actividad hemopoyética.

La característica que mejor define a las CPHs es su capacidad para reconstruir la inmunohemopoyesis de forma estable en situaciones de extrema pobreza celular. En esta facultad se basa el trasplante de células progenitoras hemopoyéticas (TPH), un procedimiento terapéutico mediante el cual se infunden CPHs con el propósito de establecer una hemopoyesis y una inmunidad normales.

Los primeros trasplantes de médula ósea (MO) que consiguieron la curación de enfermedades antes incurables tuvieron lugar en el año 1968. Los pacientes fueron tres niños, dos afectos de una inmunodeficiencia combinada severa (IDCS) y el tercero afecto de un síndrome de Wiskott-Aldrich (SWA) (Gatti et al, 1968). Los tres actualmente son adultos que llevan una vida normal (Bortin et al, 1994). Desde entonces y hasta finales de 1995, figuraban en el registro internacional de trasplantes de médula ósea (IBMTR) los datos completos de más de 45.000 pacientes. Se estima que más de 10.000 pacientes viven actualmente sin la enfermedad que motivó el trasplante después de transcurridos al menos cinco años (Bortin et al, 1994). Por tanto, se trata de un procedimiento terapéutico en el que existe dilatada experiencia. Sin embargo, las distintas modalidades de trasplantes y fuentes de obtención de las CPH así como las ventajas y las complicaciones derivadas de cada una de ellas hacen que las indicaciones y las prioridades en cada caso no sean siempre precisas.

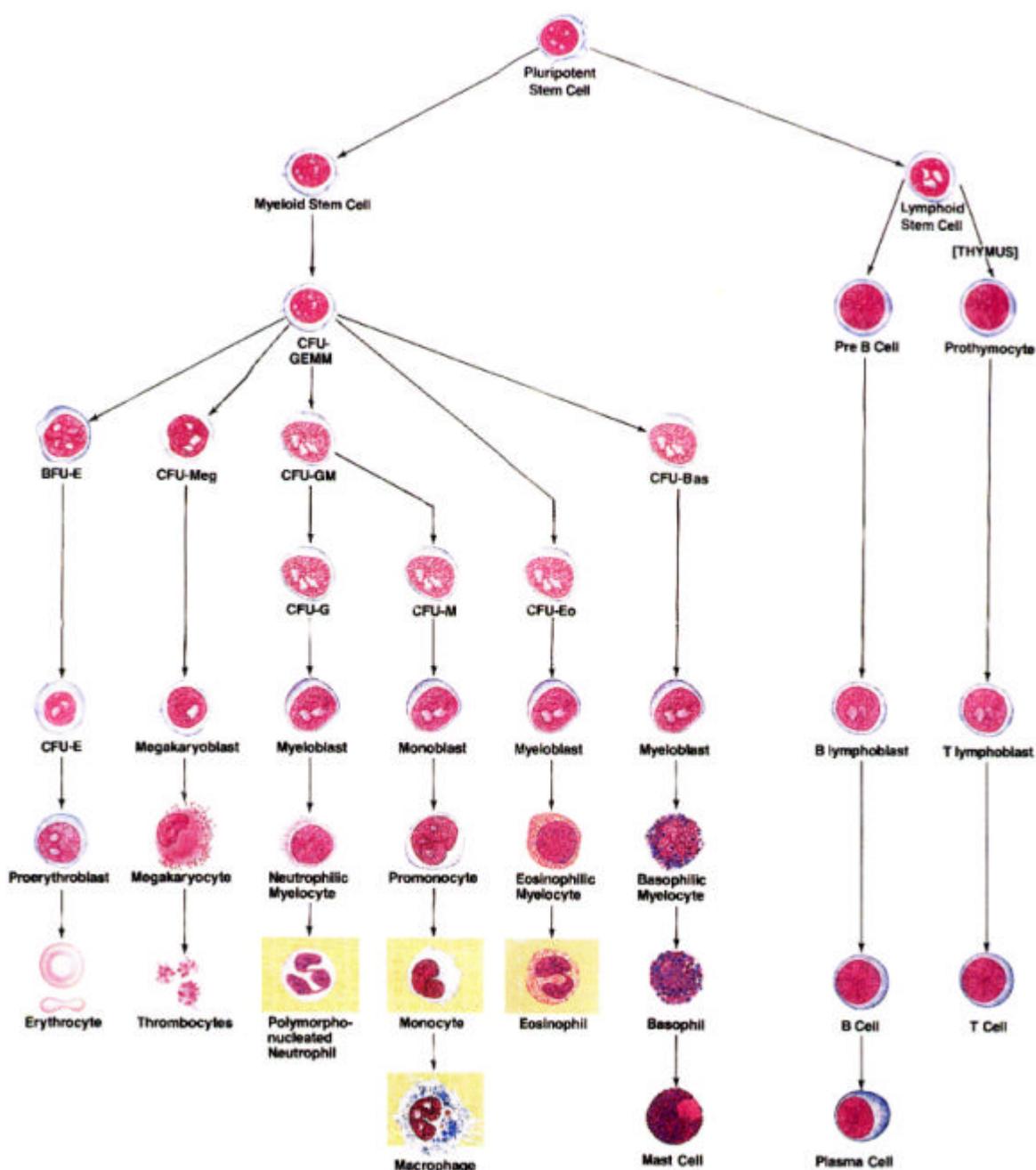


Figura 1.1 Hemopoiesis generada a partir de las células progenitoras hemopoyéticas (CPHs) o *stem cells*

1.1.1 TIPOS DE TRASPLANTES DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS

Según la procedencia de las CPH infundidas distinguimos dos tipos de TPH. Los TPH **autólogos**, en los que las CPH del propio paciente, después de extraídas, manipuladas o no y conservadas adecuadamente, son reinfundidas como procedimiento de rescate; y los TPH **alogénicos** donde las CPH proceden de un donante que no es el propio paciente; los TPH singénicos son un caso particular de TPH alogénico donde el donante es el gemelo monozigótico del paciente.

Tanto en los trasplantes autólogos como en los singénicos, el injerto (CPH infundidas) es genéticamente idéntico al receptor. En cambio, en el TPH alogénico donante y receptor son individuos genéticamente distintos. Las diferencias antigenicas entre las células infundidas y los tejidos del receptor explican la aparición de un problema inmunológico doble: por una parte, el sistema inmune del receptor tiende a reconocer como ajenas y destruir las CPH infundidas, provocando un **fracaso o fallo de implante (FI)**; a la vez que las células infundidas procedentes del donante tienden a rechazar los tejidos del receptor desencadenando la llamada **enfermedad injerto contra huésped (EICH)**. Por lo tanto, en los trasplantes alogénicos es preciso que donante y receptor tengan idénticos los seis antígenos (Ags) mayores del sistema HLA o como máximo diferencias en un sólo antígeno (Tabla 1.1). Se admiten diferencias en dos antígenos cuando se emplea cordón umbilical, dada la menor inmunoreactividad de los linfocitos del neonato.

Tabla 1.1. Loci del sistema HLA

HLA clase I		
<u>HLA-A</u> 98• (18)	<u>HLA-B</u> 212•(35)	<u>HLA-C</u> 51•(8)
HLA clase II		
<u>HLA-DRB</u> 240•(14)	<u>HLA-DQB1</u> 35•(6)	<u>HLA-DP</u> 82•(?)

• N° de alelos conocidos de cada antígeno. () N° de alelos que actualmente se detectan de forma rutinaria

Los donantes más adecuados son los hermanos genotípicamente idénticos para el sistema HLA. Estos sólo los encontramos en el 20-30% de los pacientes. En su defecto pueden utilizarse como donantes familiares genotípicamente idénticos o con diferencia en un sólo antígeno de clase I o II. Los familiares con diferencias en dos o en tres antígenos HLA sólo deben utilizarse como donantes en trasplantes en niños con IDCS y después de someter el producto a infundir a un proceso de eliminación de la mayor parte de linfocitos T con el fin de disminuir al máximo la EICH. El empleo de donantes no emparentados es obligado sólo cuando el trasplante alogénico sea necesario y no exista un donante familiar adecuado, ya que presentan mayores problemas de EICH y la mortalidad derivada del trasplante es superior (Casper et al, 1995 and Balduzzi et al 1995). En la actualidad existen registrados más de 4,5 millones de donantes voluntarios de CPHs en el mundo.

En los trasplantes alogénicos con donantes no idénticos, con el fin de disminuir la incidencia y la gravedad de la EICH, se aconseja eliminar los linfocitos T de las CPH a infundir (Depleción T, Dpl T), sobretodo en aquellos trasplantes donde existe una gran disparidad antigenica entre el donante y el receptor. Las subpoblaciones de linfocitos T implicadas en la EICH y en el efecto del injerto contra la leucemia (eICL) son motivo de estudio y parece ser que no son las mismas, de hecho ciertos autores han dirigido sus esfuerzos a eliminar las que suponen responsables de la EICH preservando las responsables del eICL (Giralt et al, 1994, Herrera et al, 1995, Soiffer et al, 1997).

Por otro lado, el hecho de eliminar la población linfoide T provoca un aumento de la frecuencia de recaídas (en enfermedades neoplásicas), de fallo de implante y de infecciones (Marmont et al, 1991). Para evitar estos efectos se aconseja realizar una deplección parcial de linfocitos T, conservando una cantidad de células CD3+ en el inóculo de entre 0,005 y 0,5 x 10⁶/kg (Verdonck et al, 1994). Con este método se han obtenido resultados de probabilidad de recaída similares a los que se observan después de un trasplante sin deplección T.

En los trasplantes autólogos, a diferencia de los alogénicos, no se producen las reacciones inmunológicas de la EICH. Como consecuencia de ello, la mortalidad debida al procedimiento es inferior. Sin embargo, existe el riesgo de infundir células neoplásicas y por tanto, provocar una recidiva de la enfermedad maligna (Roberts, 1994). La depuración del producto puede llevarse a cabo con técnicas que eliminan preferentemente las células neoplásicas y preserven en mayor o en menor grado el resto de la celularidad (selección negativa) o mediante la concentración de los progenitores hemopoyéticos (selección positiva de CD34+) al tiempo que se desechan células más maduras y las neoplásicas acompañantes.

Generalmente se utilizan agentes farmacológicos citotóxicos como la mafosfamida (ASTA-Z) y la 4-hidropoxiciclofosfamida (4-HC) o el marcaje de las células blásticas con anticuerpos monoclonales y posterior destrucción por citolisis mediada por complemento o inmunotoxinas o separación por métodos inmunomagnéticos.

Sin embargo, el tratamiento *ex vivo* también tiene detractores, ya que con frecuencia se asocia a una lenta reconstitución hemopoyética post-trasplante, lo que aumenta la morbilidad y el coste del procedimiento y puede incluso incrementar su mortalidad. Además, ciertos autores que se basan en los resultados de trasplantes singénicos, indican que el trasplante de un producto sin contaminación neoplásica, en ausencia de reacción del injerto contra la leucemia (EICL), se asocia a una frecuencia elevada de recidivas, en torno al 50% (Gale et al, 1991; Gale et al 1994). Por ello defienden que la influencia de la celularidad leucémica transplantada en la aparición de recaídas debe ser escasa. De hecho la proporción de recaídas sigue siendo superior en los trasplantes autólogos en relación a los alogénicos aunque se realice el tratamiento *ex vivo* del producto infundido.

1.1.2 FUENTES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMOPOYÉTICAS

Actualmente las CPHs se obtienen de tres fuentes: **médula ósea (MO)**, **sangre periférica (SP)** y **sangre de cordón umbilical (SCU)** del recién nacido.

Las CPHs se identifican con el anticuerpo monoclonal CD34. Su caracterización y cuantificación presenta dificultades debido a su escasez. Las células que expresan el antígeno CD34 se encuentran en distinta proporción en MO, en SP y en la SCU. En la MO la proporción es mayor, del orden del 1,5% de las células mononucleadas (CMN), constituyendo una población muy heterogénea que incluye células con capacidad de reconstitución medular sostenida a largo plazo, todos los tipos de células formadoras de colonias y los precursores mieloides y eritroides más inmaduros (Berenson et al, 1988 y Civin y Gore 1993). En la SCU constituyen un 0,3-0,4% de las CMN, proporción que decrece muy rápidamente durante las primeras 24 horas de vida postnatal (García et al, 1993), y en SP representan menos del 0,1% de las CMN.

El procedimiento habitual de obtención de las CPH hasta hace pocos años era el de aspirados medulares por punciones múltiples bajo anestesia en ambos huesos ilíacos. En el curso de los años ochenta se observó que en la fase de recuperación de la función medular, después del periodo de aplasia inducida por la quimioterapia, la proporción de células CD34+ circulantes en SP aumentaba de modo notable durante unos pocos días. Si durante esos días se practican varias leucaférasis, mediante máquinas separadoras de células, es posible obtener un número de células progenitoras equivalente y aún superior al que se obtiene de MO. Con la administración de factores de crecimiento hemopoyético, en particular G-CSF y GM-CSF, se puede conseguir el mismo efecto movilizador de las células progenitoras, que el obtenido en la fase de recuperación post-quimioterapia, con la ventaja de ser un procedimiento controlable. En el momento actual, la mayoría de trasplantes autólogos se realizan empleando CPHs de SP (TASPE), ya que se obtienen de una forma sencilla y la recuperación de neutrófilos y de plaquetas después del trasplante es muy rápida. El uso de CPHs de SP en trasplantes alogénicos (aloTPHSP) tiene algunos inconvenientes, como son la posibilidad de que la administración del G-CSF en los donantes de lugar a efectos desconocidos a largo término, el riesgo de una mayor incidencia de la EICH y la posibilidad de un fallo de implante tardío. Por otra parte, las principales ventajas clínicas del aloTPHSP respecto al trasplante alogénico de MO (aloTMO) son disminuir los riesgos asociados a la anestesia general y a las punciones óseas, obtener un mayor número de células CD34+ que el

obtenido en un aspirado de MO convencional y la mayor rapidez en el implante de neutrófilos y de plaquetas.

La tercera fuente de obtención de CPHs es la SCU, tiene la particularidad de que son células más inmaduras y con mayor capacidad de proliferación *in vitro* que las de MO y que las movilizadas de SP. Por otra parte, las CPHs de SCU parecen tener una menor aloreactividad, que puede ser explicada por una cierta inmadurez funcional de los linfocitos (Risdon et al 1994). Aunque la proporción de linfocitos T es similar a la de SP del adulto, la mayoría son del tipo *naive* y las CMN tienen reducidas la capacidad proliferativa, estimuladora y citotóxica ante estímulos alogénicos. Las vías de transducción de señal de las células T son inmaduras, con una menor expresión de los antígenos HLA-DR, y capacidad de producir IL-2 (Matsuzaki et al, 1989). La actividad NK es prácticamente inexistente. Por su parte, las células B tienen una capacidad normal de producción de IgM mientras que muestran una capacidad reducida en la producción de IgG e IgA. Así mismo, las células CFU-GM, los macrófagos y los monocitos de la SCU tienen una expresión reducida de los antígenos HLA de clase II.

Todos estos datos hacen que las CPHs de SCU resulten de mayor interés como reconstituyentes hemopoyéticos trasplantables y como sustratos de amplificación *ex vivo*, lo que podría ampliar su potencial terapéutico. El primer trasplante de CPHs de SCU (TSCU) fue llevado a cabo en 1988 en un paciente afecto de anemia de Fanconi (AF) con SCU de un hermano HLA idéntico, consigiéndose una reconstitución hematológica e inmunológica estable tras ocho años y habiendo obtenido aparentemente la curación de la enfermedad original (Gluckman et al, 1990). Desde entonces el ritmo de realización de TSCU se ha incrementado y a finales de 1998 el número de trasplantes realizados superaba los 500. Las principales ventajas de las de SCU son su abundancia y facilidad de obtención sin riesgos para el donante, la relativa baja incidencia de enfermedades infecciosas transmisibles, el elevado potencial hemopoyético y la disminuida reactividad inmunológica que da lugar a una incidencia menor de la EICH e incluso a pesar de notables disparidades en el sistema HLA. Los mayores inconvenientes son el tiempo de recuperación hemopoyética, algo mayor que en los TMO, y una mayor incidencia de fracaso de prendimiento relacionada con el número de células infundidas y con el tratamiento de acondicionamiento (Ortega et al, 1995).

1.1.3 REGÍMENES DE ACONDICIONAMIENTO

La infusión intravenosa del injerto va precedida necesariamente de un tratamiento de preparación del receptor que haga posible el prendimiento de las CPHs. Con el tratamiento de acondicionamiento se persiguen tres objetivos :

- ✓ La destrucción de la hemopoyesis del paciente, como requisito para dejar espacio físico para el prendimiento de las CPHs infundidas.
- ✓ La anulación del sistema inmune del receptor, para evitar que rechace las células infundidas cuando estas son alogénicas.
- ✓ La erradicación de la población celular maligna cuando la enfermedad de base es una neoplasia.

La intensidad del régimen de acondicionamiento dependerá de las finalidades que se persigan en cada situación concreta. Un ejemplo extremo es el TPH singénico por aplasia medular severa. En estos enfermos la hemopoyesis del receptor ha sido destruida espontáneamente por la enfermedad de base y no debería haber riesgo inmunológico, puesto que donante y receptor son gemelos monozigóticos. Por lo tanto, teóricamente puede prescindirse del régimen de acondicionamiento. Sin embargo, en la práctica, si no se aplica un tratamiento inmunosupresor, el prendimiento fracasa o es muy lento en la mitad de los casos, tal vez debido a mecanismos autoinmunes en la génesis de la aplasia medular

(Baro et al, 1992).

La terapia de acondicionamiento consiste en administrar quimioterapia a altas dosis con o sin irradiación corporal total (ICT). El tipo de acondicionamiento depende del tipo de trasplante y de la enfermedad de base. En aplasias medulares adquiridas (AA) se aconseja emplear ciclofosfamida (CY) (200 mg/kg, dosis total) con globulina antilinfocitaria (GAL) o irradiación nodal total (INT) (4 a 7 Gy). En la AF los mejores resultados se han obtenido con el empleo de CY a dosis más bajas (20-40 mg/kg, dosis total) e irradiación toracoabdominal (IT) (5 Gy). En las enfermedades congénitas, el régimen más empleado es la asociación de busulfán (BU) (14-18 mg/kg, dosis total) y CY (200 mg/kg, dosis total). En las leucemias agudas generalmente se utiliza la ICT de 12 a 14 Gy dosis total, fraccionada en seis o nueve sesiones, combinada con una o dos drogas, generalmente CY (120 ó 200 mg/kg, dosis total). Otras drogas empleadas son el etopósido (VP-16), el arabinósido de citosina (ARA-C) o el melfalán (MEL). En general en niños menores de dos años no se debe emplear la ICT.

1.1.4 COMPLICACIONES POST-TRASPLANTE

El procedimiento del TPH, conlleva una serie de complicaciones asociadas a un riesgo de mortalidad; según datos del IBMTR este riesgo representa el 20%. En los trasplantes de MO de donante familiar no idéntico o no emparentado el riesgo se acerca al 40% (Casper et al, 1995). Las principales complicaciones son:

- **Fracaso o fallo de implante (FI)**

Se considera FI cuando las CPHs transplantadas son incapaces de mantener la hemopoyesis en unos niveles adecuados. En el trasplante alogénico no existe consenso en cuanto a los criterios para definir el retraso de implante, tras el trasplante, pero la mayoría de autores (Nemunaitis et al, 1990; Khwaja et al, 1995) lo consideran cuando existe:

- ✓ incapacidad de alcanzar más de 100 granulocitos en el día +21 post-trasplante.
- ✓ incapacidad de alcanzar más de 500 granulocitos en el día +28 post-trasplante.

En general se han descrito dos tipos de FI. El fallo de implante primario (FIP) en el cual no existe evidencia de recuperación hemopoyética tras el proceso y el fallo de implante tardío (FIT) en el cual se produce inicialmente una recuperación hemopoyética y posteriormente se desarrolla una pancitopenia. Ambos obedecen a mecanismos inmunológicos de defensa del receptor contra el implante.

La frecuencia de esta complicación aumenta cuanto mayor es la disparidad antigénica entre donante y receptor, menor es la intensidad del régimen de acondicionamiento, menor es la cantidad de células infundidas y mayor es la sensibilización previa del receptor por transfusiones. Es más frecuente en los TPH por aplasias medulares, donde se suele utilizar únicamente CY como régimen de acondicionamiento y cuando la infusión medular ha sido depurada de células T.

El FI se describió inicialmente tras trasplante de MO alogénico. Su frecuencia en este tipo de trasplantes no es alta, el 1% de los casos de leucemia mieloblástica aguda (LMA) transplantados a partir de donantes HLA idénticos y el 5% cuando existe disparidad HLA entre donante y receptor (Powles et al, 1983). Esta proporción aumenta considerablemente cuando se realiza el trasplante con depleción de linfocitos T, llegando a presentarse hasta en un 8-50% de los casos (Champlin y Gale 1984).

En el trasplante autólogo también puede producirse un FI, o lo que es más frecuente en este tipo de trasplantes, un retraso en el implante, lo que sucede en el 10% de los casos (Sing y Nemunaitis 1994). En particular, en trasplantes autólogos en LMAs, en el que el

injerto es tratado farmacológicamente *in vitro* el prendimiento se halla muy retardado (40-60 días). Esto condiciona periodos más prolongados de mielosupresión con el consecuente aumento en el riesgo de infecciones bacterianas o fúngicas y un incremento del riesgo de morbilidad y mortalidad del proceso.

El tratamiento de un FI es difícil. Si existen datos indicativos de prendimiento medular puede intentarse un tratamiento con el factor de crecimiento granulo-macrofágico (GM-CSF) (Nemunaitis et al, 1990) y una segunda infusión de CPHs. Si no hay ninguna evidencia de hemopoyesis derivada del donante, esta segunda infusión debe ir precedida por un nuevo régimen de acondicionamiento inmunosupresor.

• **Enfermedad injerto contra huésped (EICH)**

La EICH se define como el daño inmunológico causado al introducir células inmunológicamente competentes en un individuo huésped inmunoincompetente. Fue observada por Hathaway et al, en 1965 en niños trasplantados con MO alogénica y al año siguiente, Billingham definió tres requisitos para el desarrollo de la EICH:

- ✓ que el injerto contenga células inmunológicamente competentes
- ✓ que el injerto reconozca como extraño al receptor
- ✓ que el receptor sea incapaz de reaccionar contra el injerto

El término EICH describe un síndrome que se manifiesta de forma aguda o crónica. La forma aguda, aparece como dermatitis, enteritis y hepatitis, y suele presentarse entre los 30-40 días hasta los primeros 100 días post-trasplante alogénico. La forma crónica se desarrolla a partir del día +100 y describe un síndrome probablemente autoinmune, en forma de fallo multiorgánico (Sullivan 1994).

La EICH constituye la mayor causa de morbilidad y mortalidad de los trasplantes alogénicos. Se relaciona básicamente con la diferencia antigénica en el sistema HLA y con el tratamiento preventivo que se administra. Generalmente como profilaxis se utiliza la ciclosporina (Cs) sola o con metotrexato (MTX), o Cs con otros corticosteroides. El empleo de Cs y MTX en los primeros tres a seis meses después del TMO reduce la frecuencia de EICH a un 20-35% de los pacientes sometidos a un aloTMO compatible.

La forma aguda aparece entre los 10 y 60 días siguientes a la infusión, y afecta, con intensidad variable, al 40% de los pacientes que reciben un TPH de un hermano HLA idéntico y al 60-80% cuando se utiliza un donante alternativo con diferencia en un antígeno

(Beatty et al, 1985). Se manifiesta especialmente por una combinación de lesiones cutáneas, hepáticas y gastrointestinales, deterioro general y acentuación del efecto inmune. Una escala de severidad clínica basada en la afectación cutánea, el grado de hiperbilirrubinemia y la cuantía de la diarrea, permite clasificar la enfermedad desde el punto de vista pronóstico en grados del I al IV (Tablas 1.2 y 1.2.1). Los pacientes afectos de anemia aplásica que no presentan EICH o únicamente ésta es de grado I tiene una probabilidad de supervivencia mucho mayor que los que presentan EICH de grado \geq II. Un grado moderado (I ó II) de EICH en pacientes afectos de neoplasias puede ser indicador de una menor probabilidad de recaída ya que suele ir unido a un efecto inmunológico antineoplásico (eICL). En los pacientes con EICH aguda de grado III y IV el riesgo de mortalidad por causa no relacionada con la enfermedad de base, es elevado. La prevención de la EICH puede realizarse o bien mediante depleción de linfocitos T o bien administrando Cs sólo o con 3 ó 4 días de MTX. La EICH establecida se trata habitualmente con prednisona (PRE) u otros corticosteroides a dosis intermedias (2mg/Kg) o elevadas (10mg/kg) con o sin anticuerpos bloqueantes de la reacción inmunológica como la globulina antilinfocitaria (GAL) o el OKT3. Los casos resistentes a PRE tienen muy mal pronóstico. Aún con una terapia inmunosupresiva intensiva entre el 20 y el 50% de los casos trasplantados con un donante HLA compatible presentan complicaciones debido a la EICH aguda y es causa de mortalidad en el 5-15% de los casos.

Tabla 1.2. Grados de EICH aguda

GRADO	PIEL	HIGADO	DIGESTIVO
I	1 a 2	0	0
II	1 a 3	1	y/o 1
III	2 a 3	2 a 3	y/o 2 a 3
IV	2 a 4	2 a 4	y/o 2 a 4

Tabla 1.2.1 Descripción de los grados de EICH aguda

ORGANO	ESTADO	DESCRIPCIÓN
Piel	1	Rash máculopapular <25% superficie del cuerpo
	2	Rash máculopapular 25-50% superficie del cuerpo
	3	Eritroderma generalizado
	4	Descamación y formación de ampollas

Hígado	1	2,0-3,0 mg/dl Bilirrubina
	2	3,1-6,0 mg/dl Bilirrubina
	3	6,1-15 mg/dl Bilirrubina
	4	>15 mg/dl Bilirrubina
Digestivo	1	Diarrea >30ml/kg
	2	Diarrea >60ml/kg
	3	Diarrea >90 ml/kg
	4	Dolor abdominal severo o cólico

La forma crónica suele presentarse entre los 100 y 400 días después del trasplante. Ha sido interpretada bien como una fase tardía de la forma aguda o bien como una enfermedad distinta con características autoinmunes. Actualmente se considera una enfermedad autoinmune ya que presenta características similares a ciertas enfermedades autoinmunes como son, atrofia del timo, pérdida de la capacidad secretora de su epitelio medular y disminución en la producción de linfocitos. La incidencia de la EICH crónica depende de la edad, afecta al 13% de los pacientes menores de 10 años, al 28% de los adolescentes entre los 10 y 19 años y al 42% de los adultos de más de 20 años (Klingebiel y Schlegel 1998). Incide especialmente en los que habían padecido la forma aguda en grado igual o superior a II. Las manifestaciones clínicas son más variadas que en la forma aguda aunque afectan también de modo especial a la piel (discromías, escleredema), mucosa oral (lesiones liquenoides), tracto gastrointestinal e hígado. Al igual que la forma aguda, su influencia en el pronóstico vital de los pacientes depende de la intensidad de las manifestaciones medidas en dos grados, limitado o extendido (Tabla 1.3). El empleo continuado de inmunosupresores para tratar estas complicaciones predispone a padecer infecciones múltiples por gérmenes oportunistas aumentando así el riesgo de mortalidad por infección.

Tabla 1.3. Grados de EICH crónica

GRADO	Organo implicado
Limitado	Localizado en la piel y/o con disfunción hepática
Extendido	Generalizado en la piel

Limitado con disfunción hepática o con alguna de las siguientes complicaciones:

- a)Histología hepática mostrando progresiva hepatitis, con necrosis o cirrosis
 - b)complicaciones oculares
 - c)complicaciones de la mucosa oral y glándulas salivares
 - d)complicaciones en otros órganos
-

• **Complicaciones infecciosas**

Durante las primeras 2-6 semanas del trasplante, necesarias para la reconstitución hemopoyética, el paciente permanece con intensa pancitopenia y profundamente inmunosuprimido. La ruptura de barreras defensivas (catéter intravascular permanente y lesiones orales e intestinales secundarias al régimen de acondicionamiento) y la administración de inmunosupresores, contribuye a un estado defensivo muy precario, en el que son frecuentes las infecciones bacterianas (*Staphylococcus epidermidis*, bacilos entéricos gram negativos), micóticas (*Candida, Aspergillus*) y víricas (en sujetos seropositivos es frecuente la reactivación del *Herpes simplex*) (Engelhard 1998). El paciente debe permanecer hospitalizado en condiciones de aislamiento, recibir medicación antibacteriana y antifúngica por vía oral (anfotericina, miconazol) y en los individuos seropositivos para *Herpes simplex* se debe administrar aciclovir. Durante esta etapa el paciente soporta una trombopenia que puede conducir a hemorragias pulmonares o cerebrales. Por ello, el soporte hemoterápico es esencial. Deben emplearse concentrados de hematíes para mantener los niveles de hemoglobina por encima de 7,5 g/dl y concentrados de plaquetas para garantizar un mínimo de 20x10⁹/l. Los concentrados celulares deben ser irradiados antes de su infusión para evitar la trasfusión de linfocitos viables.

Una vez se ha alcanzado la reconstitución hemopoyética, entre los primeros tres y seis meses después del trasplante el paciente permanece profundamente inmunosuprimido. El deterioro afecta principalmente a las células T inductoras (*helper*), pero la respuesta humoral a抗ígenos también está deteriorada en la mayoría de los casos. El proceso de reconstitución inmune tarda de uno a dos años en completarse en individuos sanos de injertos no manipulados. Este plazo es mayor en TPH con depleción de células T y en casos que desarrollan una EICH.

El deterioro defensivo en los primeros meses post-trasplante provoca una elevada incidencia de infecciones víricas y por *Pneumocystis carinii*. El agente infeccioso más importante en esta etapa, es sin duda el citomegalovirus (CMV), que se reactiva en un 70% a 80% de los

pacientes seropositivos antes del TPH, provoca síntomas en un 40% y contribuye decisivamente a la muerte en un 15-20% de los casos. La infección por CMV puede prevenirse en pacientes seronegativos, evitando trasfundir productos hemáticos provenientes de donantes seropositivos. Una quimioprofilaxis con ganciclovir es efectiva en pacientes seropositivos si se inicia ante la presencia de antígeno viral circulante o en el árbol respiratorio.

La neumonitis intersticial es un cuadro clínico-radiológico de elevada mortalidad, más frecuente en TPH alogénicos, acondicionados con radioterapia y/o asociado a una EICH aguda. La mayoría de los casos se deben a CMV, con menor frecuencia se detectan *Pneumocystis carinii* o adenovirus y en una tercera parte de los casos no se identifica ningún agente infeccioso asociado. La infección por *P. carinii* se previene sistemáticamente administrando cotrimoxazol durante tres a seis meses (Ljungman, 1998, Matthess-Martín et al, 1998).

- **La enfermedad veno-oclusiva hepática (EVOH)**

Tanto la EVOH como otras hepatopatías están ligadas a la toxicidad de los tratamientos previos, a las reacciones inmunológicas y a las infecciones víricas. Afecta aproximadamente al 5% de los pacientes que se someten a un TPH y alrededor del 1% fallecen por complicaciones derivadas de ésta (Carreras et al, 1998). La EVOH puede prevenirse eficazmente con la administración de bajas dosis de heparina en infusión continua desde el inicio del régimen de acondicionamiento y hasta tres semanas después del trasplante.

1.1.5. INDICACIONES Y RESULTADOS CLÍNICOS

En general, el TPH está indicado para enfermedades neoplásicas y no neoplásicas cuya etiología reside en la médula ósea.

1.1.5.1.TPH EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

El fundamento de la utilización del TPH en las enfermedades neoplásicas se basa en que:

- ✓ La mayoría de las neoplasias son sensibles a los agentes citotóxicos, pero administradas a dosis tolerables por el paciente no son capaces de erradicar la enfermedad en una proporción importante de casos.
- ✓ Existe una correlación dosis-efecto antitumoral para diversos agentes citotóxicos, pero la limitación de la dosis viene dada por la toxicidad y ésta puede ser superada reconstituyendo el sistema hemopoyético destruido mediante la infusión de CPH alogénicas o autólogas.
- ✓ Existe, además, un efecto inmunológico antitumoral (eICL) cuando la enfermedad neoplásica es residual y el trasplante es alogénico.

1.1.5.1.1. TPH EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia aguda es la forma más común de neoplasia, representa el 30% de todos los cánceres de la infancia en Europa y EE.UU. El 80% de las leucemias agudas son linfoblásticas (LLA) y el resto son mieloblasticas (LMA). La LLA en la infancia presenta una máxima frecuencia entre los tres y los cinco años de edad, con un ligero predominio en el sexo masculino.

- **Tratamiento de la LLA en primera remisión**

En los últimos 30 años ha pasado de ser una enfermedad mortal a alcanzar en la actualidad una probabilidad de curación entre el 62% y el 78% (Figura 1.2). Esta mejoría se debe a los avances diagnósticos y terapéuticos así como al desarrollo de las medidas de soporte. El establecimiento de protocolos cooperativos llevados a cabo por instituciones dedicadas a la oncología infantil, también ha influido decisivamente en esta mejoría.

Protocolo	Pacientes	SLE	Autor
BFM (1983-86)	653	64% a 5 a.	Ritter ⁽²¹⁾
Dana Farber (1981-85)	289	72% a 7 a.	Clavell ⁽²²⁾
FRALLE (1983-87)	559	57% a 7 a.	Schaison ⁽²³⁾
MRC UKALL (1985-90)	1614	66% a 4 a.	Chessells ⁽²⁴⁾
POG (1986-90)	2404	66% a 4 a.	Crist ⁽²⁵⁾
SJCRH (1984-89)	358	71% a 5 a.	Pui ⁽²⁶⁾
SHOP (1989-93)	259	63% a 6 a.	Torras ⁽²⁷⁾
PETHEMA (1989-93)	184	64% a 5 a.	Ortega ⁽²⁸⁾

SLE: supervivencia actuarial libre de enfermedad.

BFM: Berlin Franckfurt Münster. Dana-Farber: Cancer Institute Boston.

FRALLE: French ALL. MRC: Medical Research Council, United Kingdom.

POG: Pediatric Oncology Group, Chicago.

SJCRH: St. Jude Children's Research Hospital, Memphis.

SHOP: Sociedades Españolas de Hematología y Oncología Pediátricas.

PETHEMA: Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas.

Figura 1.2. SLE según los protocolos de tratamiento para LLA en niños

Generalmente tras el diagnóstico de la enfermedad el paciente recibe un tratamiento de quimioterapia en el cual podemos diferenciar cinco etapas terapéuticas:

- INDUCCIÓN.

Tiene como finalidad conseguir la remisión de la enfermedad (menos de un 5% de blastos en MO y ausencia de síntomas clínicos atribuibles a la enfermedad), combina tres o cuatro drogas (suelen ser PRE, vincristina y L-asparaginasa) y dura entre tres y cuatro semanas

- INTENSIFICACIÓN-CONSOLIDACIÓN

Tiene como finalidad reducir la masa residual evitando la aparición de células leucémicas quimiorresistentes, combina las drogas utilizadas en la inducción y se realiza inmediatamente después de la inducción

- PROFILAXIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Tiene como finalidad eliminar y/o prevenir la aparición de células leucémicas en el SNC, dado que la mayoría de quimioterápicos utilizados no atraviesan la barrera hematoencefálica o lo hacen a dosis insuficientes. En general se utiliza MTX intratecal y en pacientes de alto riesgo con infiltración del SNC, además irradiación craneoespinal.

- MANTENIMIENTO

Tiene como finalidad prevenir las recaídas que se producen debido a la persistencia de células leucémicas quiescentes (en Go) poco sensibles a la quimioterapia. Asocia dos drogas (6-mercaptopurina y el metotrexato) y la duración desde el diagnóstico es de dos a tres años.

- TRATAMIENTO DE SOPORTE

Tiene como finalidad facilitar el empleo de quimioterapia específica cada vez más agresiva en los protocolos actuales. Comprende terapia sustitutiva de los componentes sanguíneos, diagnóstico y tratamiento de las complicaciones infecciosas, correcto manejo de las alteraciones metabólicas, control del estado nutricional y soporte psico-social del niño y su familia.

El reconocimiento de que la LLA es una enfermedad heterogénea y que los pacientes deben ser estratificados en grupos de riesgo para adoptar el tratamiento más adecuado en cada caso, ha favorecido la obtención de mejores resultados, al mismo tiempo que ha minimizado las secuelas de los tratamientos utilizados.

Los factores de riesgo más ampliamente considerados en la LLA infantil son:

- ✓ no alcanzar la remisión después de 4 ó 5 semanas del tratamiento de inducción,
- ✓ presentar la t(9;22)(q34;q11) o la reorganización BCR-ABL,
- ✓ lactantes con la t(4;11)(q21;q23) o con reorganización del gen MLL,
- ✓ pobre respuesta al tratamiento de inducción con persistencia de más de un 10% de blastos en el aspirado de MO en el día +14, con al menos otro factor de riesgo como puede ser leucocitosis inicial $>100 \times 10^9/l$, edad inferior a un año o superior a 10 años y fenotipo T.

Estos factores limitan una población con alto riesgo de recaídas que constituyen entre el 8 y el 10% de los pacientes diagnosticados de LLA. Estos pacientes tratados sólo con quimioterapia tienen una SLE inferior al 30%. Así, aunque el tratamiento indicado para los pacientes con LLA son los protocolos de quimioterapia establecidos, en este grupo de pacientes el más indicado, una vez alcanzada la remisión, es el TMO alogénico de un donante HLA-identico, con el que se consiguen supervivencias del 50 al 60% de los casos (Uderzo et al, 1997). En los pacientes con las alteraciones citogenéticas antes citadas, t(9;22) y t(4;11), que no tengan un donante HLA-identico, está indicada la búsqueda de un donante aunque tenga disparidad antigénica, aunque sea no emparentado o la búsqueda de un cordón

umbilical; incluso en otros casos el trasplante autólogo puede ser efectivo (Ortega y Olivé 1998).

- **Tratamiento de la LLA en segunda remisión**

El pronóstico de un paciente pediátrico que presenta una recidiva leucémica, depende del tiempo de duración de la primera remisión, de su localización, así como del tratamiento que ha recibido previamente.

Aquellos que han presentado la recidiva finalizado el tratamiento de quimioterapia, alcanzan más fácilmente la remisión que aquellos que recaen durante el tratamiento y tienen más probabilidades de mantenerla. La recidiva medular es la más frecuente, la recidiva del SNC ha disminuido a menos del 5% de los casos, y la recidiva testicular aislada es poco frecuente, pero puede observarse en el 5-10% de los pacientes varones con LLA infantil. La recidiva combinada, medular y extramedular, no implica peor pronóstico que la recidiva medular aislada. En sucesivas recidivas, la posibilidad de obtención de una nueva remisión es menor debido al desarrollo de resistencias. Las recidivas que se observan en la actualidad son más resistentes que las que se observaban hace unos años, en los que la intensidad del tratamiento inicial era menor.

En caso de recidiva medular, los pacientes que recaen tras una primera remisión de una duración superior a los tres años, tienen más probabilidad de alcanzar una segunda remisión. Existen discrepancias entre la aplicación del TPH en los pacientes pediátricos que recaen tardíamente, si bien está indicado para aquellos pacientes con recidiva en pleno tratamiento o antes de los 6-12 meses después de finalizado el mismo.

Con el TPH alogénico en pacientes afectos de LLA en segunda remisión, se obtienen SLE prolongadas en más del 40-60% de los pacientes. Con el trasplante autólogo, se han alcanzado SLE que varían entre el 29 y el 53%, obteniéndose mejores resultados cuando la duración de la primera remisión es más prolongada (Tabla 1.4). Si la duración de la primera remisión es superior a los 30 meses se alcanzan SLE del 61%, si es inferior a los 30 meses del 18% (Badell, 1997) (Figura 1.3). Estos resultados son mejores a los obtenidos con quimioterapia, que son del 10-20%, sobretodo en aquellos que han presentado una recidiva precoz (Torres et al, 1989; Dopfer et al, 1991).

Tabla 1.4. SLE en niños afectos de LLA trasplantados en segunda remisión

AUTOR	N	ACONDICIONAMIENTO	DONANTE	%SLE	%RECAIDA
Sanders (1987) FHCC. Seattle	57	CY+ICT	HI	40	42
Brochstein (1987) MSKCC	31	CY+ICT hiperfraccionada	HI	64	13
Dopfer (1991) Germany	51	CY+ICT VP16+ICT	HI	52	40
Barrett (1994) IBMTR	255	VARIABLE	HI	40	54
Oakhill (1996) RHSC. Bristol	50	CY+ICT+CAMPATH-G	NF	53	30
Parsons (1996) DFCI. Boston	57	VP16+CY+ICT	AUTÓLOGO (PURGADO)	47	31
Badell (1996) HIVH. Barcelona	47	VP16+CY+ICT	AUTÓLOGO (PURGADO)	43	35

HI, donante hermano HLA idéntico. NF, donante no relacionado

En la recidiva extramedular, con quimioterapia se consigue una supervivencia prolongada en el 20-40% de los pacientes, si bien presentan alto riesgo de recidivas hematológicas y secuelas (Ortega et al, 1987 y Uderzo et al, 1990). Las indicaciones del TPH y los resultados obtenidos en pacientes con recidiva extramedular precoz, son similares a los que presentan recidiva medular (Badell, 1997) (Figura 1.4). Si la recidiva es aislada y tardía puede ser tratada sólo con quimio y radioterapia.

