

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

**ESTUDIO SECUENCIAL Y CUANTITATIVO DEL QUIMERISMO
HEMOPOYÉTICO EN PACIENTES SOMETIDOS A UN TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS CON DEPLECIÓN
LINFOIDE T O CON ACONDICIONAMIENTO SUB-MIELOABLATIVO**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por
Francesc Fernández Avilés

INDICE

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	1
--	----------

INTRODUCCIÓN

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES

HEMOPOYÉTICOS.....	3
---------------------------	----------

- PERSPECTIVA HISTÓRICA.....** 3
 - 1. CONCEPTO DE TRASPLANTE HEMOPOYÉTICO.....* 4
 - 2. FUENTE DE PROGENITORES PARA TRASPLANTE HEMOPOYÉTICO: MÉDULA ÓSEA O SANGRE PERIFÉRICA.....* 6

IMPLANTE HEMOPOYÉTICO Y REACCIONES ALLOIMUNES.....	9
---	----------

- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL IMPLANTE HEMOPOYETICO.....** 9
- INDUCCIÓN DE TOLERANCIA Y FALLO DE IMPLANTE.....** 11
- EFECTO ANTITUMORAL DEL INJERTO.....** 12

ELIMINACION DE LINFOCITOS T DEL INÓCULO.....	16
---	-----------

- ASPECTOS CLÍNICOS.....** 16
- ASPECTOS TÉCNICOS.....** 19

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA.....	23
---	-----------

- INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS.....** 23
- VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS TRASPLANTES CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA.....** 24

QUIMERISMO	27
❑ CONCEPTO	27
❑ EVALUACION DEL QUIMERISMO	28
1. <i>CITOGENÉTICA</i>	29
2. <i>HIBRIDACION FLUORESCENTE IN SITU (FISH)</i>	29
3. <i>POLIMORFISMOS DE ADN</i>	30
❑ POLIMORFISMOS BASADOS EN EL ADN REPETITIVO	32
1. <i>SECUENCIAS DISPERSAS</i>	32
2. <i>SECUENCIAS REPETIDAS EN TÁNDEM (MINI-MICROSATÉLITES)</i>	32
3. <i>ANALISIS DEL QUIMERISMO: SANGRE PERIFÉRICA/MÉDULA</i> <i>ÓSEA</i>	37

OBJETIVOS.....	38
-----------------------	-----------

RESULTADOS

- 1.- Análisis del quimerismo en el trasplante alogénico con eliminación de linfocitos T. **Leukemia (2003)**.....páginas 613-620.
- 2.- Análisis del quimerismo en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida tipo "no mieloablativo". **Experimental Hematology (2003)**..... páginas 934-940.

DISCUSIÓN

ESTUDIO MOLECULAR DEL QUIMERISMO..... 39

**QUIMERISMO EN EL TRANSPLANTE ALOGÉNICO CON ELIMINACIÓN DE
LINFOCITOS T 45**

**QUIMERISMO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO CON ACONDICIONAMIENTO DE
INTENSIDAD REDUCIDA TIPO "NO MIELOABLATIVO" 49**

CONCLUSIONES..... 54

REFERENCIAS..... 55

ABREVIATURAS

Alo-TIR:	trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos con acondicionamiento de intensidad reducida
Alo-TMO:	trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos de médula ósea
Alo-TPH:	trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos
Alo-TSP:	trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos de sangre periférica
CHP:	células hemopoyéticas pluripotenciales
CsA:	ciclosporina A
EICH:	enfermedad del injerto contra el huésped
ELT:	eliminación de linfocitos T
FISH:	hibridación fluorescente <i>in situ</i>
G-CSF:	factor estimulante de colonias granulocíticas
HCI:	huésped contra el injerto
ICL:	injerto contra la leucemia
ILD:	infusión de linfocitos T del donante
MMF:	micofenolato mofetil
QC:	quimerismo hemopoyético completo
QCLT:	quimerismo completo en linfocitos T
QCMi:	quimerismo completo mieloide
QM:	quimerismo hemopoyético mixto
QMLT:	quimerismo mixto en linfocitos T
QMMi:	quimerismo mixto mieloide
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PH:	progenitores hemopoyéticos

- PHSP:** progenitores hemopoyéticos de sangre periférica
- RFLP:** polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
- STR:** repeticiones en tándem cortas
- VNTR:** número variable de repeticiones en tándem

En el alo-TPH convencional se administran dosis intensivas de quimioterapia y/o de irradiación corporal total con el fin de erradicar el clon maligno, crear espacio para que la nueva médula pueda implantar e inmunodeprimir al receptor para evitar el rechazo de los PH. Los principales factores limitantes del alo-TPH son la mielodepresión y sus complicaciones asociadas: infecciones y hemorragias, así como la EICH. Por otro lado, en las últimas décadas se ha hecho evidente que el efecto terapéutico del alo-TPH radica no solamente en la intensidad de la quimioterapia y radioterapia administradas, sino también en un efecto antileucémico del injerto, mediado por sus células inmunocompetentes y estrechamente vinculados a la EICH. Este efecto se denomina “ICL”.

Con la finalidad de disminuir la mortalidad asociada al procedimiento y ampliar el número de pacientes candidatos a beneficiarse de un trasplante alogénico, se han desarrollado formas de trasplante con una menor toxicidad: alo-TPH con ELT y los llamados alo-TIR. Así, en la primera modalidad se consigue reducir significativamente la incidencia de la EICH, principal causa de morbimortalidad relacionada directamente con el alo-TPH. En el segundo, su posible beneficio terapéutico se basa, más que en la quimioterapia o radioterapia administradas, en el efecto ICL. Este efecto antitumoral forma parte de un efecto aloinmune general contra el receptor, el cual tiene particular actividad contra la linfhemopoyesis residual, a la que puede erradicar por completo. Dado que en estas modalidades de alo-TPH se atenúan el efecto aloinmune y la intensidad del régimen de acondicionamiento, respectivamente, en ambos casos no se elimina el sistema linfhemopoyético del receptor, el cual coexiste inicialmente y en diversas proporciones con el inóculo alogénico inmunocompetente. La coexistencia de células hemopoyéticas e inmunoreactivas originarias de individuos genéticamente distintos en un individuo receptor de un TPH se conoce como QM, y en su contexto se

puede observar un efecto ICL, mediado por los linfocitos T del donante, así como un efecto contrario del HCI, en el sentido de rechazo, mediado por las células linfoides residuales del receptor. Debido al papel central del QM en estos tipos de alo-TPH, algunos autores consideran estos TPH “nuevas formas de terapia celular mediadas por el QM”. En este sentido, cobra gran relevancia el análisis genético del quimerismo y de su dinámica de instauración en las distintas líneas celulares.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es analizar, utilizando una técnica molecular que nos permita distinguir las células del donante de las del paciente, cual es el patrón de quimerismo más frecuente tras el alo-TSP con ELT y tras el alo-TIR de tipo “no mieloablativo” y, sobre todo, la relación del estado del quimerismo hemopoyético con la recidiva leucémica y con el rechazo del injerto alogénico.

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS

PERSPECTIVA HISTÓRICA

El alo-TMO es un tratamiento eficaz para enfermedades hematológicas graves, congénitas y adquiridas, y para enfermedades malignas sensibles a la quimioterapia o radioterapia. Donald Thomas desarrolló este procedimiento durante la década de los 1960, y por ello le fue concedido el premio Nobel de Medicina en el año 1990. En sus orígenes, el objetivo del alo-TMO era sustituir una médula ósea enferma –en general la de un paciente diagnosticado de aplasia medular o leucemia– por otra sana. El donante de la médula ósea era casi siempre un hermano del paciente, ya que en este tipo de trasplante tiene una gran importancia la estrecha compatibilidad genética entre el donante y el receptor. En el momento actual, el objetivo del alo-TMO es regenerar una hemopoyesis que ha sido eliminada por la administración al paciente de fármacos citotóxicos o radiaciones ionizantes, bien para eliminar la médula ósea enferma o una enfermedad no hematológica. La fuente clásica de los PH para el trasplante es la médula ósea, pero no es la única: también se emplea para este fin la sangre periférica o la sangre de cordón umbilical. De ahí que el término «trasplante de progenitores hemopoyéticos» sea preferible al de TMO. De hecho, más del 80% de los alo-TPH se efectúa ahora utilizando los PHSP. Las dos razones fundamentales para este cambio son, por una parte, que de la sangre periférica se obtiene un gran número de PH de una forma mejor tolerada por el donante y, por otra, la rapidez con la que se recupera la hemopoyesis después del trasplante. La primera evidencia acerca de la existencia de PH en la sangre periférica la proporcionó Goodman y cols. en 1962, al demostrar que estas células eran capaces de reconstituir la hemopoyesis en ratones que habían recibido previamente un tratamiento mieloablativo que incluía irradiación (Goodman *et al.*, 1962). Sin embargo, tuvieron que transcurrir más de 20 años antes de que se realizasen en humanos los primeros trasplantes autólogos, utilizando PHSP obtenidos mediante citaféresis (Körbling *et al.*, 1996). Uno de los principales problemas de este

procedimiento era la escasa cantidad de PH circulantes en la sangre periférica, lo cual hacía que se necesitasen múltiples procedimientos de aféresis para obtener un número suficiente de PH para asegurar el implante hemopoyético. Este problema se solucionó mediante la utilización de agentes que facilitaban la movilización de los PH hacia la sangre periférica. Así, el uso de factores de crecimiento hemopoyéticos mejoró sustancialmente el rendimiento de la recolección de los PHSP (Körbling *et al.*, 1996).