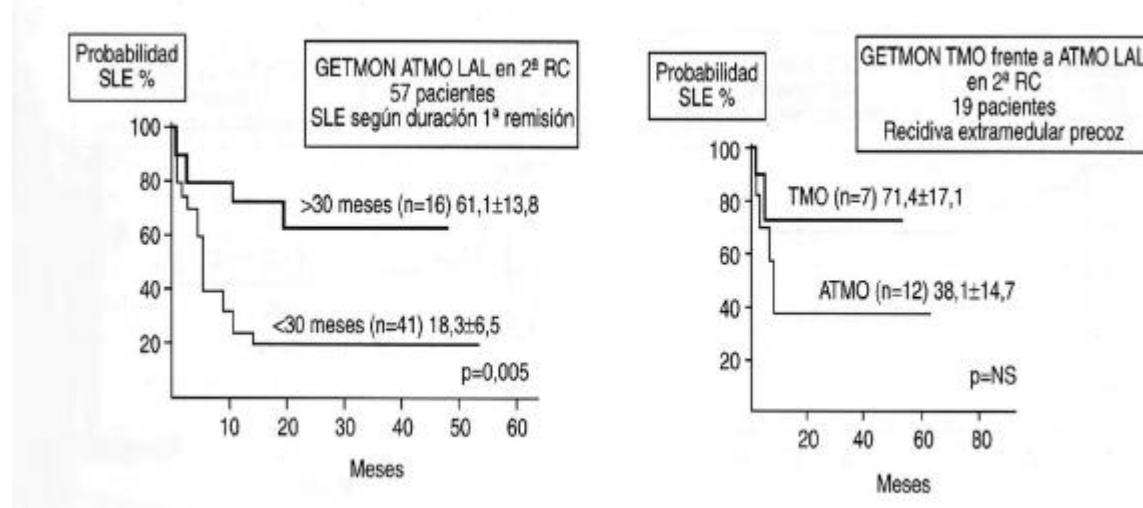


Figura 1.3. Influencia en la SLE de la duración de la primera remisión en niños autotrasplantados afectos de LLA. SLE en niños afectos de LLA con recidiva extramedular precoz después de recibir un autotrasplante o un alotrasplante.

- **Tratamiento de la LLA en estadios avanzados**

La única elección para el rescate de pacientes afectos de LLA en remisión parcial, en tercera remisión o en sucesivas remisiones es una quimioterapia intensiva seguida de un TPH alogénico. En estos casos la tasa de mortalidad debida a complicaciones es muy alta, y la probabilidad de obtener SLE prolongadas es sólo del 20%.

La inmunoterapia post-trasplante, con infusión de linfocitos del donante y el empleo de linfocinas, se está comenzando a utilizar como terapia alternativa en estos pacientes.

1.1.5.1.2. TPH EN LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

La LMA representa el 20% de todas las leucemias agudas infantiles. Durante los años 60 sólo el 3% de los niños con LMA conseguían sobrevivir más de cinco años, en los últimos 25 años este porcentaje se ha multiplicado por diez y actualmente, con diferentes combinaciones de quimioterapia entran en remisión completa (RC) entre el 80% y el 85% de los niños. Según el estado de la enfermedad las terapias utilizadas para el mantenimiento de la remisión incluyen la quimioterapia adicional, el trasplante alogénico de MO y el TPH autólogo.

1. Tratamiento de la LMA en primera remisión

La utilización del TPH en la LMA en primera remisión es objeto de debate. En estudios de los últimos 15 años, realizados en Europa y en Estados Unidos, muestran que utilizando sólo quimioterapia entre el 40% y el 60% de los niños presentan 5 años de SLE post-remisión (Lie, 1995). Mientras que con el trasplante alogénico de MO de un donante HLA idéntico el porcentaje oscila entre el 55% y el 80% (Figura 1.4) (Dini et al, 1994; Dinndorf y Bunin 1995; Michel et al, 1996).

Author	n	Conditioning	% Relapses	% TRM	% DFS	flu years
Sanders (1985) FHCC, Seattle	38	CYCLO+TBI	13	21	64	4
Weisdorf (1988) Minnesota	38	CYCLO+TBI	15	28	61	3
Brochstein (1987) MSKCC	24	TBI+CYCLO	0	34	66	2
Feig CCG-251 (1987) CCG-213 (1993)	67	CYCLO+TBI	22	31	54	4
Dini (1994) AIEOP-GITMO	74	CYCLO+TBI	35	11	39	4
Dini (1994) AIEOP-GITMO	59	CYCLO+TBI (50)	23	20	58	5
Michel (1996) SFHIP	33	CYCLO+TBI	26	3	72	4

Figura 1.4. Porcentaje de recaídas, SLE y mortalidad relacionada con el trasplante en niños afectos de LAM en primera RC sometidos a un TMO alogénico. CICLO, ciclofosfamida. TBI, irradiación corporal total.

En la mayoría de estudios comparativos realizados, la probabilidad de recaída es menor y la SLE mayor en el grupo de pacientes que reciben un trasplante alogénico que los que reciben sólo quimioterapia adicional. En el estudio francés LAME 89/91 (Michel et al, 1996), la SLE fue del 72% en el grupo de pacientes transplantados frente al 48% del grupo de pacientes que recibieron quimioterapia; la probabilidad de recaída también fue menor en el grupo de pacientes transplantados, entre un 10% y un 20%, pero sin embargo la mortalidad relacionada con el trasplante debido principalmente a la EICH y a las complicaciones infecciosas fue relativamente alta entre un 10% y un 15%.

Por otro lado los resultados obtenidos con el TPH autólogo en LMA en primera remisión son controvertidos. Mientras en algunos estudios multicéntricos no obtienen ninguna ventaja del empleo del trasplante autólogo en relación con el uso de la quimioterapia (Ravindranath et al 1996), en otros consiguen SLE similares a las obtenidas con el empleo del TMO alogénico HLA idéntico (Figura 1.5).

<i>Author</i>	<i>n</i>	<i>Months in CR</i>	<i>Conditioning</i>	<i>Purging</i>	<i>% DFS</i>	<i>flu mo</i>
Tiedemann (1996) RCH. Melbourne	49	5	MELF	NO	69	72
Ortega (1997) HIVH. Barcelona	34	3	CYCLO + TBI BU + ETO + CYCLO	YES	82	62
Bonetti (1997) AIEOP-BMTG	33	3.5	TBI + MELF	YES	78	16
Yaniv (1997) SCMC-Israel	13	3	MELF	NO	83	12

Figura 1.5. SLE en niños afectos de LMA en primera RC sometidos a un TPH autólogo. CYCLO, ciclofosfamida. TBI, radiación corporal total. BU, busulfán. MELF, melfalán. ETO, etopósido.

Actualmente se está considerando el tratamiento de mantenimiento o de post-consolidación de acuerdo con el riesgo de recaída, delimitando tres grupos de riesgo:

- ✓ Pacientes con LMA M3 o promielocítica, con presencia de la t(15;17)(q22;q11-q21) y reordenamiento PML-RAR α . El 90% de estos pacientes alcanzan la remisión con un tratamiento de inducción basado en una combinación de antraciclinas y ácido trans-retinóico (ATRA). Con la consolidación y la terapia de mantenimiento en adultos se alcanzan SLE del 70-80%. Por lo tanto en este grupo de pacientes el TMO alogénico o el TPH autólogo está indicado sólo si persiste el reordenamiento PML-RAR α después de la consolidación y después de una recaída.
- ✓ Pacientes con LMA M7 con síndrome de Down. Presentan una buena respuesta a la quimioterapia y no requieren un trasplante en primera remisión.
- ✓ Pacientes con LMA M2 y bastones de Auer, o M4 con eosinofilia, con la traslocación t(8;21)(q22;q22) y la inv(16)(p13q22) respectivamente. Representan, junto con los pacientes con LMA M3, el 30% de los pacientes con LMA, y se consideran un grupo de buen pronóstico que responden bien al tratamiento de inducción y que pueden beneficiarse de tratamientos menos agresivos. Sólo con quimioterapia presentan SLE del 70% en contraste con el 35% que presentan los otros pacientes (Creutzig et al, 1995).

En el resto de pacientes con LMA el TMO alogénico o el TPH autólogo estaría indicado como primera opción tras alcanzar la remisión.

- **Tratamiento de la LMA en segunda remisión**

Menos de la mitad de los pacientes que recaen alcanzan una segunda remisión y se estima que la supervivencia total de los niños que recaen oscila entre el 21-24% (Webb et al, 1997).

Después de la recaída el tratamiento de elección es el TPH alogénico o autólogo. Aproximadamente el 40% de los niños trasplantados en segunda remisión presentan supervivencias prolongadas.

1.1.5.1.3. TPH EN LINFOMAS

Los linfomas son neoplasias del sistema linfoide que se caracterizan por su gran heterogeneidad histológica y clínica. Las manifestaciones clínicas y la respuesta terapéutica difieren mucho de unos casos a otros.

- **Tratamiento de los Linfomas no Hodgkin (LNH)**

Con las combinaciones quimioterápicas actuales se consiguen largas SLE en el 30-45% de los pacientes con LNH agresivos (Fiser et al, 1993). La curación después del fallo de dos o más regímenes de poliquimioterapia es excepcional y con los tratamientos de rescate actuales se han descrito respuestas en el 21-37% de los casos, pero la SLE a largo plazo es inferior al 10% (Rodríguez et al, 1995). Estos malos resultados favorecen la indicación de un TPH teniendo en cuenta la situación clínica del paciente, los factores pronóstico y la sensibilidad del linfoma a la quimioterapia. En niños la indicación de un TPH en primera remisión se limita a los casos con falta de respuesta al tratamiento de inducción inicial y en los casos de recidiva quimiosensible. En la experiencia del Grupo Español de Trasplante de Médula en niños (GETMON), la SLE fue del 85% para los trasplantados en 1^a remisión y del 68% para los que se hallaban en 2^a remisión (Bureo et al, 1995). En general, se prefiere practicar un TPH autólogo salvo en casos de remisión parcial o con afectación medular donde estaría más indicado un trasplante alogénico.

- **Tratamiento de los Linfomas Hodgkin**

El tratamiento inicial de los pacientes con la enfermedad de Hodgkin se basa en la radioterapia en los estadios iniciales y en la quimioterapia en los estadios avanzados. Hasta un 80% de los enfermos se curan con el tratamiento en primera línea. Un 10-15% de los pacientes son resistentes al tratamiento inicial y hasta un 30% puede presentar una recaída

de la enfermedad. Por lo tanto, el TPH está indicado en los casos en los que se consigue una remisión parcial después del tratamiento o en aquellos otros en los que la duración de la remisión inicial es inferior a 12 meses (Iriondo et al, 1994). Al igual que en los LNH, el TPH en primera remisión estaría indicado sólo para los casos de mal pronóstico.

1.1.5.1.4. TPH EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS Y EN LOS SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) y los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMP) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades cuyo origen es la expansión clonal de una CPH multipotente o pluripotente.

- **Tratamiento de los SMD**

Los SMD son poco frecuentes en niños, representan el 3% de las neoplasias hematológicas pediátricas, aunque se considera que un 17% de los casos de LAM podrían tener una fase previa de mielodisplasia. En general estos pacientes presentan una elevada mortalidad y entre un 20% y un 30% sufren una transformación hacia una LAM.

Según la heterogeneidad clínica que presentan se clasifican en cinco subtipos morfológicos: Anemia refractaria (AR), AR con sideroblastos en anillo (ARSA), AR con exceso de blastos (AREB), AREB en transformación (AREB-t) y leucemia mielomónica crónica (LMMC) (Bennett et al, 1982). Los subtipos menos agresivos, la AR y la ARSA, son poco frecuentes en niños, mientras que la mayoría de niños con un SMD presentan alguno de los subtipos de peor pronóstico (RAEB, RAEB-t o LMMC) (Gadner y Haas 1992).

La LMMC es el SMD más frecuente en niños, representa menos del 2% de todas las leucemias infantiles, tiene una mayor incidencia en niños varones menores de dos años y en pacientes con neurofibromatosis tipo I. Se caracteriza por presentar un curso clínico muy agresivo y aunque los pacientes raramente muestran una transformación clara a crisis bástica, la media de supervivencia no supera los 10 meses desde el diagnóstico (Niemeyer et al, 1997). Los factores pronósticos en los SMD asociados a corta supervivencia son:

- ✓ dos o tres citopenias, particularmente anemias ($<10\text{g/dl}$ Hb) y trombocitopenias ($<100\times10^9/\text{l}$ plaquetas)
- ✓ número elevado de blastos en MO, entre un 11% y un 30%

- ✓ y alteraciones cromosómicas, especialmente anomalías del cromosoma 7 y cariotipos complejos
- ✓

La respuesta a la quimioterapia en niños con SMD es limitada y complicada, con prolongados períodos de aplasia; la duración de la remisión suele ser corta. En pacientes con un porcentaje de blastos en MO superior a un 15% (RAEB o RAEB-t) se recomienda administrar un protocolo de quimioterapia igual al de las LMA, con el fin de reducir el riesgo de recaída post-trasplante.

Actualmente el TPH alogénico es el único tratamiento curativo para pacientes jóvenes con SMD. Con un TMO alogénico de un donante HLA idéntico se consiguen SLE en el 60% de los casos. Los mejores resultados se han obtenido en las formas menos agresivas, AR, ARSA y en AREB caracterizadas por un bajo número de blastos en MO (Anderson et al, 1993). En formas más agresivas los resultados son peores, en la LMMC con un TMO alogénico HLA idéntico se consiguen SLE del 40% y si el donante es no relacionado del 20% (Locatelli et al, 1997).

En las formas más agresivas se aconseja realizar el trasplante lo antes posible desde el diagnóstico de la enfermedad para evitar la progresión a LMA (Anderson et al, 1993).

- **Tratamiento de los SMP**

La leucemia mieloide crónica (LMC) es el SMP más frecuente en niños, representa el 2-5% de todas las leucemias infantiles. En el 95% de los casos la LMC se acompaña de la t(9;22)(q34;q11), que da lugar al cromosoma Philadelphia (Ph). El gen químérico resultante es el BCR-ABL, producto de la translocación del protooncogen de Abelson (c-abl) del cromosoma 9 en una región restringida del cromosoma 22 denominada *breakpoint cluster region* (bcr). En la mitad de los casos de LMC Ph negativa se puede demostrar la presencia del reordenamiento del gen BCR-ABL. Se han descrito variantes del gen BCR-ABL según la localización de los puntos de rotura en el intrón del BCR y también según la región de fusión del BCR. Estas variantes no parecen conferir una evolución clínica o una sensibilidad al tratamiento distinta.

La LMC tiene un curso bifásico, con progresión a la fase blástica (FB) después de un periodo más o menos largo o fase crónica (FC) en el que la enfermedad se controla bien con el tratamiento. En un 60% de casos la FB está precedida de una fase de aceleración (FA). Durante la FB la enfermedad se comporta como una leucemia aguda refractaria al tratamiento.

Hasta 1980, la supervivencia media de los enfermos con LMC era de 3,5 a 4,5 años. Tanto la hidroxiurea (HU) como el busulfan (BU) consiguen normalizar el hemograma, reducir el tamaño del bazo y/o del hígado y la desaparición de los síntomas, pero apenas modifica el porcentaje de células Ph positivas (Ph+). La utilización de protocolos de quimioterapia similares a los utilizados para la LMA, permite obtener remisiones hematológicas transitorias de tres a nueve meses de duración y reducir el porcentaje de células Ph+ en un 30-50% de los pacientes pero sin alargar de manera significativa la supervivencia al no retrasar la evolución hacia la FB.

En las últimas décadas, el interferón (IFN) y el TPH han mejorado el pronóstico de la LMC. Estos tratamientos consiguen la disminución e incluso desaparición del cromosoma Ph y del reordenamiento BCR-ABL y en el caso del TPH alogénico muchas veces la curación de la enfermedad. El tratamiento de la LMC debe incluir el estudio citogenético sistemático y el estudio molecular, en especial, para el seguimiento del trasplante, ya que el conocimiento de la intensidad de las respuestas es importante para la toma de decisiones terapéuticas.

El IFN α consigue controlar la LMC y disminuir el clon Ph+ lo que permite establecer la hemopoyesis a partir de las células sanas de la MO en un porcentaje elevado de pacientes (Claxton et al, 1992). El IFN logra un 30%-80% de remisiones hematológicas completas en la FC precoz (<1año después del diagnóstico) y hasta un 18%-56% de respuestas citogenéticas, siendo un 6%-26% respuestas citogenéticas completas. La respuesta al IFN permite predecir el pronóstico de la LMC, ya que los pacientes con respuesta citogenética mayor tienen una supervivencia media de 8,5 años (Kloke et al, 1993). La asociación de IFN con arabinósido de citosina (ARA-C) a bajas dosis consigue aumentar la tasa de remisiones hematológicas y citogenéticas pero a costa de una mayor toxicidad global (Guilhot et al, 1996). Recientemente se está ensayando la utilización de retinoicos (ATRA) por sus efectos reguladores de la apoptosis y de la diferenciación celular (Meyskens et al, 1995).

Hasta el momento, el TPH alogénico es la única alternativa curativa para la LMC. De los datos de los Registros Internacional y Europeo de trasplante (Bortin et al, 1993; Goldman et al, 1993) se desprenden tasas de supervivencia a los 3-5 años del TPH alogénico de un donante HLA idéntico del 40-80% para los pacientes transplantados en FC y sólo del 10% si el trasplante se lleva a cabo en fases más avanzadas. El riesgo de recaídas es alto, con una probabilidad de recaída clínica del 22% y citogenética del 31%. El trasplante de donante no emparentado presenta una mayor mortalidad relacionada con el procedimiento, debido a una mayor incidencia de la EICH (54% de los casos) y a un alto índice de fallo de implante (16%). Sin embargo se consiguen SLE entre el 40 y el 60% de los pacientes transplantados en

FC precoz, cifras similares a los obtenidos con el TPH de hermanos genotípicamente idénticos. En los pacientes que no disponen de donante o en los de edad superior a 50 años se ha ensayado el tratamiento de quimioterapia o quimio-radioterapia seguido de un TPH autólogo realizado durante la FC, consiguiendo en algunos casos, la negativización temporal, total o parcial, del cromosoma Ph. Hoyle et al, (1994) consiguen una supervivencia a los 5 años del 56% en pacientes sometidos a un TPH autólogo en FC. El trasplante autólogo más allá de la FC no consigue remisiones duraderas, ya que estos suelen recaer a los 6-12 meses del trasplante. Para optimizar los resultados del TPH autólogo se intenta, después de una quimioterapia más o menos intensiva obtener clones de células progenitoras Ph negativas, aprovechando la circunstancia de una más pronta recuperación de éstas respecto a las células Ph positivas; esto sólo se consigue en una proporción relativamente pequeña de casos.

1.1.5.1.5. TPH EN TUMORES SÓLIDOS

El TPH se práctica especialmente en tres indicaciones:

- En **neuroblastomas** en estadios III y IV de niños de más de un año de edad en primera y en segunda remisión. Los resultados iniciales son esperanzadores, sin embargo la relativa frecuencia con que aparecen recidivas tardías sugieren que la terapia mieloablativa prolonga la supervivencia pero probablemente no consigue nuevas curaciones. Actualmente se realizan estudios empleando tratamientos con la IL-2.
- En **rabdomiosarcomas**, el TPH autólogo está indicado como consolidación de una remisión completa o parcial en casos de enfermedad de alto riesgo y en segunda remisión completa. En el registro Europeo se han descrito supervivencias del 28% a los 3 años para los tratados en primera remisión y del 12 % para los transplantados en segunda remisión (Landenstein et al, 1993).
- En **sarcomas de Ewing** la indicación es en primera remisión completa o parcial en casos de alto riesgo, como son los de localización pélvica y los que presentan metástasis óseas o medulares. La supervivencia para estos pacientes según datos del registro Europeo es del 25% a los 2 años (Ladenstein et al, 1993).

1.1.5.2. TPH EN ENFERMEDADES NO NEOPLÁSICAS

Agrupa a un conjunto de enfermedades irreversibles de cualquiera de las subpoblaciones medulares originadas en la médula ósea, que incluyen aplasias, enfermedades genéticas del sistema inmunitario o hemopoyético y enzimopatías generalizadas en cuya expresión clínica es decisiva la participación del sistema mononuclear fagocítico.

En estos procesos el TPH tiene como finalidad la de sustituir la población celular de la médula enferma casi inexistente, como ocurre en las aplasias medulares, o no funcional incapaz de producir en cantidad o calidad suficientes ciertos elementos celulares sanguíneos, como en el caso de hemopatías congénitas graves, inmunodeficiencias y ciertas enfermedades metabólicas, por otra derivada de un donante sano. Son indicaciones preferentes de un TPH alogénico.

- En **aplasias medulares graves**, cuando el donante es un hermano HLA-ídéntico las probabilidades de curación son en torno al 90%, si el donante es no emparentado las probabilidades descienden al 30%.
- En **inmunodeficiencias congénitas**, actualmente el TPH alogénico está indicado para el tratamiento de: las **inmunodeficiencias combinadas graves (IDCG)** en todas sus modalidades, el **síndrome de WisKott-Aldrich (SWA)**, la deficiencia de antígenos de clase II, la **deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD)**, o la **linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (LHF)**, entre otras. Cuando estos pacientes tienen un donante hermano HLA-ídéntico la tasa de éxito es superior al 90% (Porta y Friedrich, 1998). Las posibilidades de evolución favorable con donantes familiares haploidénticos son del 50% en tanto que con donantes no emparentados compatibles llegan al 70%. En ambos casos es necesario eliminar la mayor parte de los linfocitos T del producto a infundir.
- En **enfermedades metabólicas congénitas**, el TPH alogénico de un donante hermano HLA-ídéntico está indicado especialmente en las **mucopolisacaridosis tipos I y II**, en la **enfermedad de Gaucher tipos I y III** y en la **leucodistrofia metacromática**, entre otras. Los resultados varían según el tipo de enfermedad. Es importante realizar el trasplante antes de que la afectación neurológica sea grave.
- En enfermedades congénitas como, la **Anemia de Fanconi (AF)** que es un síndrome de inestabilidad cromosómica, de herencia autosómica recesiva, descrita por primera vez por Fanconi en 1927, responsable de la forma más frecuente de anemia aplásica congénita. La

evolución a un SMD o a una LMA se da en el 52% de los pacientes que alcanzan los 40 años de edad (Butturini et al, 1994). La presencia de una alteración cromosómica clonal puede indicar la evolución a estas neoplasias hematológicas que confieren un peor pronóstico. Estos pacientes suelen ser tratados con andrógenos, esteroides y factores de crecimiento pero sólo un TPH alogénico puede conseguir la curación de la enfermedad. La edad temprana y un conteo alto de plaquetas en el momento del trasplante, así como el uso de baja dosis de CY y de radiación, están relacionadas con un aumento en la supervivencia. Según el registro internacional con un donante hermano HLA-identico el 66% de los pacientes alcanzan 5 años libres de enfermedad, con otro tipo de donante los resultados son muy inferiores (Gluckman et al, 1995).

1.1.6. TRATAMIENTO DE RESCATE POST-TRASPLANTE. INFUSIÓN DE LINFOCITOS DEL DONANTE

Las opciones terapéuticas de las recaídas tras el TPH son limitadas e incluyen entre ellas un segundo TPH, opción que tiene alta morbi-mortalidad por toxicidad y escasa SLE (Radich, 1993). La quimioterapia en estos casos no logra remisiones duraderas y el uso del IFN α en el tratamiento de las recaídas de LMC post-trasplante se ha mostrado útil en

algunos casos, logrando incluso remisiones completas citogenéticas y moleculares, pero su impacto en la supervivencia a largo plazo está por establecer.

Están siendo evaluadas desde hace tiempo (Slavin et al, 1993) distintas formas de inmunoterapia celular con leucocitos del donante, administradas post-trasplante para incrementar el eICL. El mecanismo de acción de los leucocitos se basa en el efecto EICL producido por células no idénticas a las responsables de la EICH; como son los linfocitos T, las células NK, y el sistema monocito-macrófago. Estas células reconocerían los antígenos del sistema HLA presentes en las células del receptor y posibles antígenos específicos de la célula leucémica como el péptido de fusión P-210 en la LMC. La eficacia del eICL radicaría en la eficacia de los leucocitos infundidos en reconocer antígenos específicos que sería deseable manipular para que se encontraran sólo en la célula leucémica.

Kolb et al, (1990,1993) demostraron en animales y en el hombre que es posible la inmunoterapia con leucocitos del donante, sin excesiva toxicidad, cuando se infunden en pacientes que han recaído después de recibir un TPH alogénico en el que el injerto ha prendido y se ha establecido una quimera con un cierto grado de tolerancia inmune (alrededor del día +60), no siendo necesaria una inmunosupresión adicional. En el control de las recaídas de la LMC en fase crónica la eficacia de los leucocitos del donante para lograr remisiones completas llega a ser del 70-80% (Kolb et al, 1995; Mackinnon, 1995). Tras ILD en pacientes con recaídas citogenética o hematológica en fase crónica la probabilidad de una nueva recaída a los tres años es del 20% (Kolb et al, 1995), cifra que puede llegar al 100% en un año si los pacientes se encuentran en fase blástica.

La inducción del eICL con leucocitos del donante se ha mostrado también eficaz en el control de las recaídas de las leucemias agudas post-trasplante (Forés et al, 1996). El estudio cooperativo del EBMT (Kolb et al, 1995) muestra que la ILD puede inducir nuevas remisiones completas en el 29% de las recaídas post-TMO de las LMA y ninguna eficacia en las LLA. La indicación y el momento de la ILD en las leucemias agudas es controvertido ya que la agresividad de algunas formas de recaída no permiten el tiempo necesario para el desarrollo del efecto ICL. La ILD post-trasplante tiene efectos secundarios importantes:

- El desarrollo de la EICH.

Alguna forma de EICH aguda ocurre en el 80% de los casos en un promedio de 32 días tras la infusión; en caso de donantes no emparentados o parcialmente idénticos suele aparecer en menos de dos semanas y los grados II a IV se observan en un 45% de los pacientes (Pati et al, 1994). La EICH crónica se observa en el 70% de los pacientes. La toxicidad de la EICH observada en estos casos es menor que la que cabría esperar si fuese el

período agudo post-TPH. En general no se suele administrar profilaxis inmunosupresora en el momento de la ILD excepto en los pacientes que reciben leucocitos de donantes no emparentados.

Se han planteado estrategias que persiguen la obtención de un máximo eICL con el mínimo EICH posible. Mackinnon (1995), efectúa una administración gradual de linfocitos T del donante logrando un eICL cuando se llegaba a un número de células T entre 1×10^7 a $1 \times 10^8/\text{kg}$. Otros autores hacen depleción selectiva de la subpoblación CD8 de linfocitos T reduciendo la EICH sin reducir el eICL (Giralt y Champlin, 1994). Incluso en algunos centros se han transfectado los linfocitos T del donante con el gen timidin-kinasa del virus herpes simple, de forma que si se observa una EICH grave se puede tratar al paciente con ganciclovir y los linfocitos T transfectados se destruirían (Bonini et al, 1994).

- Otros efectos adversos

El desarrollo de citopenias que en forma moderada son muy comunes tras la infusión y al comienzo de la EICH mientras que las formas graves con aplasia ocurren en un 20-30% de los pacientes (van Rhee et al, 1994). Y entre el 12 y el 15% requiere reinfusión medular de un donante para su recuperación. El desarrollo de las formas de aplasia medular más graves guarda relación con el grado de quimera mixta (coexistencia de células del donante y del paciente) existente y la cuantía de la recaída leucémica en el momento de la infusión de leucocitos, siendo menor el riesgo de aplasia si hay quimera mixta y la enfermedad residual es mínima (van Rhee et al, 1994).

La mortalidad inherente a este procedimiento terapéutico bien por infecciones, aplasia, EICH u otras complicaciones ha sido estimada en un 10-20% que es sensiblemente inferior a la de un segundo trasplante (Kolb et al, 1995).

1.2. CONCEPTO DE QUIMERISMO

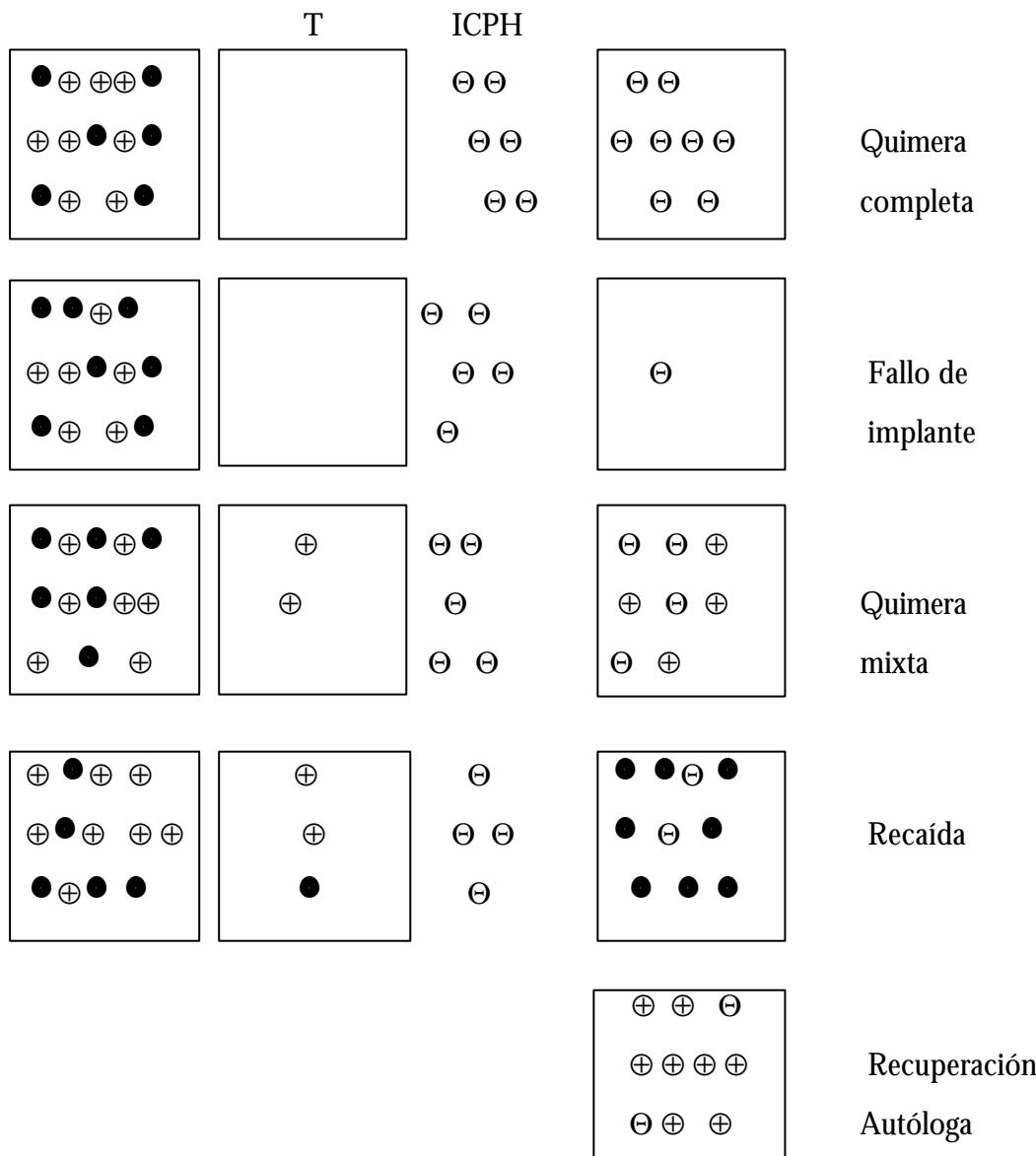
El término quimera se utiliza para designar a un organismo en cuyo cuerpo coexisten de forma espontánea o artificial, poblaciones celulares de diferentes individuos de la misma o diferente especie.

En 1956 Ford introduce el término *radiation chimaera* para hablar de un ratón cuyo sistema hemopoyético había sido irradiado y sustituido por CPH de otro ratón.

En la actualidad, el TPH alogénico es una terapia ampliamente establecida dentro del tratamiento de las enfermedades hematológicas, siendo capaz de sustituir la hemopoyesis del paciente por una nueva hemopoyesis originada a partir de células progenitoras hemopoyéticas de un donante. Dependiendo de la intensidad del régimen de acondicionamiento, entre otros factores, y en función de si se consigue o no erradicar de forma completa la hemopoyesis del paciente o receptor podemos hablar de diferentes posibilidades de reconstitución de la hematopoyesis (Figura 1.6):

- ✓ Si la erradicación es total y se implantan las células del donante, hablamos de una **quimera completa del donante (QC)**.
- ✓ Si la erradicación es parcial y no se destruye totalmente la hemopoyesis del paciente, coexisten células del donante y del receptor y hablamos de **quimera mixta (QM)**. En este caso las células del receptor pueden ser todas sanas, o bien persistir células leucémicas (en neoplasias hematológicas) que pueden provocar la recaída de la enfermedad. Estas células leucémicas constituyen lo que se conoce como enfermedad mínima residual (EMR).
- ✓ Si la erradicación es total, pero las células del donante no se implantan (por problemas inmunológicos principalmente), hablamos de un **FI**, que como ya se ha citado se da con frecuencia en TPH donde se infunde un producto deplecionado de linfocitos T.
- ✓ Si no se consigue erradicar completamente la hemopoyesis del paciente y las células del donante no logran implantarse, la reconstitución hemopoyética se puede producir a expensas de células del propio paciente y hablamos de una **recuperación autóloga (RA)**, si estas células son leucémicas se produce recidiva de la enfermedad.

Figura 1.6. Posibilidades de reconstitución de la hemopoyesis después de un TPH alogénico.



⊕ célula hemopoyética sana del paciente o receptor

● célula hemopoyética neoplásica del paciente o receptor

Θ célula hemopoyética sana del donante

T, régimen de acondicionamiento. ICPH, infusión de células progenitoras hemopoyéticas del donante.

El conocimiento del origen de la población celular que está regenerando la médula sustituida se hace necesario con el fin de adoptar las consideraciones terapeúticas más adecuadas en cada momento.

1.2.1 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DEL QUIMERISMO

La evaluación de la reconstitución hemopoyética, como se ha visto en el capítulo anterior sigue unos parámetros hematológicos que permiten controlar la evolución clínica del paciente durante los primeros meses del trasplante, pero de los que no se puede obtener información alguna sobre el origen celular del nuevo sistema hemopoyético que se está formando. En las últimas décadas se han desarrollado diferentes metodologías que permiten conocer cualitativa y cuantitativamente el origen de éstas nuevas células hematopoyéticas, a la vez que permiten realizar un seguimiento exhaustivo del injerto en los pacientes transplantados.

Las técnicas más utilizadas actualmente son:

- El estudio del fenotipo eritrocitario
- El estudio de los cromosomas sexuales mediante el análisis citogenético, técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y PCR
- El estudio de polimorfismos de DNA mediante *Southern blotting* y PCR

Todas ellas son capaces de distinguir entre células del receptor y del donante, sin embargo presentan ventajas e inconvenientes que se describen a continuación.

1.2.1.1 ESTUDIO DEL FENOTIPO ERITROCITARIO

Permite distinguir las células del receptor y del donante cuando éstas tienen diferencias en su fenotipo eritrocitario. Nos da una visión cualitativa del estado del injerto y la sensibilidad de la técnica oscila entre el 0,01% y el 1% (Bar et al, 1989).

En la primera etapa del trasplante donde los requerimientos transfusionales pueden ser considerables, la información que se obtiene no es valorable, ya que las repetidas transfusiones impiden determinar si los antígenos detectados corresponden a los hematíes transfundidos o a los del receptor. A partir de los seis meses del trasplante el estudio de los antígenos eritrocitarios muestra una alta sensibilidad. Sin embargo sólo proporcionan información de una sola línea celular, esto puede provocar que el paciente recaiga sin que se detecte la presencia de una eritropoyesis del paciente (Frassoni et al, 1990).

1.2.1.2 ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

El estudio citogenético permite distinguir las células del donante de las del receptor cuando éstas son de diferente sexo. La técnica requiere células en división. Nos da información cualitativa y cuantitativa en todo momento del estado del injerto y la sensibilidad de la técnica depende del número de metafases analizadas. Estudiando 20 metafases es del 10% y estudiando 45 metafases es del 5% (Lawler et al, 1984).

La técnica FISH permite realizar el estudio tanto en metafase como en interfase, aumentando la sensibilidad de la citogenética, a la vez que sigue dando una información cuantitativa del estado del injerto. Actualmente se realiza la hibridación simultánea con las sondas de DNA específicas para los cromosomas sexuales X e Y, marcadas con dos fluorocromos distintos, lo que permite visualizar las dos señales en un núcleo interfásico. Si tenemos en cuenta que la pérdida del cromosoma Y en mosaico es frecuente en neoplasias hematológicas, la utilización sólo de la sonda del cromosoma Y puede causarnos una tasa de falsos negativos del 2,5% (White et al, 1995); por lo tanto la utilización de ambas sondas a la vez permite realizar un control interno de la técnica reduciendo la tasa de falsos negativos y falsos positivos. La sensibilidad de la técnica es del 1% (Palka et al, 1996).

Con ambas técnicas, citogenética y FISH se ha observado que durante los primeros 14 días del trasplante en más de un 50% de los casos de pacientes con anemia aplásica y con LMC, quedan células hemopoyéticas del paciente (Huss et al, 1996). Incluso después de un año de seguimiento en un porcentaje elevado de pacientes en remisión se sigue observando más de un 1% de células del paciente (Palka et al, 1996). En las series estudiadas existe una oscilación durante el seguimiento en el número de células detectadas en un mismo paciente. Se puede detectar una hemopoyesis residual del paciente que se convierte en un **quimerismo mixto transitorio (QM_t)** ya que no persiste en el siguiente control. Esta oscilación puede atribuirse, aparte de a la detección de un resurgir de la hemopoyesis del paciente, a una posible contaminación de la muestra por células del estroma medular, cuyo origen es motivo de controversia. Probablemente parte del estroma medular no es destruido con el régimen de acondicionamiento previo al trasplante y por lo tanto el estroma medular puede ser regenerado a partir de las células del propio paciente. La existencia de contaminación por células del estroma se pone de manifiesto cuando se estudian muestras directas de MO sin cultivar, aquí el porcentaje de

estas células llega al 3% frente a menos de un 1% cuando se estudia la muestra a partir de un cultivo celular (Wessman et al, 1993). Aunque se siguen detectando células del paciente después del año del trasplante, y en algunas series existe una relación significativa entre presencia de QM y probabilidad de recaída (Tabla 1.8), se considera predictivo de recaída sólo cuando se produce un aumento seriado de las células del paciente (Bernaconi et al, 1997)

Tabla 1.8. QM y recaída según las diferentes metodologías

AUTOR	TECNICA	ENF	N	%QM	%QMR	%QCR
Huss (1996)	FISH (X/Y)	LMC	197	51	17	18
Bader (1998)	Cuantitativa PCR (VNTR)	LA/SMD	55	33	50	19
Diez-Martín (1998)	FISH (X/Y)	EH	21	47	30	27
Choi (2000)	PCR (microsatélites)	LA	30	47	14	31

ENF, enfermedad. N, número de pacientes estudiados. %QM, % de pacientes con quimera mixta. %QMR, % de pacientes con quimera mixta que recaen. %QCR, % de pacientes con quimera completa que recaen. LA, leucemia aguda. SMD, síndrome mielodisplásico. EH, enfermedades hematológicas. LMC, leucemia mieloide crónica.

1.2.1.4 ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE DNA POR SOUTHERN BLOTTING Y PCR

El análisis de las secuencias polimórficas del DNA constituye un método informativo y versátil para poder distinguir entre las células del donante y las del receptor. Su aplicación es independiente de la identidad de sexo.

Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) consisten en fragmentos de DNA que se han originado mediante pérdida o ganancia de un punto de reconocimiento para un enzima de restricción, o por la inserción o delección de pares de bases de DNA entre los puntos de restricción. El resultado es la formación de dos alelos polimórficos. Existen además los polimorfismos de longitud basados en la presencia de un número variable de fragmentos de DNA de igual tamaño que se repiten en *tandem* (VNTR). El tamaño del fragmento de DNA que se repite también puede variar, en cuyo caso podemos hablar de minisatélites o de microsatélites; estos últimos son repeticiones cortas que pueden variar de un individuo a otro en sólo un par de bases de DNA.

La técnica de *Southern* presenta un sensibilidad que oscila entre el 5% y el 20%, en función de la región polimórfica estudiada (Blazar et al, 1985) y en todo momento sólo nos da una visión cualitativa del injerto.

Actualmente se utiliza la técnica PCR para amplificar regiones polimórficas del DNA. La sensibilidad de la técnica oscila entre el 1 y el 0,01%. De esta manera se elimina la limitación de la técnica de *Southern blotting* que requiere una cantidad relativamente elevada de DNA. Ambas técnicas requieren un estudio previo al trasplante tanto del donante como del paciente para determinar la informatividad de una región polimórfica del DNA. Amplificando microsatélites se puede encontrar un locus informativo en el 96% de los casos (Oberkircher et al, 1995). La técnica de PCR sólo aporta información cualitativa del estado injerto. Detecta QM en la mayoría de los casos y su detección no es predictiva de recaída (Lawler et al, 1991). Para solventar el valor cualitativo de la PCR, se ha desarrollado la PCR cuantitativa. Aunque con esta técnica se encuentra una relación significativa entre la presencia de QC y la probabilidad de recaída, el valor más predictivo es el aumento seriado de las células del huésped (Bader et al, 1997,1998, Choi et al, 2000) (Tabla 1.8).

1.2.2 FACTORES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE QUIMERISMO MIXTO

El tamaño de la población residual neoplásica que queda tras el TPH está en estrecha relación con la recaída de la enfermedad, de ahí la necesidad de poder evaluar la EMR; sin embargo, el valor predictivo de la presencia de una QC o de una QM es todavía desconocido. Se considera que la presencia de una QM puede conferir ventajas en la supervivencia debido principalmente a que suele estar relacionada con una baja incidencia de la EICH (Huss et al, 1996).

El desarrollo de una QC o una QM tras el trasplante depende de dos factores:

- ✓ De la tasa de desaparición de las células del paciente. Cuanto más lenta sea, mayor será el periodo durante el seguimiento en el que se observe la presencia de una QM.
- ✓ De la tasa de aparición de las nuevas CPH regeneradas a partir de las células infundidas del donante. Cuanto más rápida sea, antes se alcanzará una hemopoyesis total del donante y por lo tanto el desarrollo de una QC.

A su vez, estos factores están estrechamente relacionados con la enfermedad de base, el régimen de acondicionamiento utilizado, el número de células infundidas y la profilaxis de la EICH utilizada.

La celularidad medular está disminuida durante las 2-3 semanas post-trasplante. A partir del día 21 ya se observa la regeneración de las tres líneas celulares (glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas) en los aspirados de MO, y la normalización de los componentes celulares morfológicamente reconocibles se da entre los tres y seis meses post-trasplante.

La regeneración de una hemopoyesis total del donante, se da con mayor rápidez en pacientes afectos de anemia aplásica severa (AAS). Los pacientes afectos de LMC reconstituyen la hemopoyesis más lentamente que los pacientes afectos de LA. Se cree que es debido a que los pacientes con AAS tienen un espacio físico medular mayor

mientras que los pacientes con LMC generalmente se trasplantan con médulas hipercelulares con un mínimo espacio. En pacientes con LMC es frecuente encontrar QM durante los primeros meses post-trasplante.

Con la iniciación del régimen de acondicionamiento la tasa de desaparición de las células del paciente es elevada y se manifiesta en una disminución rápida de glóbulos blancos en sangre periférica. Se ha observado que la utilización del BU está asociado con una tasa lenta de disminución comparada con la utilización de la ICT.

La duración de un número bajo de glóbulos blancos depende a su vez de la tasa de aparición de las células regeneradas a partir de las células infundidas, así como del número y de la persistencia de las células maduras del donante infundidas con el inóculo. Se sabe que en pacientes con AAS acondicionados con CY un número de células infundidas superior a 3×10^8 disminuye la tasa de FI. Las plaquetas y los neutrófilos en el inóculo apenas influyen en el número de células circulantes del paciente, sin embargo los linfocitos maduros presentes en el inóculo si intervienen funcionalmente en la inmunidad del paciente dando lugar a problemas inmunológicos (EICH) y retrasan la regeneración de la hemopoyesis; de ahí que algunos grupos utilicen la depleción de linfocitos T para evitarlos. Sin embargo, la utilización de la deplección de linfocitos T aunque disminuye la tasa de la EICH, está relacionada con una regeneración de la hemopoyesis más lenta e incluso con una tasa elevada de FI. En estos pacientes se puede observar el desarrollo de QM.

El uso de Cs como profilaxis de la EICH, ha sido asociado a una tasa rápida de regeneración de la hemopoyesis en comparación con el uso de MTX favoreciendo el desarrollo rápido de QC.

El desarrollo de QM después de un año del trasplante, aunque también depende de los factores antes citados (por ejemplo la presencia de una EICH crónica favorece la baja incidencia de QM), tiene un valor pronóstico diferente en relación con la recaída de la enfermedad. La incidencia de la recaída aumenta significativamente en pacientes con LMC y QM cuando ésta se detecta después del día 100 post-trasplante (Huss et al, 1996).

1.3. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Una de las primeras causas de fracaso terapéutico del TPH es la recaída de la enfermedad que ocurre en un 15-25% de los pacientes trasplantados con LMC en FC o con leucemias agudas en primera remisión y en un 40-60% de los pacientes con leucemias en fases avanzadas de la enfermedad o que reciben médulas deplecionadas de linfocitos T (Giralt y Champlin, 1994).

Actualmente se sabe que la probabilidad de curar un paciente con leucemia aguda está relacionada con el volumen de la población neoplásica y que la rápida reducción del clon leucémico durante la fase inicial del tratamiento de inducción está correlacionada con largas supervivencias (Campana y Pui, 1995). Las estrategias clínicas habituales que se utilizan en el manejo de estos pacientes no permiten conocer en la totalidad de los casos el estado de la población neoplásica. En el momento del diagnóstico la mayoría de pacientes con leucemia presentan un número de células neoplásicas superior a 10^{12} (Greaves, 1997). Alcanzan la remisión cuando tras el tratamiento con quimioterapia o tras un trasplante, el número de células blásticas en la médula es menor al 5%, siempre desde el punto de vista morfológico observados en el microscopio óptico. Sin embargo pacientes en remisión morfológica todavía pueden presentar del orden de 10^{10} células leucémicas.

Cómo se comportan estas células residuales en el curso de la enfermedad, si fluctúan, disminuyen o permanecen estables tras la terapia de consolidación o si otros factores, como la respuesta inmunológica, pueden afectar al tamaño de la población residual, son cuestiones que actualmente son motivo de numerosos trabajos de investigación. Así, en los últimos años, se han desarrollado nuevas metodologías cuyos objetivos han sido: a) la detección, cuantificación y seguimiento de las células leucémicas residuales y b) determinar si los resultados obtenidos con las diferentes técnicas son predictivos de la evolución de la enfermedad, con el fin de poder diferenciar grupos de pacientes con diferente pronóstico que puedan beneficiarse de tratamientos más adecuados.

1.3.1 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA EMR

Actualmente se están utilizando de forma rutinaria cuatro metodologías para la detección y el seguimiento de la EMR en pacientes con leucemias (Tabla 1.9):

- El estudio citogenético para detectar alteraciones cromosómicas clonales específicas de las células leucémicas.
- La FISH para detectar alteraciones cromosómicas y reorganizaciones génicas específicas de las células leucémicas, tanto en metafase como en interfase.
- La citometría de flujo para detectar inmunofenotipos aberrantes que son característicos de un particular clon leucémico.
- Y diversas estrategias de amplificación de ácidos nucléicos (PCR, RT-PCR) para detectar reorganizaciones génicas específicas de las células leucémicas.

Tabla 1.9 Métodos para la detección de la EMR en la leucemia aguda y crónica

TECNICA	%Casos estudiados(1)	Sensibilidad relativa(2)	Ventajas	Desventajas
CITOGENETICA	>75%	10^{-1}	-Detecta células leucémicas in situ -Seguimiento de la mayoría de los pacientes -No contaminación -Cuantitativo	-Poca sensibilidad -Requiere células en división
FISH	>40%	$10^{-1}-10^{-4}$	-Detecta marcadores específicos -Estudio en metafase y en interfase -Rápido -Cuantitativo	-Relativa poca sensibilidad (3) -Ruido de fondo o Background
CITOMETRIA DE FLUJO	>50%	$10^{-2}-10^{-4}$	-Rápido -Relativa sensibilidad -Cuantitativo	-Existencia de subpoblaciones leucémicas -Ruido de fondo o Background -Cambio del fenotipo con la progresión de la enfermedad
Amplificación de ácidos nucléicos (PCR , RT-PCR)	>40%	$10^{-4}-10^{-6}$	-Rápido -Alta sensibilidad -Cuantitativo (4)	-Potencial contaminación -Degrado del RNA/DNA -Baja expresión del mRNA -Ineficiencia de la Transcriptasa inversa

(1) El porcentaje de pacientes estudiados en cada caso depende del tipo de enfermedad y del marcador específico que se estudie

(2) Cada técnica tiene una sensibilidad intrínseca que varía en función de la precisión de la metodología empleada y de la variable estudiada

(3) La sensibilidad de la técnica de FISH está en función de los marcadores que se estudien, el análisis con una única sonda nos da una sensibilidad del 1% mientras que con tres sondas llega a 10^{-4}

(4) En la mayoría de laboratorios el seguimiento de las reorganizaciones génicas mediante PCR y RT-PCR da una visión cualitativa sobre la presencia o no de la EMR. Recientemente se ha desarrollado la PCR cuantitativa que permite realizar un seguimiento cuantitativo y la PCR a tiempo real que disminuye los problemas de contaminación.

1.3.1.1 ANÁLISIS CITOGENÉTICO

El análisis citogenético da una amplia información estableciendo el espectro de aneuploidías y cambios estructurales cromosómicos que se producen en las células de la mayoría de las formas aguda y crónica de leucemia. Si tenemos en cuenta que estas alteraciones cromosómicas recurrentes aparecen en el 80%-90% de los niños con leucemia aguda (Pui 1996, Raimondi, 1998), y en el 95% de pacientes afectos de LMC (Kurzrock et al, 1988), se entiende que el estudio citogenético pueda utilizarse en el seguimiento de la mayoría de pacientes con leucemia. Por otro lado, la principal ventaja de esta técnica es que identifica la célula leucémica sin problemas de ambigüedad ni de contaminación.

En la mayoría de estudios realizados, la desaparición del cariotipo anómalo del clon leucémico coincide con la remisión clínica (morfológica) del paciente. Ya en 1971 Hart et al, estudiaron una serie de nueve pacientes, ocho con LMA y uno con LLA, observando que todos los pacientes que recaían presentaban las mismas alteraciones cromosómicas observadas al diagnóstico. Más recientemente en 1992 Freireich et al, estudiaron una serie de 71 pacientes afectos de LMA, en 20 de ellos detectaron el cariotipo anómalo presente al diagnóstico y todos recayeron durante las 78 semanas siguientes al estudio sugiriendo la utilidad del estudio citogenético para predecir la recaída. Sin embargo, 25 de los 51 pacientes restantes recayeron sin que se observara el cariotipo inicial, indicando que la no detección del clon original no garantiza remisiones durables.

La eficacia de esta técnica también parece estar relacionada con el tipo de progresión de la enfermedad que se estudia, siendo especialmente útil en el seguimiento de pacientes con LMC y en particular en aquellos que siguen una terapia con INF. Con esta terapia se consiguen largas remisiones clínicas y algunas remisiones citogenéticas pero no se erradica totalmente la enfermedad. La utilización de la RT-PCR, para detectar la reorganización BCR-ABL específica de la LMC, aunque es muy sensible, no presenta una relación estrecha con la probabilidad de recaída, ya que pacientes con persistencia de PCR positivas no necesariamente recaen (Radich et al 1995, Lion 1996, Hochhaus et al, 1996). Sin embargo, el estudio citogenético desempeña un papel pronóstico importante porque detecta anomalías adicionales que son indicativas de la progresión de la enfermedad. Aunque dependiendo de la estandarización de la técnica en cada laboratorio, en general se acepta como respuesta “menor” al tratamiento con INF cuando se observan entre un 35% y un 90% de metafases con la t(9;22), “mayor” si se observan sólo entre un 1% y un 34%

de metafases positivas y “completa” cuando no se observan metafases positivas (Lion, 1996).

Sin embargo, el estudio citogenético tiene limitada su eficacia en el seguimiento de la EMR debido a la baja sensibilidad que presenta. Requiere células en división y por tanto la sensibilidad está en función de la tasa de división celular y del número de metafases que se estudian; con el análisis de 20 metafases la sensibilidad de la técnica se estima en un 10%, y con el análisis de 45 metafases aumenta hasta el 5%. Por lo tanto ha sido necesario desarrollar técnicas que permitan aumentar el número de metafases evaluables o bien que no requieran de células en división.

1.3.1.2 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

La FISH es una técnica molecular muy versátil e informativa. Puede utilizar desde sondas que hibridan con toda la superficie del cromosoma (Pintado cromosómico), como sondas que hibridan con regiones concretas del cromosoma (como por ejemplo las sondas centroméricas de DNA satélite- α específicas para cada cromosoma), o sondas que hibridan sobre la secuencia de un gen (sondas de secuencia única como por ejemplo la sonda para la reorganización BCR-ABL). Permite estudiar desde cambios cromosómicos numéricos a reorganizaciones génicas, tanto en metafase como en interfase, ya que no es imprescindible disponer de células en división.

La sensibilidad de la técnica depende del tipo y número de sondas que se utilicen. Kasprzyk y Secker-Walker, (1997) demostraron que utilizando una única sonda centromérica para la detección de trisomías, la sensibilidad era alrededor del 1%; sin embargo si se detectaban varias trisomías (en casos de LLA con hiperdiploidías) aplicando sondas para tres cromosomas simultáneamente la sensibilidad aumentaba a 10^{-4} . Nylund et al, (1994) utilizaron la técnica FISH con sondas centroméricas para detectar cambios cromosómicos numéricos en interfase y en metafase en siete pacientes afectos de LMA en remisión; en tres detectaron cariotipos anómalos y dos de ellos acabaron recayendo. Los pacientes que presentaron una FISH negativa (cariotipo normal) se mantuvieron en remisión. Sin embargo, en cinco pacientes afectos de LLA la FISH resultó ser menos informativa: todas las muestras examinadas fueron FISH negativas y sin embargo recayeron dos pacientes. White et al, (1995) estudiaron 13 niños afectos de LLA con hiperdiploidías, detectando la EMR en cinco pacientes en remisión, en cuatro al cabo del

mes de finalizar el tratamiento y en tres persistía en controles sucesivos; sin embargo, la correlación con la evolución de la enfermedad no fue significativa.

El-Rifai et al, (1997) utilizaron la técnica de pintado cromosómico para estudiar la EMR en 25 pacientes con LLA; establecieron la sensibilidad de la técnica analizando 2000 metafases en 14×10^{-4} con un límite de confianza de 0.95. Sin embargo, aunque esta técnica puede ser aplicada para la detección de trisomías y translocaciones, en el estudio de las monosomías no es informativa ya que la tasa de falsos positivos está entre un 5% y un 10% de las células analizadas. Detectaron la EMR en 13 de los 25 pacientes estudiados, seis de ellos mostraron un aumento en más de un 1% de células residuales antes de la recaída clínica. El resto, que presentaron entre un 0,5% y un 0,8% de células residuales, se mantenía en remisión. En 12 de los 25 pacientes estudiados no se detectó la EMR pero dos pacientes recayeron.

Zhao et al, (1995) utilizaron la librería cromosómica del cromosoma 17 para detectar la t(15;17) en diez pacientes afectos de leucemia promielocítica en remisión. Detectaron la traslocación en tres pacientes entre uno y dos meses antes de la recaída clínica coincidiendo con los resultados obtenidos por PCR.

La FISH también permite detectar translocaciones en interfase utilizando sondas de secuencia única, como por ejemplo la sondas específicas que hibridan sobre los genes BCR y ABL marcadas con dos fluorocromos distintos y que permiten visualizar la t(9;22) en la LMC (Tkachuk et al, 1990). Sin embargo, la sensibilidad de la técnica está limitada por el porcentaje de falsos positivos en linfocitos normales, que es del 5%. Amiel et al, (1994) estudiaron la EMR en 11 pacientes, cinco de ellos trasplantados, alcanzando un nivel de detección de la reordenación de un 1%. En los cinco pacientes trasplantados detecta una FISH positiva durante los tres meses post-trasplante. Sinclair et al, (1997), reducen la tasa de falsos positivos de reordenaciones BCR-ABL en linfocitos normales al 0,14%. Estos autores utilizan además de las sondas BCR (marcada de color verde) y ABL (marcada de color naranja), la sonda ASS (marcada de color azul) correspondiente al gen de la argininosuccinato sintetasa localizado junto al gen ABL en el cromosoma 9. Así, una célula positiva no sólo debe presentar la colocalización BCR-ABL (verde/naranja) sino además la colocalización ASS-ABL (naranja/azul). Recientemente, Dewald et al, (1998) describen una nueva técnica, *Double (D)-FISH*, que permite visualizar además de la reorganización BCR-ABL sobre el cromosoma 22, la recíproca ABL-BCR sobre el cromosoma 9; reduciendo los falsos positivos al 0,079%.

Una de las principales desventajas de esta técnica es el *background* o ruido de fondo, aunque se evita cada vez más con la mayor especificidad de los protocolos y las sondas que suministran las casas comerciales.

Actualmente se están desarrollando técnicas que combinan la técnica FISH con la citometría de flujo y la incorporación de la bromodeoxiuridina (FACS/FISH/BUDR). Las diferentes subpoblaciones celulares se separan mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales, y se analizan mediante FISH aquellas que presentan el mismo inmunofenotipo observado al diagnóstico, a la vez que la incorporación de la BUDR permite saber la capacidad proliferativa de las células leucémicas (Engel et al, 1997). Esta técnica permite detectar tres células leucémicas de entre 10^5 células normales, aumentando notablemente la sensibilidad de la FISH.

1.3.1.3 CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células hemopoyéticas presentan en la superficie y en el citoplasma un conjunto de antígenos (inmunofenotipo), cuya expresión está regulada durante la hemopoiesis y que suele ser característico de cada tipo celular. Las células leucémicas, salvo raras excepciones, no presentan antígenos específicos que las diferencien de las células normales. Sin embargo, estudios paralelos realizados en muestras de individuos sanos y de pacientes con leucemias agudas, han puesto de manifiesto la existencia en las células leucémicas de múltiples aberraciones antigenicas con respecto a los patrones fenotípicos detectados en las células normales (Campana et al, 1990). Si conocemos el perfil antigenico aberrante (inmunofenotipo aberrante) de las células leucémicas al diagnóstico, podemos utilizarlo como guía en el seguimiento de la EMR. Los tipos de aberraciones más frecuentes son:

- ✓ La infidelidad de línea, consiste en la coexpresión de Ags mieloides en blastos de LLA, su incidencia varía entre un 5% y un 46%. Otro tipo de infidelidad de línea sería la expresión de Ags linfoides T en LLA de línea B o viceversa.
- ✓ Los asincronismos madurativos que indican la coexpresión en una célula de dos o más Ags que en la médula ósea normal pertenecen a una etapa distinta de diferenciación. Por ejemplo la coexpresión de los Ags CD34 (Ag de inmadurez) y CD22 (Ag característico de un estadio de diferenciación más maduro). Estos

asincronismos se observan en un 32% a un 75% de las LLA de línea T y entre un 11% y un 93% de las LLA de línea B (Ross et al, 1990)

- ✓ Los cambios en la intensidad de expresión antigenica, ya que en las células leucémicas, a veces, los Ags tienen una intensidad y expresión distinta a la normal, por exceso o por defecto. Por ejemplo es muy frecuente la sobreexpresión antigenica del Ag CD10 en las LLA de línea B y del Ag CD3 en las LLA de línea T (Lavabre-Bertrand, 1994).
- ✓ La expresión de un fenotipo restringido a ciertos tejidos que no suelen encontrarse en la MO. Por ejemplo más del 90% de las LLA de línea T expresan un fenotipo que se detecta únicamente en los timocitos corticales y nunca, o muy escasamente, en las localizaciones extratímicas (menos de un 0,03% en MO y menos de un 0,02% en SP).
- ✓ El aumento en la expresión de un immunofenotipo muy inmaduro ya que en la MO normal representan sólo un pequeño porcentaje de la celularidad global; así, la proporción de CD19+/CD34+ y sobre todo de CD7+/CD34+ es muy pequeña.

Si se marcan las células con una combinación de anticuerpos monoclonales (entre tres y cuatro diferentes), mediante el análisis de citometría de flujo, podemos identificar los diferentes patrones fenotípicos aberrantes que nos permitirán poder detectar las células leucémicas residuales. La sensibilidad de la técnica es de 10^{-3} analizando 30.000 células nucleadas (Stelzer et al 1992) y su eficacia dependerá de la combinación de antígenos que se utilice.

Farahat et al, (1998) estudiaron 53 pacientes afectos de LLA de línea B, utilizando una combinación de antígenos TdT con CD10 y CD19. En seis de nueve pacientes que recayeron detectaron la expresión de los antígenos entre las cinco y 15 semanas antes de la recaída morfológica, 43 pacientes permanecieron en remisión sin detectarse la EMR en ninguno de ellos. A su vez, encontraron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre ambos grupos para la SLE. Ciudad et al, (1998) estudiaron 53 niños afectos de LLA en remisión citomorfológica, utilizando un gran panel de anticuerpos monoclonales en triple combinación para detectar las aberraciones fenotípicas y subpoblaciones celulares presentes al diagnóstico. Los mismos autores discriminaron un grupo de pacientes con peor

pronóstico que serían aquellos que presentaron después de la terapia de inducción un nivel de EMR superior a 1×10^{-3} . Más recientemente, los mismos autores (Ciudad et al, 1999) estudiaron 45 pacientes afectos de LLA de linaje B. Como estrategia para la detección de la EMR analizaron la presencia de un aumento en la frecuencia de células B inmaduras (CD34+/CD19+ ó CD20-/CD34+) o la existencia de un asincronismo madurativo y demostraron que la detección de la EMR, reflejada de una u otra forma, era indicativa de una alta tasa de recaída y de corta supervivencia ($p < 0,01$).

La principal ventaja de esta técnica es que no presenta falsos positivos. Sin embargo, sigue mostrando falsos negativos debido a que se producen cambios fenotípicos constatados en las recaídas leucémicas (van Wering et al, 1995). Por lo tanto, es importante determinar el máximo de posibilidades fenotípicas aberrantes al diagnóstico, de manera que estos cambios no afecten al menos a alguna de ellas. Una importante proporción de cambios fenotípicos se relaciona con la presencia de subpoblaciones leucémicas minoritarias (la incidencia de subpoblaciones oscila alrededor del 45% en LLA de línea T y alrededor del 24% en la LLA de línea B). Así, dentro del clon leucémico pueden aparecer células positivas y negativas para un mismo antígeno. La identificación de las subpoblaciones leucémicas es importante para la búsqueda de células leucémicas residuales, ya que la recaída puede ocurrir en una subpoblación menos representada que sea altamente resistente a la quimioterapia.

1.3.1.4 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (PCR, RT-PCR)

La presencia de alteraciones cromosómicas en neoplasias hematológicas se describieron por primera vez durante la década de los 60. A partir de entonces se pensó que estas alteraciones cromosómicas podrían ser la base etiológica de la neoplasia. En 1983 Rowley, observó que los puntos de rotura de las translocaciones frecuentes en las leucemias, coincidían con la localización de un oncogen celular. Posteriormente investigaciones han descubierto que alrededor de una translocación cromosómica pueden producirse diferentes eventos. Por un lado se puede producir la desregulación de un oncogen y por otro lado crearse un gen nuevo directamente envuelto en el proceso de la leucemogénesis.

Actualmente, está establecido que las translocaciones contribuyen al proceso de leucemogénesis induciendo una alteración en la activación de un gen, que en la mayoría de los casos se trata de factores de transcripción.

Se han descrito dos métodos de activación (Rabbitts, 1994):

- ✓ El primer método se da en las LLA de células B maduras y en las LLA de células T. Consiste en la yuxtaposición de un gen de las inmunoglobulinas (Ig) o de los receptores de las células T (TCR) con el oncogen *c-MYC* localizado en 8q24 o con otro oncogen putativo. En este caso, el punto de rotura se produce fuera del oncogen, de manera que *c-MYC* puede colocarse a un extremo u otro del gen de las Ig o de los TCR, de tal forma que el promotor de estos provoca la activación del *c-MYC*, cuya transcripción provoca la desregulación de la transcripción y del ciclo celular.

- ✓ El método más habitual que se produce en la mayoría de leucemias, consiste en la activación de un oncogen putativo creado a partir de la rotura de dos genes normales, seguida de una yuxtaposición inapropiada. El resultado es un gen quimérico, resultante de la fusión de los exones de ambos genes, cuya transcripción está regulada por el promotor de otro gen. Generalmente la expresión de este gen quimérico da lugar a un factor de transcripción anómalo que inicia la desregulación del ciclo celular.

La técnica de PCR permite detectar estas reorganizaciones génicas, ya que si conocemos las secuencias adyacentes al punto de rotura de ambos genes, podemos utilizarlas como *primers* para amplificar el gen quimérico resultante. La técnica es muy sensible detectando una célula leucémica entre 10^{-5} - 10^{-6} células normales.

Si a la hora de diseñar los *primers* que flanquean la región translocada, éstos están separados por una secuencia de DNA relativamente corta (no mas de pocos cientos pares de bases), podemos amplificar directamente el DNA; la técnica es más fácil de realizar con menos problemas de degradación del ácido nucleico. Sin embargo, en la mayoría de casos, los *primers* separan secuencias de DNA largas que contienen exones e intrones, de manera que es mejor amplificar el DNA complementario a partir del RNA mensajero (RT-PCR), en el que a través del proceso de *splicing* se han eliminado la mayoría de secuencias no codificantes. Trabajar con RNA presenta más dificultades por los problemas de degradación del material y de contaminación.

Tabla 1.10. Reorganizaciones génicas más frecuentes que pueden detectarse mediante PCR

Enfermedad	TRANSLOCACIÓN	FUSIÓN GÉNICA	Frecuencia (%)	
			Adultos	Niños
LLA				
Linaje B	t(12;21)(p12;q22)	*TEL-AML1 (DNA)	25-30 (?)	25-30
	t(9;22)(q34;q11)	*BCR-ABL (RNA)	25-40	4-6
	t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1 (RNA)	2-3	2
	t(4;11)(q21;q23)	*MLL-AF4 (RNA)	5	<1
	t(5;14)(q31;q32)	IL3-IGH (DNA)	<1	<1
	t(11;19)(q23;p13)	*MLL-ENL (RNA)	<1	<1
	t(9;11)(p21;q23)	*MLL-AF9 (RNA)	<1	<1
	t(17;19)(q22;q13)	E2A-HLF (RNA)	<1	<1
	t(8;14)(q24;q32)	*MYC-IgH (DNA)	4-5	1-2
Linaje T		TAL1 delección (DNA)	10-30	20-30
	t(11;14)(p13;q11)	RHOM2-TCR& (DNA)	5-10	5-10
	t(1;14)(p34;q11)	TAL1-TCR α (DNA)	1-3	1-3
	t(10;14)(q24;q11)	HOX11-TCR α (DNA)	1-3	1-3
	t(1;7)(p32;q35)	TAL1-TCR β (DNA)	<1	<1
LMA				
	t(8;21)(q22;q22)	*AML1-ETO (RNA)	5-10	5-10
	t(15;17)(q22;q11-21)	*PML-RAR α (RNA)	5-10	5-10
	inv(16)(p13q22)	*CBF β -MYH11 (RNA)	5-10	5-10
	t(9;11)(p21-22;q23)	*MLL-AF9 (RNA)	1-5	5-10
	t(9;22)(q34;q11)	*BCR-ABL (RNA)	1-3	<1
	t(6;9)(p23;q34)	DEK-CAN (RNA)	<1	<1

* Reorganizaciones que pueden ser detectadas también mediante la técnica de FISH

Las técnicas de PCR y RT-PCR se han utilizado en el campo de la EMR (Tabla 1.10), sobre todo, en el seguimiento del transcripto BCR-ABL en pacientes con LMC o con leucemias agudas Ph+, en el seguimiento del transcripto *PML-RAR α* en pacientes con LMA tipo M3, y en el seguimiento del transcripto *AML1-ETO* en pacientes con LMA tipo M2. también, se ha estandarizado la técnica para el seguimiento del transcripto *CBF β -MYH11* en pacientes con LAM tipo M4 (Evans et al, 1997), y para el seguimiento de los reordenamientos donde está implicado el gen *MLL* en leucemias agudas con alteraciones en 11q23 (Cimino et al, 1998). Por otro lado, se han estandarizado las técnicas para el seguimiento de la EMR mediante la detección de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores de las células T (TCR) en pacientes con LLA (Pongers-Willemse et al, 1999).

El reordenamiento BCR-ABL ha sido el más estudiado. En un principio, los estudios por PCR no cuantitativa, aunque eran muy sensibles, presentaban falsos positivos y se consideraban predictivos de recaída bien cuando se producía un cambio de una PCR Ph- a Ph+ o bien cuando en sucesivos controles persistía una PCR Ph+. Esta situación también se podía producir incluso en periodos prolongados durante los cuales el paciente se encontraba en remisión morfológica sin presentar evidencia de recaída. Recientemente, Radich et al (1995) estudiaron una serie de pacientes con LMC utilizando la RT-PCR cuantitativa demostrando que la recaída estaba relacionada con la detección o no de una PCR positiva; así el 42% de los pacientes con una PCR Ph+ recaían mientras que sólo lo hacían el 3% de los pacientes con una PCR Ph-, además con una probabilidad menor a 0.001. Sin embargo los mismos autores seguían encontrando casos donde existía una persistencia de PCR+ sin estar relacionada con la recaída del paciente. Recientemente, los mismos autores (Radich et al 1997), estudiaron 36 pacientes trasplantados afectos de LAL Ph+ y demostraron que el tipo de gen químérico BCR-ABL detectado post-trasplante estaba relacionado con el riesgo de recaída; siete de los 10 pacientes que expresaron el transcripto BCR-ABL codificante para la proteína p190 recayeron, mientras que de los ocho pacientes que expresaron el transcripto BCR-ABL codificante para la proteína p210 sólo recayó uno. En este sentido Serrano et al (2000) estudiaron 55 pacientes con LMC trasplantados y observaron que la recaída citogenética estaba precedida por la detección del transcripto codificante para la p190.

La técnica RT-PCR es especialmente útil en pacientes con LPA en el seguimiento del transcripto *PML-RAR α* resultante de la t(15;17)(q22;q11-q21). Es bien sabido que estos pacientes pueden beneficiarse de un tratamiento de inducción con el ácido trans-retinóico o ATRA, que en combinación con la quimioterapia puede eliminar el clon leucémico e inducir remisiones duraderas. La aplicación de la RT-PCR ha demostrado la persistencia del transcripto *PML-RAR α* en pacientes con LPA después del tratamiento con ATRA. En estos trabajos la sensibilidad de la técnica oscila entre 10^{-3} y 10^{-4} y permite diferenciar entre grupos de pacientes con diferente pronóstico. Normalmente, después de los tratamientos de inducción y de consolidación no suele detectarse el transcripto. Sin embargo, existe un tiempo variable durante el cual aún se detecta; este tiempo en la mayoría de estudios no excede los tres meses post-consolidación. En los pacientes en los que persiste el transcripto o bien son PCR- y pasan a tener una PCR+, el pronóstico es desfavorable. Una revisión hecha por Diverio et al, (1994) muestra que 27/36 pacientes PCR+ recaen durante los seis meses siguientes al estudio mientras que sólo recaen 5/86 de los que presentaban una PCR-

Recientemente se han realizado diferentes experimentos para aumentar la sensibilidad de esta técnica. Han demostrado que en 1 g de RNA procedente de 10^6 blastos de LPA, se encuentran aproximadamente 1000 moléculas del transcripto PML-RAR α . También han demostrado que la exposición *in vitro* de los blastos al INF, antes de la extracción del RNA, puede aumentar la expresión de estos transcriptos (Seale et al 1996). Sin embargo, aunque la técnica es más sensible los resultados no se relacionan tanto con la recaída del paciente, ya que se encuentra persistencia del transcripto asociada a largos períodos de remisión.

A diferencia de los reordenamientos descritos en los que el punto de rotura podía variar dando lugar a diferentes transcriptos, en el reordenamiento AML1-ETO resultante de la t(8;21)(q22;q22), los puntos de rotura son bastante constantes y sólo da lugar a un transcripto. Al igual que en el seguimiento del transcripto BCR-ABL, la persistencia del transcripto AML1-ETO no necesariamente implica la recaída del paciente (Kusec et al, 1994, Jurlander et al, 1996). En estos casos la RT-PCR cuantitativa tiene más valor predictivo. Así, aunque pacientes en remisión pueden presentar una persistencia del clon, se detecta un aumento de células residuales entre tres y seis meses antes de la recaída clínica (Tobal et al, 2000).

En la LLA la detección de la EMR mediante PCR se realiza utilizando como marcadores los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores de las células T que se producen en la mayoría de LLA de línea B y de línea T, respectivamente. Mediante esta técnica, van Dongen et al, (1998) realizaron el seguimiento de la EMR en 240 niños afectos de LLA, realizaron una PCR semicuantitativa en diferentes momentos del tratamiento. Estos autores llegaron a la conclusión de que el riesgo de recaída era significativamente tres veces mayor en los pacientes que presentaron un nivel de EMR igual o superior a 10^{-2} , al final de la inducción y antes de la consolidación, comparado con el riesgo de recaída de aquellos que presentaron un nivel de detección de EMR igual o inferior a 10^{-4} ; al mismo tiempo asociaron la persistencia de la EMR al final del tratamiento a un mal pronóstico.

Aunque las técnicas PCR y RT-PCR son muy sensibles para la detección de la EMR, presentan una serie de problemas a considerar. Se pueden obtener falsos positivos por problemas de contaminación del DNA, especialmente cuando amplificamos una translocación utilizando los mismos primers y sondas para diferentes casos. Problemas que deben solucionarse utilizando la PCR a tiempo real así como máximas condiciones de esterilidad durante la manipulación y procesamiento de las muestras. Por otro lado, en el caso de utilizar transcriptos de RNA puede ser que la mayoría de las células neoplásicas con

una translocación cromosómica no expresen el correspondiente RNA, como ocurre en las células madre progenitoras en la LMC (Bedi et al, 1993). O que aunque lo expresen sea realmente difícil obtenerlo intacto, debido a que se degrada fácilmente, como ocurre con el tránscrito PML-RAR α .

OBJETIVOS

1.4. OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es estudiar una serie de pacientes afectos de enfermedades hematológicas, en edad pediátrica, sometidos a un trasplante de progenitores hemopoyéticos, con el fin de realizar el seguimiento del quimerismo y de la enfermedad mínima residual. Para ello se han planteado diversos objetivos:

- 1. El seguimiento del trasplante en pacientes que han recibido un trasplante alogénico de un donante de diferente sexo mediante el estudio del QUIMERISMO,** analizando los cromosomas sexuales con técnicas citogenéticas y de hibridación *in situ* fluorescente.
- 2. El seguimiento en pacientes que presentaban una alteración cromosómica al diagnóstico, tanto si recibían un TPH autólogo o un TPH alogénico, mediante el estudio de la ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL,** con técnicas citogenéticas y de FISH utilizando sondas de pintado cromosómico y la sonda para detectar la reorganización BCR-ABL
- 3. Relacionar el quimerismo con los siguientes parámetros clínico-biológicos: edad, sexo, tipo de enfermedad, estado de remisión completa, tipo de trasplante, tipo de donante, tipo de acondicionamiento, tipo de profilaxis administrada para la enfermedad injerto contra el huésped, tipo de enfermedad injerto contra el huésped desarrollada y evolución post-trasplante.**
- 4. Evaluar la influencia del cariotipo observado y del pronóstico de las alteraciones cromosómicas detectadas en el diagnóstico de la enfermedad, en la recaída y en la supervivencia post-trasplante.**

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en este estudio ha consistido en 229 muestras de médula ósea de pacientes en edad pediátrica afectos de neoplasias hematológicas, sometidos a un trasplante autólogo o alogénico.

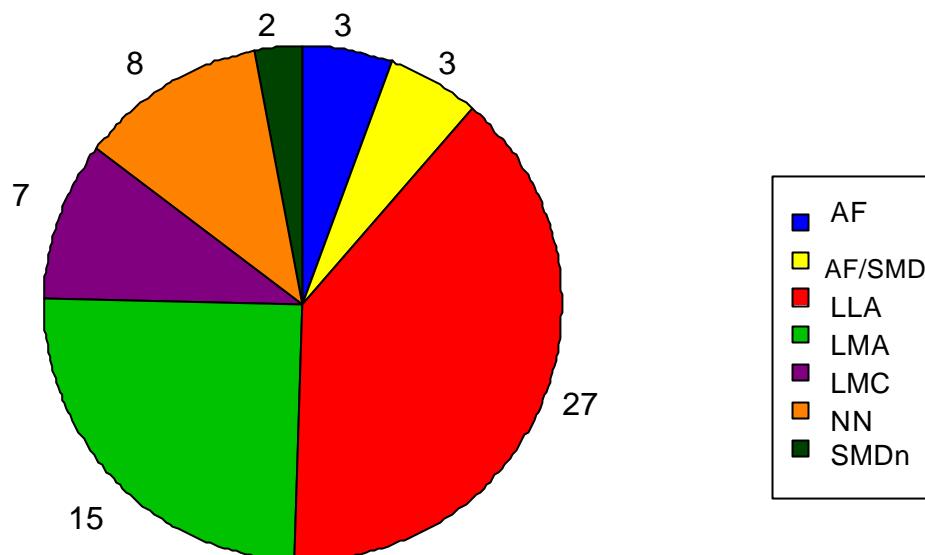
Todas las muestras proceden de la Unidad de Trasplantes del Servicio de Hematología y Oncología Pediátrica del Hospital “Vall d’Hebron” de Barcelona.

2.2 PACIENTES

Se ha realizado el seguimiento en 65 pacientes, 37 niños y 28 niñas, de edades comprendidas entre los dos meses y los quince años (Tabla 2.1 y Figura 2.1):

- La mayoría afectos de neoplasias hematológicas:
 - 27 de leucemia linfoblástica aguda (LLA)
 - 15 de leucemia mieloblástica aguda (LMA)
 - siete de leucemia mieloide crónica (LMC)
 - y cinco de un síndrome mielodisplásico (SMD), dos de novo y tres desarrollado en pacientes afectos de anemia de Fanconi (AF)
- Los 11 pacientes restantes padecían enfermedades no neoplásicas (ENN):
 - tres presentaron una anemia de Fanconi (AF)
 - uno presentó una anemia aplásica adquirida (AAA)
 - uno una deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD)
 - uno una anemia de Blackfan Diamond (ABD)
 - uno una Linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (LH)
 - dos una inmuno deficencia combinada severa (IDCS)
 - uno una leucodistrofia metacromática (LM)
 - y uno una mucopolisacaridosis tipo I (MPS-I)

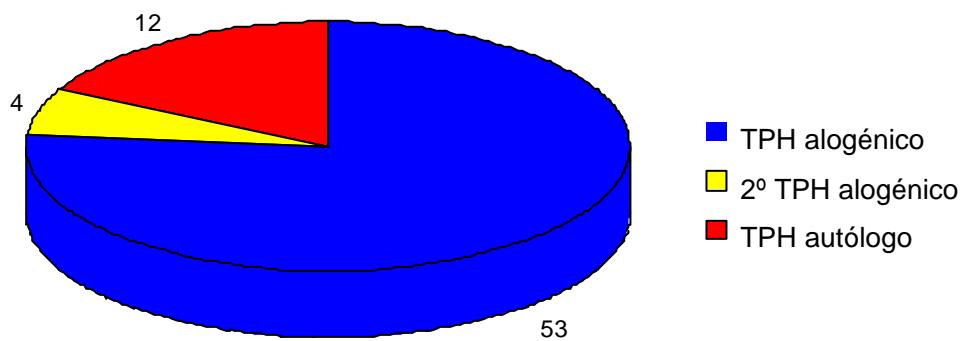
FIGURA 2.1. Tipo de enfermedad



2.2.1. TRATAMIENTO

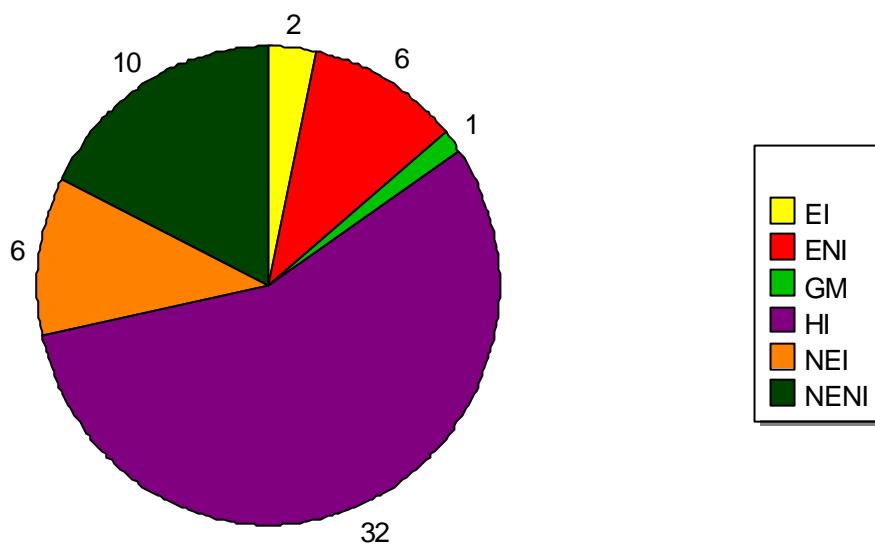
Se ha realizado el seguimiento de 69 trasplantes. De ellos, 53 fueron alogénicos, cuatro pacientes se sometieron a un segundo aloTPH y 12 fueron autólogos (Figura 2.2).

FIGURA 2.2. Tipo de TPH



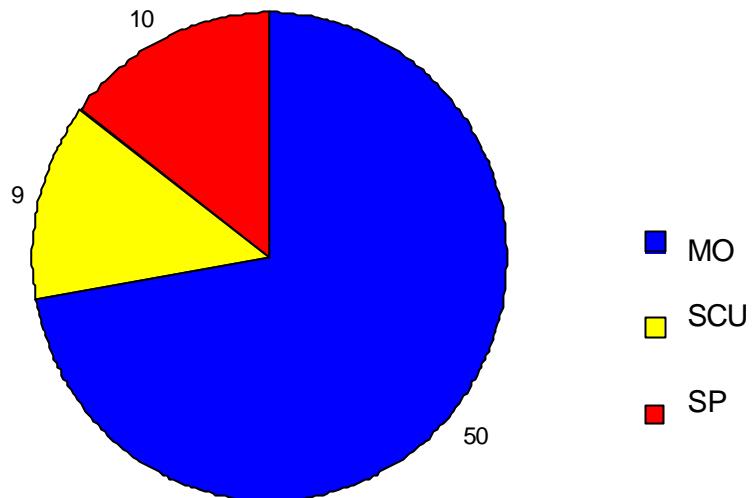
De los 57 TPH alogénicos, 41 se realizaron con un donante HLA idéntico, 32 de ellos de un hermano histocompatible (HI), dos de un donante familiar (EI), uno de un gemelo monocigótico (GM) y seis de un donante no emparentado (NEI); 16 recibieron el producto de un donante HLA no idéntico, de ellos, diez de un donante no emparentado (NENI) y seis de un donante familiar (ENI) (Figura 2.3).