El primer alo-TSP en humanos se efectuó en 1989, cuando Kessinger y cols. (Kessinger *et al.*, 1989) lo aplicaron a un paciente afecto de una leucemia aguda linfoblástica en 3ª remisión. El donante no recibió ningún tratamiento de movilización y se le efectuaron 10 aféresis. Cuatro años más tarde, dos autores (Russell *et al.*, 1993; Dreger *et al.*, 1993) describieron sendos alo-TSP, esta vez administrando G-CSF al donante. El rápido incremento en el número de alo-TSP observado en los últimos años se debe a que, de una forma poco agresiva para el donante, se obtiene un gran número de PH y la recuperación de neutrófilos y de plaquetas tras el alo-TSP es más rápida que tras el alo-TMO (Russell *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1996). La incidencia de EICH aguda es muy similar en ambos tipos de trasplante. En cambio, la incidencia de EICH crónica parece superior en el alo-TSP. En el momento actual hay suficiente experiencia en diferentes centros de trasplante en el mundo para sugerir que el alo-TSP es superior al alo-TMO en la mayoría de las indicaciones de alo-TPH.

1. CONCEPTO DE TRASPLANTE HEMOPOYÉTICO

En el alo-TPH no se trasplanta la médula ósea como tal, sino células progenitoras con capacidad de generar una hemopoyesis completa. Las células de la médula ósea con capacidad hemopoyética representan tan sólo el 1% de la celularidad total. Esta población celular está formada por progenitores muy inmaduros, con gran capacidad de autorrenovación –las células germinales o *stem cells*–, y otros más maduros –los llamados precursores– que tienen características propias de la línea celular, mieloide o linfoide, a la que dan lugar. La práctica totalidad de las células que

tienen capacidad para generar hematopoyesis presentan en su membrana una molécula que es reconocida por los AcMo del grupo CD34. De ahí que sean casi sinónimos los términos «PH» y «células CD34+». El trasplante consiste en la infusión al paciente de un número relativamente pequeño de células CD34+ (aproximadamente, 3×10^6 por kg del paciente), con la finalidad de restaurar la hemopoyesis eliminada por el efecto de fármacos citotóxicos o radiaciones ionizantes. A pesar de este rescate hemopoyético, existirá un período de aplasia medular (2-3 semanas) hasta que las células infundidas implanten y comiencen a producir células sanguíneas. La recuperación de eritrocitos, de neutrófilos y de plaquetas se inicia a partir de los precursores mieloides maduros y se mantiene a lo largo de la vida del paciente gracias a los progenitores más inmaduros que se trasplantan (Leitman *et al.*, 1996).

Cuando se recogen las células CD34+ del donante, bien sea de la médula ósea o de la sangre periférica, también se obtienen otras células accesorias. De ellas, las más importantes son los linfocitos T. Estas células inmunocompetentes son de una gran importancia en el éxito del trasplante alogénico: por una parte, facilitan el implante de los progenitores hematopoyéticos, al anular los linfocitos T residuales del receptor que rechazarían el inóculo infundido. Por otra parte, los linfocitos T del donante son capaces de reconocer los antígenos menores de histocompatibilidad del receptor distintos a los del donante, y ello podría dar lugar a una reacción contra los tejidos del paciente. Esta reacción, denominada EICH, es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en el trasplante alogénico (Vogelsang *et al.*, 1994). Para reducir la frecuencia y la gravedad de la EICH se ideó hace unos años una modalidad de alo-TPH con ELT parcial, convirtiéndose en la técnica más eficaz para prevenir esta complicación postrasplante (Urbano-Ispizua *et al.*, 1997). Por otro lado, el conocimiento de que los linfocitos T también eliminan las células leucémicas residuales, el llamado efecto ICL, ha provocado que se ensayen trasplantes en los que se atenúa la intensidad de dicho régimen (McSweeney & Storb, 1999). Los pacientes

que más se podrían beneficiar de estos alo-TIR son aquellos que por edad o por un mal estado general no tolerarían un acondicionamiento convencional y que además padecen una enfermedad sensible al efecto ICL. Estas son la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfocítica crónica, la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple, y el linfoma no Hodgkin de tipo folicular.

2. FUENTE DE PROGENITORES PARA TRASPLANTE HEMOPOYÉTICO: MÉDULA ÓSEA O SANGRE PERIFÉRICA

La fuente clásica de PH para trasplante es la médula ósea, pero no es la única. En la sangre periférica normal hay células CD34+ circulantes. Las células hemopoyéticas se originan durante la vida fetal en el mesénquima del saco embrionario y migran por la sangre periférica al hígado y al bazo. Por tanto, la circulación por la sangre periférica es una propiedad natural de los PH. En condiciones normales, el número de estas células en la sangre periférica es diez veces menor al presente en la médula ósea. Esta cantidad aumenta en gran medida tras la administración de factores de movilización -como el G-CSF- al donante (Russell *et al.*, 1994).

VENTAJAS DEL ALO-TSP RESPECTO AL ALO-TMO

El alo-TSP tiene las siguientes ventajas respecto al alo-TMO convencional (Russell *et al.*, 1994): 1) el método de obtención de PH es menos agresivo para el donante, ya que no es necesaria la anestesia general y se evitan el dolor y las molestias propias de la aspiración medular, 2) al disminuir el riesgo y las molestias asociadas a la donación se ha producido un aumento en el número de donantes para el programa de TPH "no emparentado", 3) el período de granulocitopenia y de plaquetopenia

postrasplante es menor, 4) el número de PH obtenidos mediante aféresis de sangre periférica de un sujeto sano estimulado con G-CSF es superior al conseguido con la aspiración medular, y ello es de particular utilidad en los fallos de implante hemopoyético, 5) la gran cantidad de celularidad linfoide B y T que se obtiene mediante leucaféresis y que se infunde al paciente puede acelerar la recuperación inmunológica, y 6) el mayor número de linfocitos T y de células NK infundido se relaciona con una mayor incidencia de EICH, sobre todo crónica, lo cual puede ir acompañado de un mayor efecto antileucémico.