FIGURA 2.3. Tipo de donante



De los 57 TPH alogénicos, 38 se realizaron con un donante de diferente sexo que son los que se han incluido dentro del protocolo de seguimiento de quimerismo.

De los 69 TPH realizados, en 50 pacientes las CPH infundidas procedían de MO, en 10 de SP tras movilización con factores de crecimiento y en nueve de SCU (Figura 2.4).

Figura 2.4. Producto infundido

El régimen de acondicionamiento más utilizado en los pacientes afectos de LLA, ha sido la combinación de CY y etopósido (VP-16) con ICT; en los pacientes afectos de LMA y de LMC la combinación de CY con ICT; en los pacientes afectos de un SMD la combinación de CY, BU y melfalán (MELF); en los pacientes afectos de AF la combinación de CY y globulina antitimocítica (ATG) con INT. En los pacientes afectos de enfermedades congénitas el régimen de acondicionamiento más utilizado ha sido la administración de CY y BU; en la mayoría de niños menores de dos años independientemente del tipo de patología que han presentado, se ha utilizado la combinación de BU con CY o combinado con alguna otra droga.

Como profilaxis de la EICH, se ha utilizado en la mayoría de los casos donde receptor y donante eran HLA-idiénticos, Cs sola y en una minoría Cs con otra droga, como el MTX, la PRE o la ATG. En la mayoría de casos donde receptor y donante no eran HLA-idiénticos se ha utilizado Cs combinada con MTX o con alguna otra droga generalmente PRE o ATG.

Tabla 2.1 Pacientes y características clínicas

MATERIAL Y MÉTODOS

N	ENF	E	S	S D	EST TPH	TPH	D	PRO	TRATADO	ACONDICION	PRO. EICH
23	AAA	7	V	F		ALO	NEI	MO	NO	ATG+CY+INT	MTX+Cs
6	AF	11	F	V		ALO	NEI	MO	NO	ATG+CY+INT	ATG+MTX+Cs
31	AF	12	V	F		ALO	HI	MO	NO	ATG+CY+INT	MTX+Cs
71	AF	10	V	F		ALO	NENI	MO	NO	ATG+CY+ICT	MTX+Cs
41	AF/SMD	10	F	F	1 ^a RC	ALO	ENI	SP	Sel.+ CD34	ATG+INT+CY	Cs
1a	AF/SMD	6	F	V	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	INT+CY	ATG+Cs
26	AF/SMD	8	V	V	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	INT+CY	Cs
12	DAL	6M	V	F		ALO	ENI	MO	DEPL T	BU+CY	Cs
39	EBD	5	F	V		ALO	HI	MO	NO	BU+CY	MTX+Cs
53	LH	15M	F	V		ALO	ENI	SP	Sel.+ CD34	CY+VP-16+TBI	PRE+Cs
52	IDCS	2M	F	V		ALO	NENI	SCU	NO	BU+CY	ATG+MET+Cs
79	IDCS	2M	V	F		ALO	NEI	SCU	NO	BU+CY+ATG	Cs
3	LAL-B	15	V	F	3 ^a RC	ALO	NENI	MO	DEPL T	ATG+MEL+BU+CY	URB+MTX+Cs
18	LAL-B	11	V	F	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	ARAC+CY+TBI	Cs
47	LAL-B	11	F	V	2 ^a RC	ALO	HI	SCU	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
48	LAL-B	3	V	F	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
7	LAL-B	11	F	V	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	ARAC+CY+TBI	Cs
70	LAL-B	14	V		2 ^a RC	AUTO		SP	NO	CY+VP-16+TBI	
76	LAL-B	5	V	F	2 ^a RC	ALO	ENI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
42	LAL-B	10	V	F	3 ^a RC	ALO	HI	SP	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
43	LAL-B	14	F	V	3 ^a RC	ALO	NENI	MO	NO	BU+VP-16+CY	MTX+Cs
44	LAL-B	11	V	F	3 ^a RC	ALO	ENI	SP	Sel.+ CD34	CY+VP-16+TBI	Cs
50	LAL-B	6	V	V	1 ^a RC	ALO	NEI	SCU	NO	ATG+MEL+BU	MET+Cs
55	LAL-B	5	V	F	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
58	LAL-B	4	F	V	1 ^a RC	ALO	NEI	MO	DEPLET	CY+VP-16+TBI	Cs
24	LAL-B	8	F	V	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
4	LAL-B	8	F	V	1 ^a RP	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	MET+Cs
34	LAL-B	3M	V		1 ^a RC	AUTO		MO	ACMN	BU+VP-16+CY	
54	LAL-B	9	V	F	3 ^a RC	ALO	NENI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	MTX+Cs
61	LAL-B	15	F		2 ^a RC	AUTO		SP	ACMN	CY+VP-16+TBI	
21	LAL-B	3	V	F	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	ARAC+CY+TBI	Cs
35	LAL-B	2	F		1 ^a RC	AUTO		MO	ASTA-Z	BU+VP-16+CY	
15	LAL-B	7	V	F	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
9	LAL-T	8	V	V	2 ^a RC	ALO	EI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
22	LAL-T	13	V	F	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
49	LAL-T	13	V	F	2 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
56	LAL-T	6	V	F	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	CY+VP-16+TBI	Cs
57	LAL-T	4	V	F	2 ^a RC	ALO	NENI	SCU	NO	CY+VP-16+TBI	PRE+Cs
75	LAL-T	3M	V	V	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	BU+VP-16+CY	Cs
33	LAM-M2 preb.	2	V		1 ^a RC	AUTO		MO	NO	BU+VP-16+CY	
33b	LAM-M2 preb.	3	V		2 ^a RC	2º ALO	NENI	SCU	NO	CY	MET+Cs+MTX
27	LAM-M2	11M	F		1 ^a RC	AUTO		MO	ASTA-Z	BU+VP-16+CY	
45	LAM-M2	9	V	F	1 ^a RC	ALO	EI	MO	NO	TBI+CY	Cs
11	LAM-M3	7	F	V	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	BU+VP-16+CY	Cs
59	LAM-M3	5	V	F	1 ^a RC	ALO	ENI	MO	NO	BU+VP-16+CY	MTX+Cs
62	LAM-M3	2	V		2 ^a RC	AUTO		MO	NO	MEL+BU	
67	LAM-M3	7	V		1 ^a RC	AUTO		SP	NO	TBI+CY	
2	LAM-M4	10M	F	V	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	BU+VP-16+CY	MET+Cs
51	LAM-M4	5	F	F	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	TBI+CY	Cs
40	LAM-M4Eo	12	V	V	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	TBI+CY	MTX+Cs
32	LAM-M5	13	F		1 ^a RC	AUTO		MO	NO	TBI+CY	

37	LAM-M5	2	V	F	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	BU+VP-16+CY	Cs
37b	LAM-M5	4	V	F	2 ^a RC	2º ALO	HI	MO	NO	TBI+MEL	Cs
46	LAM-M5	4	F		1 ^a RC	AUTO		MO	ASTA-Z	CY+VP-16+TBI	
17	LAM-M6	18M	F	F	1 ^a RC	ALO	GM	MO	NO	VP-16+BU	ATG+MTX
30	LAM-M7	2	F		1 ^a RC	AUTO		MO	ASTA-Z	MEL+BU	
60	LM	14	F	V		ALO	HI	MO	NO	BU+CY	MTX+Cs
1b	LMA-M5	8	F	V	2 ^a RC	2º ALO	HI	MO	NO	ARAC+CY+VP-16	Cs
26b	LMA-M5	11	V	V	2 ^a RC	2º ALO	HI	MO	NO	ARAC+CY+VP-16	Cs
5	LMC	4	F	V	FC	ALO	HI	MO	NO	TBI+CY	PRE+Cs
14	LMC	12	V	V	FA	ALO	HI	SCU	NO	TBI+CY	Cs
19	LMC	11	F	V	FC	ALO	HI	MO	NO	TBI+CY	MTX+Cs
25	LMC	7	V		FA	AUTO		SP	NO	BU+VP-16+CY	
69	LMC	13	V	V	FC	ALO	NEI	MO	NO	TBI+CY	MTX+Cs
77	LMC	7	V	V	FC	ALO	NENI	SCU	NO	TBI+CY	MTX+Cs
78	LMC	12	V	V	FC	ALO	NENI	MO	NO	TBI+CY	MTX+Cs
64	LMMC	4	F		2 ^a RC	ALO	NENI	SCU	NO	MEL+BU+CY	PRE+Cs
20	MPS-I	6	F	V		ALO	HI	MO	NO	BU+CY	Cs
68	SMD	9	F	F	1 ^a RC	ALO	HI	MO	NO	MEL+BU+CY	Cs

N, número de caso. ENF, enfermedad, LLA, leucemia linfoblástica aguda, LMA, leucemia mieloblástica aguda, LMC, leucemia mieloide crónica, LMA preb, LMA de precursores basófilos. LMMC, leucemia mielomonocítica crónica, SMD, síndrome mielodisplásico, AF, anemia de Fanconi, LM, leucodistrofia metacromática, HX, histiocitosis X, DAL, deficencia de adhesión leucocittaria, IDCS, inmunodeficiencia combinada severa, EBD, anemia de Blackfan-Diamond, MPS-I, mucopolisacaridosis tipo I. E, edad al trasplante. S, sexo del paciente. SD, sexo del donante, EST AL TPH, situación del paciente al trasplante. RC, remisión completa. RP, remisión parcial. TPH, tipo del trasplante. ALO, alogénico, AUTO, autólogo. D, tipo de donante, HI, hermano HLA-identico, EI, emparentado HLA-identico, GM, gemelo monocigótico, NEI, No emparentado HLA-identico, ENI, emparentado no HLA-identico, NENI, no emparentado no HLA-identico. PRO, origen de la CPH infundidos, MO médula ósea, SP sangre periférica, SCU, sangre de cordón umbilical. TRATADO, CPH infundidas tratadas previamente o no a la infusión, DEPLE T, deplecionadas de linfocitos T, Sel+ CD34, tras selección positiva de CD34, ACMN, tratadas con anticuerpos monoclonales, ASTA-Z, tratadas con mafosfamida. ACONDICION, Acondicionamiento, CY, ciclofosfamida, VP-16, etopósido, ICT, irradiación corporal total, INT, irradiación nodal total, ARA-C, arabinósido de citosina, BU, busulfán, MELF, melfalán, ATG, globulina antitimocítica. PRO. EICH, profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped, Cs, ciclosporina, MTX, metotrexato, MET, metilprednisona, URB, urbasón, PRE, prednisona.

2.2.2 PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO

Los pacientes han sido estudiados desde el diagnóstico de la enfermedad hasta como mínimo los dos años post-trasplante. Los controles se han realizado según el protocolo siguiente (Figura 2.5):

- un primer análisis citogenético al diagnóstico de la enfermedad y si se observaban alteraciones cromosómicas el paciente entraba en el protocolo de seguimiento de la EMR
 - un segundo estudio antes de recibir el trasplante, en aquellos pacientes que entraban dentro del protocolo de seguimiento de la EMR
 - diversos estudios tras recibir el trasplante, tanto para el seguimiento de quimerismo como para el estudio de la EMR. El estudio de las muestras se ha realizado con la siguiente pauta: al mes después del trasplante, cada tres meses durante el primer año de seguimiento, y cada seis meses durante el segundo año
 - el seguimiento ha finalizado a los dos años del trasplante y sólo se ha continuado cuando los datos clínicos así lo indicaban
- .

Algunos pacientes han sufrido complicaciones post-trasplante (Figura 2.6), bien fallo del implante, recaída, desarrollo de la EICH o complicaciones por otras causas. En estos pacientes se ha continuado el protocolo de seguimiento, en aquellos en los que la evolución clínica lo ha permitido.

Figura 2.5. Diseño del protocolo de seguimiento del paciente trasplantado

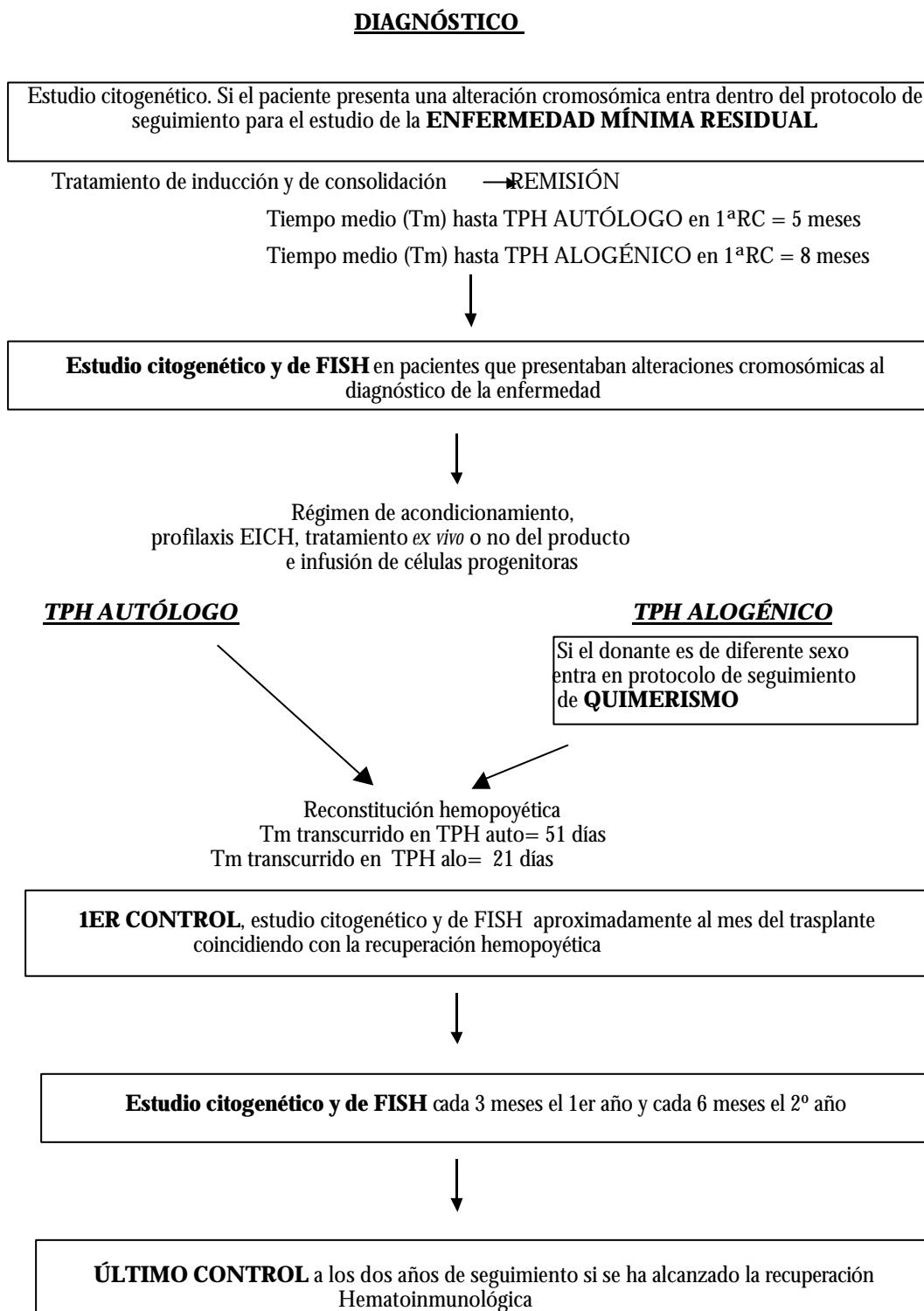
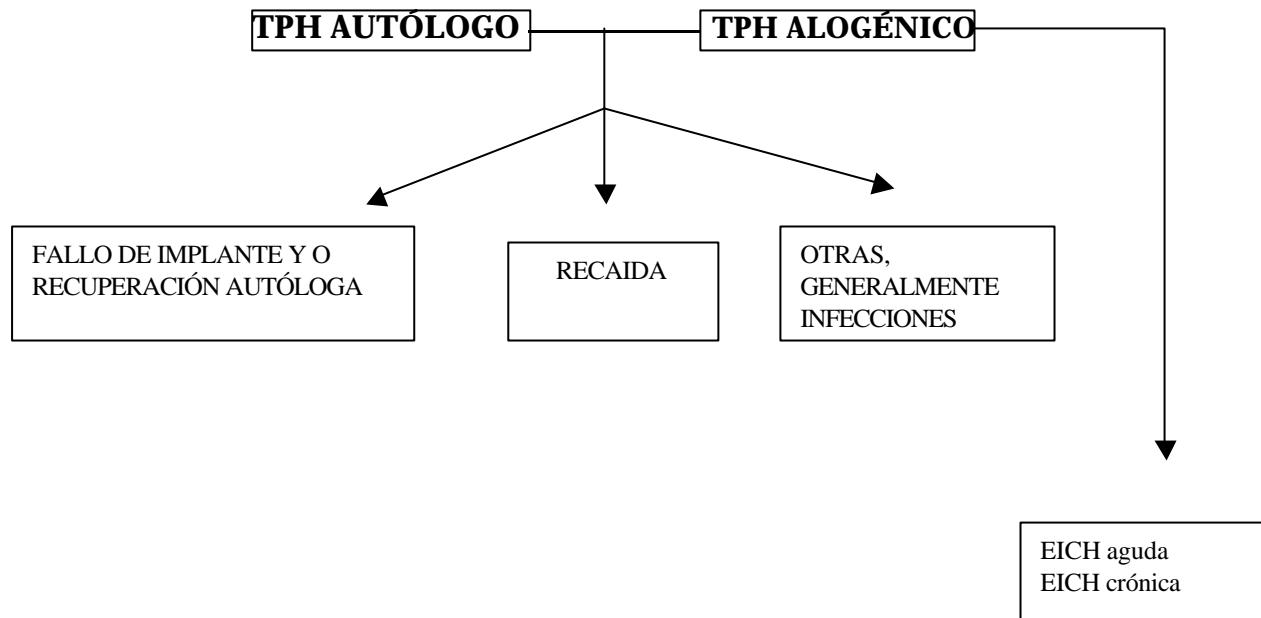


Figura 2.6. Complicaciones post-TPH



2.3 MATERIAL DE LABORATORIO

2.3.1 APARATOS Y MATERIAL FUNGIBLE

El material utilizado ha sido el siguiente:

• Utilizados en el cultivo celular y en la obtención de las preparaciones

Contador automático de células (SYSMEX)
Cámara de flujo laminar (TELSTAR)
Incubador de CO₂ (FORMA SCIENTIFIC, Inc)
Centrífuga CT-422 (JOUAN)
Plancha calefactora (OXFORD TRADE)
Falcons 25ml (CORNING)
Tubos de vidrio cónicos de 20ml (AFORA)
Pipetas Pasteur estériles de 135 mm (CEB)
Portaobjetos de vidrio (KNITLER GLÄSER)

• Utilizados en la tinción de bandas G

Baño (SELECTA)
Cubetas de tinción
Pipetas de vidrio 5 y 10 ml
Vasos de precipitado 50 ml

• Utilizados en las técnicas de FISH

Baños (SELECTA Y BRAUN)
Microcentrífuga Biofuge 13 (HERAEUS)
Estufa (HERAEUS)
Micropipetas (BIOHIT)
Puntas de micropipeta de 10 y 1000µl
Filtros estériles de 0,22µ (MILLIPORE)
Cubetas de vidrio de 100 ml
Probetas de 100, 500 y 1000 ml
Cajas metálicas
Eppendorffs (ELKAY)
Tubos de plástico con fondo cónico de 10ml (CORNING)

Cubreobjetos de 24x24 y de 15x15 (MENZEL-GLÄSER)

• Microscopios

Microscopio invertido (NIKON)

Microscopio óptico (LEITZ)

Microscopios de fluorescencia (AXIOPHOT ZEISS equipado con lámpara de 50W y filtros de excitación para la FITC y el ioduro de propidio y OLYMPUS Bx60 equipado con una lámpara de 100W, triple filtro de excitación para la FITC, TRITC Y DAPI, filtro para la FITC y para la TRITC)

• Material fotomicroscopía

Gelprinter (TDI)

Cámaras de video y monitor VM-900 (HITACHI)

• Otros

Agitador magnético (DINKO)

pHmetro (CRISON)

Balanza de precisión (SARTORIUS)

Sistema de purificación de agua Mili Q (MILLIPORE)

Autoclave (CERTO Y RAYPA)

Congelador -20°C (LIEBHERR)

Refrigerador (LIEBHERR)

2.3.2 PRODUCTOS

• Productos para el medio de cultivo de MO

Medio de cultivo RPMI 1640 sin Hepes y sin glutamina (GIBCO)
Suero bovino fetal (GIBCO)
Penicilina-Estreptomicina 12.000 uni (GIBCO)
Calciparina 15000 uni (SANOFI WINTHROP)
L-Glutamina 200mM (GIBCO)

• Productos para la extracción del cultivo

Colcemid (GIBCO)
KCl 0,075M (MERCK)
Metanol pa (MERCK)
Ácido acético pa (MERCK)

• Productos para la limpieza de los portaobjetos

Metanol (PANREAC)
Dextrán sulfato (MERCK)
Histolemon (CARLO HERBA)

• Productos para la tinción de Bandas G

NaCl pa (MERCK)
Citrato trisódico dihidratado pa (MERCK)
Colorante Wright (SIGMA)
 KH_2PO_4 dihidrogenofosfato de potasio pa (MERCK)
 Na_2HPO_4 dihidrogenofosfato de sodio pa (MERCK)

• Productos para la observación al microscopio

Aceite de inmersión (MERCK)

• Productos para la técnica de Hibridación *in situ*

Anticuerpo de cabra anti-avidina biotinilada (VECTOR)
Avidina-FITC (VECTOR)

Kit *Nick Translation* (BETESHDA RESEARCH LABORATORIES, BRL)

DNA humano genómico total (BRL)

DNA de esperma de salmón (BOEHRINGER)

Acetato de sodio (BRL)

RNAsa (BOEHRINGER)

HCl (MERCK)

Pepsina (SIGMA)

Formaldheido pa (MERCK)

Etanol pa (MERCK)

Formamida (RIEDEL-DE HÄEN)

EDTA (MERCK)

MgCl₂ (SIGMA)

Nonidet P-40 (FLUKA)

Goma de sellar, Ruber cement (BEST-TEST)

Vectashield (SIGMA)

DAPI (SIGMA)

Ioduro de propidio (SIGMA)

• Sondas

Se han utilizado tres tipos:

* Las utilizadas en la técnica de pintado cromosómico, constituidas por todas las secuencias de DNA de cada cromosoma que hibridan sobre todo el cromosoma. Se han utilizado las de la casa ATTC y se han marcado por el método del *Nick Translation*, y las de marcaje directo de las casas comerciales CAMBIO y VYSIS.

* La BCR/ABL (VYSIS) hibrida sobre el gen c-abl situado en la banda q34 del cromosoma 9 y sobre la region bcr situado en la banda q11 del cromosoma 22. La sonda está marcada con dos fluorocromos, de espectro verde y rojo para el gen abl y el gen bcr respectivamente.

* Las de los cromosomas X e Y (VYSIS) constituidas por secuencias de DNA α-satélite, correspondientes a la región centromérica del cromoma X y a la región de heterocromatina de DNA satélite II del cromosoma Y, marcadas con dos fluorocromos, espectro rojo y verde, respectivamente.

2.3.3 SOLUCIONES

- **Medio de cultivo de MO**

Para preparar 100ml de medio se mezclan:

- 80 ml de RPMI 1640
- 20 ml de suero bovino fetal
- 2 ml de L-glutamina
- 1,5 ml de penicilina-estreptomicina
- 1,8 ml de calciparina

El suero bovino fetal se ha de desactivar previamente para evitar la reacción de antígeno-anticuerpo que provocaría su coagulación, para ello se incuba en un baño a 56°C durante 30 minutos agitándolo con frecuencia.

- **Soluciones utilizadas en la extracción del cultivo**

Hipotónico: KCl 0,075M (0,5522g en 100ml de agua destilada)

Carnoy: 3 partes de metanol y una de ácido acético

Es importante preparar ambas soluciones en el momento de utilizarlas para mantener sus propiedades osmóticas y fijadoras, respectivamente.

- **Tinción de Bandas G**

Colorante Wright: 1,25g de Wright en 500ml de metanol. Se mantiene en agitación durante una hora hasta que esté bien disuelto, se filtra con un papel de filtro y se mantiene en una botella protegida de la luz a 37°C durante tres días. Se conserva a 4°C.

Buffer Sörensen: se prepara a partir de un 50% de solución A y un 50% de solución B.

Solución A: 4,54g de KH_2PO_4 en 1litro de agua destilada.

Solución B: 5,93g de $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ en 1litro de agua destilada.

Se conserva a 4°C.

- **Soluciones utilizadas en la técnica de Hibridación *in situ***

20xSSC: 87,75g de NaCl y 44,1g de citrato de sodio dihidratado en agua tridestilada hasta 500ml. Se ajusta a pH 7 y se esteriliza. Para obtener el 2xSSC se hace una dilución 1/10.

* Soluciones para el pretratamiento de las preparaciones

Rnasa solución madre 10mg/ml. Se mezclan 25mg de RNAsa en 2,5ml de 2xSSC. Se filtra la solución, se hacen alícuotas de 200μl y se calientan a 100°C durante 15 minutos, con el fin de destruir la DNAsa.

Se conserva a -20°C.

La solución de trabajo consiste en utilizar 150μl de la solución madre por preparación.

Pepsina solución madre 20mg/ml. Se diluye 1g de pepsina en 50ml de agua estéril, se hacen alícuotas de 500μl y se guarda a -20°C.

Antes de utilizarla se disuelven 500μl de la solución madre en 100ml de una solución 0,01N de HCl.

* Solución de post-fijación

10xPBS. Se mezclan 4g de KH₂PO₄, 23g de Na HPO₄ y 80g de NaCl en agua tridestilada hasta 1l. Se autoclava. Para obtener el 1xPBS se hace una dilución 1/10.

Formaldehido al 37%. 1,6 ml de formaldehido, 3ml de MgCl₂, 6ml de 10xPBS en 49,9ml de agua tridestilada.

* Soluciones de deshidratación

etanol al 70%, al 80% y al 100%

* Solución de desnaturización

Formamida al 70%. 70ml de formamida en 30ml de 2xSSC. Ajustarlo a pH 7. Se prepara en el momento de su utilización.

* Soluciones para el marcaje de la sonda

Solución de marcaje con biotina para 1μg de sonda

Kit Nick Translation BRL: 5μl de 10x dNTP conteniendo biotin-14-dATP y 5μl de una mezcla de enzimas 10x conteniendo DNA polimerasaI y DNA polimerasaI/DNAsaI, en 45μl de agua destilada.

Solución madre de Stop mix: 4 mg de Bromofenol al 0,1%, 20 mg de Azul dextran al 0,5%, 80μl de NaCl 5M, 800μl de EDTA 0,1M, 30μl de Tris 1M y 4ml de agua tridestilada

Se conserva a -20°C. Para 1μg de sonda se toman 50μl de la solución madre de *stop mix*.

DNA humano genómico total (1μg/μl) contiene fragmentos de 200 a 500pb. Se hacen alicuotas de 2μl y se conservan a -20°C. Se toman 2μl por 1μg de sonda

DNA de esperma de salmón (10μg/μl) contiene fragmentos de 200 a 500pb. Se hacen alicuotas de 1μl y se conservan a -20°C. Se toman 1μl por 1μg de sonda

Acetato de sodio 2M. Se toman 10μl por 1μg de sonda

Etanol al 100%. Se toman 250μl por 1μg de sonda

Formamida al 100%. Se toman 10μl por 1μg de sonda

Solución de TE: 0,7878mg de Tris 10mM y 0,1811g de EDTA 1mM en 500ml de agua tridestilada

* Solución de hibridación

Generalmente se toman 10μl sonda por muestra y su contenido varía según el protocolo de la casa comercial que se utilice. En el caso de las sondas con marcaje indirecto por cada 5μl se añade 5μl de la solución madre de *master mix*.

Solución madre de master mix: 2g de dextrán sulfato al 20%, 1ml de 20xSSC, 9ml de agua tridestilada

* Soluciones de post-hibridación

-Formamida al 50%. 50ml de formamida en 50ml de 2xSSC. Ajustar a pH 7. Se puede conservar a 4°C durante un mes.

* Soluciones de lavado

0.1XSSC: 2,5ml de 20xSSC en 497,5ml agua tridestilada

4XSSC: 100ml de 20xSSC en 400ml de agua tridestilada

Nonidet P40 al 0.1%: 100ml de 20xSSC, 1ml de NP40 en 850ml de agua tridestilada.

Ajustar pH 7. Se conserva a Tª ambiente.

Según la sonda utilizada la solución de lavado será distinta.

* Soluciones para la amplificación de la señal

Estas soluciones también varían según el protocolo de la casa comercial que suministra la sonda. Aquí se describen las soluciones utilizadas para la amplificación de la señal de las sondas con marcaje indirecto.

Avidina-FITC: solución madre 0,5mg de avidina en 1ml de agua estéril.

Se hacen alicuotas y se guardan en el congelador.

Anticuerpo de cabra anti-avidina biotinilada: solución madre 0,5mg de anti-avidina biotilinada en 1ml de agua estéril.

Se hacen alicuotas y se guardan al congelador.

4xSSC estéril: se filtran 10ml de 4xSSC a través de un filtro millipore de entre 20 y 45 μ de diámetro

* Soluciones de contra-tinción

-Ioduro de propidio (IP): solución madre de 1mg de IP en 1ml de agua tridestilada

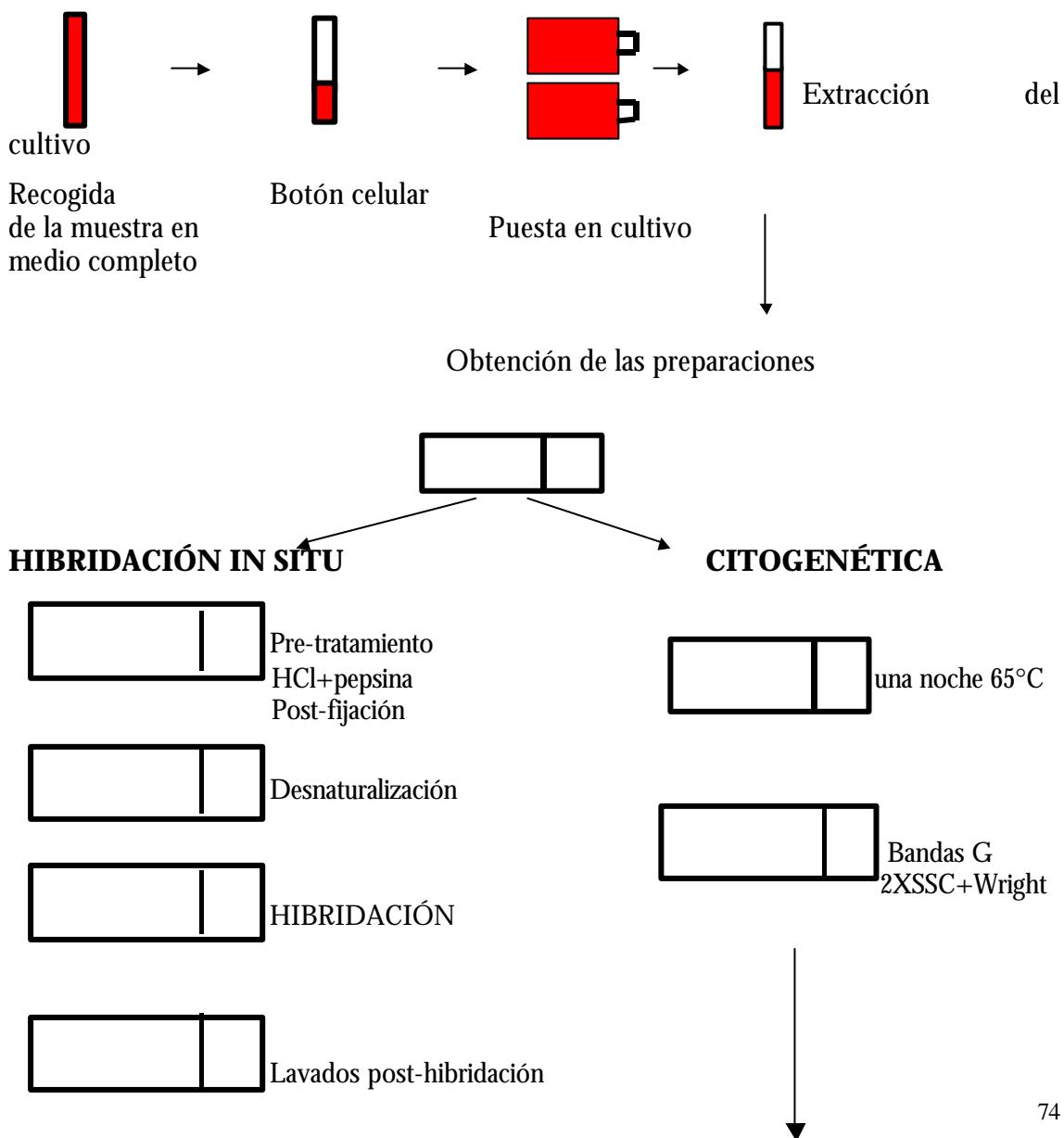
DAPI: solución madre de 5mg de DAPI en 1ml de agua tridestilada

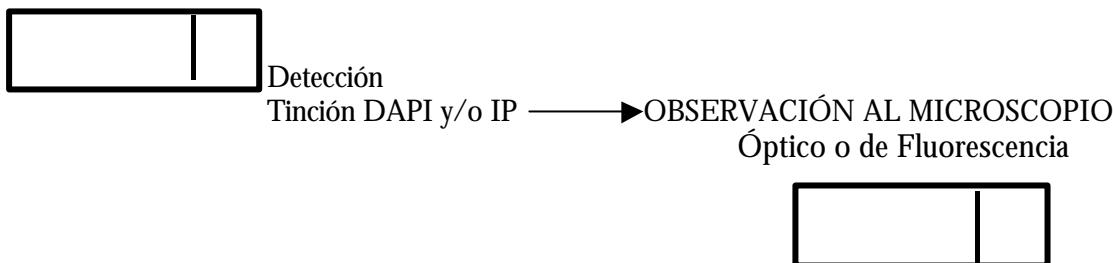
Según el marcaje de la sonda se utilizará una u otra contratinción.

2.4 METODOLOGÍA

Una vez la muestra se remite al laboratorio, se realiza un cultivo celular a partir del cual se obtienen las preparaciones para el estudio citogenético y para el análisis de hibridación *in situ* (Figura 2.7).

Figura 2.7. Metodología utilizada en el procesamiento y análisis de la muestra





2.4.1 CULTIVO CELULAR

Se realiza una primera centrifugación de la muestra a 1200rpm durante 12 minutos, para separar la serie blanca de los hematíes. Después de la centrifugación en el tubo aparece un botón celular con dos capas, una roja formada en su mayor parte por hematíes y por encima una capa de color rosáceo blanquecina formada en su mayoría por glóbulos blancos. Además del botón queda un sobrenadante correspondiente al medio de cultivo y al plasma sanguíneo.

Para obtener un crecimiento celular satisfactorio, se han de cultivar unas 2×10^6 células por mililitro de cultivo. Con una jeringuilla de insulina de 1ml se recoge la capa blanquecina y se coloca una gota en un eppendorff, para realizar el contaje. Se reparten unos 10×10^6 millones de células por Falcon que contiene 5 ml de medio de cultivo. Se cierran los Falcons dejando el tapón algo abierto y se colocan en el incubador de CO₂ a 37°C durante 24 horas.

El número de Falcons que se siembran varía en función del material celular disponible. Si se dispone de suficiente material se cultiva uno durante 24h y otro añadiendo 20μl de antimitótico colcemid a una concentración de 0,02μl/ml, durante toda la noche.

2.4.1.1 EXTRACCION DEL CULTIVO

A la muestra incubada durante 24h sin colcemid, media hora antes de la extracción del cultivo se añade 50μl de éste, agitando antes con suavidad el Falcon. Pasados 30 minutos se pasa el contenido del Falcon a un tubo cónico de centrífuga y se centrifuga a 1600rpm durante 12 minutos. Se elimina el sobrenadante con cuidado de no mover el botón celular. Se resuspende el botón, se añade la solución hipotónica lentamente y después se enrasa el tubo. Es importante obtener una solución lo más

traslúcida posible, sin grumos que posteriormente pueden impedir obtener unas extensiones limpias. La muestra con el hipotónico se incuba a 37°C durante 30 minutos.

Pasado éste tiempo se hace una pre-fijación de la muestra añadiendo unas cuantas gotas de Carnoy y resuspendiendo bien ésta hasta conseguir una solución translúcida. Se centrifuga la muestra a 1600rpm durante 12 minutos.

Se elimina el sobrenadante con cuidado de no mover el botón celular, y se realiza la fijación de la muestra. Después de resuspender el botón se añade lentamente el Carnoy sin que se formen grumos y se enrassa. Se vuelve a centrifugar a 1600rpm durante 12 minutos y se elimina el sobrenadante. El botón celular se vuelve a resuspender, se añade Carnoy y se centrifuga. Este último paso se repite tantas veces como sea necesario hasta obtener un botón celular blanco, generalmente con tres lavados el material queda limpio.

Tras realizar el último lavado, el botón celular se resuspende con Carnoy recién preparado (en proporción 3:1 ó 4:1) y se realizan las extensiones, el material sobrante se pasa a un eppendorff debidamente rotulado para su conservación a -20°C.

Las extensiones se realizan dejando caer la gota sobre el portaobjetos desde la máxima altura posible. Una vez ha caído la gota sobre el portaobjetos, éste se coloca rápidamente sobre una plancha calefactora a 55-60°C. Se dejan sobre la plancha hasta que se secan.

Se controla la concentración y la calidad del material en un microscopio invertido. Tanto para el estudio de bandas G como para la aplicación de técnicas de FISH es importante que el material esté bien seco y que no se observen núcleos y cromosomas refringentes. Si la preparación está refringente la dejaremos secar varios minutos más sobre la plancha. Una extensión buena es aquella en la que tanto los núcleos como los cromosomas muestran un color gris oscuro.

Para obtener una buena extensión los portaobjetos han de estar muy limpios. Para la aplicación de la técnica de bandas G es suficiente con mantenerlos sumergidos en metanol a -20°C. Para la aplicación de técnicas de FISH antes de sumergirlos en metanol se lavan con Dextran sulfato al 20% y con agua destilada.

2.4.2 BANDAS G

El estudio del cariotipo de la muestra se ha realizado mediante la tinción de bandas G. Las preparaciones se han envejecido durante toda una noche a 65°C. Las

bandas G se han obtenido según modificación del protocolo descrito por Yunis en 1982, incubando las preparaciones en 2xSSC a 65°C y tiñéndolas con el colorante Wright disuelto en tampón Sörensen (1:3). El tiempo de incubación y de tinción varía en función de la muestra, del envejecimiento de ésta y de la solución de Wright preparada. En general para una noche de envejecimiento a 65°C, se han incubado durante 20 y 30 segundos en 2xSSC y se han teñido con Wright de un minuto y medio a dos. Después se lavan con agua y se dejan secar.

Para el estudio citogenético y descripción del cariotipo se han seguido las normas y la nomenclatura establecidas en la ISCN 1991 y ISCN 1995.

2.4.3 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

Se han utilizado las técnicas de pintado cromosómico, la FISH con la sonda BCR-ABL y la FISH con la sonda dual para los cromosomas X e Y.

2.4.3.1 PINTADO CROMOSÓMICO

La técnica de pintado cromosómico (PC) es una FISH, en la que se utilizan sondas formadas por fragmentos de DNA que corresponden a todas las secuencias únicas de un cromosoma (librerías cromosómicas). Permite visualizar el cromosoma entero, y por lo tanto detectar monosomías, trisomías, delecciones que afectan a una parte importante del cromosoma y translocaciones.

En este trabajo se han realizado dos variaciones de la técnica de pintado cromosómico, dependiendo de la sonda utilizada. Con las sondas no marcadas de la ATTC, en un primer paso se ha realizado el marcaje de la sonda con biotina por el método de *Nick Translation*, con el *kit* de marcaje de la casa BRL y en un segundo paso, después de la hibridación se ha procedido a la amplificación de la señal. Con las sondas marcadas directamente de las casas comerciales ONCOR, CAMBIO y VYSIS se ha seguido el protocolo detallado por la casa comercial y generalmente no han necesitado amplificación de la señal.

- Marcaje de la sonda**

Se ha utilizado el método de *Nick translation* recomendado por la casa comercial BRL:

- En un eppendorff para 1 μ g de sonda se añaden 5 μ l de 10x dNTP conteniendo Biotin-14-dATP y 5 μ l de una mezcla de enzimas 10x que contiene DNA polimerasa I y DNA polimerasa I/DNAasa I, y 45 μ l de agua destilada
- Se incuba la mezcla a 16°C durante 60 minutos
- Se añade a la mezcla 50 μ l de *stop mix*, para parar el marcate de la sonda
- Para eliminar los nucleótidos no incorporados a la sonda de DNA se realiza una cromatografía de exclusión por filtración en columnas de Sephadex, equilibrando las columnas haciendo tres lavados con 100 μ l de TE y centrifugando a 1200rpm durante 5 minutos
- Se pasa a través de la columna la mezcla con la sonda marcada y los nucleótidos no unidos, y se recoge en otro eppendorff la sonda marcada
- Al eppendorff con la sonda marcada se añaden, 2 μ l de la solución de DNA humano genómico total, 1 μ l de la solución de DNA de esperma de salmón, 10 μ l de acetato de sodio 2M y 250 μ l de etanol al 100%. Se deja un mínimo de 30 minutos a -20°C y se centrifuga a 12.000g
- Se elimina el etanol y se añaden 250 μ l de etanol frío (a -20°C). Se vuelve a centrifugar 15 minutos a 12.000g
- Se elimina el etanol y se deja secar el botón
- Se añaden 10 μ l de formamida y se resuspende bien, se deja a 37°C durante 30 minutos
- La sonda marcada se puede conservar a -20°C durante 1 año

• **Protocolo de la técnica de pintado cromosómico**

Varía según si la sonda utilizada está marcada directamente o no y según la casa comercial suministradora de la sonda, en este trabajo el protocolo que ha dado mejor rendimiento ha sido el siguiente:

- * Es importante que las extensiones de las muestras se hagan el día antes a la aplicación de la técnica, para que el DNA se envejezca y sea más fácil de desnaturizar sin que se altere demasiado la estructura del cromosoma. En la preparación, con un lápiz de

diamante se delimita el área a hibridar, que tiene que ser una zona limpia y con abundantes metafases.

* En un primer paso se ha llevado a cabo un PRE-TRATAMIENTO de las muestras, que consiste en una serie de tratamientos con proteasa y RNAsa. Se utiliza la pepsina que actúa degradando las proteínas de membrana y citoplasmáticas, facilitando el acceso de la sonda a la secuencia diana del ADN en el núcleo celular. Si se utilizan preparaciones citogenéticas convencionales el tratamiento con hipotónico ya elimina la membrana y el citoplasma celular, sin embargo el tratamiento con pepsina es aconsejable ya que ésta actúa también sobre las proteínas que rodean el ADN nuclear, facilitando su accesibilidad. La RNAsa actúa degradando el ARN celular. Al mismo tiempo se ha realizado una POST-FIJACIÓN del material que evita una posible degradación del DNA y mantiene la estructura del cromosoma durante los pasos posteriores de desnaturización y de hibridación. Para ello:

- se colocan sobre el portaobjetos 150µl de la solución de RNAsa en 2xSSC, se cubre con un cubreobjetos de 24x40, se coloca en una caja metálica y se deja incubar durante 1 hora a 37°C
- se sumerge la preparación en un baño de 2xSSC hasta que se desprende el cubreobjetos, y se realizan dos lavados más en 2XSSC a T^a ambiente durante 5 minutos cada uno
- se incuba la preparación en un baño de pepsina en HCl 0,01N a 37°C durante 5 minutos
- se realiza un lavado en 1xPBS a T^a ambiente durante 5 minutos
- se realiza la post-fijación en una solución de formaldehido al 37% a T^a ambiente durante 10 minutos
- se realiza otro lavado en 1xPBS a T^a ambiente durante 5 minutos

* A continuación se ha realizado la deshidratación de las muestras con el fin de secar al máximo los portaobjetos, eliminando moléculas de agua que pueden interferir en la hibridación, para ello:

- se sumerge la preparación en una serie de baños de etanol al 70%, 80% y 100% durante 3 minutos en cada uno, y se dejan secar a T^a ambiente

* El siguiente paso consiste en la DESNATURALIZACIÓN del DNA tanto de la sonda como de la muestra problema, para ello:

- la preparación se sumerge en un baño de formamida al 70% a $72^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos. Rápidamente se detiene la desnaturalización sumergiendo la preparación en una serie de baños de etanol frío (a -20°C) al 70%, 80% y 100% durante 3 minutos en cada uno
- la sonda ($10\mu\text{l}$ de sonda/porta) se incuba a 70°C durante 10 minutos y se mantiene a 37°C , entre 15 minutos y dos horas, hasta el momento de hibridar

La solución de $10\mu\text{l}$ de sonda es diferente según el tipo de sonda utilizada:

- en las sondas marcadas por el método de *Nick Translation*, contiene $5\mu\text{l}$ de sonda marcada previamente calentada a 37°C y $5\mu\text{l}$ de *master mix* (20% dextran sulfato en 2xSSC)
- en las sondas de marcaje directo, el contenido depende de la casa comercial que la suministra

* Durante la HIBRIDACIÓN es importante mantener el área de hibridación sellada herméticamente y en condiciones de alta humedad, con el fin de evitar la evaporación de la solución de hibridación, para ello:

- se coloca sobre el área (previamente delimitada) de la preparación los $10\mu\text{l}$ de sonda, se cubre con un cubreobjetos de 20x20, se sellan bien los bordes con goma de sellar, se coloca la preparación en una caja metálica que contiene papel mojado para crear una cámara húmeda, y se deja incubar a 42°C durante toda la noche

* El siguiente paso consiste en la DETECCIÓN de la señal:

- se retira la cola de los bordes del cubreobjetos con cuidado de no moverlo, y se sumerge la preparación en un baño en 2xSSC a T^a ambiente, hasta que se desprende el cubreobjetos
- se realizan tres lavados en una solución de post-hibridación de formamida al 50% a 45°C durante 5 minutos en cada uno
- se lava la preparación en tres baños de 0,1xSSC a 45°C durante 5 minutos en cada uno
- finalmente se realizan tres lavados en una solución de Tween20 al 2% en 4xSSC a 45°C durante 5 minutos en cada uno

Los lavados descritos varían según la casa comercial que suministra la sonda.

* En la mayoría de casos antes de los tres últimos lavados de post- hibridación se ha realizado la amplificación de la señal. Las sondas que se han utilizado estaban marcadas con biotina de ahí que para la amplificación de la señal se haya utilizado los anticuerpos de avidina y anti-avidina (Figura 2.8), para ello:

- se coloca sobre el área hibridada de la preparación 500 μ l de BSA (albumina de suero bovino) en 4xSSC, se cubre con un cubreobjetos de 24x60 y se incuba en la caja metálica a 37°C durante 30 minutos. Este paso es importante ya que se consigue que las áreas de afinidad inespecífica de las proteínas queden bloqueados por la albumina aumentando la afinidad de la avidina por la biotina y por lo tanto eliminando el ruido de fondo.
- se hace saltar el cubreobjeto con un golpe seco y se lava la preparación en 4xSSC en Tween20 al 0,01% a 45°C durante 1 minuto
- se colocan sobre el área hibridada de la preparación 200 μ l de la solución de avidina (1 μ l de avidina-FITC en 200 μ l de 4xSSC estéril), se cubre con un cubreobjetos de 24x50 y se incuba en la caja metálica a 37°C durante 30 minutos
- se lava la preparación en tres baños de 4xSSC en Tween20 al 0,01% a 45°C durante 5 minutos en cada uno
- se colocan sobre el área hibridada de la preparación 200 μ l de la solución de anti-avidina (1 μ l de anti-avidina biotilinada en 200 μ l de 4xSSC estéril), se cubre con un cubreobjetos de 24x50 y se incuba en una caja metálica a 37°C durante 30 minutos
- se lava la preparación en tres baños de 4xSSC en Tween20 al 0,01% a 45°C durante 5 minutos en cada uno
- se colocan sobre el área hibridada de la preparación 200 μ l de la solución de avidina (1 μ l de avidina-FITC en 200 μ l de 4xSSC estéril), se cubre con un cubreobjetos de 24x60 y se incuba en una caja metálica a 37°C durante 30 minutos
- se lava la preparación en tres baños de 4xSSC en Tween20 al 0,01% a 45°C durante 5 minutos en cada uno

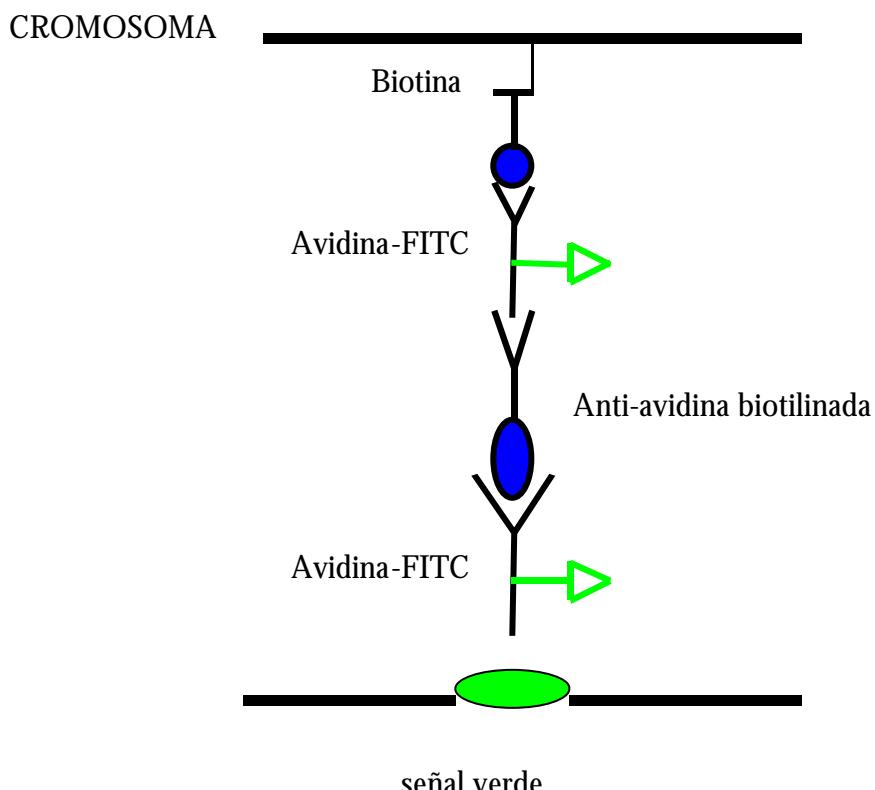
Si la señal es débil se puede realizar una segunda amplificación de la señal, o aumentar el número de lavados de post-hibridación.

* Se realiza una CONTRA-TINCIÓN, ésta es diferente según el marcate de la sonda utilizada. En las sondas marcadas con biotina y detectada con avidina-FITC la señal que

se obtiene es de color verde, por lo tanto como contratinción se utiliza el propidium iodide que tiñe el resto de la preparación de color naranja. Para ello:

- se colocan sobre el portaobjetos 500 μ l de la solución de propidium iodide (10 μ l propidium iodide y 5 μ l de DAPI en 5ml de 4xSSC estéril), y se deja en la oscuridad a T^a ambiente durante 5 minutos
- se lava bien la preparación con abundante agua del grifo y se deja secar en la oscuridad a T^a ambiente
- se colocan 9 μ l de “antifade” Vectashield sobre el área hibridada, y se observa al microscopio de fluorescencia

Figura 2.8. Esquema de la detección y amplificación de la señal de una sonda marcada con biotina



* VISUALIZACIÓN de la señal

La visualización al microscopio permite observar en metafase, dos señales de color verde correspondientes al cromosoma que estemos hibridando, si la metafase es normal (Fig 2.9). Una señal verde o tres señales verdes del cromosoma en cuestión, si el caso presenta monosomía o trisomía, respectivamente. Tres señales verdes de diferente tamaño si presenta una translocación donde está implicado el cromosoma pintado (Fig 2.10).

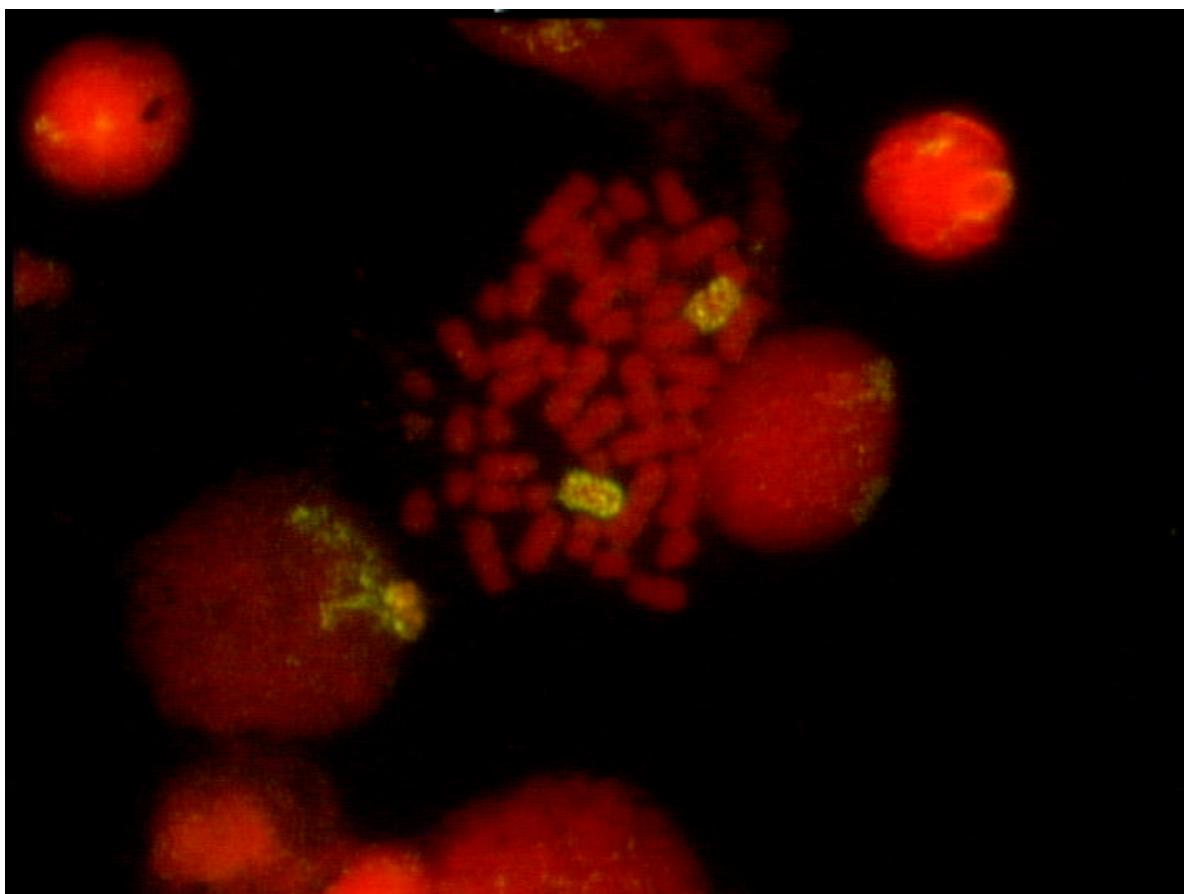


Figura 2.9. Pintado cromosómico realizado con la sonda del cromosoma 11. Se observa una metafase con dos señales verdes correspondientes a los dos cromosomas 11 normales

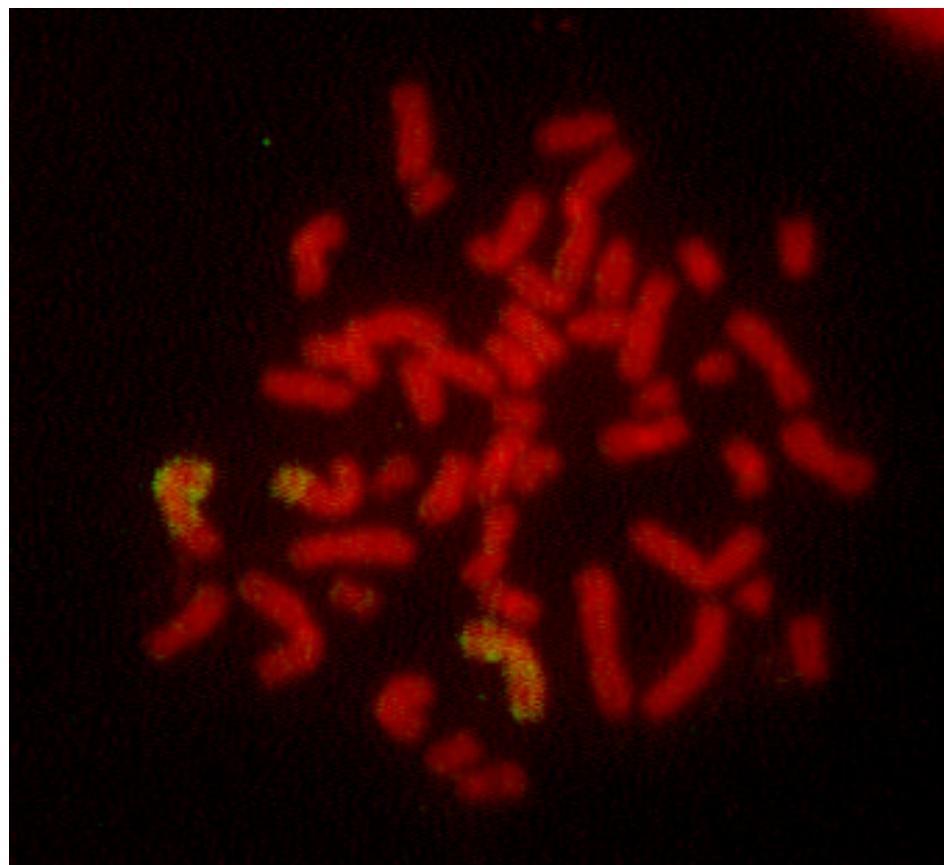


Figura 2.10. Pintado cromosómico realizado con la sonda del cromosoma 3. Se observa una metafase del caso 33, con tres señales de diferente tamaño correspondientes a un der(6)t(3;6)(p21;q23)

2.4.3.2 HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON LA SONDA BCR-ABL

Se utiliza la sonda BCR-ABL formada por las secuencias correspondientes al gen ABL situado en el cromosoma 9 en la banda q34 y a la region M-bcr del gen BCR situado en el cromosoma 22 en la banda q11. Se visualiza la t(9;22)(q34;q11) presente en los casos con LMC o con leucemias agudas Ph positivas. La sonda utilizada es la de la casa comercial VYSIS marcada directamente con dos fluorocromos (espectro verde y espectro rojo).

El protocolo utilizado es similar al descrito en la técnica de pintado cromosómico, usando sondas de marcaje directo, con pequeñas variaciones:

* El PRE-TRATAMIENTO y la POST-FIJACIÓN de la preparación consiste en las mismas incubaciones descritas en la técnica anterior. Aunque en la mayoría de los casos se han realizado ambos tratamientos, en algún caso, donde la extensión no presentaba restos citoplasmásticos, no se ha realizado.

* La DESNATURALIZACIÓN consiste en los mismos pasos pero con algunas modificaciones:

- la desnaturalización de las preparaciones se realiza en un baño con formamida al 70% a 73°C±1°C durante 5 minutos

- la deshidratación se produce en una serie de etanoles fríos al 70% 85% y 100%, se secan al aire y antes de hibridar se colocan en una plancha calefactora a 45-50°C durante 2 minutos

- la desnaturalización de la sonda (de la casa VYSIS), consistió la incubación en un baño a 73°C±1°C durante 5 minutos da la solución de 10µl de sonda formada por 7µl de buffer, 1µl de sonda y 2 µl de agua destilada

* Para la HIBRIDACIÓN:

- se colocan 10µl de la solución con la sonda, sobre el área de la preparación a hibridar (previamente delimitada), se cubre con un cubreobjetos de 15x15, y se sellan los bordes del cubreobjetos con goma de sellar.

- la preparación se coloca en una caja metálica con cámara humeda, y se deja hibridar a 37°C durante toda la noche.

* Los lavados de POST-HIBRIDACIÓN son similares a la técnica de pintado cromosómico con las siguientes modificaciones:

- se elimina la goma de sellar del cubreobjetos, y se sumerge la preparación en un baño con 2xSSC hasta que se desprende el cubreobjetos
- se incuba la preparación en tres baños de formamida al 50% a 45-47°C durante 10 minutos en cada uno
- se realiza otra incubación en 2XSSC a 45-47°C durante 10 minutos
- se incuba finalmente la preparación en 2XSSC con NP-40 al 0,1% entre 45-47°C, durante 10 minutos
- se deja secar a T^a ambiente

* La CONTRA-TINCIÓN se realiza con 10μl de una solución de DAPI.

* VISUALIZACIÓN de la señal

La visualización al microscopio de fluorescencia permite detectar en un caso normal tanto en interfase como en metafase, dos señales verdes (correspondientes a los dos alelos del gen ABL) y dos señales rojas (correspondientes a los dos alelos del gen BCR). Sobre un caso Ph positivo, una señal verde (correspondiente al alelo del gen ABL sin translocar), una señal roja (correspondiente al alelo del gen BCR sin translocar) y una señal amarillenta (correspondiente a la reorganización BCR-ABL) (Figura 2.11).

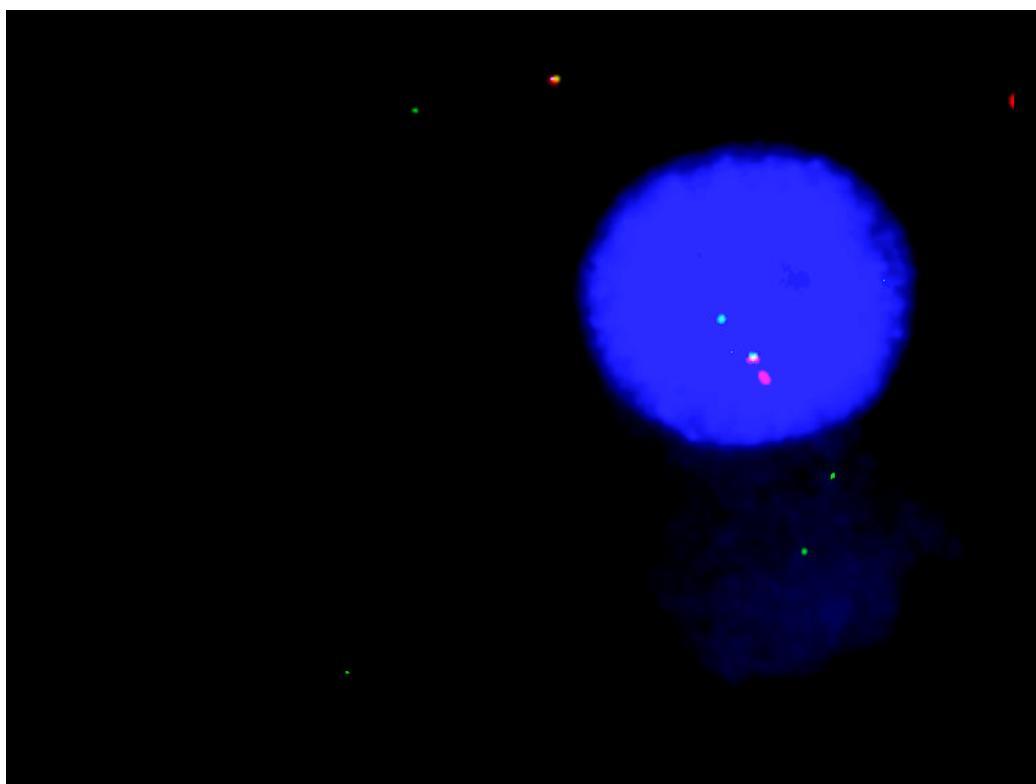


Figura 2.11 FISH con la sonda dual para la reordenación BCR-ABL. Se observa un núcleo con una señal amarillenta correspondiente a la fusión de los genes BCR y ABL, una señal verde correspondiente al alelo normal del gen ABL y una roja correspondiente al alelo normal del gen BCR

2.4.3.3 FISH CON SONDAS CORRESPONDIENTES A LOS CROMOSOMAS SEXUALES

En esta técnica se utilizan las sondas formadas por las secuencias de DNA correspondientes a la región centromérica del cromosoma X y a la región de heterocromatina del cromosoma Y. La sonda (VYSIS) está marcada directamente con un fluorocromo de espectro rojo para el cromosoma X y un fluorocromo de espectro verde para el cromosoma Y.

El protocolo de la técnica es similar a los descritos anteriormente, la diferencia más importante es que las preparaciones no requieren pre-tratamiento.

* La DESNATURALIZACIÓN consiste en:

- Una incubación de la preparación en formamida al 70% en 2XSSC a 72-74°C durante 4 minutos, se sumerge inmediatamente en una serie de etanoles fríos al 70%, 85% y 100% durante 1 minuto en cada uno y se deja secar al aire
- Los 10μl de la solución de sonda (1μl de spectrum CEP sonda, 2μl de agua y 7μl de spectrum CEP buffer con DNA bloqueante) se desnaturalizan en un baño a 74°C durante 5 minutos. Y se mantienen a 45°C hasta el momento de hibridar

* La HIBRIDACIÓN se realiza colocando los 10μl de la solución con la sonda sobre el área delimitada previamente sobre la preparación, se cubre el área con un cubreobjetos de 20x20 se sellan los bordes con goma de sellar, se coloca en una caja metálica con cámara húmeda y se deja 2 horas a 42°C

* Los lavados de POST-HIBRIDACIÓN son similares a los utilizados en la técnica anterior:

- se elimina la goma de sellar del cubreobjetos, y se sumerge la preparación en un baño con 2xSSC hasta que se desprende el cubreobjetos
- se incuba la preparación en tres baños de formamida al 50% a 45°C durante 10 minutos en cada uno
- se realiza otra incubación en 2XSSC a 45°C durante 10 minutos
- se incuba la preparación en 2XSSC con NP-40 al 0,1% a 45°C durante 5 minutos
- se deja secar a T ambiente

* La CONTRA-TINCIÓN se realiza con 10 μ l de DAPI.

* VISUALIZACIÓN de la señal

La visualización al microscopio de fluorescencia detecta tanto en interfase como en metafase, dos señales rojas sobre células XX (Figura 2.12) y una señal roja y otra verde sobre células XY (Figura 2.13).

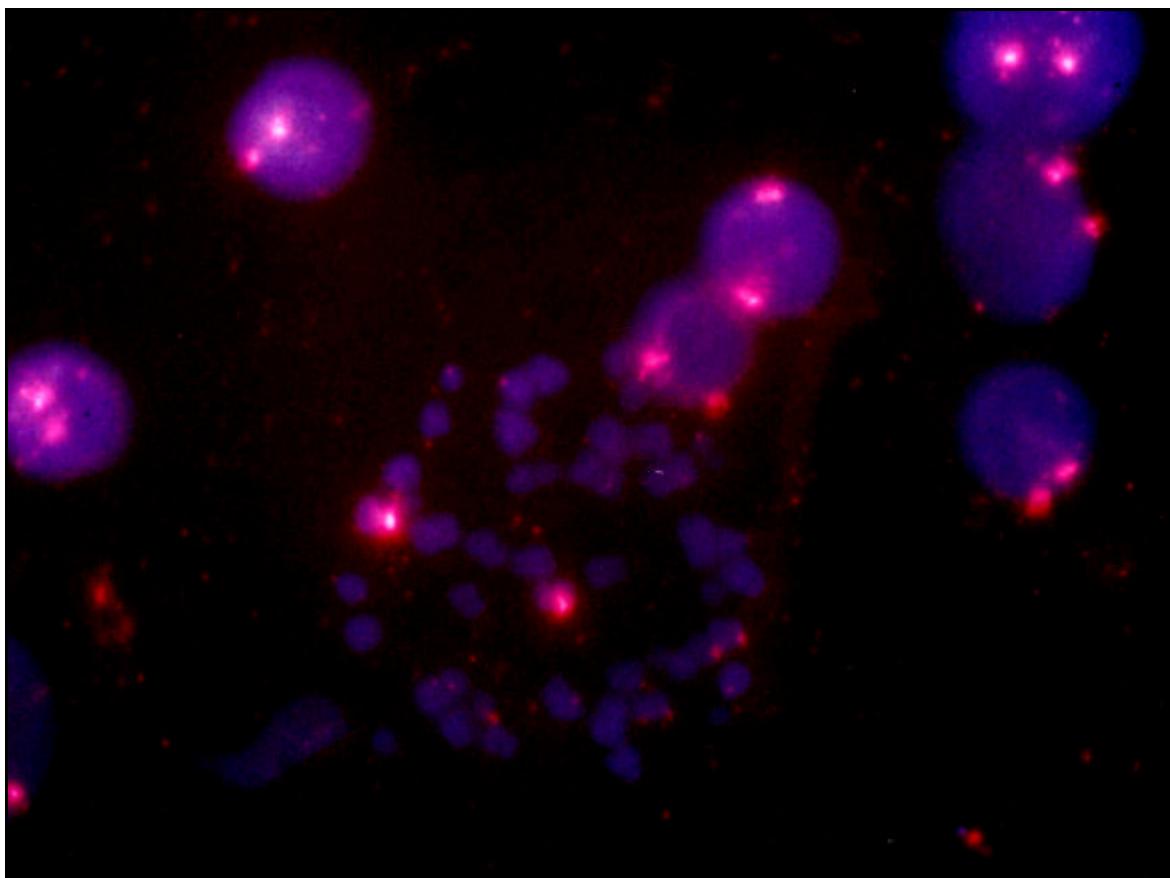


Figura 2.12. FISH con la sonda dual X/Y. En la figura se observan varios núcleos y una metafase con dos señales rojas correspondientes a células XX

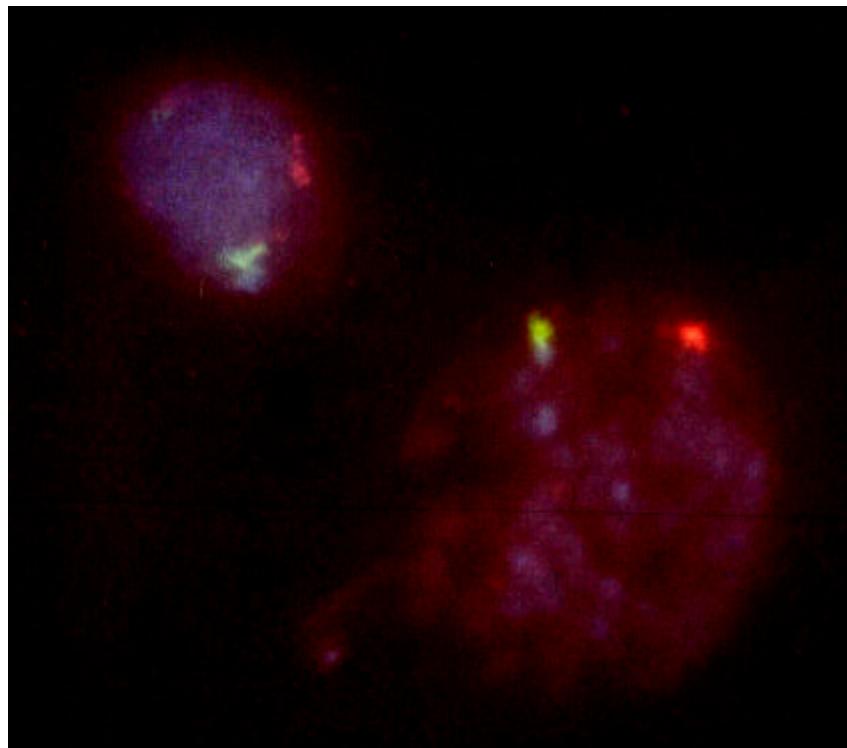


Figura 2.13. FISH dual con la sonda X/Y. En la figura se observan dos núcleos con una señal roja correspondiente al cromosoma X y una señal verde correspondiente al cromosoma Y, en células XY

2.8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado un análisis univariable, utilizando el test de *Fisher's* para comparar variables cualitativas y el test de *Mann-Whitney* para comparar variables cuantitativas. En cada variable cualitativa se ha calculado el riesgo total (RT) para cada valor de la probabilidad (p). No se ha realizado un análisis multivariable debido al tamaño de la muestra.

La supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) se han calculado por medio de las curvas de supervivencia estimadas por el método de *Kaplan-Meier*, para establecer si las diferencias entre las curvas son significativas se ha utilizado el estadístico *long-rank*. Todas las diferencias se han considerado significativas cuando la probabilidad era menor a 0,05.

III. RESULTADOS

3.1 ESTUDIO DEL QUIMERISMO

Desde enero de 1993 hasta abril de 1998 se ha realizado el seguimiento del quimerismo en 38 trasplantes de 37 niños afectos de enfermedades hematológicas que habían sido sometidos a un TPH alogénico de un donante de diferente sexo, en uno de ellos se realizó también el seguimiento tras someterse a un segundo trasplante (Tabla 3.1). Dieciseis eran niñas y veintiún niños, ambos de edades comprendidas entre los seis meses y los catorce años de edad.

- Veintiseis niños padecían algún tipo de neoplasia hematológica:
 - Diecinueve afectos de LLA, cinco transplantados en primera RC, uno en primera remisión parcial, nueve en segunda RC y cuatro en tercera RC.
 - Cinco afectos de LMA transplantados en primera RC
 - Uno afecto de AF que desarrolló un SMD transplantado en primera RC, que posteriormente desarrolló una LMA y fue sometido a un segundo TPH.
 - Uno afecto de LMC transplantado en FC.
- Once pacientes padecían enfermedades no neoplásicas:
 - Tres afectos de una AF
 - Dos afectos de una inmunodeficiencia combinada severa (IDCS)
 - Uno afecto de una anemia de Blackfan-Diamond (ABD)
 - Uno afecto de una anemia aplásica adquirida (AAA)
 - Uno afecto de un déficit de adhesión leucocitaria (DAL)
 - Uno afecto de una linfohistiocitosis (LH)
 - Uno afecto de una mucopolisacaridosis tipo I o síndrome de Hunter (SH)
 - Uno afecto de una leucodistrofia metacromática (LM)

De ellos, 32 pacientes recibieron células progenitoras hematopoyéticas (CPH) procedentes de MO, tres de SP y tres de SCU. De los cuales, en dos pacientes se infundió CPH deplecionadas de linfocitos T y en otros dos CPH tras una selección positiva de células CD34. Treinta y uno recibieron las CPH de un donante HLA idéntico y siete de un donante HLA no idéntico (Tabla 3.1).

RESULTADOS

Tabla 3.1 Pacientes incluidos en el protocolo de seguimiento del quimerismo

P	EDAD (años)	ENFERMEDAD	Estado TPH	DONANTE	PRODUCTO INFUNDIDO
4	8	LLA	1 ^a RP	HI	MO
7	11	LLA	2 ^a RC	HI	MO
15	7	LLA	1 ^a RC	HI	MO
18	11	LLA	2 ^a RC	HI	MO
21	3	LLA	1 ^a RC	HI	MO
22	13	LLA	2 ^a RC	HI	MO
24	8	LLA	2 ^a RC	HI	MO
42	10	LLA	3 ^a RC	HI	SP
43	14	LLA	3 ^a RC	NENI	MO
44	11	LLA	3 ^a RC	ENI	SP SELECCIÓN + CD34
47	11	LLA	2 ^a RC	HI	SCU
48	3	LLA	2 ^a RC	HI	MO
49	13	LLA	2 ^a RC	HI	MO
54	9	LLA	3 ^a RC	NENI	MO
55	5	LLA	2 ^a RC	HI	MO
56	6	LLA	1 ^a RC	HI	MO
58	4	LLA	1 ^a RC	NEI	MO DEPLECIÓN T
75	2	LLA	1 ^a RC	HI	MO
76	5	LLA	2 ^a RC	EI	MO
45	9	LMA-M2	1 ^a RC	EI	MO
11	7	LMA-M3	1 ^a RC	HI	MO
59	5	LMA-M3	1 ^a RC	ENI	MO
2	0,5	LMA-M4	1 ^a RC	HI	MO
1B	8	LMA-M5	2 ^a RC	HI	MO (2º TPH)
37	2	LMA-M5	1 ^a RC	HI	MO
5	4	LMC	FC	HI	MO
1A	6	AF/SMD	1 ^a RC	HI	MO
71	10	AF		NEI	MO
6	11	AF	1 ^a RC	NEI	MO
31	12	AF	1 ^a RC	HI	MO
23	7	AAA		NEI	MO
12	0,5	DAL		ENI	MO DEPLECION T
39	5	EBD		HI	MO
52	0,5	IDCS		NENI	SCU
79	1	IDCS		NEI	SCU
53	1	HX		ENI	SP SELECCIÓN + CD34
60	14	LM		HI	MO
20	6	MPS-I		HI	MO

P, número de paciente. RC, remisión completa. RP, remisión parcial. FC, fase crónica. HI, hermano HLA idéntico. EI, emparentado HLA idéntico. ENI, emparentado HLA no idéntico. NEI, no emparentado HLA idéntico. NENI, no emparentado HLA no idéntico. DEPLECION T, depleción de linfocitos T. A,B, paciente sometido a dos trasplantes

El seguimiento del quimerismo se ha realizado analizando los cromosomas sexuales mediante la aplicación de la técnica de FISH utilizando las sondas correspondientes a la región centromérica y a la región heterocromática de los cromosomas X e Y respectivamente y mediante el análisis citogenético con bandas G (Ortega et al, 1999).

3.1.1 ESTUDIO CONTROL PARA LA DETECCIÓN DEL QUIMERISMO

Para determinar mediante FISH cuando se podía considerar presencia de células XX o células XY, se ha realizado un estudio control en el que se han analizado un total de 16.000 núcleos (1000 núcleos por muestra) de muestras de MO procedentes de 16 individuos (8 niños y 8 niñas) que habían recibido un trasplante autólogo.

El rango de falsos negativos para núcleos XY en muestras de controles femeninos osciló entre el 0% y el 0,2%; el rango de falsos negativos para núcleos XX en muestras de controles masculinos osciló entre el 0% y el 0,1% (Tablas 3.2 y 3.3 respectivamente).

Tabla 3.2 Porcentaje de núcleos XY en muestras XX

Nº	% NÚCLEOS XX	% FALSOS NEGATIVOS (NÚCLEOS XY)
1	100	0
2	100	0
3	100	0
4	100	0
5	100	0
6	99,8	0,2
7	100	0
8	100	0

Media de falsos negativos = 0,025 Desviación estandard = 0,265

Tabla 3.3 Porcentaje de núcleos XX en muestras XY

Nº	% NÚCLEOS XY	% FALSOS NEGATIVOS (NÚCLEOS XX)
1	100	0
2	100	0
3	100	0
4	100	0
5	99,9	0,1
6	100	0
7	100	0
8	99,9	0,1

Media de falsos negativos = 0,025

Desviación estandard = 0,215

Para determinar el valor umbral a partir del cual se considera que una muestra presenta núcleos XX o núcleos XY se ha aplicado la siguiente fórmula:

Media de falsos negativos + 3 x desviación estandard = valor umbral

$0,025 + 3(0,265) = \underline{\textbf{0,82}}$ Valor umbral a partir del cual se ha considerado que una muestra de un individuo femenino presenta células XY

$0,025 + 3(0,215) = \underline{\textbf{0,67}}$ Valor umbral a partir del cual se ha considerado que una muestra de un individuo masculino presenta células XX

Para valorar con más fiabilidad los resultados obtenidos mediante FISH, en este trabajo se ha considerado que una muestra presentaba QM (células XX y células XY), cuando se ha observado un número de núcleos XX o XY igual o superior al 1%.

En el estudio citogenético se ha considerado presencia de células XX o XY cuando se ha observado al menos una metafase XX o XY.

En cuanto a la eficacia de ambas técnicas se ha observado que después de analizar un total de 106 muestras de médula ósea, en el 100% de las muestras analizadas por FISH se ha obtenido resultado, mientras que en un 12% (13/106) de las analizadas por citogenética no se pudo realizar el estudio por falta de metafases.

3.1.2 SEGUIMIENTO DEL QUIMERISMO SEGÚN LA PATOLOGÍA

El estudio del quimerismo se ha realizado en 26 niños afectos de neoplasias hematológicas y en 11 niños afectos de enfermedades congénitas.

3.1.2.1 PACIENTES CON ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

El estudio del quimerismo se ha realizado en 19 niños afectos de LLA, en cinco afectos de LMA, en uno afecto de un SMD con AF y uno con una LMC.

3.1.2.1.1 PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

De los 19 pacientes afectos de LLA (Tabla 3.4):

- En diez pacientes (casos 4, 7, 18, 21, 22, 24, 47, 48, 49 y 55) se realizó un seguimiento durante dos años post-trasplante.
 - El paciente 4 que recibió un TPH alogénico de MO de un donante HLA idéntico en primera remisión parcial, pasó de un 0,1% de células del paciente a los tres meses del estudio, a un 1,1% a los dos años de seguimiento. Por citogenética sólo se observaron células del donante. Al final del estudio presentó un QM y permanecía en remisión sin síntomas de enfermedad.
 - En el paciente 7 que recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico, en segunda RC, se realizaron cuatro controles, a los tres, seis, doce y 24 meses de seguimiento y en todos ellos se detectaron sólo células del donante (QC), tanto por FISH como por citogenética. Al final del estudio el paciente se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
 - En el paciente 18 que recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico, en segunda RC, se realizaron tres controles entre los seis y los 24 meses de seguimiento. Por FISH, a los seis meses se observó un 4,2% de células del paciente que aumentó hasta un 22,2% al año del trasplante. Por citogenética se detectaron un 34% de células del paciente con un cariotipo de 46,XY,inv(3)(p12q29) (Figura 3.1). En cambio, a los dos años tanto por FISH como por citogenética sólo se detectaron células XX del donante. El paciente al final del estudio presentó un QC tras haber desarrollado un QMt y permanecía en remisión sin síntomas de enfermedad.