INCONVENIENTES DEL ALO-TSP RESPECTO AL ALO-TMO

El inconveniente fundamental del alo-TSP es que para conseguir una adecuada movilización de los PH de la medula ósea a la sangre periférica hay que administrar al donante el factor de estimulación G-CSF (Russell *et al.*, 1994; Bensinger *et al.*, 1995; Körbling *et al.*, 1995). El G-CSF tiene pocos efectos secundarios, que se limitan a molestias músculo-esqueléticas, y no se han descrito reacciones adversas graves. Una vez movilizados los PHSP hay que recogerlos mediante leucaféresis, un procedimiento que en los Bancos de Sangre con experiencia en este tema no da lugar a complicaciones destacables. Es extremadamente improbable que la administración de G-CSF de lugar a efectos indeseables a largo plazo: los niveles de G-CSF que se alcanzan tras la administración al donante de esta citocina son inferiores a los que se alcanzan en un proceso séptico. Un 5% de los donantes de PHSP requieren la colocación de un catéter venoso central para obtener un adecuado flujo sanguíneo durante el procedimiento de leucaféresis. En este caso, la ventaja de evitar al donante la anestesia general y las

punciones óseas se minimiza. La obtención de PHSP conlleva una pérdida significativa de plaquetas. Este aspecto podría ser un factor limitante si se precisan varias aféresis.

IMPLANTE HEMOPOYÉTICO Y REACCIONES ALOINMUNES

El sistema hemopoyético produce a diario millones de leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Todas estas células proceden, a su vez, de una población celular que constituye un pequeño porcentaje de las CHP. Dichas células, en el adulto, se encuentran en su mayoría en la médula ósea. Las CHP presentan tres capacidades características: 1) de autorenovación, 2) de diferenciación en todas las células del sistema hemopoyético, y 3) de reconstitución, completa y a largo plazo, de la hemopoyesis de un paciente que ha recibido un tratamiento mieloablativo (Orlic *et al.* 1994). Así, la capacidad de la CHP para autorrenovarse es finita, y es posible que con el paso del tiempo existan CHP que ya no sean capaces de proliferar, de forma que el número de CHP disminuye con el tiempo (Morrison *et al.* 1997b; Van Zant *et al.* 1997).

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL IMPLANTE HEMOPOYETICO

Existen diversos factores, tanto del donante como del paciente, que determinan el éxito del implante de las células hemopoyéticas trasplantadas. De manera esquemática, destacan los siguientes (Tabla 1):

Tabla 1. Factores determinantes del implante

-
- Edad del paciente
 - Enfermedad de base (aplasia medular: ↑ fallo de implante)
 - Tratamientos previos al trasplante
 - Identidad HLA donante-paciente
 - Fuente de progenitores utilizada
 - Cantidad de células CD34⁺ infundidas
 - **Manipulación del inóculo (ELT)**
-

-
- **Tipo e intensidad del tratamiento de acondicionamiento**
 - Profilaxis de la EICH
 - Eventos postrasplante
-

En negrita se destacan los factores que analizaremos con más detalle en esta Tesis Doctoral.

En la Tabla 2 se muestra la cinética de implante tras alo-TSP con y sin selección CD34+. En ambos casos se observa que, al igual que ocurre en el autotrasplante, la recuperación de neutrófilos y de plaquetas es más rápida que tras el alo-TMO. Si se administra G-CSF postrasplante, la recuperación de neutrófilos es muy similar en el alo-TSP y alo-TMO; en cambio, se mantienen las diferencias a favor del alo-TSP respecto a la recuperación de plaquetas.

Tabla 2. Cinética de implante en trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos

Grupo de pacientes	Neutrófilos >0,5 x 10⁹/L	Plaquetas >20 x 10⁹/L
<i><u>Alo-TSP</u></i>		
Alo-TSP	17	11
Alo-TSP/CD34+	14	8
<i><u>Alo-TMO</u></i>		
Alo-TMO	20,5	23
Alo-TMO/ELT*	22	25,5
Alo-TMO+G**	18	15

*Alo-TMO/ELT: médula sometida a ELT mediante elutriación; **Alo-TMO+G: MO estimulada con G-CSF antes de su extracción. El implante se expresa como mediana de días de la recuperación de neutrófilos y plaquetas.

La capacidad de implante a largo término de los PHSP ha sido ampliamente demostrada. Así, en el Hospital Clínic de Barcelona se utilizó la técnica de PCR-STR para el análisis del quimerismo tras alo-TSP (Briones *et al.*, 1996; Briones *et al.*, 1998) y se demostró que los PHSP tienen una capacidad de generar una hemopoyesis a largo plazo igual o incluso superior a los de médula ósea.

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA Y FALLO DE IMPLANTE

Desde hace más de medio siglo que se conoce que la introducción de una quimera hemopoyética en el receptor de un alo-TPH da lugar a la inducción de una tolerancia específica del donante. Así, en ovejas se observó que los fetos con una placenta común aceptaban mutuamente un implante cutáneo en la época adulta, a pesar de no ser singénicas. En ratones se efectuaron experimentos similares, observándose que la inoculación de tejidos hemopoyéticos en los embriones de ratón daba lugar a una tolerancia a un subsecuente implante cutáneo en el ratón adulto. Se han observado resultados similares en otros modelos animales, incluyendo los primates (Ildstad *et al.*, 1984; Sykes *et al.*, 1988). En humanos, los pacientes que recibían un alo-TMO por una enfermedad hematológica y más tarde desarrollaban una insuficiencia renal, se observaba que cuando recibían un trasplante renal a partir del mismo donante de la médula ósea, los implantes eran funcionales, sin signos de rechazo agudo ni crónico, y sin requerir una inmunosupresión significativa (Starzl *et al.*, 1993).

El implante alogénico hemopoyético depende de varios factores, tanto del donante como del paciente, y se considera que es el resultado del régimen de acondicionamiento, del contenido celular del inóculo, y de la ausencia de linfocitos T

alorreactivos del receptor. Se ha observado que, o bien reduciendo la intensidad del régimen de acondicionamiento o la cantidad de células infundidas, sobre todo de los linfocitos T, aumenta la probabilidad de fallo de implante. Una reducción en la intensidad del régimen de acondicionamiento se podía compensar con un aumento de la masa celular, y viceversa. El régimen de acondicionamiento representa un factor clave en el tipo de implante, ya que crea espacio o nichos para el desarrollo de los PH del donante, y, sobre todo, reduce el número de células alo-reativas del receptor contra las células hemopoyéticas del donante que pueden causar un rechazo. Los regímenes que eliminan tanto los PH como las células que causan el rechazo darán lugar a un implante alogénico completo, y, en cambio, los regímenes que no eliminan el sistema inmune del paciente, pero que dejan indemne los PH del huésped, dan lugar a un rechazo del inóculo alogénico, con una reconstitución autóloga. Los regímenes que no lesionan los PH y que, en cambio, inactivan las células causantes del rechazo podrían dar lugar a un QM, permitiendo una repoblación competitiva con elementos hemopoyéticos del donante y del receptor. Este último tipo de acondicionamiento se ha venido a denominar de tipo “no mieloablativo”, y constituyen la base de los alo-TIR (McSweeney & Storb, 1999). Por último, los regímenes que dejan intactas las células que provocan el rechazo del implante y que, además, eliminan los PH dan lugar a una aplasia medular y a la muerte del paciente.

EFEECTO ANTITUMORAL DEL INJERTO

En el momento actual hay muchos datos experimentales y clínicos que demuestran la existencia de un potente efecto antineoplásico del injerto. Así, los pacientes que desarrollan una EICH aguda y crónica tienen un riesgo muy inferior de recaída leucémica que aquellos que no la desarrollan (Weiss *et al.*, 1994; Naparstek *et*

al., 1996; Slavin *et al.*, 1978; Weiss *et al.*, 1992) hay un mayor riesgo de recidiva leucémica en los pacientes sometidos a un trasplante singénico (Gale *et al.*, 1994), o en aquellos pacientes que han recibido un inóculo al que se han eliminado los linfocitos T del donante (Champlin, 1993; Marmont *et al.*, 1991). Sin embargo, la evidencia más clara de este efecto antitumoral se observa en que un 80% de los pacientes diagnosticados de leucemia mieloide crónica que recaen tras el trasplante alogénico pueden alcanzar nuevamente una remisión molecular estable y prolongada con la simple ILD. En otras enfermedades también se observa una cierta sensibilidad al efecto citotóxico de los linfocitos T del donante, pero no tan marcada como en la leucemia mieloide crónica (Collins *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 1995). Estas enfermedades son la leucemia linfática crónica, el mieloma múltiple, la mielofibrosis, el linfoma folicular, y la enfermedad de Hodgkin. Por último, un tercer grupo de enfermedades tienen una sensibilidad muy escasa a la ILD: la leucemia aguda, el linfoma de células grandes y el síndrome mielodisplásico. En este último grupo, la ILD da lugar a la remisión en un tercio de los casos, pero a diferencia de lo que ocurre en la leucemia mieloide crónica, en estas enfermedades la respuesta es, en general, transitoria y para su desarrollo se precisa la aparición de una EICH aguda de grado II-IV (Horowitz *et al.*, 1990; Weiden *et al.*, 1979). La diferente efectividad de los linfocitos T del donante en la eliminación de ciertas enfermedades hematológicas puede deberse a que las más sensibles derivan de células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B en el caso de neoplasias linfoides, o las células dendríticas en el caso de leucemia mieloide crónica. Estas enfermedades podrían presentar sus antígenos in vivo. Las enfermedades con una escasa respuesta al efecto antitumoral, como la leucemia aguda linfoblástica, se caracterizan por la escasa expresión de moléculas coestimuladoras y por su poca capacidad de inducir una respuesta aloimmune. El rápido índice proliferativo de la

leucemia aguda linfoblástica y de los linfomas de alto grado puede hacer que estas enfermedades escapen del efecto de una respuesta inmune que se está generando. En el caso de los tumores sólidos, se han observado reducciones de las masas tumorales coincidiendo con la aparición de EICH en pacientes afectos de neoplasias de mama, melanomas, o en pacientes afectos de carcinoma renal.