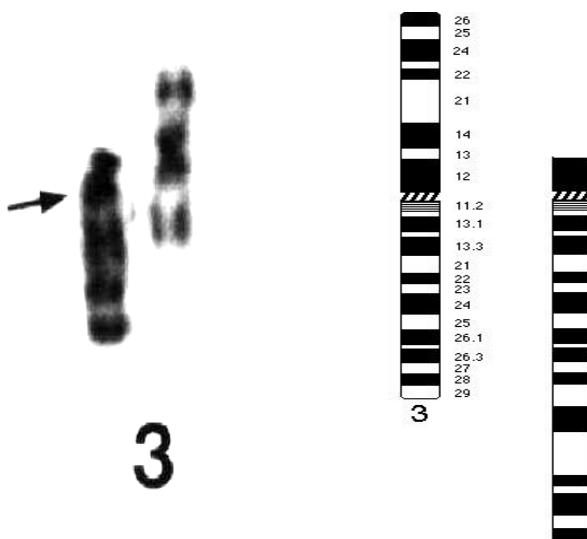


Figura 3.1. Alteración cromosómica detectada al año post-trasplante en el caso 18.
- inv(3)(p12q29)-

- El paciente 21 recibió un TPH de MO de un donante también HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado al año y a los dos años del trasplante, detectándose al año por FISH un 2,7% de células del paciente, por citogenética se encontró un 3,4% de células del paciente que presentaron un cariotipo normal. A los dos años de seguimiento ambas técnicas detectaron sólo células del donante (QC). Por tanto, el paciente presentó un QC precedido de un QMt y al final del estudio seguía en remisión sin síntomas de enfermedad.
- El paciente 22 recibió un trasplante de MO de un donante HLA idéntico, en este caso en segunda RC. Fue estudiado al mes, a los seis meses, al año y a los dos años, sin detectarse por ambas técnicas células del paciente. El paciente en todo momento presentó un QC y al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
- El paciente 24 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en segunda RC, y fue estudiado al mes, a los seis meses, al año y a los dos años, detectándose por FISH, solo en el primer control un 2,5% de células del paciente. En el resto de estudios sólo se detectaron células del donante. El paciente presentó un QC precedido por un QMt y al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
- El paciente 47 recibió un TPH de SCU de un donante HLA idéntico en segunda RC, y fue estudiado al mes, a los tres, a los seis meses y a los dos años del trasplante. En todo momento presentó un QC y al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.

RESULTADOS

- El paciente 48 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en segunda RC. Fue estudiado al mes, a los tres, a los seis meses, al año y a los dos años del trasplante. En los dos primeros controles por ambas técnicas sólo se detectaron células del donante. A los seis meses por FISH se detectó un 4,3% de células del paciente, y no se pudo realizar el estudio citogenético por falta de metafases. Al año de seguimiento el porcentaje de células del paciente aumentó hasta el 10,4%, por citogenética se observó un 16% de células del paciente que presentaron un cariotipo normal. Sin embargo, a los dos años de seguimiento por ambas técnicas sólo se detectaron células del donante. El paciente al final del estudio presentó una QC tras haber desarrollado un QMt y se encontraba bien, en remisión sin síntomas de enfermedad.
- El paciente 49 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en segunda RC. Fue estudiado al mes, a los tres meses, al año y a los dos años del trasplante. Salvo a los tres meses que por FISH se detectó un 1,1% de células del paciente sin que por citogenética se detectara ninguna célula residual, en todos los demás controles por ambas técnicas sólo se observaron células del donante. Al final del estudio el paciente presentó un QC precedido por un QMt en uno de los controles y se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
- El paciente 55 que recibió también un TPH de MO de un donante HLA idéntico en segunda RC, fue estudiado al año y a los dos años del trasplante. En los dos controles tanto por FISH como por citogenética sólo se detectaron células del donante. El paciente desarrolló un QC en todo el seguimiento y al final del estudio se encontraba aliviado sin síntomas de enfermedad.

- Dos pacientes (casos 43 y 56) fueron estudiados durante un año de seguimiento.
- El caso 43 recibió un TPH de MO de un donante HLA no idéntico en tercera RC. Fue estudiado al mes, a los tres y seis meses y al año del trasplante. El estudio citogenético no pudo realizarse en ninguno de los controles por falta de metafases. Por FISH en los tres primeros controles sólo se detectaron células del donante, pero al año de seguimiento se detectó un 68,2% de células del paciente. El paciente al final del estudio presentó un QMr coincidiendo con la recaída clínica, el paciente falleció a los 13 meses de recibir el TPH.
- El caso 56 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado al mes, a los tres y seis meses y al año del trasplante. Por citogenética se detectaron sólo células del donante en todos los controles, por FISH se detectó un 2,2% de células del paciente a los tres meses de seguimiento, en el resto de controles sólo se observaron células del donante. El paciente presentó un QC precedido por un QMt en uno

RESULTADOS

de los controles y al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.

- Tres pacientes (casos 42, 44 y 58) se estudiaron hasta los seis meses del trasplante.
 - El caso 42 recibió un trasplante de SP con selección positiva de células CD34, de un donante HLA idéntico, en tercera RC. Fue estudiado al mes, a los tres meses y a los seis meses post-TPH. En todos los controles por ambas técnicas sólo se detectaron células del donante (QC), sin embargo, falleció a los nueve meses de recibir el TPH debido a un fallo de implante tardío.
 - El caso 44 recibió un TPH de SP de un donante HLA no idéntico en tercera RC. Fue estudiado a los tres y a los seis meses, y en ambos controles por ambas técnicas sólo se detectaron células del donante (QC). El paciente falleció a los seis meses de recibir el TPH por causas relacionadas con el trasplante.
 - El caso 58 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado al mes, a los tres y a los seis meses. Por citogenética se detectaron sólo células del donante, por FISH se detectaron células del paciente en el último control (1%). El paciente al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
- En cuatro pacientes (casos 15, 54, 75 y 76) el estudio se ha realizado sólo al mes del trasplante.
 - El paciente 15 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Por ambas técnicas mostró células del donante (QC). El paciente falleció a los siete meses por causas relacionadas con el TPH.
 - El paciente 54 tras un trasplante autólogo fallido, recibió un segundo TPH de MO de un donante HLA no idéntico en tercera RC. Por ambas técnicas mostró QC. Al final del estudio se encontraba bien y sin síntomas de enfermedad.
 - El paciente 75 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Mostró por citogenética células del donante, mientras que por FISH presentó un QM con un 1,6% de células del paciente. Al final del estudio se encontraba clínicamente bien.
 - El paciente 76 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en segunda RC. Por ambas técnicas mostró un QC. Al final del estudio el paciente permanecía en remisión sin síntomas de enfermedad.

RESULTADOS

Tabla 3.4 Seguimiento en pacientes con LLA

P	E F	TQ	S	1M		3M		6M		12M		24M	
				FISH % cel P	C	FISH % cel P	C						
4	V	QMr	F			0,1	XY					1,1	XY
7	V	QC	F			0,4	XY	0,1	XY	0,8	XY	0	XY
15	E	QC	M	0,4	XX								
18	V	QC	M					4,2	NM	22,2	XX/XY	0	XX
21	V	QC	M							2,7	XX/XY	0,3	XX
22	V	QC	M	0	XX			0	XX	0,3	XX	0	XX
24	V	QC	F	2,5	XY			0,1	XY	0,6	XY	0	XY
42	E	QC	M	0,2	XX	0,2	XX	0,3	XX				
43	E	QMr	F	0,5	NM	0,4	NM	0	NM	68,2	NM		
44	E	QC	M			0,6	XX	0,1	XX				
47	V	QC	F	0,1	NM	0	XY	0,1	XY			0,2	XY
48	V	QC	M	0,1	XX	0,8	XX	4,3	NM	10,4	XX/XY	0,4	XX
49	V	QC	M	0	NM	1,1	XX			0	XX	0,2	XX
54	V	QC	M	0	XX								
55	V	QC	M							0,1	XX	0,8	XX
56	V	QC	M	0,5	XX	2,2	XX	0,1	XX	0,1	XX		
58	V	QMr	F	0	XY	0,2	XY	1,1	XY				
75	V	QM	M	1,6	XX								
76	V	QC	M	0	XX								

P, número de paciente. EF, estado del paciente al final del estudio. V, vivo. E, exitus. TQ, tipo de quimerismo. QC, quimerismo completo. QMr, quimerismo mixto resurgente. S, sexo del paciente. M, meses. C, citogenética. % cel P, % de células del paciente. NM, no metafases.

3.1.2.1.2 SEGUIMIENTO EN PACIENTES CON LMA Y LMC

RESULTADOS

El seguimiento del quimerismo se ha realizado en cinco pacientes (casos 2, 11, 37, 45 y 59) que presentaron una LMA y en un paciente (caso 5) afecto de una LMC (Tabla 3.5).

- Cuatro pacientes fueron estudiados hasta los dos años de seguimiento (casos 2, 5, 37 y 45)
 - El paciente 2 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Se estudió a los tres y seis meses, al año, a los dos años y aún se realizó otro control a los tres años del trasplante. Aunque por citogenética sólo se detectaron células del donante, el estudio por FISH reveló en todos los controles presencia de células del paciente que fueron disminuyendo a lo largo del seguimiento, pasando de un 5,3% en el primer control a un 1,6% en el último. El paciente presentó un QMt y al final del estudio se encontraba bien sin síntomas de enfermedad.
 - El paciente 5 afecto de LMC recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en fase crónica, se realizó un control a los seis años de recibir el TPH y por ambas técnicas se observaron sólo células del donante (QC). El paciente al final del estudio permanecía en remisión sin síntomas de enfermedad.
 - El paciente 37 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado a los seis meses, al año, a los dos años y a los 33 meses del trasplante. Por ambas técnicas, hasta los dos años sólo se detectaron células del donante. A los 33 meses del trasplante coincidiendo con la recaída clínica se detectaron por FISH un 97,8% de células del paciente (Figura 3.2). Por citogenética el 100% de las metafases analizadas pertenecían al paciente y presentaban las mismas alteraciones cromosómicas observadas al diagnóstico de la enfermedad. El paciente presentó un QMr y tras alcanzar una segunda RC y recibir un segundo trasplante, al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.

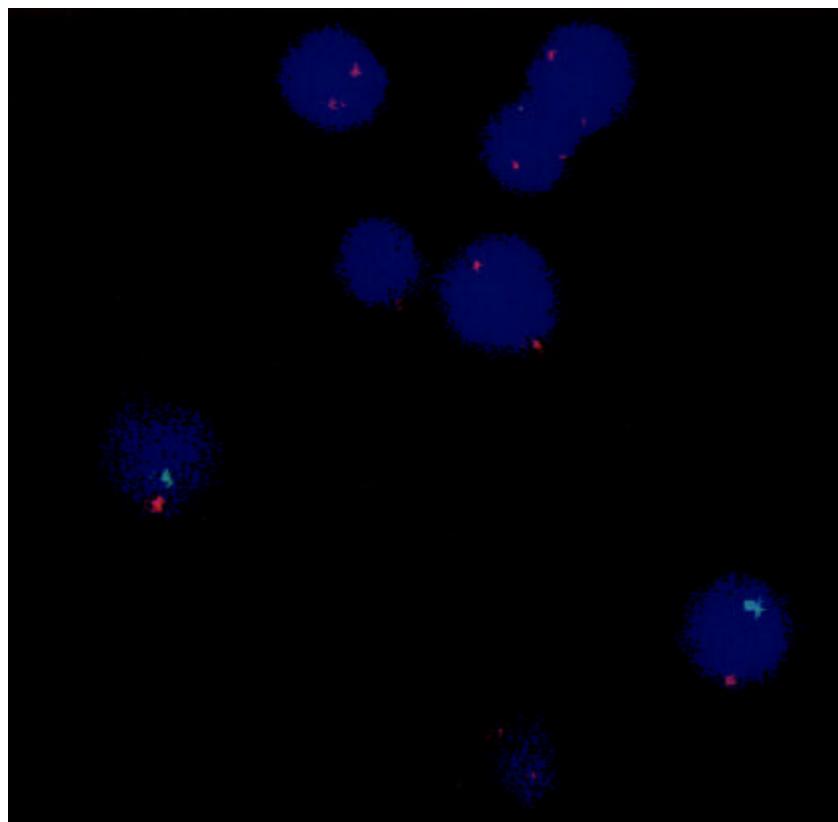


Figura 3.2. QM correspondiente al caso 37 en recaída. Células del donante con dos señales rojas (XX) y células del paciente con una señal roja y otra verde (XY)

RESULTADOS

- El paciente 45 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado a los tres, seis, doce y 24 meses. En todos los controles realizados tanto por citogenética como por FISH sólo se observaron células del donante (QC). El paciente al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.

- Un paciente fue estudiado hasta completar el año de seguimiento (caso 59).
- El paciente recibió un TPH de MO de un donante HLA no idéntico en primera RC, y fue estudiado al mes, a los tres, a los seis, y a los 12 meses del trasplante. En todos los controles por ambas técnicas sólo se detectaron células del donante (QC). El paciente al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
- Un paciente fue estudiado al mes del trasplante (caso 11).
- El paciente recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Por ambas técnicas presentó QC, falleciendo a los seis meses por causas relacionadas con el trasplante.

Tabla 3.5 Seguimiento en pacientes con LAM y LMC

P	EF	TQ	S	1M		3M		6M		12M		24M		>24M	
				FISH	C % cel P										
2	V	QM	F			5,3	XY	4	XY	1	XY	1,5	XY	1,6	NM
5	V	QC	F											0,2	XY
11	E	QC	F	0	XY										
37	V	QMr	M					0,1	XX	0	XX	0,3	XX	97,8	XY
45	V	QC	M			0,6	XX	0	XX	0,8	XX	0,2	XX		
59	V	QC	M	0	XX	0	XX	0	XX	0	XX				

P, número de paciente. EF, estado del paciente al final del estudio. V, vivo. E, exitus. TQ, tipo de quimerismo. QC, quimerismo completo. QMr, quimerismo mixto resurgente. S, sexo del paciente. M, meses. C, citogenética. % cel P, % de células del paciente. NM, no metafases.

3.1.2.2 SEGUIMIENTO EN PACIENTES CON ENFERMEDADES NO NEOPLÁSICAS

El seguimiento del quimerismo se ha realizado en ocho pacientes afectos de enfermedades no neoplásicas no afectos de AF (casos 12, 20, 23, 39, 52, 53, 60 y 79) (Tabla 3.6)

- En un paciente se completó el seguimiento a los dos años (caso 20)
 - El paciente afecto de una MPS tipo I, recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico. Fue estudiado al mes, al año y a los dos años del trasplante. Por ambas técnicas se detectaron células del paciente, observándose por FISH una disminución de células del paciente, pasando de un 14,7% al mes del trasplante, a un 8% al año y a un 5,4% a los dos años. El paciente mostró un QMt y al final del estudio se encontraba bien.
- En un paciente se realizó un año de seguimiento (caso 60)
 - El paciente afecto de una LM recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico. Fue estudiado al mes, a los tres, seis y a los doce meses del TPH. En todos los controles por ambas técnicas sólo observaron células del donante (QC). El paciente al final del estudio se encontraba estabilizada en sus manifestaciones neurológicas.
- En tres pacientes se realizó seis meses de seguimiento (casos 12, 23 y 39)
 - El paciente 12 afecto de un LAD, recibió un TPH de MO deplecionada de linfocitos T de un donante HLA no idéntico. Fue estudiado a los tres y seis meses del trasplante. En ambos controles por citogenética se detectó un 100% de metafases del paciente, por FISH se observaron un 99,9% y un 97,3% de células del paciente. El paciente presentó una recuperación autóloga y falleció a los nueve meses del trasplante.
 - El paciente 23 afecto de una AAA, recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico. Fue estudiado a los tres y seis meses del trasplante, detectándose por ambas técnicas sólo células del donante (QC). El paciente falleció a los nueve meses del TPH debido a causas relacionadas con el trasplante.
 - El paciente 39 afecto de un ABD, recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico. Fue estudiado al mes, a los tres y a los seis meses del trasplante. En todos los controles y por ambas técnicas se detectaron sólo células del donante (QC). El paciente presentó falleció a los 13 meses del TPH por causas relacionadas con el trasplante.
- En dos pacientes (casos 52 y 53) se realizó tres meses de seguimiento.

RESULTADOS

-El paciente 52 afecto de una IDCS recibió un TPH de SCU de un donante HLA no idéntico. Fue estudiado al mes y a los tres meses. Por citogenética sólo se detectaron células del donante, mientras por FISH se pasó de un 0,5% a un 3,9% a los tres meses del TPH. El paciente presentó un QMr y al final del estudio permanecía bien clínicamente.

-El paciente 53 afecto de una LHF, recibió un TPH de SP tras selección positiva de células CD34 de un donante HLA no idéntico. Fue estudiado al mes y a los tres meses. Al mes se observaron por ambas técnicas células del paciente, por FISH un 79,3%, y a los tres meses tanto por citogenética como por FISH se observaron un 100% de células del paciente. El paciente presentó una recuperación autóloga y falleció a los tres meses del TPH por progresión de la enfermedad.

- Un paciente fue estudiado sólo al mes del TPH (caso 79)
- El paciente afecto de una IDCS recibió un TPH de SCU de un donante HLA idéntico. Con ambas técnicas se detectaron sólo células del donante (QC). Al final del estudio permanecía bien sin síntomas de enfermedad.

Tabla 3.6 Seguimiento en pacientes con enfermedades no neoplásicas

P	EF	TQ	S	1M		3M		6M		12M		24M	
				FISH % cel P	C	FISH % cel P	C	FISH % cel P	C	FISH % cel P	C	FISH % cel P	C
12	E	QC	M			99,9	XY	97,3	XY				
20	V	QM	F	14,7	NM					8	XX/XY	5,4	XX/XY
23	E	QC	F			0	NM	0,1	XY				
39	E	QC	F	0,7	XY	0,3	XY	0	XY				
52	V	QMr	F	0,5	XY	3,9	XY						
53	E	QM	F	79,3	XX/XY	100	XX						
60	V	QC	F	0,4	XY	0,5	XY	0	XY	0,1	XY		
79	V	QC	M	0	NM								

P, número de paciente. EF, estado del paciente al final del estudio. V, vivo. E, exitus. TQ, tipo de quimerismo. QC, quimerismo completo. QMr, quimerismo mixto resurgente. QMs, quimerismo mixto estable. S, sexo del paciente. M, meses. C, citogenética. % cel P, % de células del paciente. NM, no metafases.

3.1.2.2.1 SEGUIMIENTO EN PACIENTES CON AF

El seguimiento del quimerismo se ha realizado en cuatro pacientes afectos de AF (casos 1, 6, 31 y 71) (Tabla 3.7).

- El seguimiento se completó a los dos años en dos pacientes (casos 1 y 6).
 - El paciente 1 desarrolló además un SMD, recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado a los tres, 12, 24 y 29 meses del trasplante. A los tres meses por citogenética se detectaron sólo células del donante, mientras que por FISH se observó un 3% de células del paciente. A los seis meses por citogenética se seguía observando sólo células del donante y por FISH un 1,7% de células del paciente. Al año del trasplante por FISH se encontró un 6% de células del paciente. A los 29 meses coincidiendo con la recaída clínica, por citogenética se detectaron un 14% de células del paciente con un cariotipo alterado y por FISH se observaron un 37,8% de células del paciente. El paciente presentó un QMr y una evolución de su enfermedad hacia una LMA M5. Recibió quimioterapia y tras alcanzar la segunda RC se sometió a un segundo trasplante también de MO y del mismo donante. Se realizó el seguimiento a los tres, seis, doce, y veinticuatro meses, detectándose en todos los controles por ambas técnicas sólo células del donante. El paciente al final del estudio se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad.
 - El paciente 6 recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Fue estudiado a los seis, 12 y 20 meses del trasplante. Por citogenética en ningún control se observaron células del paciente, por FISH en todos los controles se detectaron células del paciente en un porcentaje similar (2%, 2% y 2,5%). El paciente presentó un QMe y falleció debido a causas relacionadas con el trasplante.
 - Un paciente fue estudiado hasta el año de seguimiento (caso 31)
 - El paciente recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico en primera RC. Se estudió al año del TPH, mostrando por ambas técnicas células del donante. Tras presentar un QC al final del estudio se encontraba vivo y sin síntomas de enfermedad.
- C) Un paciente fue estudiado al mes del TPH (caso 71)
- El paciente recibió un TPH de MO de un donante HLA idéntico. Por ambas técnicas mostró un QC y al final del estudio permanecía clínicamente bien.

RESULTADOS

Tabla 3.7 Seguimiento en pacientes afectos de AF

P	EF	TQ	S	1M		3M		6M		12M		24M		>24M	
				FISH	% cel P										
1A	V	QMr	F			3	XY			1,7	XY	6	XY	37,8	XX/XY
1B	V	QC	F			0	XY	0,4	XY	0,5	XY	0	XY		
6	E	QMe	F					2	XY	2	XY	2,5	NM		
31	V	QC	M							0,1	XX				
71	V	QC	M	0	XX										

P, número de paciente. EF, estado del paciente al final del estudio. V, vivo. E, exitus. TQ, tipo de quimerismo. QC, quimerismo completo. QMr, quimerismo mixto resurgente. QMe, quimerismo mixto estable. S, sexo del paciente. M, meses. C, citogenética. % cel P, % de células del paciente. NM, no metafases.

3.1.3 EVOLUCIÓN DEL QUIMERISMO MIXTO

Los pacientes 12 y 53 los excluimos a la hora de valorar la evolución post-trasplante de las células residuales del paciente (Tabla 3.8), ya que presentaron un fallo de implante con una recuperación autóloga con un porcentaje de células del paciente que oscilaron entre un 79% y un 100%.

Mediante FISH, durante el primer mes de seguimiento, el 14,3% (3/21) de los pacientes presentaron un QM y la media del porcentaje de células del paciente encontrada fue de un 6% (1,6%-14,7%). Tanto en el tercero como en el sexto mes un 25% (5/20) de los pacientes mostraron un QM, y la media de células del paciente encontrada fue de un 3% (1,1%-5,3%) en el tercer mes y de un 3% (1,1%-4,3%) en el sexto mes.

Mediante el estudio citogenético durante los seis primeros meses de seguimiento no se encontró ninguna metafase del paciente.

Al año del seguimiento por FISH, el 40% (8/20) de los pacientes seguidos presentaron un QM con una media de células del paciente del 14,5% (1%-68,2%), en cuatro de ellos (21%) se observaron más de un 2,7% de células del paciente, el estudio citogenético también detectó metafases del paciente (casos 18, 20, 21 y 48).

A los dos años del seguimiento por FISH, el 29% (5/17) de los pacientes estudiados presentaron QM, y la media de células fue del 3% (1,1%-6%); el estudio citogenético detectó QM en uno de los cinco pacientes (caso 20) que por FISH mostró un 5,4% de células del paciente.

Cinco pacientes fueron estudiados entre los 25 y los 36 meses del trasplante, por FISH el 60% (3/5) de los pacientes presentaron QM, la media de células encontradas fue del 45,7% (1,6%-97,8%); el estudio citogenético detectó células neoplásicas en dos pacientes (casos 1 y 37) que presentaron más de un 37,8% de células del paciente por FISH, ambos pacientes se encontraban en recaída en el momento del estudio.

RESULTADOS

Tabla 3.8 Porcentaje de pacientes con QM y porcentaje de células del paciente encontradas mediante el estudio por FISH y por citogenética

Intervalo post-trasplante (meses)	FISH		% pacientes con QM
	% pacientes con QM (rango)	X del % cel P	
1	14,3 (3/21)	6,26 (1,6-14,7)	0 (0/17)
3	25 (5/21)	3,1 (1,1-5,3)	0 (0/19)
6	25 (5/21)	3,1 (1,1-4,3)	0 (0/18)
12	40 (8/20)	14,52 (1-68,2)	21,1(4/19)
24	29 (5/17)	3,30 (1,1-5,4)	6,2 (1/16)
>24	60 (3/5)	45,7 (1,6-97,8)	66,7 (2/3)

X del % cel P, media del % de células del paciente. QM, quimerismo mixto

3.1.4 QUIMERISMO Y PARÁMETROS CLÍNICO-BIOLÓGICOS

En primer lugar se ha relacionado el tipo de quimerismo observado con la evolución post-trasplante, y en segundo lugar se ha correlacionado la presencia de QM o QC con diferentes parámetros clínico-biológicos.

3.1.4.1 TIPO DE QUIMERISMO Y EVOLUCIÓN POST-TRASPLANTE

Excluyendo los dos pacientes que presentaron una recuperación autóloga (casos 12 y 53), en 16 pacientes se han detectado células del paciente. Al final del estudio, de ellos, diez seguían mostrando un QM mientras que seis evolucionaron hacia una QC del donante (casos 18, 21, 24, 48, 49 y 56). En veinte pacientes se ha detectado un QC del donante a lo largo de todo el seguimiento (Tabla 3.9).

- Diez pacientes presentaron QM (Tabla 3.9):
 - * Dos (casos 2 y 20) mostraron un QM transitorio, con disminución de las células del huésped. Ambos pacientes permanecían vivos sin síntomas de enfermedad, después de más de tres años del trasplante.
 - * Un paciente (caso 6) mostró un QM estable, el paciente desarrolló una EICH aguda y crónica que le causó la muerte a los 20 meses de recibir el trasplante.
 - * Un paciente (caso 75) presentó un QM, en el momento de concluir el estudio sólo se había realizado el primer control, y permanecía bien sin síntomas de enfermedad después de cuatro meses del trasplante.
 - * Seis pacientes (casos 1, 4, 37, 43, 52 y 58) mostraron un QM resurgente.
 - En los casos 4, 52 y 58 el número de células del huésped osciló entre el 1,1% y el 3,9%, todos ellos permanecían en clínicamente bien, después de 52, 23 y 18 meses respectivamente, de recibir el trasplante.
 - En los casos 1, 37 y 43, el número de células del huésped osciló entre el 1,7% y el 97,8% y los tres pacientes recayeron a los 29, 33 y 9 meses del trasplante respectivamente. Los pacientes 1 y 37 permanecían en remisión después de someterse a un segundo trasplante, mientras que el paciente 43 falleció a los cuatro meses de la recaída.

En el caso 1 se detectó un aumento consecutivo de células del huésped entre el año y el momento de la recaída a los 29 meses, pasando de un 1,7% a un 6% y a un 37,8% de células del huésped. El paciente afecto de una AF y un SMD tenía una monosomía 7 al

RESULTADOS

diagnóstico de la enfermedad, el estudio citogenético detectó células residuales con un cariotipo complejo sólo en el momento de la recaída (se detalla en el apartado 3.2.4.4).

En los casos 37 y 43 se pasó de un QC a un QM en el momento de la recaída. El caso 37 afecto de una LAM tipo M5 con una t(11;17)(q23;q21) al diagnóstico, pasó de un 0,1% de células del paciente a los seis meses, a un 0% y un 0,3% al año y a los dos años de seguimiento respectivamente, para presentar un 97,8% de células del paciente a los 33 meses coincidiendo con la recaída citogenética y clínica. El caso 43 pasó de un QC durante los primeros seis meses del trasplante, a un 68,2% de células del paciente en el momento de la recaída.

- Veintiséis pacientes presentaron QC (Tabla 3.9):

*Seis (casos 18, 21, 24, 48, 49 y 56) presentaron un QM transitorio, y el porcentaje de células del huésped detectadas osciló entre el 1,1% y el 22% con una media del 6%. Cuatro de estos pacientes (casos 18, 21, 24, y 48) desarrollaron una EICH aguda que no superó el grado 2, y un paciente (caso 49) desarrolló además una EICH crónica. Todos permanecían clínicamente bien después de más de dos años del trasplante.

* Veinte pacientes (casos 1b, 5, 7, 11, 15, 22, 23, 31, 39, 42, 44, 45, 47, 54, 55, 59, 60, 71, 76 y 78) presentaron un QC con una media de seguimiento de 23 meses.

- Cuatro pacientes (casos 45, 55, 60 y 71) no desarrollaron EICH y actualmente permanecían clínicamente bien.

- Diez pacientes (casos 1B, 5, 7, 31, 42, 47, 54, 59, 76 y 78) desarrollaron una EICH aguda, todos permanecían bien excepto el paciente 42 que falleció a los nueve meses del trasplante debido a un fallo tardío del implante.

- Seis pacientes (casos 11, 15, 22, 23, 39 y 44) desarrollaron una EICH aguda y crónica, excepto el paciente 22 que permanecía en remisión, el resto falleció por complicaciones post-trasplante derivadas por el desarrollo de la EICH.

Tabla 3.9. Quimerismo y características clínicas

Las filas oscuras corresponden a los pacientes que han mostrado un QM y las filas blancas a los que han presentado un QC

P	E	D	Enf	Estado al TPH	Régimen de acondicionamiento	Profilaxis EICH	EICH Ag/C	R (m)	Tipo de Quimerism	Supervivencia (m) / EF
23	7		AAA		ICT+CY	CsA+MTX	4/E		QC	9/Ex
39	5		ABD		CY+BU	CsA+MTX	1/L		QC	13/Ex
6	11		AF	1 RC	IN+CY	CsA+MTX	2/L		QMs	20/Ex
31	12		AF	1 RC	IN+CY	CsA+MTX	1		QC	49/V
71	10		AF		ICT+CY	CsA+MTX	N		QC	6/V
1A	6		AF/SMD	1 RC	IN+CY	CsA+ATG	1	29	OMr	31/V
12	0.5	NI	DAL		CY+BU	CsA	N		OM	6/Ex (RA)
52	0.5	NI	IDCS		CY+BU	CsA+M	3		OMr	23/V
79	1		IDCS		CY+BU	CsA	2		QC	3/V
53	1	NI	LH		CY+BU	CsA+M	N		OM	3/Ex (RA)
60	14		LM		CY+BU	CsA+MTX	N		QC	16/V
20	6		MPS I		CY+BU	CsA	1		OM (QMt)	43/V
2	0.5		LMA	1 RC	CY+VP-16+BU	CsA+M	1		OM (QMt)	54/V
11	7		LMA	1 RC	ICT+CY+BU+V	CsA	3/E		QC	6/Ex
37	2		LMA	1 RC	CY+BU+VP-16	CsA	N	33	OMr	38/V
45	9		LMA	1 RC	ICT+CY	CsA	N		QC	29/V
59	5	NI	LMA	1 RC	CY+VP-16+BU	CsA+MTX	1		QC	15/V
5	4		LMC	FC	ICT+CY	CsA+M	1		QC	124/V
4	8		LLA	1 RC	ICT+CY+VP-16	CsA+M	1		OMr	52/V
7	11		LLA	2 RC	ICT+CY	CsA	1		QC	55/V
15	7		LLA	1 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	3/E		QC	7/Ex
18	11		LLA	2 RC	ICT+CY+ARA	CsA	2		QC(QMt)	54/V
21	3		LLA	1 RC	ICT+CY+ARA	CsA	1		QC (QMt)	55/V
22	13		LLA	2 RC	TBI+CY+VP-16	CsA	1/L		QC	40/V
24	8		LLA	2 RC	ICT+CY	CsA	1		QC (QMt)	27/V
42	10		LLA	3 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	2		QC	9/Ex (FI)
43	14	NI	LLA	3 RC	ICT+CY+VP-16	CsA+MTX	2	9	OMr	13/Ex
44	11	NI	LLA	3 RC	ICT+CY	CsA	4/E		QC	6/Ex
47	11		LLA	2 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	1		QC	27/V
48	3		LLA	2 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	2		QC (QMt)	27/V
49	13		LLA	2 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	3/L		QC (QMt)	27/V
54	9	NI	LLA	3 RC	ICT+CY+VP-16	CsA+MTX	2		QC	21/V
55	5		LLA	2 RC	ICT+CY	CsA	N		QC	31/V
56	6		LLA	1 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	N		QC (QMt)	19/V
58	4		LLA	1 RC	ICT+CY+VP-16	CsA	N		OMr	18/V
75	2		LLA	1 RC	CY+BU	CsA	1		OM	4/V
76	5		LLA	2 RC	ICT+CY+VP-16	CsA+MTX	1		QC	3/V

P, número de paciente. E, edad en años. R/D, receptor/donante. Ag/Cr, aguda/crónica. R, recaída. (m) meses. EF, estado del paciente al final del estudio. F/M, femenino/masculino. RC, remisión completa. FC, fase crónica. ICT, irradiación corporal total. IN, irradiación nodal. CY, ciclofosfamida. BU, busulfán. CsA, ciclosporina A. MTX, metotrexato. M, otra droga (generalmente metilprednisona). ATG, globulina antitimocítica. L, limitado. E, extensivo. N, no mostró EICH. V, vivo. Ex, exitus. RA, recuperación autóloga. FI, fallo de implante.

3.1.4.2 CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-BIOLÓGICOS Y EL TIPO DE QUIMERISMO OBSERVADO

Los pacientes se han agrupado en dos grupos en función de si al final del seguimiento presentaban un QM o un QC. Se ha analizado si existían diferencias significativas entre los dos grupos teniendo en cuenta las siguientes variables:

- edad
- sexo
- tipo de enfermedad (neoplasia o no neoplasia) y en las neoplásias el estado de éstas al trasplante (1^aRC ó ≥ 2^a RC)
- tipo de donante (HLA idéntico o no)
- tipo de régimen de acondicionamiento recibido (irradiación más quimioterapia o sólo quimioterapia)
- tipo de profilaxis utilizada para prevenir la EICH (ciclosporina sola o combinada con otra droga)

En cuanto a la evolución post-trasplante se ha relacionado:

- con el estado del paciente al final del seguimiento, si estaba vivo, si había sufrido una recaída, un fallo de implante o había fallecido por causas relacionadas con el trasplante
- con la EICH, diferenciando dos grupos, los que no manifestaron una EICH o los que la desarrollaron con una intensidad inferior a II y aquellos que manifestaron una intensidad igual o superior a II. También se ha diferenciado entre los que desarrollaron una EICH crónica y los que no la manifestaron
- con la supervivencia

Los resultados obtenidos del análisis estadístico comparando las distintas variables citadas son las siguientes (tabla 3.10):

- El grupo de pacientes con QM tenía una media de edad inferior al de los pacientes que presentaron un QC (5 años vs 8,5 años).
- De los pacientes que presentaron un QM el 80% era de sexo femenino y de los que mostraron un QC el 69% era de sexo masculino, estas diferencias son significativas ($p=0,011$).

RESULTADOS

- No se han observado diferencias significativas entre el grupo de pacientes que han presentado enfermedades neoplásicas y los que han presentado enfermedades no neoplásicas. Probablemente debido a que el grupo de pacientes con enfermedades no neoplásicas es pequeño (N=9).
- Los pacientes que presentaron un QM el 83% se encontraban en primera RC en el momento del trasplante, la mayoría de los que presentaban un QC el 65% se encontraban en segunda o en tercera, las diferencias no han sido significativas.
- No se han observado diferencias al comparar el tipo de quimerismo con el tipo de donante utilizado, en ambos grupos la mayoría eran pacientes con un donante HLA idéntico (31 con un donante HLA idéntico y 5 con un donante HLA no idéntico).
- De los pacientes que presentaron un QM, el 60% habían recibido como régimen de acondicionamiento sólo quimioterapia mientras que de los que presentaron una QC el 80% habían recibido quimioterapia combinada con irradiación local o total. Estas diferencias son significativas ($p=0,039$).
- En ambos grupos (QM y QC) el tipo de profilaxis utilizado en la prevención de la EICH no ha dado lugar a diferencias significativas, aunque la mayoría de pacientes (el 61%) que han presentado un QC sólo había recibido ciclosporina.
- En cuanto a la evolución post-trasplante la mayoría de pacientes que presentaron tanto un QM como un QC estaban vivos (60% y 77% respectivamente), como era de esperar ninguno de los que presentaron QC recayó mientras que si lo hicieron el 30% de los que presentaron un QM. El porcentaje de pacientes que presentó un fallo de implante fue ligeramente superior en el grupo de pacientes que presentó un QM (10% vs 3,8%). Todos los pacientes que fallecieron por causas relacionadas con el trasplante presentaron una QC, aunque las diferencias no son significativas.
- De los pacientes con QM la mayoría (el 70%) desarrollaron una EICH aguda leve de grado inferior o igual a I, y el 12% desarrolló una EICH crónica. De los pacientes con QC aproximadamente la mitad desarrollaron una EICH aguda leve y la otra mitad una EICH aguda grave y el 33% desarrollaron una EICH crónica. Las diferencias no son significativas.
- La mediana de supervivencia fue mayor en el grupo de pacientes con QM que en el grupo de pacientes con QC (45 meses vs 30 meses). Sin embargo, las diferencias no son significativas. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para la supervivencia global (SG) y la

RESULTADOS

supervivencia libre de enfermedad (SLE). La SG acumulada para los dos años de seguimiento fue igual para el grupo de pacientes con QC que para el grupo con QM, 65,9% y 65,6%, respectivamente. Sin embargo, la SLE a los dos años fue superior en el grupo de pacientes con QC que en el grupo de pacientes con QM (75% vs 51%).

Tabla 3.10 Correlación entre los factores clínico-biológicos y el tipo de quimerismo

	QM	p	RT	
EDAD DEL PACIENTE media (rango)	5.0(0.5-14.0)	8.5(1.0-14.0)	NS	
SEXO DEL PACIENTE				
FEMENINO	8 (80.0%)	8 (30.8%)	0.011	9.00 (2.06-39.40)
MASCULINO	2 (20.0%)	18 (69.2%)		
TIPO DE ENFERMEDAD				
NEOPLASIA	7 (70.0%)	21 (80.8%)	NS	0.56 (0.14-2.25)
NO NEOPLASIA	3 (30.0%)	5 (19.2%)		
SITUACIÓN AL TPH				
1 ^a RC	5 (83.3%)	7 (35.0%)	NS	9.29 (1.31-65.94)
2 ^a RC Ó 3 ^a RC	1 (16.7%)	13 (65.0%)		
DONANTE				
HLA IDENTICO	8 (80.0%)	23 (88.5%)	NS	1.17 (0.16-8.73)
HLA NO IDENTICO	2 (20.0%)	3 (11.5%)		
ACONDICIONAMIENTO				
ICT +QUIMIOTERAPIA	4 (40.0%)	21 (80.8%)	0.039	0.16 (0.04-0.61)
QUIMIOTERAPIA	6 (60.0%)	5 (19.2%)		
PROFILAXIS EICH				
CsA	5 (50.0%)	16 (61.5%)	NS	0.63 (0.18-2.15)
CsA+M	5 (50.0%)	10 (38.5%)		
ESTADO DESPUÉS DEL TPH				
VIVO	6 (60.0%)	20 (77.0%)		
RECAÍDA	3 (30.0%)			
FALLO DE IMPLANTE	1 (10.0%)	1 (3.8%)	NS	1.90 (0.04-13.14)
FALLECIDOS POR OTRAS COMPLICACIONES		5 (19.0%)		
EICH aguda				
0-I	7 (70%)	14 (53.8%)	NS	2.00 (0.54-7.39)
II-IV	3 (30%)	12 (46.2%)		
EICH crónica				
Sí	1 (12.5%)	7 (33.3%)	NS	0.29 (0.04-1.94)
No	7 (87.5%)	14 (66.7%)		
SUPERVIVENCIA				
mediana en meses (rango)	44.6 (5.4-83.8)	30.1 (22.7-37.5)	NS	
SG (a los dos años del TPH)	65,9%	65,6%		
SLE (a los dos años del TPH)	51%	75%		

QM, quimerismo mixto, QC, quimerismo completo, p, probabilidad, RT, riesgo total, 1^aRC, 2^a RC, 3^a RC, primera, segunda y tercera remisión completa, ICT, irradiación corporal local o total, CsA, ciclosporina, CsA + M, ciclosporina combinada con otra droga, NS, no significativo

RESULTADOS

3.2 ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Desde enero de 1993 hasta junio de 1998 se ha realizado el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) en 38 pacientes sometidos a un TPH alogénico u autólogo que presentaron algún tipo de alteración cromosómica al diagnóstico.

3.2.1 ESTUDIO CITOGENÉTICO AL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

Las características clínicas y las alteraciones cromosómicas observadas al diagnóstico de la enfermedad se detallan a continuación:

- Doce pacientes presentaron una LLA (Tabla 3.11)

Ocho de linaje B, de los cuales cuatro presentaron la t(4;11)(q21;q23), uno una t(11;16)(p13;q13), dos una hiperdiploidía y uno una t(1;19)(q23;q21) desequilibrada. Tres fueron de linaje T, los tres presentaron alteraciones implicando al cromosoma 14; finalmente un caso presentó una LLA bifenotípica con un cromosoma 1 derivativo.

Exceptuando, los cuatro pacientes que tenían la t(4;11) y el que presentó una trisomía del cromosoma 14 trasplantados en primera RC, todos fueron trasplantados en segunda o en tercera RC.

Dos pacientes con una t(4;11) y los dos que presentaron un cariotipo hiperdiploide recibieron un trasplante autólogo, el resto recibieron un trasplante alogénico.

Tabla 3.11 Pacientes con LLA

Alteración cromosómica	Cariotipo parcial	Nº	LLA	E TPH	Tipo de TPH/ producto infundido	Donante
11q23	t(4;11)(q21;q23)	15	B	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
	t(4;11)(q21;q23)	34	B	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
	t(4;11)(q21;q23)	35	B	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
	t(4;11)(q21;q23)	50	B	1 ^a RC	ALOGENICO/SCU	NENI
11p	t(11;16)(p13;q13)	54	B	3 ^a RC	ALOGENICO/MO	NENI
Hiperdiploidía	tetraploidía	61	B	2 ^a RC	AUTOLOGO/SP	
	55-62	70	B	2 ^a RC	AUTOLOGO/SP	
14	t(1;14)(p34;q11),del(6)(q21)	9	T	2 ^a RC	ALOGENICO/MO	EI
	t(11;14)(p13;q11),del(6)(q21)	57	T	2 ^a RC	ALOGENICO/SCU	NENI
	+14	75	T	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
1q	der(1)t(1;?)(q25;?)	3	Bi	3 ^a RC	ALOGENICO/MO	NENI
	der(19)t(1;19)(q23;q21)	44	B	3 ^a RC	ALOGENICO/SP	ENI

Nº, número de caso, E TPH, tipo de donante hermano idéntico (HI), emparentado idéntico (EI), no emparentado idéntico (NEI), emparentado no idéntico (ENI), no emparentado no idéntico (NENI), T, LLA de linaje T, B, LLA de linaje B. Bi, LLA bifenotípica

RESULTADOS

- Catorce pacientes presentaron una LMA (Tabla 3.12)

Dos tipo M2, uno con la t(8;21)(q22;q22) típica y otro con la t(9;11)(p21-22;q23) y una LMA M2 de precursores basófilos con un der(6)t(3;6)(p21;q23) y una trisomía 8; tres tipo M3 uno con la t(15 ;17)(q22;q12) característica, otro con una translocación implicando también al cromosoma 17 en q12 y otro con una trisomía del cromosoma 9; tres tipo M4, dos mostraron una t(1;11)(q21;q23) y uno una inv(16)(p13q22) característica de las LMA M4 con eosinofilia; tres tipo M5, uno presentó una t(11;17)(q23;q21) con el gen MLL reorganizado, otro una trisomía 4 y el otro una trisomía 8; una tipo M6 con una add(5)(q35); y una tipo M7 con trisomía 21 y 22.

Exceptuando el caso que presentó una LMA M3 con una t(1;17) trasplantado en segunda RC, el resto fue trasplantado en primera RC.

La mitad recibieron un trasplante autólogo y la otra mitad un trasplante alogénico.

Tabla 3.12 Pacientes con LMA

LMA	Cariotipo parcial	Nº	E TPH	TPH/Producto infundido	Donante
M2	t(8;21)(q22;q22)	45	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	EI
	t(9;11)(p21-22;q23)	27	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
M2 preb	der(6)t(3;6)(p21;q23),+8	33	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
M3	t(15;17)(q22;q12)	11	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
	der(17)t(1?;17)(?,q12)	62	2 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
	+9	67	1 ^a RC	AUTOLOGO/SP	
M4	t(1;11)(q21;q23)	2	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
	t(1;11)(q21;q23)	51	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
M4Eo	inv(16)(p13q22),+22	40	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
M5	+4	32	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
	t(11;17)(q23;q21)	37	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
	+8	46	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	
M6	add(5)(q35)	17	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	GM
M7	+21,+22	30	1 ^a RC	AUTOLOGO/MO	

Nº, número de caso, E TPH, estado del paciente en el momento de recibir el trasplante, en primera remisión completa (1^aRC) en segunda (2^aRC) o en tercera (3^aRC), médula ósea (MO), sangre periférica (SP) o sangre de cordón umbilical (SCU), tipo de donante hermano idéntico (HI), emparentado idéntico (EI), gemelo monozigótico (GM)

- Siete pacientes presentaron una LMC

Cinco fueron trasplantados en fase crónica y dos en fase blástica, todos ellos presentaron la t(9;22)(q34;q11) al diagnóstico. Excepto un paciente que recibió un trasplante autólogo, el resto recibieron un trasplante alogénico (Tabla 3.13).

Tabla 3.13 Pacientes con LMC

Cariotipo parcial	Nº	E TPH	TPH/Producto infundido	Donante
t(9;22)(q34;q1 1)	5	FC	ALOGENICO/MO	HI
t(9;22)(q34;q1 1)	19	FC	ALOGENICO/MO	HI
t(9;22)(q34;q1 1)	69	FC	ALOGENICO/MO	NEI
t(9;22)(q34;q1 1)	77	FC	ALOGENICO/SCU	NENI
t(9;22)(q34;q1 1)	78	FC	ALOGENICO/MO	NENI
t(9;22)(q34;q1 1)	14	FB	ALOGENICO/SCU	HI
t(9;22)(q34;q1 1)	25	FB	AUTOLOGO/SP	

Nº, número de caso, E TPH, estado del paciente en el momento de recibir el trasplante, en fase crónica (FC) o en fase blástica (FB), médula ósea (MO), sangre periférica (SP) o sangre de cordón umbilical (SCU), tipo de donante hermano idéntico (HI), no emparentado idéntico (NEI), emparentado no idéntico (ENI), no emparentado no idéntico (NENI)

- Cinco pacientes presentaron un SMD

Tres pacientes con AF desarrollaron un SMD mostrando una monosomía 7, una delección en 7q22 y otro con un cariotipo complejo implicando a los cromosomas 1,16 y 14. Dos pacientes presentaron un SMD de *novo* ambos con una monosomía 7. Todos recibieron un trasplante alogénico (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Pacientes con SMD y/o AF

Cariotipo parcial	Nº	Enf	E TPH	TPH/Producto infundido	Donante
-7	1	AF/SMD	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
-7	64	LMMoC	2 ^a RC	ALOGENICO/SCU	NENI
-7	68	SMD	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI
del(7)(q22),-19,+mar	41	AF/SMD	1 ^a RC	ALOGENICO/SP	ENI
+t(1;16)(q11;q13),del(14)(q22),+19	26	AF/SMD	1 ^a RC	ALOGENICO/MO	HI

Nº, número de caso, E TPH, estado del paciente en el momento de recibir el trasplante, en primera remisión completa (1^aRC) en segunda (2^aRC), médula ósea (MO), sangre periférica (SP) o sangre de cordón umbilical (SCU). tipo de donante hermano idéntico (HI), emparentado no idéntico (ENI), no emparentado no idéntico (NENI)

3.2.2 APLICABILIDAD DE LAS TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y DE FISH EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

De los 38 pacientes estudiados en cuatro (10,5%) no se ha podido proceder al seguimiento citogenético debido a no obtener metafases en ninguno de los controles realizados.

Se han realizado mediante citogenética 104 controles, de ellos, en el 41% (43) se pudieron analizar 50 ó más metafases, en el 36,5% (38) entre 20 y 50 metafases, en el 4,8% (5) menos de 20 metafases y en el 17% (18) no se obtuvieron metafases (Tabla 3.15).

Tabla 3.15 Relación entre el número de controles estudiados y el número de metafases analizables

≥ 50 metafases	20-49 metafases	<20 metafases	0 metafases
41% (43)	36,5% (38)	4,8% (5)	17% (18)

() número de controles analizados

En 19 controles se ha aplicado, bien la técnica de pintado cromosómico o la técnica de FISH usando la sonda BCR-ABL, en uno (5,2%) no se obtuvo resultado. Además, en 11 pacientes que se sometieron a un TPH alogénico de donante de diferente sexo, se han realizado 37 controles para el estudio del quimerismo (Tablas 3.17-3.18-3.19).

3.2.3 ESTUDIO CONTROL Y DETECCIÓN DE LA REORGANIZACIÓN BCR-ABL

Para valorar los resultados obtenidos mediante la técnica de FISH utilizando la sonda BCR/ABL, al igual que para la aplicación de la sonda X/Y, se han realizado hibridaciones en muestras de MO de ocho individuos control. Se han analizado un total de 6910 núcleos y se ha obtenido una media de falsos positivos del 2,75% con un rango que ha oscilado entre 0,60% y 3,94% (Tabla 3.16).

Tabla 3.16 Núcleos con la fusión BCR-ABL y tanto por ciento de falsos positivos

CONTROL	NÚCLEOS TOTALES	NÚCLEOS CON LA FUSIÓN BCR-ABL	% FALSOS POSITIVOS
1	503	3	0,60
2	1035	35	3,38
3	1041	41	3,94
4	711	21	2,95
5	525	10	1,90
6	1031	31	3,01
7	1030	30	2,91
8	1034	34	3,29
	$\Sigma=6910$	$\Sigma=205$	2,75%

El porcentaje de células que definen el valor umbral a partir del cual se puede aceptar la existencia de células con el reordenamiento BCR-ABL, se ha calculado aplicando la misma fórmula utilizada en el apartado 3.1.1, para determinar el valor umbral a partir del cual se considera presencia de núcleos XX o núcleos XY:

$$\text{Media de núcleos con el reordenamiento} + 3 \times \text{desviación estándar} = \text{valor umbral}$$

$$2,75\% + 3(1,04) = 5,87\%$$

Por lo tanto, el valor umbral establecido en nuestro laboratorio es del 6%. Las muestras de los pacientes que presentaron un porcentaje de núcleos con la fusión BCR-ABL superior al 6% se han considerado positivas para el reordenamiento BCR-ABL.

3.2.4 SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LAS DIFERENTES PATOLOGÍAS

El seguimiento citogenético de las alteraciones cromosómicas detectadas al diagnóstico de la enfermedad se ha realizado en 38 pacientes afectos de neoplasias hematológicas, doce con LLA, 14 con LMA, siete con LMC y cinco con un SMD.

3.2.4.1 EMR EN PACIENTES AFECTOS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

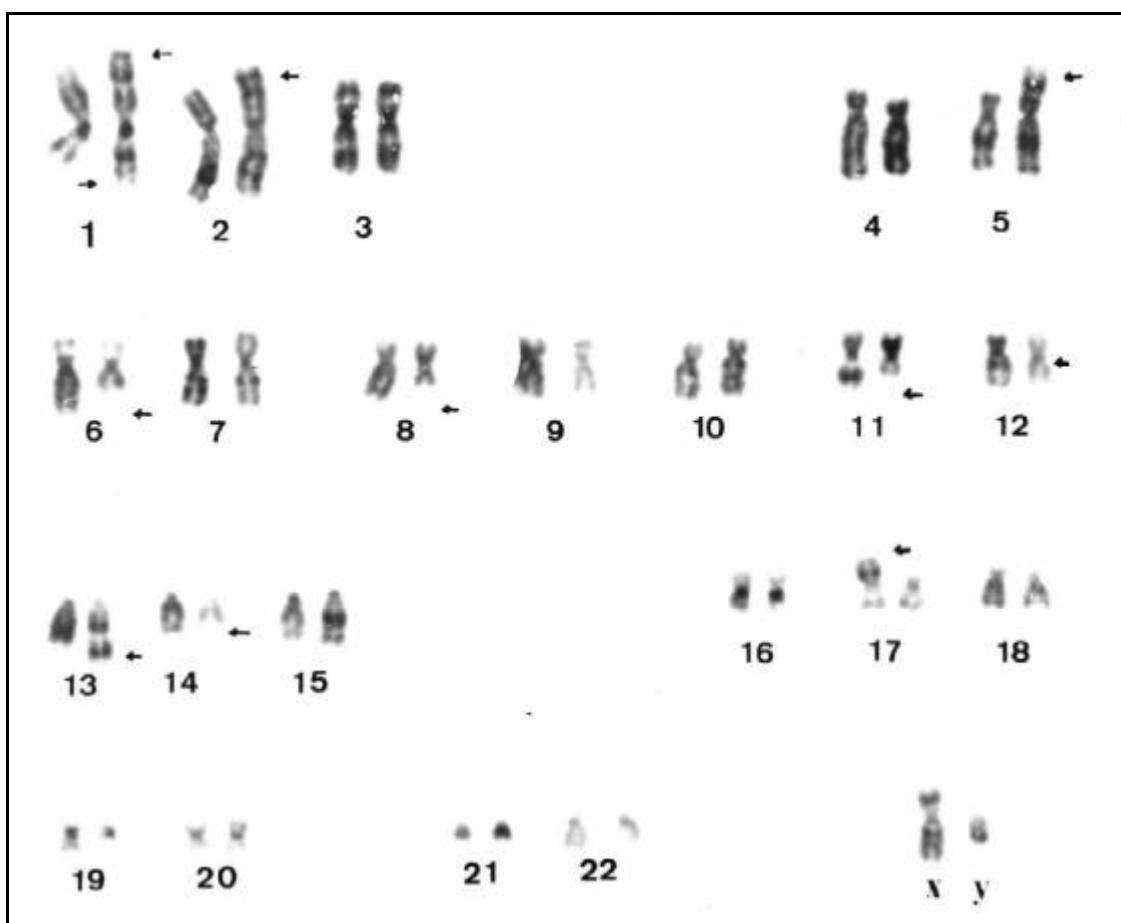
De los doce pacientes afectos de LLA (Tabla 3.17):

- Cuatro pacientes (casos 15, 34, 35 y 50) presentaron la t(4;11)(q21;q23) al diagnóstico de la enfermedad.
 - El caso 15 fue estudiado al mes del trasplante y tanto el estudio citogenético como el pintado del cromosoma 11 reveló un cariotipo normal. El seguimiento no se pudo continuar ya que el paciente falleció debido a una neumonía intersticial.
 - Los casos 50 y 34 se siguieron durante uno y tres años, respectivamente, en ninguno de los cinco controles realizados se observó la t(4;11) (Figura 3.3); el paciente 34 permanecía vivo después de cinco años de recibir un trasplante autólogo de MO, y el paciente 50 se encontraba en remisión sin síntomas de enfermedad después de 21 meses de recibir un trasplante alogénico de SCU.
 - El caso 35 fue estudiado a los tres meses del trasplante, el estudio citogenético reveló la t(4;11) en el 67% (22/33) de las metafases analizadas, y el paciente falleció debido a la recaída de la enfermedad.
- Un paciente (caso 54) presentó la t(11;16)(p13;q13) al diagnóstico de la enfermedad. Se estudió al mes del trasplante, y no se pudo realizar el estudio citogenético, aunque, el análisis mediante FISH usando las sondas para los cromosomas X e Y, reveló una QC. El seguimiento no se pudo continuar ya que el paciente falleció debido a complicaciones post-trasplante.
- Dos pacientes que presentaron cariotipos hiperdiploides al diagnóstico de la enfermedad (casos 61 y 70) se estudiaron durante el primer año del trasplante y en ambos el estudio citogenético reveló un cariotipo normal. Los dos estaban vivos y sin síntomas de enfermedad, después de 17 y 21 meses de recibir un trasplante de SP, respectivamente.
- Tres pacientes (casos 9, 57 y 75) presentaron un cariotipo alterado implicando al cromosoma 14 al diagnóstico de la enfermedad. En los tres, el seguimiento no superó los tres meses.

RESULTADOS

- En dos de ellos (casos 57 y 75) el estudio citogenético detectó un cariotipo normal y el análisis de FISH usando las sondas X e Y mostró una QC. El paciente 75 permanecía en remisión después de un año de recibir un trasplante alogénico de MO, mientras que el paciente 57 falleció debido a complicaciones causadas por el desarrollo de una EICH aguda.
- El paciente 9 presentó un cariotipo de 46,XY,t(1;14)(p34;q11),del(6)(q21) al diagnóstico de la enfermedad; una semana antes del trasplante se realizó un estudio citogenético y de pintado del cromosoma 1, mostrando en un 12% (16/129) de las metafases analizadas las mismas alteraciones observadas al diagnóstico. Al mes (18 días) de recibir un trasplante alogénico de MO, con ambas técnicas se estudiaron 109 metafases sin detectarse ninguna alteración cromosómica. A los tres meses el estudio citogenético reveló el cariotipo observado al diagnóstico además de nuevas alteraciones cromosómicas (Figura 3.3). El paciente falleció a los seis meses del trasplante debido a una recaída de la enfermedad.
- Dos pacientes (casos 3 y 44) presentaron un cariotipo con el cromosoma 1 alterado, al diagnóstico de la enfermedad. El paciente 3 se estudió al mes del TPH sin que se obtuvieran metafases para el análisis citogenético. En el caso 44 el seguimiento se realizó a los tres y seis meses del trasplante, y en ambos controles el estudio citogenético reveló un cariotipo normal. En ambos pacientes en todos los controles realizados el análisis de FISH usando las sondas X e Y detectó un QC. Los dos pacientes fallecieron debido a complicaciones post- trasplante.

RESULTADOS



**Figura 3.3. Cariotipo correspondiente al caso 9 en la recaída.
46,XY,t(1;14)(p34;q11),t(2;8)(p24;q21),t(5;12)(p15;q21),del(6)(q21),der(13)t(11;13)(q13;q22),add(17)(p12)**

Tabla 3.17.Resultados obtenidos por citogenética y FISH en el seguimiento de la EMR en pacientes con LLA

Nº	S	EA	CARIOTIPO PARCIAL	CITOGENÉTICA	PAINTING	FISH sonda XY
15	M	E	t(4;11)(q21;q23)	1 MES: 46,XX [18]	1 MES: #11 2 señales [71]	
50	M	V	t(4;11)(q21 ;q23)	1 MES: 46,XY [35] 4 MESES: 46,XY [31] 12 MESES: 46,XY [40]		
35	F	R/E	t(4;11)(q21;q23)	3 MESES: 46,XX [11] / 46,XX,t(4;11)(q21;q23) [22]		
34	M	V	t(4;11)(q21;q23)	24 MESES: 46,XY [42] 36 MESES: 46,XY [50]	24 MESES: #11 2 señales [33]	
54	M	E	t(11;16)(p13;q13)	1 MES: NM		1 MES: 0%XY
61	F	V	tetraploidía	2 MESES: NM 6 MESES: NM 11 MESES: 46,XX [50]		
70	M	V	55-62	12 MESES: 46,XY [25]		
57	M	E	t(11;14)(p13;q11),del(6)(q21)	2 MESES: 46,XX [58]		2 MESES: 0,3%XY
9	M	R/E	t(1;14)(p34;q11),del(6)(q21)	PRE-TPH: 46,XY [105]/46,XY,t(1;14)(p34;q11), del(6)(q21) [11] 1 MES: 46,XY [73] 3MESES: 46,XY,t(1;14)(p34;q11),t(2;8)(p24;q21),t(5;12) (p15;q21),del(6)(q21),der(13)t(11;13)(q13;q22), add(17)(p12) [12]	PRE-TMO: #1 2 señales [24] 3 señales [5] 1 MES: * 1 2 señales [36] 3 MESES: * 8 3 señales [18]	
75	M	V	+14	1 MES: 46,XX [55] 3 MESES: 46,XX [50]		1 MES: 1,6%XY 3 MESES: 0%XY
44	M	E	der(19)t(1;19)(q23;q21)	3MESES : 46,XX [49] 6MESES : NM		3MESES : 0,6% XY 6MESES : 0,1% XY
3	M	E	der(1)t(1;?)(q25;?)	1MES : NM		1MES : 0%XY

N, número de caso, S, sexo del paciente. M, masculino. F, femenino. EA, estado actual. V, vivo. R, recaída. E, exitus. #, sonda del cromosoma implicado en la anomalía observada al diagnóstico. NM, no metafases. [], número de metafases.

3.2.4.1 EMR EN PACIENTES AFECTOS DE LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

De los 14 pacientes que presentaron una LMA, en uno (caso 62) el estudio citogenético no se pudo realizar por falta de metafases. Excepto dos pacientes (casos 37 y 33), en el resto no se han detectado células residuales, tanto en el seguimiento por citogenética como por pintado cromosómico; todos ellos a excepción del caso 11 que falleció debido a complicaciones post-trasplante, permanecían vivos, sin síntomas de enfermedad, con una media de seguimiento de 18 meses (Tabla 3.18).

- El caso 27 presentó al diagnóstico de la enfermedad la t(9;11)(p21-22;q23), después del trasplante se realizaron dos estudios, a uno y 13 meses, detectándose en ambos una t(2;17)(q31;q23). El paciente permanece vivo después de más de 6 años del trasplante.
- En el caso 2 con una t(1;11)(q21;q23) al diagnóstico, el estudio citogenético y el de pintado cromosómico usando la sonda del cromosoma 1, no detectó ninguna célula residual, sin embargo, el estudio del quimerismo por FISH, detectó en todos los controles presencia de células del paciente aunque en un bajo porcentaje (entre 1,6% y un 5,3%). El paciente permanecía sin síntomas de enfermedad después de 7 años de recibir un trasplante autólogo de MO.
- En los casos 37 y 33 el estudio citogenético detectó células residuales coincidiendo con la recaída clínica.
 - El caso 37 afecto de una LMA tipo M5, presentó una t(11;17)(q23;q21) (Figura 3.4) con reorganización del gen MLL al diagnóstico; a los 33 meses del trasplante el estudio citogenético detectó la t(11;17) además de una t(3;4)(q21;q34) en todas las metafases analizadas, el estudio del quimerismo también detectó un 97,8% de células del paciente. El paciente se sometió a un segundo trasplante, y tanto el estudio citogenético como el análisis por FISH detectaron un QC. El paciente permanecía en remisión después de 3 meses de recibir el segundo trasplante alogénico de MO.
 - El caso 33 afecto de una LMA M2 de precursores basófilos con un cariotipo de 47,XY,der(6)t(3;6)(p21;q23),+8 al diagnóstico de la enfermedad, fue estudiado a los 3 y 6 meses del trasplante mostrando además, de el mismo cariotipo, nuevas alteraciones cromosómicas adicionales; tras recibir un segundo trasplante el paciente fue estudiado a

los 2 y 5 meses sin detectarse ninguna célula residual, después de 22 meses del segundo trasplante estaba bien, sin síntomas de enfermedad.

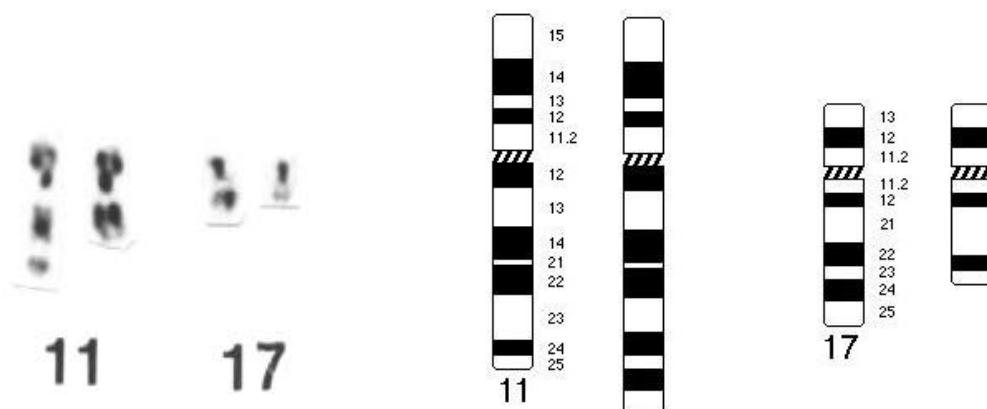


Figura 3.4. $t(11;17)(q23;q21)$ observada en el diagnóstico y en la recaída del caso 37

Tabla 3.18 Resultados obtenidos por citogenética y FISH en el seguimiento de la EMR en pacientes con LMA

Nº	S	EA	CARIOTIPO PARCIAL	CITOGENÉTICA	PAINTING	FISH sonda XY
27	F	V	t(9;11)(p21-22;q23)	1 MES: 46,XX [34] / 46,XX,t(2;17)(q31;q23) [16] 13 MESES: 46,XX [48] / 46,XX,t(2;17)(q31;q23) [13]	13 MESES: # 11 2 señales [55]	
4 5	M	V	t(8;21)(q22;q22)	3 MESES: 46,XX [23] 6 MESES: NM 12 MESES: 46,XX [53] 24 MESES: 46,XX [55]		3 MESES: 0,6%XY 6 MESES: 0%XY 12 MESES: 0,8%XY 24 MESES: 0,2%XY
11	F	E	t(15;17)(q22;q12)	1 MES: 46,XY [54]		1 MES: 0%XX
62	M	V	t(1?;17)	3 MESES: NM		
67	M	V	+9	3 MESES: NM 12 MESES: 46,XY [30]		
2	F	V	t(1;11)(q21;q23)	3 MESES: 46,XY [36] 6 MESES: 46,XY [50] 16 MESES: 46,XY [79] 24 MESES: 46,XY [20] 37 MESES: NM	6 MESES: # 1 2 señales [25] 16 MESES: # 1 2 señales [32] 24 MESES: # 1 2 señales [25]	3 MESES: 5,3%XX 6 MESES: 4%XX 16 MESES: 1%XX 24 MESES: 1,5%XX 37 MESES: 1,6%XX
51	F	V	t(1;11)(q21;q23)	1 MES: 46,XX [52] 7 MESES: 46,XX [50] 9 MESES: 46,XX [52] 24 MESES: 46,XX [55]	1 MES: # 11 2 señales [37]	
40	M	V	inv(16)(p13q22),+2	3 MESES: 40,XY [53] 6 MESES: 40,XY [48] 24 MESES: 40,XY [50]		
32	F	V	+4	1 MES: NM 12 MESES: 46,XX [53] 24 MESES: 46,XX [33]		
37	M	R/V	t(11;17)(q23;q21)	4 MESES: 46,XX [30] 12 MESES: NM 24 MESES: 46,XX [50] 33 MESES: 46,XY,t(11;17)(q23,q21),t(3;4)(p21;q34) [42] Pre 2°TPH: 46,XX [62] 1 MES: 46,XX [4] 5 MESES: NM	24 MESES: # 11 2 señales [80]	4 MESES: 0,1%XY 12 MESES: 0%XY 24 MESES: 0,3%XY 33 MESES: 97,8%XY Pre 2° TPH: 0% XY 1 MES: 0%XY 5 MESES: 0%XY
46	F	V	+8	2 MESES: NM 11 MESES: 46,XX [50]		
17	F	V	add(5)q35)	12 MESES: 46,XX [8] 24 MESES: 46,XX [37]		
30	F	V	+21,+22	6 MESES: 47,XX,+21 [46]		
33	M	R/V	der(6)t(3;6)(p21;q23),+8	3MESES:47,XY,t(3;6)(p21;q35),+8[22]/47,XY,t(3;6)(p21;q35),+8,der(16)t(16;?) [13] 6 MESES: 46,XY [38] / 47,XY,t(3;6)(p21;q35),+8,der(16) t(16;?) [12] PRE-2°TPH: 46,XY [50] 2 MESES: 46,XY [20] 5 MESES: 46,XY [54]		

Nº, número del caso. S, sexo del paciente. M, masculino. F, femenino. EA, estado actual. E, exitus. R, recaída. V, vivo. #, cromosoma implicado en la anomalía observada. NM, no metafases. [] numero de metafases

3.2.4.3 SEGUIMIENTO DE LA EMR EN PACIENTES AFECTOS DE LMC

Siete pacientes presentaron la t(9;22)(q34;q11) (Tabla 3.19):

- Dos de ellos fueron trasplantados en FB (casos 14 y 25).
 - En el primero de ellos (caso 14) el estudio citogenético pre-TPH reveló un 54% (12/22) de las metafases Ph positivas, sin embargo los estudios posteriores no detectaron la t(9;22) hasta los 36 meses de seguimiento. El paciente recayó clínicamente a los 38 meses del trasplante, aunque no se pudo realizar el estudio citogenético por falta de metafases. La FISH usando la sonda BCR/ABL detectó un 15% de núcleos con el reordenamiento BCR-ABL.
 - El caso 25 al mes del trasplante presentó en el 100% de las metafases analizadas un cariotipo de 46,XY,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(17;?)(p12;?) (Figura 3.5) y un 98% de núcleos con el reordenamiento BCR-ABL. Ambos pacientes fallecieron debido a una recaída de la enfermedad.
- Los cinco pacientes restantes fueron trasplantados en FC (casos 5, 19, 69, 77 y 78)
 - Cuatro de ellos (casos 5, 19, 69 y 78) el seguimiento tanto por citogenética como por FISH usando la sonda BCR/ABL no detectó células Ph positivas. Todos los pacientes permanecían vivos con una media de seguimiento de 84 meses, a excepción de uno (caso 78) que falleció debido a una neumonía intersticial.
 - En el paciente 77 se realizó un estudio pre-trasplante en el que se detectó un 88% (45/51) de metafases Ph positivas y un 91% de núcleos con el reordenamiento BCR-ABL; al cabo de un mes del trasplante no se pudo realizar el estudio citogenético, pero el análisis de FISH reveló un 8,9% de núcleos con el reordenamiento, el paciente falleció debido a una neumonía intersticial.

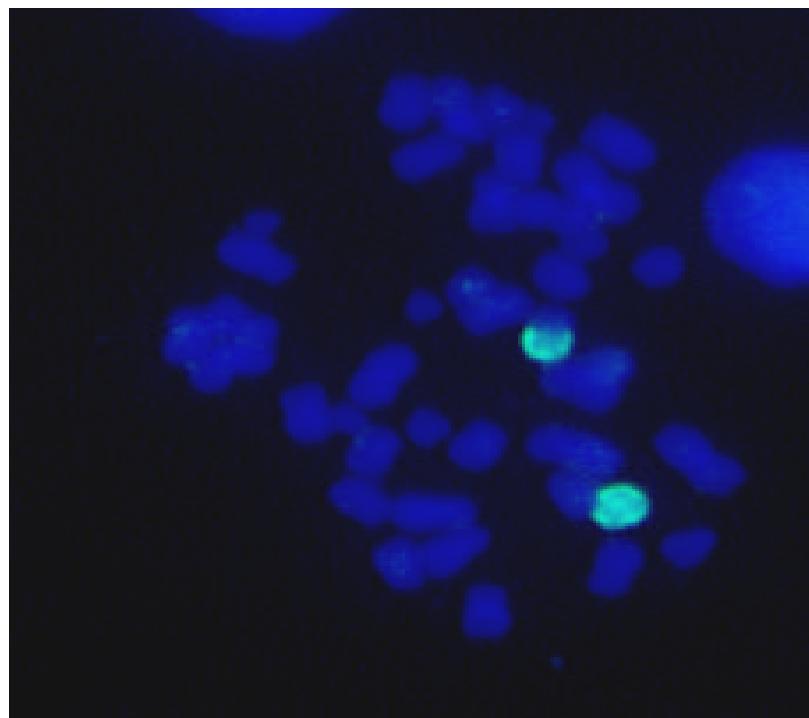


Figura 3.5. Pintado cromosómico con la sonda del cromosoma 17 correspondiente al caso 25 en el momento de la recaída. Se observa una señal verde más grande que corresponde al cromosoma 17 normal, y una señal verde más pequeña que corresponde al cromosoma 17 con material de otro cromosoma

Tabla 3.19. Resultados obtenidos por citogenética y FISH en el seguimiento de la EMR en pacientes con LMC

N	S	EA	CARIOTIPO PARCIAL	CITOGENÉTICA	BCR-ABL Painting	FISH sonda XY
5	F	V	t(9;22)(q34;q11)	72 MESES: 46,XY [50] 84 MESES: 46,XY [36] 96 MESES: 46,XY [50]		72 MESES: NR 84MESES: 0,2%XX
14	M	R/E	t(9;22)(q34;q11)	PRE-TPH: 46,XY,t(9;22)(q34;q11) [12] / 46,XY [10] 3 MESES: 46,XY [31] 6 MESES: 46,XY [42] 12 MESES: 46,XY [53] 36MESES: 46,XY,del(5)(q12q33),t(9;22)(q34;q11) [20]/ 46,XY [70] 38MESES: NM		38 MESES: 15% BCR-ABL
19	F	V	t(9;22)(q34;q11)	48 MESES: 46,XX [15]		
25	M	R/E	t(9;22)(q34;q11)	1 MES: 46,XY,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(17;?)(p12;?) [26]	1 MES: 98% BCR-ABL #17 2 señales [19]	
69	M	V	t(9;22)(q34;q11)	2 MESES: 46,XY (100) 3 MESES: 46,XY (34) 4 MESES: 46,XY (30)	2 MESES: 4,2% BCR-ABL 3 MESES: 3,2% BCR-ABL 4 MESES: NR	
77	M	E	t(9;22)(q34;q11)	PRE-TPH: 46,XY [6]/ 46,XY,t(9;22)(q34;q11) [45] 1 MES: NR	PRE-TMO: 91% BCR-ABL 1 MES: 8,9% BCR-ABL	
78	M	E	t(9;22)(q34;q11)	2 MESES: 46,XY [34]	2 MESES: 0% BCR-ABL	

N, número del caso. S, sexo del paciente. M, masculino. F, femenino. EA, estado actual. E, exitus. R, recaída. V, vivo. #, cromosoma implicado en la anomalía observada. NM, no metafases. []. NR, no resultado

3.2.4.4 EMR EN PACIENTES AFECTOS DE UN SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

El estudio se realizó en cinco pacientes afectos de SMD:

- Cuatro pacientes presentaron una alteración en el cromosoma 7, tres (casos 1, 64 y 68) una monosomía 7 y uno (caso 41) una delección en 7q (Tabla 3.20).
- En el caso 1 afecto de AF y SMD, el estudio citogenético se realizó en cinco ocasiones durante 29 meses de seguimiento, en todas ellas a excepción de la última no se detectaron células residuales del paciente; a los 29 meses coincidiendo con la recaída clínica y con una evolución hacia una LMA tipo M5 se detectaron células residuales con un cariotipo complejo implicando al cromosoma 7 (Figura 3.6). En este paciente también se realizó seguimiento de quimerismo, detectándose un incremento en el porcentaje de células residuales a partir de los 18 meses del trasplante, pasando de un 1,7% a un 6% y a un 37,8% en el momento de la recaída. El paciente recibió un segundo trasplante y después de tres años de seguimiento, tanto el estudio citogenético como el análisis de FISH utilizando la sonda X/Y, detectaron únicamente células del donante (Ortega et al 2000).
- Los otros dos pacientes que presentaron una monosomía 7 (casos 64 y 68) fueron seguidos durante 2 y 9 meses, respectivamente. En el caso 64, se realizó un estudio citogenético antes de recibir el trasplante detectándose la monosomía 7 en el 100% de las metafases analizadas, a los dos meses del trasplante se repitió el estudio y se continuó observando la monosomía 7 en todas las metafases, el paciente falleció tras la recaída clínica. En el caso 68, se realizaron tres estudios sin detectarse células residuales en ninguno de ellos, el paciente después de 11 meses del trasplante permanecía en remisión y sin síntomas de enfermedad.
- En el caso 41 presentó una delección en 7q , el seguimiento de la EMR no pudo realizarse debido a que no se obtuvieron metafases en ninguno de los tres estudios realizados, el paciente falleció a los 10 meses del trasplante debido a un fallo de implante seguido de una recuperación autóloga.
 - El caso 26 presentó al diagnóstico un cariotipo de 48,XY,+t(1;16)(q11;q13), del(14)(q22),+19. Se estudió a los 31 y 39 meses del trasplante, y en ambos estudios se observaron células residuales con las alteraciones observadas al diagnóstico, en el segundo estudio se encontraron, además, alteraciones cromosómicas adicionales coincidiendo con la evolución de la enfermedad (Figura 3.7) hacia una LMA tipo M5. El

paciente se sometió a un segundo trasplante y en el seguimiento durante dos años el estudio citogenético no detectó ninguna célula residual. El paciente permanecía bien sin síntomas de enfermedad después de más de dos años de recibir el segundo trasplante (Ortega et al, 2000).

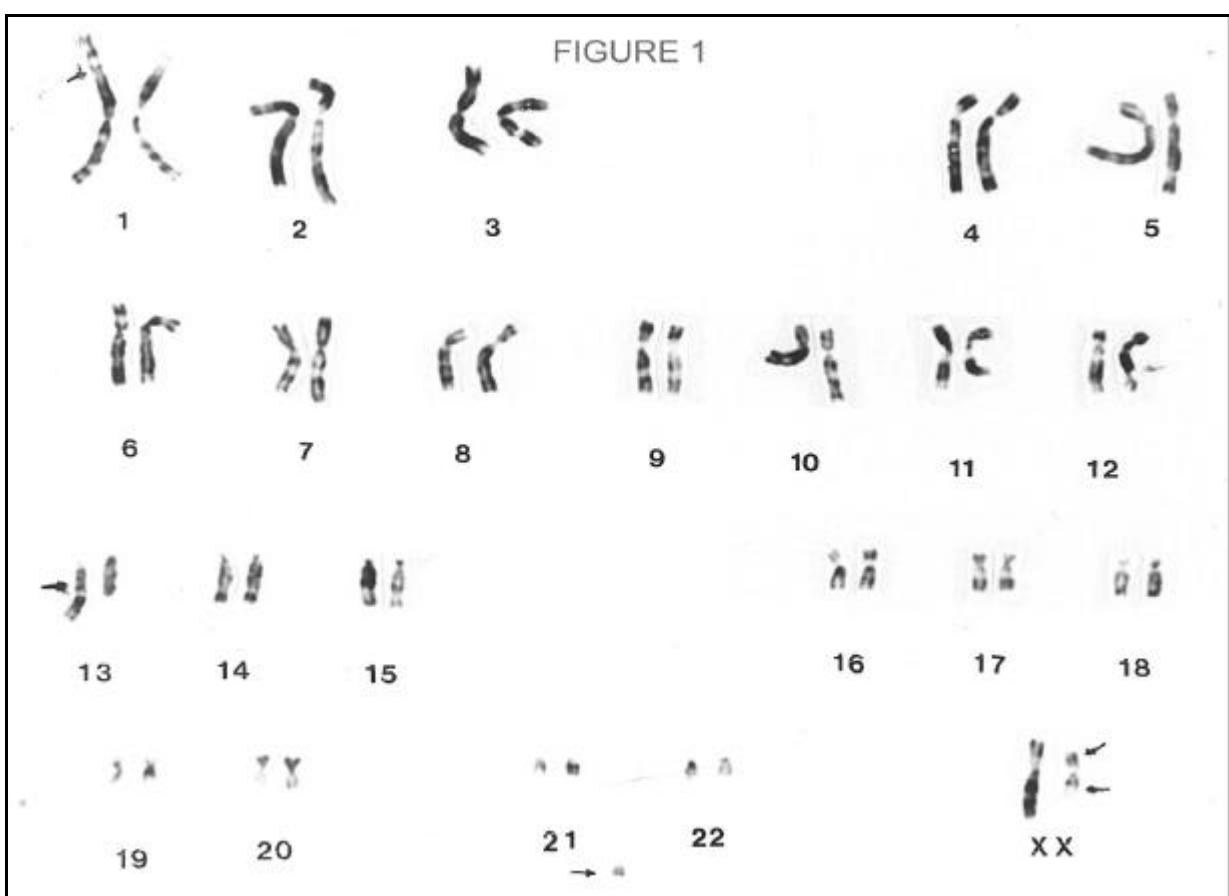


Figura 3.6. Cariotipo del caso 1 coincidiendo con la recaída clínica: 47,X,der(X)t(X;1)(q21;p32)del(X)(p22),der(1)(1;7)(p32;q21),add(13)(q24), +mar

Tabla 3.20 Resultados obtenidos por citogenética y FISH en el seguimiento de la EMR en pacientes con AF y/o SMD

Nº	S	EA	CARIOTIPO PARCIAL	CITOGENÉTICA	FISH sonda XY
1	F	R/V	-7	3 MESES: 46,XY [34] 10 MESES: 46,XY [58] 18 MESES: 46,XY [60] 23 MESES: 46,XY [61] 29 MESES: 46,XY [24]/ 47-45,X,der(X)t(X;1)(q21;p32)del(X) (p22), der(1) (1;7) (p32;q21), add (13)(q24) [4] Pre 2º TPH: 46,XY [(94)] 2ºTPH 2 MES: 46,XY [53] 6 MESES: 46,XY [50] 11 MESES: 46,XY [34] 18 MESES: 46,XY [53] 24 MESES: 46,XY [50]	3 MESES: 3%XX 10 MESES: 0%XX 18 MESES: 1,7%XX 23 MESES: 6%XX 29 MESES: 37,8%XX Pre 2ºTPH: 4%XX 2 MES: 0 %XX 6 MESES: 0,4%XX 11 MESES: 0,5%XX 18 MESES: 0%XX 24 MESES: 0%XX
41	F	E	del(7)(q22),-19,+mar	1 MES: NM 5 MESES: NM 7 MESES: NM	
64	F	R/E	-7	PRE-TPH: 45,XX,-7 [20] 2 MESES: 46,XX,-7 [12]	
68	F	V	-7	3 MESES: 46,XX [31] 6 MESES: 46,XX [1] 9 MESES: 46,XX [48]	
26	M	R/V	+t(1;16)(q11q13),del(14)(q22),+19	31 MESES: 46,XY [10] / 47-44,XY,+t(1;16)(q11q13),del(14)(q22), +19 [7] 39 MESES: 46,XY [9] / 48- 45,XY,+t(1;16)(q11q13),del(14)(q22),+del(14)(q22),i(13)(q10q10),+19 [12] 2ºTPH 3 MES: 46,XY [67] 11 MESES: 46,XY [42] 23 MESES: 46,XY [50]	

Nº, numero del caso. S, sexo del paciente. M, masculino. F, femenino. EA, estado actual. E, exitus. R, recaída. V, vivo. NM, no metafases. [], numero de metafases

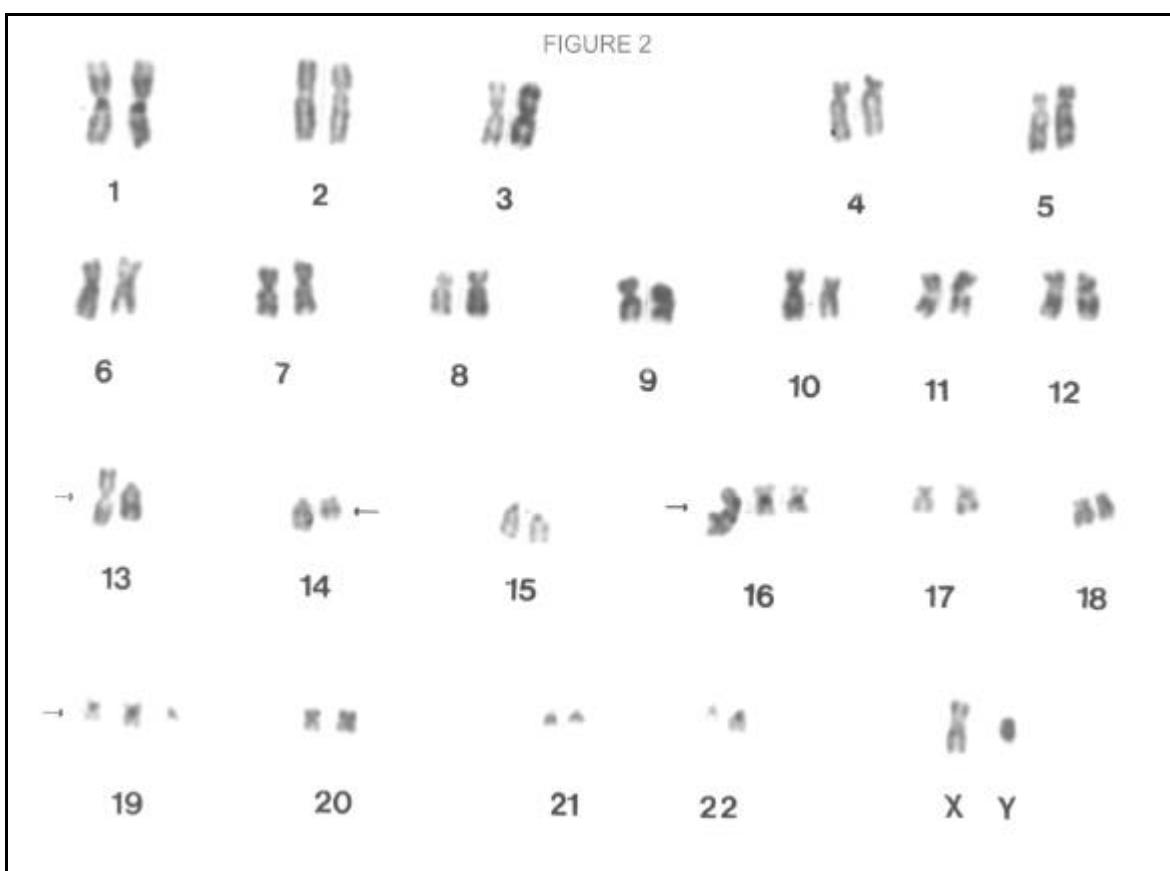


Figura 3.7. Cariotipo perteneciente al caso 26 mostrado en la recaída: 48,XY,+t(1;16)(q11q13), del(14)(q22),i(13)(q10),+19

3.2.5 VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y DE FISH EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Las alteraciones cromosómicas observadas en el diagnóstico se han detectado post-trasplante, en el 26% (10/38) de los pacientes estudiados. A excepción del caso 77 en el que la detección de la EMR se realizó sólo por FISH, en todos los casos los resultados obtenidos por citogenética han coincidido con los obtenidos por las técnicas de pintado cromosómico y de FISH usando la sonda BCR-ABL.