En general, la respuesta antileucémica se acompaña de la lesión de tejidos sanos del paciente. Los clones de linfocitos T del donante reaccionan contra células hemopoyéticas normales del huésped y contra las células leucémicas. También se puede observar una respuesta antitumoral sin que se desarrolle una EICH clínica (Weiss *et al.*, 1994). Ello puede deberse a una mayor susceptibilidad de los antígenos leucémicos que la de los antígenos tisulares a un mecanismo inmunológico común. Así, se ha demostrado la existencia de antígenos menores de histocompatibilidad restringidos a la línea hemopoyética. También, ciertos constituyentes celulares sobre-expresados o expresados de una forma anormal pueden servir como antígenos diana para el efecto antitumoral (Weiden *et al.*, 1979; Antin *et al.*, 1993; Mapara *et al.*, 2002). Un ejemplo lo constituye la proteinasa-3, una proteinasa presente en los gránulos mieloides primarios, que está expresada en exceso en la leucemia mieloide crónica y en algunos tipos de leucemia mieloide aguda. De igual forma, ciertos antígenos peptídicos derivados de la proteinasa 3 pueden estimular la generación de una citotoxicidad de linfocitos T autólogos o alogénicos contra la leucemia.

Otros genes candidatos en la generación de respuestas aloimmunes, por su sobre-expresión, son el WT1 y la mieloperoxidasa. Por tanto, la reacción antileucémica puede observarse en un contexto inespecífico de reacción citotóxica contra los tejidos -sanos y

leucémicos- del paciente, o puede tratarse de una reacción específica contra las células neoplásicas, dejando indemnes a las células normales (Kolb *et al.*, 1995; Papadopoulos *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1994; Horowitz *et al.*, 1990).

Todavía no se conocen con exactitud los mecanismos celulares implicados en la EICH y en el efecto antitumoral. Tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+ participan en la patofisiología de la EICH; las células NK, macrófagos, y otras poblaciones celulares son reclutadas, y la liberación de citoquinas participan como mediadoras en la lesión tisular (Ferrara *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1992; Mapara *et al.*, 2002). En modelos animales para el estudio del efecto antitumoral se ha demostrado que tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+ participan como células efectoras. En la mayoría de los estudios se ha dado una mayor importancia a los linfocitos CD8+. En pacientes trasplantados por leucemia mieloide crónica se han identificado recientemente líneas celulares de linfocitos T que, o bien inhiben el crecimiento de los progenitores leucémicos, o son directamente líticos. En este efecto antitumoral también se han implicado a las células NK.

ELIMINACION DE LINFOCITOS T DEL INÓCULO

La ELT parcial es el método más eficaz para reducir de forma significativa la incidencia de EICH postrasplante (Champlin, 1993). Sin embargo, este procedimiento se acompaña de una mayor incidencia de fallo de implante y de recidiva leucémica. Bajo estas premisas, a continuación analizaremos los aspectos clínicos y técnicos más relevantes de la ELT.

ASPECTOS CLÍNICOS

EICH: La EICH es la causa más frecuente de mortalidad tras el alo-TPH. La EICH aguda se produce por la reactividad de las células inmunocompetentes del donante frente a antígenos presentes en diversos tejidos del paciente (Ferrara *et al.*, 1991). La forma más eficaz de atenuar esta complicación es mediante la ELT. En un estudio comparativo, la probabilidad actuarial de desarrollar una EICH aguda y crónica graves fue significativamente inferior en el grupo de pacientes tratados con alo-TSP/ELT respecto a los que recibieron un alo-TSP sin manipular (Urbano-Ispizua *et al.*, 1997). Así, la probabilidad actuarial para EICH aguda grados II-IV en el alo-TSP/ELT y en el alo-TSP fue de 16% y 43%, respectivamente ($p=0,002$), y para EICH crónica extensa fue de 22% y 47% ($p=0,02$). En un estudio realizado sobre 315 pacientes tratados con un alo-TSP/ELT a partir de un donante hermano HLA idéntico, los factores de riesgo para el desarrollo de una EICH aguda fueron la infusión de una elevada cantidad de células $CD34^+$ y $CD3^+$ y una edad del paciente superior a 42 años (Urbano-Ispizua *et al.*, 2002). En este estudio, la incidencia de EICH aguda aumentaba a medida que se infundía una cantidad más elevada de células $CD34^+$ ($\times 10^6/\text{kg}$): los receptores de ≤ 2 , $>2-4$, y >4 presentaban una incidencia acumulada de 21%, 35% y 43%, respectivamente ($p=0,01$). En este mismo estudio, la infusión de una dosis de

células CD3⁺ ($\times 10^6/\text{kg}$) $\leq 0,05$, $>0,05-0,1$, y $>0,1$ se relacionó con una incidencia acumulada de EICH aguda grados I-IV de 18%, 35% y 44%, respectivamente ($p=0,007$). Kernan y cols. (Kernan *et al.*, 1986) estimaron que la dosis de células CD3⁺ necesaria para iniciar una EICH aguda clínicamente detectable en un receptor de un alo-TSP a partir de hermano HLA idéntico fue de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$, aunque otros autores han comunicado que la infusión de esta cantidad de linfocitos T no previene totalmente el desarrollo de una EICH aguda grave. La incidencia de EICH aguda en los receptores de una cantidad de células CD3⁺ $<0,1 \times 10^6/\text{kg}$ es baja pero se asocia a una elevada incidencia de fallo de implante. Por ello, la dosis de linfocitos T que podría atenuar ambas complicaciones se situaría en un intervalo de $0,1$ a $0,3 \times 10^6/\text{kg}$, seguida de un tratamiento inmunodepresor postrasplante adecuado.

Fallo de implante: A diferencia de los receptores de un alo-TPH sin manipular a partir de un donante HLA-idéntico, en los cuales la incidencia de rechazo inmunológico del injerto es del 1% (Beatty *et al.*, 1985), la incidencia de esta complicación en los pacientes con alo-TSP/ELT reportada en algunas series oscila entre el 10-30% (Kernan *et al.*, 1989; Hale *et al.*, 1988). El fallo de implante es generalmente una complicación grave (Kernan *et al.*, 1989; Hale *et al.*, 1988), dado que un segundo trasplante se acompaña de una elevada toxicidad y una considerable proporción de estos pacientes no alcanza un implante estable (Kernan *et al.*, 1989; Hale *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1988). Recientemente se ha comunicado una estrecha relación entre la cantidad de linfocitos T infundidos y la calidad del implante hemopoyético (Urbano-Ispizua *et al.*, 2001). Así, 23 de los 155 pacientes (14,8%) que recibieron una cantidad de linfocitos T igual o inferior a $0,2 \times 10^6/\text{kg}$ presentaron un fallo de implante, en comparación con sólo uno de los 102 pacientes (0,8%) a los que se les infundieron $>0,2 \times 10^6/\text{kg}$, con una probabilidad

actuarial de 18% vs. 1%, respectivamente ($p=0,0001$). Estos resultados están en concordancia con los observados en modelos murinos en los que el desarrollo de fallo de implante se asoció a la ELT, sobre todo cuando se eliminaban los linfocitos CD8⁺ (Martin *et al.*, 1993) o los timocitos del inóculo (Murphy *et al.*, 1990).

Recidiva leucémica: Un problema destacado tras el alo-TSP/ELT es el incremento de la incidencia de la recidiva leucémica postrasplante (Marmont *et al.*, 1991). Sobre todo, este hecho se observa en pacientes trasplantados por una leucemia mieloide crónica, en los que la incidencia de recidiva es de 50-70%. Sin embargo, la ILD se acompaña de un potente efecto antileucémico en estos pacientes, obteniéndose la remisión en la mayoría de los casos (Kolb *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1997). Para pacientes con leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda o síndrome mielodisplásico, el efecto de la ELT en la recidiva leucémica es menos importante (Marmont *et al.*, 1991; Papadopoulos *et al.*, 1997; Soiffer *et al.*, 1997; Urbano-Ispizua *et al.*, 1998). En estos pacientes, no son sólo importantes los linfocitos T infundidos para la curación de la hemopatía maligna, sino que también son relevantes otros factores como el tipo de profilaxis postrasplante, la intensidad del régimen de acondicionamiento y la cantidad de células CD34⁺ administradas. Así, la administración de ciclosporina A y metotrexate se asocia a una mayor incidencia de recidiva en leucemia mieloblástica aguda en comparación a los pacientes que reciben CsA sólo (Storb *et al.*, 1989), mientras que la incidencia de recidiva leucémica disminuye significativamente cuando se incrementa la intensidad del régimen de acondicionamiento (Clift *et al.*, 1991; Geller *et al.*, 1992). Aunque no existen estudios aleatorizados que comparen el potencial beneficio de la ELT del inóculo en pacientes con leucemia mieloblástica aguda/síndrome mielodisplásico, un análisis retrospectivo

demostró una mejor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes que recibieron un inóculo con ELT en comparación con un grupo similar de pacientes en los que no se manipuló la celularidad infundida. Esta diferencia puede explicarse por una menor mortalidad relacionada con la EICH, sin un incremento significativo de la recidiva leucémica en el grupo con ELT. Por otro lado, en un estudio reciente se analizó la asociación de las características del donante, del receptor y del contenido celular del inóculo con el resultado del trasplante en 84 pacientes adultos consecutivos con enfermedades hematológicas malignas sometidos a un alo-TSP/ELT a partir de un hermano HLA-idéntico (Urbano-Ispizua *et al.*, 2001). En este estudio se detectó una estrecha asociación de la cantidad de células CD34⁺ infundidas con la supervivencia de los pacientes. Una dosis de células CD34⁺ de $1-3 \times 10^6/\text{kg}$ se asoció a una mejor supervivencia en comparación a los que recibieron $>3 \times 10^6/\text{kg}$, con una probabilidad actuarial de 75% y 42%, respectivamente ($p=0,01$). Un alto contenido de células CD34⁺ empeora la supervivencia de estos pacientes debido a una mayor mortalidad relacionada con el trasplante, dado que en este grupo se observa una mayor incidencia y una aparición precoz de la EICH.