La mayoría de pacientes en recaída han presentado cariotipos complejos con las alteraciones cromosómicas observadas al diagnóstico y nuevas alteraciones adicionales, indicativas de la progresión de la enfermedad. Los cromosomas implicados en estas nuevas alteraciones han sido el X(1), 1(1), 2(1), 3(1), 4(1), 5(2), 7(2), 8(1), 11(1), 13(3), 16(1) y el 17(2), entre paréntesis se indica el número de veces que se ha visto implicado (Tabla 3.21).

Tabla 3.21 Pacientes en los que se ha detectado la EMR. Cariotipo al diagnóstico y en la recaída

Nº	Cariotipo al diagnóstico	Cariotipo en la recaída
35	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	46,XX,t(4;11)(q21;q23)
9	46,XY,t(1;14)(p34;q11),del(6)(q21)	46,XY,t(1;14)(p34;q11),t(2;8)(p24;q21),t(2;5)(p15;q21),del(6)(q21),der(13)t(11;13)(q13;q22),add(17)(p12)
37	46,XY,t(11;17)(q23,q21)	46,XY,t(11;17)(q23,q21),t(3;4)(p21;q34)
33	47,XY,t(3;6),del(6),+8	47,XY,t(3;6)(p21;q23),+8,der(16)t(16;?)
14	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	46,XY,del(5)(q?),t(9;22)(q34;q11)
25	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	46,XY,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(17;?)(p12;?)
77	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	NM
1	45,XX,-7	47-45,X,der(X)t(X;1)(q21;p32)del(X)(p22),der(1)t(1;7)(p32;q21), add (13) (q24)
64	45,XX,-7	45,XX,-7
26	48,+t(1;16)(q11q13),del(14)(q22), +del(14)(q22),+19	48-45,XY,+t(1;16)(q11q13),del(14)(q22),+del(14)(q22),i(13)(q10q10), +19

Nº, número de caso

En la mayoría de pacientes la recaída clínica tuvo lugar entre el primer y los tres primeros meses del trasplante, en ellos no se pudo realizar seguimiento del paciente, ya que la detección de la EMR se produjo en el primer control post-trasplante, coincidiendo con la recaída clínica del paciente (Tabla 3.22).

En los casos 9, 37 y 1 la recaída se produjo a los tres, 33 y 29 meses respectivamente (Tabla 3.22), pudiéndose realizar varios estudios durante el seguimiento. En todos ellos, la detección de la EMR se realizó coincidiendo con la recaída clínica sin que en los estudios previos se detectaran células residuales (el tiempo transcurrido entre el último estudio y el momento de la detección de la EMR fue de dos, nueve y seis meses, respectivamente). Los casos 1 y 37 recibieron un trasplante alogénico de un donante de diferente sexo y en ambos se realizó también el seguimiento del quimerismo. Así, mientras en el caso 1 en los estudios previos al de la detección de la EMR se observó un aumento de células del paciente de un 1,7%, a un 6% hasta llegar a un 37,8% en el momento de la recaída, en el caso 37 no se observó ningún aumento de células residuales, se pasó de un 0% a un 0,3%, hasta que en el momento de la recaída se observó un 98% de células del paciente.

En el caso 14, afecto de LMC Ph positivo la recaída se produjo a los 36 meses del trasplante, detectándose la EMR dos meses antes de la recaída clínica (Tabla 3.22).

Tabla 3.22. Momento de la detección de la EMR y evolución post-detección

Paciente	LEUCEMIA	Tiempo transcurrido desde el TPH hasta que se detecta la EMR y evolución
35	LLA-B	A los 3 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica
9	LLA-T	A los 3 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica
37	LMA-M5	A los 33 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica
33	LMA-M2 prebas.	A los 3 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica
14	LMC	A los 36 meses del TPH, dos meses antes de la recaída clínica
25	LMC	Al mes del TPH coincidiendo con la recaída clínica
77	LMC	Al mes del TPH cuatro meses antes de fallecer por una NI
1	AF/SMD	A los 29 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica
26	AF7SMD	A los 31 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica
64	LMMoC	A los 2 meses del TPH coincidiendo con la recaída clínica

LMA-M2 prebas, LMA-M2 de precursores basófilos, NI, neumonía intersticial

3.3 CORRELACION ENTRE EL CARIOTIPO Y LA EVOLUCIÓN POST-TPH

Para determinar la influencia del cariotipo en la supervivencia post-trasplante sólo se ha considerado la serie de 54 pacientes afectos de neoplasias hematológicas.

3.3.1 INFLUENCIA DEL CARIOTIPO EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL, EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD Y EN LA RECAÍDA

En primer lugar determinamos la influencia del cariotipo en la supervivencia global (SG), en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y en la proporción de recaídas (PR), teniendo en cuenta si en el diagnóstico de la enfermedad el paciente presentaba un cariotipo:

- normal
- desconocido (incluimos aquellos pacientes que no tenían un estudio citogenético realizado en el diagnóstico de la enfermedad y aquellos en los que el estudio se realizó pero no se obtuvo resultado, bien por muestra insuficiente o por la propia limitación de la técnica)
- alterado (con alteraciones cromosómicas clonales)

De los 54 pacientes que incluimos en la serie, cuatro presentaron cariotipo normal, doce cariotipo desconocido y 38 cariotipo alterado.

3.3.1.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD SEGÚN EL TIPO DE CARIOTIPO OBSERVADO AL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

A lo largo del estudio han fallecido 17 de los 54 pacientes con neoplásicas hematológicas. La mayoría, 14 pacientes, lo hacen durante el primer año post-trasplante, de los cuales 13 tenían un cariotipo alterado y uno un cariotipo desconocido.

Al año del TPH, el 100% y el 81% de los pacientes que presentaron un cariotipo normal o desconocido respectivamente, permanecían vivos, mientras que sólo seguían con vida el 64% de los pacientes con cariotipo alterado, siendo las diferencias no significativas. Durante el segundo y el tercer año fallecieron dos pacientes con cariotipo desconocido estimando la SG del grupo en un 71% (Tabla 3.23).

Al final del seguimiento de los 54 pacientes estudiados, 12 presentaron un cariotipo desconocido falleciendo tres, dos debido a causas relacionadas con el trasplante y uno debido a la recaída de la enfermedad; cuatro presentaron un cariotipo normal de los que no ha fallecido ninguno y 38 presentaron un cariotipo alterado de los que fallecieron 14. Es decir el 100% de los pacientes con cariotipo normal permanecían vivos, mientras que sólo permanecían vivos el 71% de los que presentaron un cariotipo desconocido y el 57% de los que tenían un cariotipo alterado. Estas diferencias no han resultado significativas (Tabla 3.23 y Figura 3.8).

Tabla 3.23 SG según el tipo de cariotipo observado al diagnóstico

Cariotipo	Al año del TPH					A los tres años del TPH					Final del seguimiento				
	N	E	SG	ES	p	N	E	SG	ES	p	N	E	SG	ES	
Desconocido															
Normal	12	1	0,818	0,116		12	3	0,710	0,142		12	3	0,710	0,142	
Alterado	4	0	1,000	-	0,495	4	0	1,000	-	0,293	4	0	1,000	-	0,255
	38	13	0,645	0,079		38	13	0,645	0,079		38	14	0,573	0,098	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SG, supervivencia global. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad

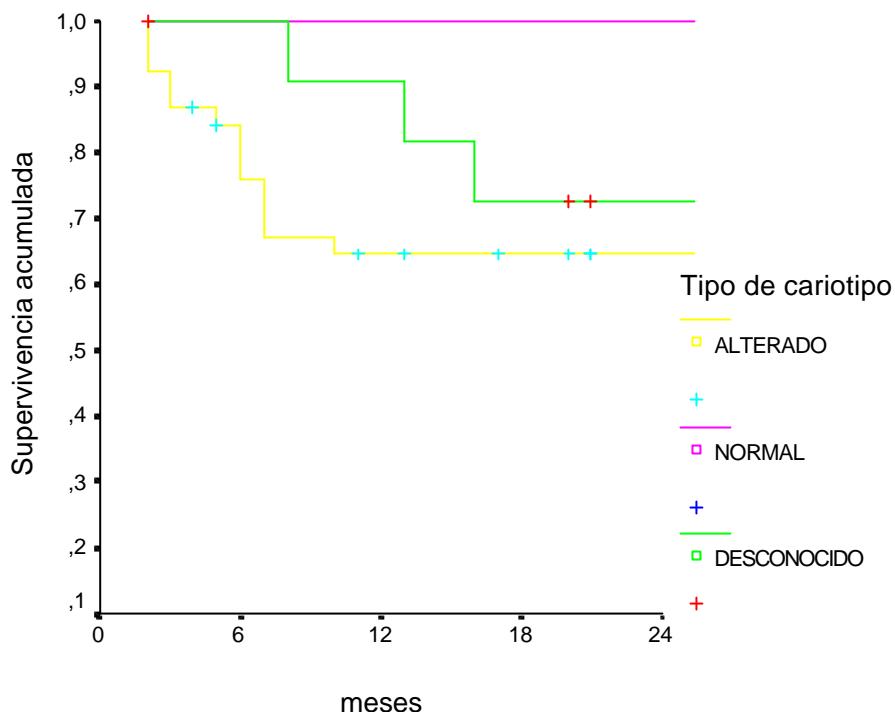


Figura 3.8. SG post-TPH según el tipo de cariotipo observado al diagnóstico

Si consideramos la SLE, se sigue observando que en el grupo de pacientes con cariotipo alterado el número de fallecidos sigue siendo mayor (Tabla 3.24). Al final del estudio de los 44 pacientes que no han recaído 11 presentaron un cariotipo desconocido, de ellos han fallecido dos; de los cuatro con cariotipo normal no ha fallecido ninguno; y de los 29 con cariotipo alterado han fallecido nueve. La SLE al año de seguimiento fue del 90% para los pacientes con cariotipo desconocido, del 100% para los pacientes con cariotipo normal y del 68% para los pacientes con cariotipo alterado. A los tres años de seguimiento fallece un paciente con cariotipo desconocido siendo la SLE para este grupo de pacientes del 80%, del 100% para los pacientes con cariotipo normal y del 68% para los pacientes con cariotipo alterado. Las diferencias no han sido significativas en ningún momento del seguimiento.

Tabla 3.24 SLE según el tipo de cariotipo observado al diagnóstico

	Al año del TPH					A los tres años del TPH				
	N	E	SLE	ES	p	N	E	SLE	ES	p
Cariotipo										
Desconocido	11	1	0,900	0,126	0,474	11	2	0,800	0,126	0,474
Normal	4	0	1,000	-		4	0	1,000	-	
Alterado	29	9	0,684	0,087		29	9	0,684	0,087	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SLE, supervivencia libre de enfermedad. ES, error estándard de la supervivencia. p, probabilidad

3.3.1.2 SG Y SLE EN PACIENTES EN PRIMERA REMISIÓN COMPLETA SEGÚN EL TIPO DE CARIOTIPO

Para eliminar factores que pueden interferir en la asociación entre cariotipo y supervivencia, tales como la recaída antes del TPH y tratamientos adicionales, se ha estimado la SG y la SLE en función del cariotipo detectado al diagnóstico, sólo considerando los pacientes que fueron trasplantados en primera RC (32 pacientes).

Al igual que en el estudio anterior, la mayoría de los pacientes que han fallecido presentaron un cariotipo alterado. Al final del estudio de los 32 pacientes incluidos en el análisis, cuatro presentaban un cariotipo desconocido de los que falleció uno debido a causas relacionadas con el TPH; uno presentaba un cariotipo normal que se mantiene con vida a lo largo de todo el seguimiento; y 27 tenían un cariotipo alterado, falleciendo seis de ellos.

A los dos años del TPH, la SG estimada fue del 75% para los pacientes con cariotipo desconocido, del 100% para los pacientes con cariotipo normal y del 76% de los pacientes con cariotipo alterado. Los valores para la SLE son los mismos que para la SG, siendo las diferencias no significativas (Tabla 3.25).

Tabla 3.25 SG y SLE a los dos años del TPH en función del tipo de cariotipo en pacientes trasplantados en primera RC

Cariotipo	SG					SLE				
	N	E	SG	ES	p	N	E	SLE	ES	p
Desconocido	4	1	0,750	0,216		4	1	0,750	0,216	
Normal	1	0	1,000	-	0,165	1	0	1,000	-	0,206
Alterado	22	5	0,761	0,093		27	6	0,761	0,085	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SG, supervivencia global. SLE, supervivencia libre de enfermedad. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad

3.3.1.3 SG Y SLE EN PACIENTES SOMETIDOS A UN TPH ALOGÉNICO

Se ha calculado la influencia del cariotipo en la SG y la SLE de aquellos pacientes sometidos a un TPH alogénico. El cálculo estadístico no se ha realizado para los pacientes sometidos a un TPH autólogo porque todos ellos presentaron un cariotipo alterado al diagnóstico de la enfermedad.

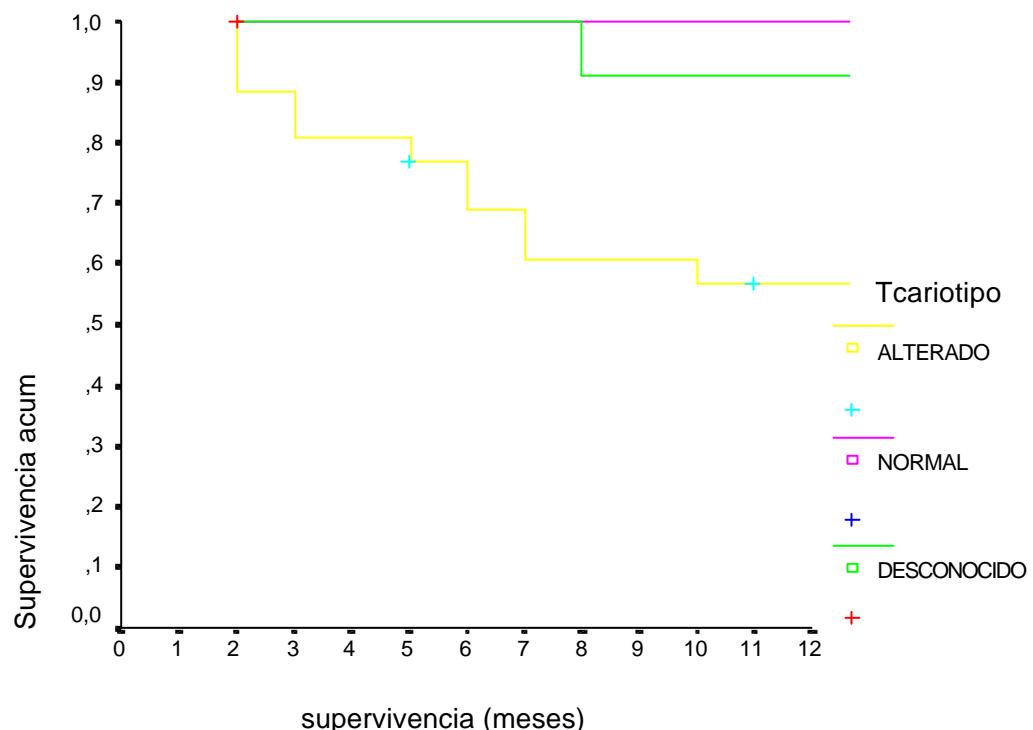
De los 54 pacientes incluidos en el análisis 42 recibieron un TPH alogénico, de ellos 12 presentaron un cariotipo desconocido falleciendo tres, cuatro un cariotipo normal y 26 presentaron un cariotipo alterado falleciendo doce.

La SG al final del estudio fue de un 73% para los pacientes con cariotipo desconocido, de un 100% para los de cariotipo normal y del 47% para los que presentaban un cariotipo alterado, siendo las diferencias no significativas. Al año del trasplante, fallecieron doce pacientes y sólo uno presentó un cariotipo desconocido. La SG fue del 91% para el grupo de pacientes con cariotipo desconocido, del 100% para los de cariotipo normal y del 56% para los que presentaron un cariotipo alterado, las diferencias son significativas con una $p=0,042$ (Tabla 3.26 y Figura 3.9).

Tabla 3.26 SG al año del TPH alogénico en función del tipo de cariotipo

Cariotipo	N	E	SG	ES	p
Desconocido	12	1	0,910	0,113	
Normal	4	0	1,000	-	0,042
Alterado	26	11	0,561	0,084	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SG, supervivencia global. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad

**Figura 3.9. SG al año del TPH alogénico**

En cuanto a la SLE se sigue observando que el grupo de pacientes con cariotipo alterado son los que presentan un número mayor de fallecidos. Las diferencias no son significativas en ningún momento del seguimiento.

Los pacientes con cariotipo desconocido o normal presentan una SLE al año del TPHalogénico de un 90% y un 100% respectivamente y a los tres años del 80% y del 100%. El grupo de pacientes con cariotipo alterado presenta una SLE al año y a los tres años del 53%. Las diferencias no son significativas (Tabla 3.27).

Tabla 3.27 SLE en TPH alogénicos según el tipo de cariotipo

Cariotipo	Al año del TPH					A los tres años del TPH				
	N	E	SLE	ES	p	N	E	SLE	ES	p
Desconocido	11	1	0,900	0,095		11	2	0,800	0,126	
Normal	4	0	1,000	-	0,613	4	0	1,000	0,094	0,095
Alterado	20	9	0,536	0,114		20	9	0,536	0,114	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SLE, supervivencia libre de enfermedad. ES, error estándard de la supervivencia. p, probabilidad

Para eliminar factores que pueden interferir en la asociación entre cariotipo y supervivencia, tales como la recaída antes del TPH y tratamientos adicionales, se ha estimado la SG y la SLE en función del cariotipo detectado al diagnóstico, sólo considerando los pacientes que recibieron un TPH alogénico en primera RC. Se ha observado una mayor SG y SLE en los pacientes con cariotipo normal o desconocido siendo las diferencias no significativas. A los tres años del trasplante los que tenían un cariotipo desconocido presentaban una SG y una SLE del 75%, los que tenían un cariotipo normal del 100% y los que tenían un cariotipo alterado una SG del 72% y una SLE del 67%.

3.3.1.4 ESTIMACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE RECAIDAS SEGÚN EL TIPO DE CARIOTIPO

Se ha estimado la proporción de recaídas (PR) en función del tipo de cariotipo que presentaban al diagnóstico de la enfermedad. De los 54 pacientes que se han incluido en el análisis, diez de ellos han recaído, uno presentó un cariotipo desconocido y nueve un cariotipo alterado.

Al final del seguimiento un 43% de los pacientes con cariotipo alterado ha recaído mientras que sólo recayeron el 10% de los pacientes que presentaban un cariotipo desconocido y ninguno de los que presentaron un cariotipo normal. Aunque las diferencias son notables éstas no son significativas (Tabla 3.28 y Figura 3.10).

Tabla 3.28 PR al final del seguimiento según el tipo de cariotipo

Cariotipo	N	E	PR	p
Desconocido	12	1	0,100	
Normal	4	0	0,000	0,235
Alterado	38	9	0,436	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. PR, proporción de recaída. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad.

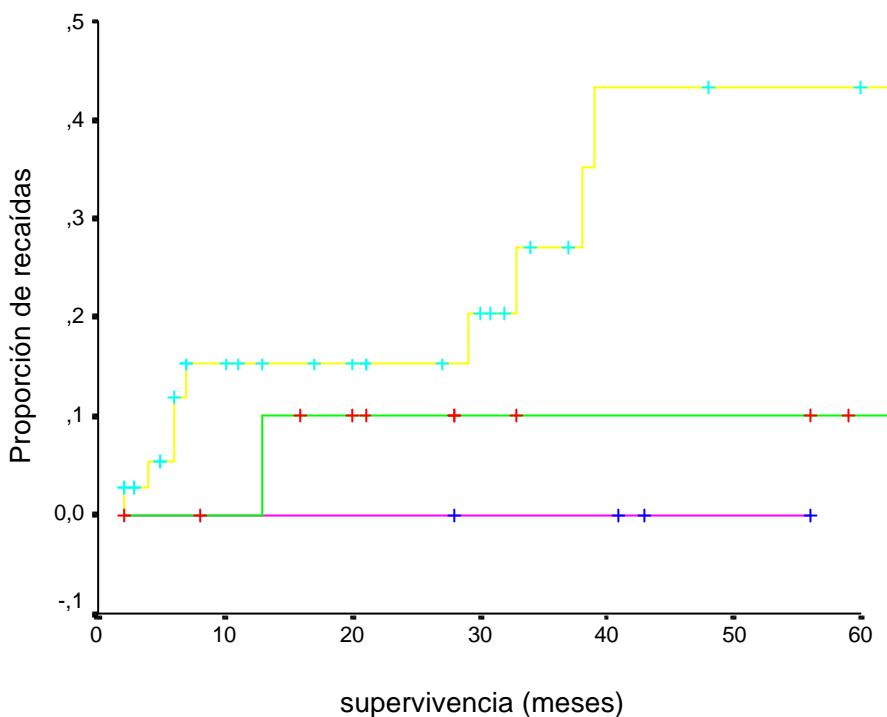


Figura 3.10. Proporción de recaída según el tipo de cariotipo

Si consideramos los pacientes que se han trasplantado en primera RC sólo han recaído cinco, todos ellos con un cariotipo alterado. La PR es del 0% para los pacientes que han presentado un cariotipo desconocido o normal y del 31% para los que han presentado un cariotipo alterado. Las diferencias no son significativas.

De los pacientes que han recibido un TPH alogénico, han recaído el 51% de los que presentaron un cariotipo alterado y sólo un 10% y ninguno de los que presentaron un cariotipo desconocido o normal, respectivamente. Si consideramos sólo los que han sido trasplantados en primera RC, se ha observado que la PR ha disminuido, es del 0% para los que han presentado un cariotipo desconocido o normal y del 38% para los que han presentado un cariotipo alterado. Las diferencias no son significativas.

3.3.2 RELACION ENTRE EL PRONOSTICO DE LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y LA EVOLUCIÓN POST-TRASPLANTE

Por otro lado se ha determinado la influencia del cariotipo en la supervivencia del paciente trasplantado, teniendo en cuenta el valor pronóstico de éste, desfavorable, intermedio o favorable según lo descrito en la literatura. Para el análisis estadístico sólo se han incluido los pacientes afectos de neoplasias hematológicas que presentaban un cariotipo normal o alterado.

- En las LLA infantiles y en función del cariotipo que han presentado nuestros pacientes, el valor pronóstico del cariotipo que se ha considerado ha sido el siguiente (Martínez-Climent 1997):

DESFAVORABLE • t(4;11)(q21;q23) y alteraciones en 11q23 con el gen MLL reorganizado
• t(9;22)(q34;q11)
• Cariotipos complejos

INTERMEDIO • hiperdiploidía con iso(17) y tetraploidía
• pseudodiploidía con der(19)t(1;19)(q23;p13)
• alteraciones en 14q11 y 7q35 en LLA-T
• otras alteraciones cromosómicas
• cariotipo normal

FAVORABLE • hiperdiploidía de más de 50 cromosomas sin alteraciones estructurales

- En las LMA infantiles y en función del cariotipo que han presentado nuestros pacientes, el valor pronóstico considerado ha sido el siguiente (Pui et al 2000, Chang et al 2000 y Raimondi et al 1999):

DESFAVORABLE • Monosomía 7 / del(7q)
• Monosomía 5 / del(5q) ↗ en casos expuestos a terapia relacionada con leucemias mieloides (t-LMA)
• Alteraciones en 11q23 en LMA M4/ M5/ t-LMA
• Cariotipos complejos

INTERMEDIO • Trisomía 8 como única alteración
• Otras alteraciones cromosómicas

FAVORABLE • t(8;21)(q22;q22) en LMA M2

- t(9;11)(p22;q23) en LMA M5a
 - inv(16)(p13q22) y t(16;16)(p13;q22) en LMA M4Eo
 - t(15;17)(q22;q12-21) en LMA M3, solo con quimioterapia sin ATRA confiere un pronóstico desfavorable
-
- En los SMD infantiles el valor pronóstico del cariotipo es el siguiente (Luna-Fineman et al 1999 y Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1997):
- | | |
|---------------------|------------------------|
| DESFAVORABLE | • Monosomía 7 |
| | • Cariotipos complejos |
| INTERMEDIO | del(7q) |
| FAVORABLE | • Cariotipo normal |

De los 54 pacientes con enfermedades neoplásicas se obtuvo resultado citogenético en 42 pacientes, de ellos cuatro presentaron un cariotipo de pronóstico favorable, 17 de pronóstico intermedio y 21 de pronóstico desfavorable.

Dado el bajo número de casos con pronóstico favorable éstos se han agrupado con los pacientes que presentaban un cariotipo de pronóstico intermedio.

3.3.2.1 INFLUENCIA DEL PRONOSTICO DEL CARIOTIPO EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL y EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

De los 42 pacientes incluidos en el análisis han recaído nueve y han fallecido 14 (cinco tras la recaída clínica). Si tenemos en cuenta el cariotipo que han presentado estos pacientes, se observa que la mayoría presentaban un cariotipo de mal pronóstico:

- tres presentaron alteraciones en 11q23, dos de ellos una t(4;11)(q21;q23) en una LLA-B que han fallecido, uno de ellos tras la recaída clínica; y uno una t(11;17)(q23;q21) en una LMA-M5 que permanece en remisión tras la recaída clínica y un segundo trasplante
- cuatro han presentado una t(9;22) todos ellos con LMC, han fallecido los cuatro dos de ellos tras la recaída clínica
- dos han presentado alteraciones en 14q11 ambos en una LLA-T, uno con una t(1;14)(p34;q11) que falleció tras la recaída y otro con una t(11;14)(p13;q11) que ha fallecido por causas relacionadas con el trasplante
- cuatro han presentado otro tipo de translocaciones, tres en una LLA-B, uno una t(11;16)(p13;q13), uno un der(19)t(1;19)(q23;p13) y otro un der(1)t(1;?) que han fallecido por causas relacionadas con el trasplante; y uno un cariotipo de 47,XY,der(6)t(3;6)(q21;q23),+8 en una LMA-M2 de precursores basofílos que tras la recaída permanece en remisión tras un segundo trasplante.
- dos han presentado una monosomía 7, uno en un AF/SMD que permanece en remisión tras recaída clínica y un segundo trasplante y otro en un SMD de *novo* que ha fallecido tras la recaída
- uno una t(15;17)(q22;q12-21) en una LMA-M3 que ha fallecido por causas relacionadas con el trasplante
- Dos han presentado un cariotipo complejo, afectos de AF/SMD , uno con un cariotipo de 47,XY,t(1;16)(q11;q13),del(14)(q22),+19, y permanece en remisión tras recaída clínica y un segundo trasplante, y otro con otro cariotipo complejo de 46,XX,del(7)(q22),-19,+mar que ha fallecido por causas relacionadas con el trasplante.

Para conocer si realmente existía alguna relación significativa entre el pronóstico del cariotipo y la evolución post-TPH en los pacientes de nuestra serie, se ha estimado en primer lugar, la influencia del pronóstico del cariotipo en la SG y en la SLE en el conjunto de pacientes trasplantados.

Se observa que tanto al año, a los dos años, como al final del estudio los pacientes con un cariotipo de pronóstico desfavorable presentan una SG y una SLE menor que los pacientes con un cariotipo de pronóstico intermedio o favorable. Alcanzan los tres años post-TPH el 75% de los pacientes con un cariotipo de pronóstico favorable o intermedio y el 60% de los pacientes con un cariotipo desfavorable, así mismo, la SLE para los de pronóstico favorable o intermedio es de un 79% y para los de pronóstico desfavorable de un 61%. Las diferencias no son significativas.

Tabla 3.29 SG y SLE según el pronóstico del cariotipo a los tres años del TPH

Pronóstico	SG					SLE				
	N	E	SG	ES	p	N	E	SLE	ES	p
Favorable/intermedio	21	5	0,756	0,095	0,390	20	4	0,797	0,091	0,336
Desfavorable	21	8	0,603	0,109		13	5	0,615	0,135	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SLE, supervivencia libre de enfermedad. SG, supervivencia global. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad

3.3.2.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN PACIENTES TRASPLANTADOS EN PRIMERA RC

Se ha estimado la influencia del pronóstico en la SG y en la SLE pero sólo considerando los pacientes trasplantados en primera RC.

Aunque se observa que las diferencias son mayores estas siguen sin ser significativas. Así la SG y la SLE a los tres años del TPH es de un 90% para los pacientes con un cariotipo de pronóstico favorable o intermedio y de un 69% y un 67% para los pacientes con un cariotipo de pronóstico desfavorable.

3.3.2.3 SUPERVIVENCIA GLOBAL y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DEL TIPO DE TRASPLANTE

Recibieron un TPH alogénico 30 pacientes y un TPH autólogo 12. Tanto en los pacientes que se sometieron a un trasplante alogénico como a uno autólogo, la SG y la SLE han sido menor en el grupo de pacientes con un cariotipo de pronóstico desfavorable.

A los tres años del **TPH alogénico** la SG es de un 59,8% y la SLE de un 65,6% para los pacientes con un pronóstico favorable o intermedio, de un 51,8% y un 58,3% respectivamente, para los de pronóstico desfavorable. Las diferencias no son significativas (Tabla 3.30).

Tabla 3.30 SG y SLE a los tres años según el pronóstico del cariotipo en TPH alogénicos

Pronóstico	<u>SG</u>					<u>SLE</u>				
	N	E	SG	ES	p	N	E	SLE	ES	p
Favorable/intermedio	13	5	0,598	0,140	0,929	4	2	0,656	0,140	0,900
Desfavorable	17	7	0,518	0,148		12	5	0,583	0,142	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SG, supervivencia global. SLE, supervivencia libre de enfermedad. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad

De los doce pacientes que recibieron un **TPH autólogo** sólo han fallecido dos, ambos con un cariotipo de pronóstico desfavorable (Tabla 3.31). La SG es de un 100% para los pacientes con un pronóstico favorable o intermedio, y de un 33% para los de pronóstico desfavorable (Figura 3.11). En este caso las diferencias son significativas (0,011). La SLE no se ha podido calcular debido al tamaño de la muestra.

Tabla 3.31 SG según el pronóstico del cariotipo en TPH autólogos

Pronóstico	<u>A los tres años del TPH</u>				
	N	E	ST	ES	p
Favorable/intermedio	8	0	1,000	-	0,011
Desfavorable	4	2	0,333	0,272	

N, número de pacientes. E, número de pacientes exitus. SLE, supervivencia libre de enfermedad. ST, supervivencia total.. ES, error estándar de la supervivencia. p, probabilidad

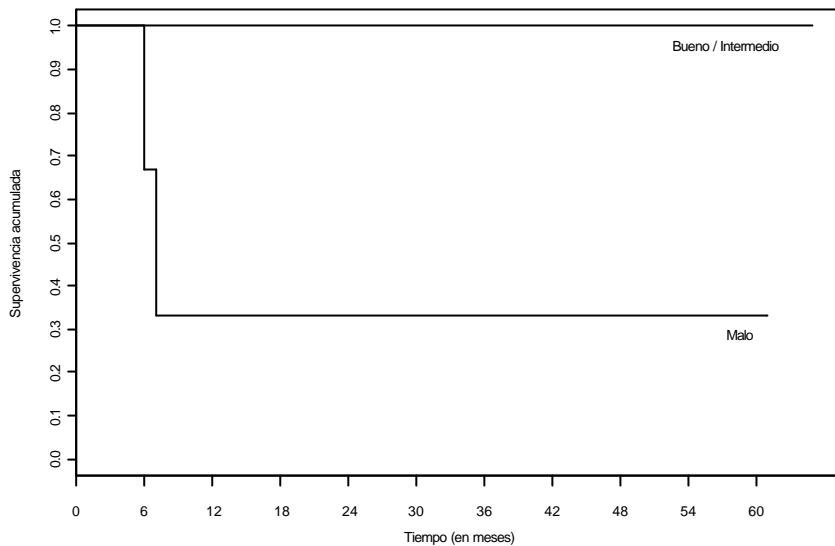


Figura 3.11. SG según el tipo de pronóstico en TPH autólogos

La SG para los pacientes con un cariotipo de pronóstico desfavorable es menor en los pacientes sometidos a un TPH autólogo (33%) en relación a los que se sometieron a un TPH alogénico (52%). Así mismo, la SG de los que presentan un cariotipo favorable o intermedio es menor en los que reciben un TPH alogénico (60%) que en los que reciben un TPH autólogo (100%).

3.3.2.4 PROPORCIÓN DE RECAÍDAS SEGÚN EL PRONÓSTICO DEL CARIOTIPO

De los diez pacientes que han recaído, nueve presentaron un cariotipo alterado y en uno no se conocía el cariotipo que presentaba al diagnóstico de la enfermedad. De los nueve que presentaron un cariotipo alterado, uno era de pronóstico intermedio y los ocho restantes de pronóstico desfavorable.

Al final del seguimiento han recaído el 5,9% de los que presentaban un cariotipo de pronóstico favorable o intermedio, y el 59,6% de los que presentaban un cariotipo de pronóstico desfavorable (Figura 3.12). Estas diferencias son significativas con una $p=0,017$.

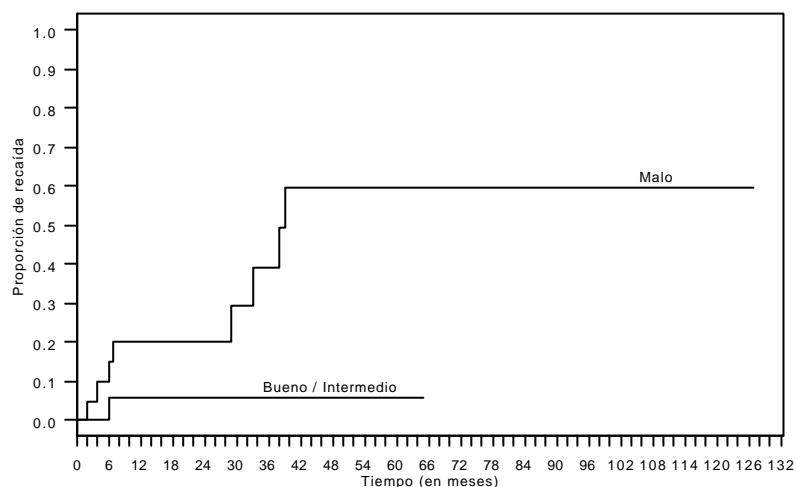


Figura 3.12 PR según el pronóstico del cariotipo

Si consideramos solo los pacientes que se transplantaron en **primera RC**, al final del seguimiento han recaído el 48,8% de los pacientes que presentaban un cariotipo desfavorable, mientras que no recayó ninguno de los pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio (Figura 3.13). Las diferencias son significativas con una $p=0,045$.

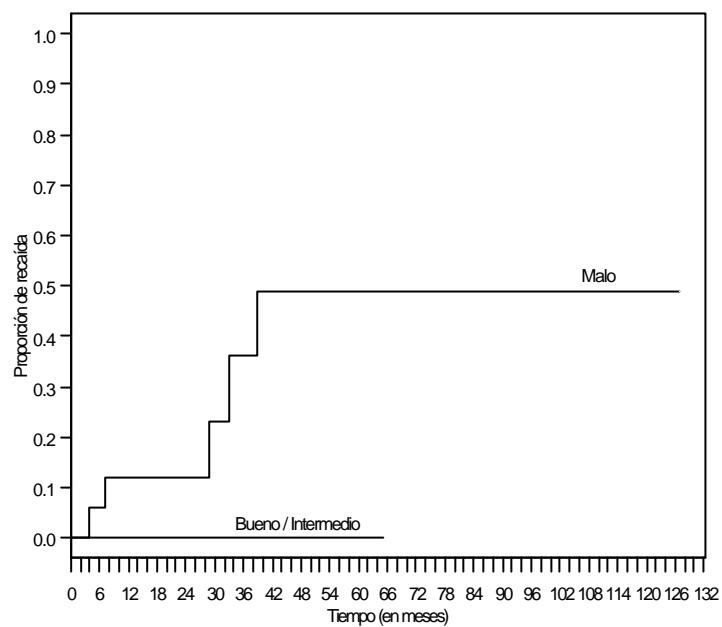


Figura 3.13 . Proporción de recaída según el pronóstico del cariotipo en pacientes trasplantados en primera RC

3.3.2.4.1 PROPORCIÓN DE RECAÍDAS EN FUNCIÓN DEL PRONÓSTICO DEL CARIOTIPO Y DEL TIPO DE TRANSPLANTE

Si consideramos los pacientes que se sometieron a un **TPH alogénico**, a los tres años de seguimiento recayeron el 11% de los pacientes que presentaron un cariotipo favorable o intermedio y el 31% de los que presentaron un cariotipo desfavorable. Las diferencias no son significativas (Tabla 3.32).

En el grupo de pacientes que recibieron un **TPH autólogo**, a los tres años del trasplante no ha recaído ninguno de los pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio, mientras que recayeron el 75% de los pacientes con cariotipo de pronóstico desfavorable (Figura 3.14). Las diferencias son significativas ($p=0,004$) (Tabla 3.32).

Tabla 3.32. PR a los tres años según el TPH y según el pronóstico del cariotipo

Pronóstico	TPH alogénico				TPH autólogo			
	N	R	PR	p	N	R	PR	p
Favorable/intermedio	13	1	0,111	0,474	8	0	0,000	0,004
Desfavorable	17	3	0,314		4	3	0,750	

N, número de pacientes. R, número de pacientes que recaen. PR, proporción de recaídas. p, probabilidad

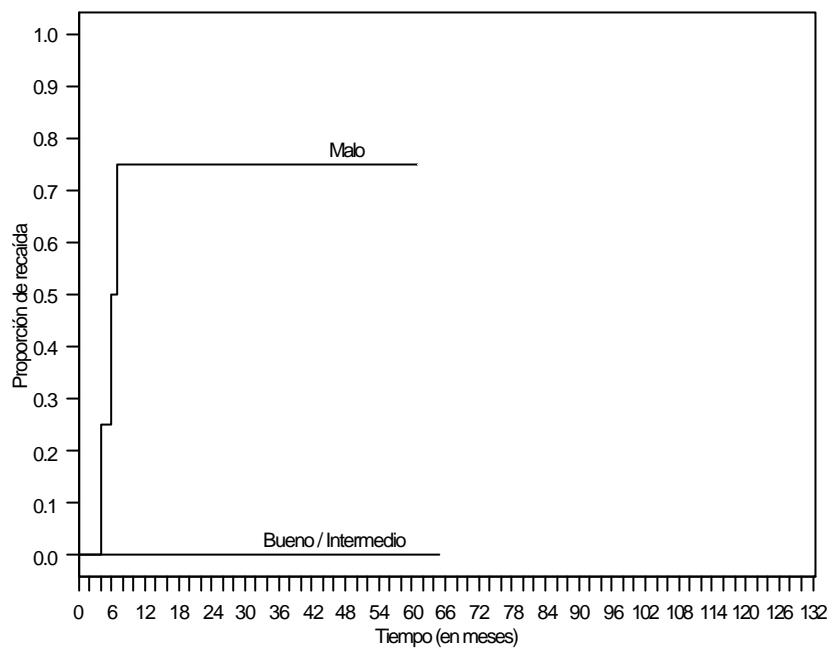


Figura 3.14. PR según el pronóstico del cariotipo en TPH autólogos

IV. DISCUSIÓN