ASPECTOS TÉCNICOS

En un primer momento se utilizaron estrategias inmunológicas (Tabla 3) para eliminar los linfocitos T del producto a infundir (selección negativa). Estas técnicas son laboriosas, requieren una gran experiencia técnica, y son difíciles de estandarizar entre los diferentes centros de trasplante. En el momento actual se dispone de técnicas sencillas, automáticas y rápidas que seleccionan directamente los PH del inóculo (selección positiva), eliminando así de una forma indirecta las células no deseadas. Estas técnicas de selección positiva se basan en que los PH inmaduros, mieloides, y

linfoides expresan en su superficie la molécula CD34. En la técnica de selección positiva de células CD34⁺ (Tabla 3) (Urbano-Ispizua *et al.*, 2001) se incuban las células hemopoyéticas con un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti CD34⁺ y se separan las células dianas en superficies inmunespecíficas, en placas de plástico, en microesferas con avidina, o en partículas o micropartículas magnetizadas. También se emplean separadores celulares de alta velocidad mediante citometría de flujo, para aislar subpoblaciones de células CD34⁺ muy purificadas. En el momento actual se emplean técnicas de ELT que dejan una cierta cantidad de linfocitos T en el inóculo, cuando se trata de trasplante entre hermanos HLA idénticos. En esta situación, la cantidad de linfocitos T que se considera adecuada infundir al paciente es de $0,3 \times 10^6/\text{kg}$. Con ello se pretende facilitar el implante y mantener, al menos en parte, el efecto antileucémico de los linfocitos T sin aumentar significativamente la incidencia y la gravedad de la EICH. Cuando se emplea la ELT parcial es necesario administrar la CsA postrasplante, con el mismo esquema que en el alo-TPH convencional.

En la Tabla 4 se comparan los tres métodos de selección CD34⁺ más empleados en la actualidad en el auto y alo-TPH: Ceprate (Inmunoadsorción avidina-biotina; CellPro®), Isolex (Inmunomagnético de partícula grande; Baxter®), CliniMacs (Inmunomagnético de partícula pequeña; Milteny®). Los resultados se refieren a: la intensidad en logaritmos de la ELT; el porcentaje de recuperación de células CD34⁺ después del procedimiento, respecto a la cantidad inicial; la proporción de células CD34⁺ en el producto final; y la cantidad de linfocitos T que se infundiría con el inóculo para un paciente de un peso de 70 kg. La SP es la fuente de PH aconsejable para efectuar las técnicas de ELT. Con dos procedimientos de leucaféresis se consigue una cantidad de células CD34⁺ doble de la obtenida con una aspiración de médula ósea

convencional. De esta forma, a pesar de la pérdida de células CD34⁺ asociada al procedimiento de ELT, la cantidad que se infunde al paciente es similar a la infundida con una médula ósea normal.

Tabla 3. Técnicas de eliminación de linfocitos T

- *Separación física*
 - Centrifugación a contraflujo o elutriación
 - Aglutinación con lectinas

- *Inmunológicas*
 - AcMo libres
 - Lisis mediadas por complemento
 - Partículas inmunomagnéticas
 - AcMo conjugados
 - Partícula magnética
 - Radionúclido

- *Técnicas de selección CD34⁺*
 - (se incluye el tipo de AcMo y de separación)
 - Inmunoadsorción (CellPro®); 12.8; mecánica
 - Inmunomagnético indirecto (Baxter®); 9C5; quimopapaína o PR34
 - Inmunomagnético directo (Dynal®); B13C5; anti-Ac
 - Panning (AIS®); ICH3; mecánica
 - Inmunomagnético indirecto (Milteny®); QBEND10; no requerida
 - FACS de alta velocidad (System®); varios; no requerida**

Tabla 4. Comparación de los tres métodos de selección CD34+ más empleados en el alotrasplante

Método	ELT log₁₀	Recuperación células CD34+ (%)	Pureza (%CD34+)	Nº de linfocitos T (x10⁶/kg)
Ceprate	3	65	65	0,4
Isolex	4	50	88	0,1
CliniMacs	5	75	95	<0,01

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA

INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS

Con la finalidad de ampliar el abanico de pacientes candidatos a beneficiarse de un alo-TPH, desarrollando formas de trasplante con menor toxicidad multiorgánica y consiguiente morbimortalidad. Con este fin, en los últimos años se han desarrollado los llamados alo-TIR o “no mieloablativos”. Estos trasplantes pueden ser realizados en régimen ambulatorio, en pacientes de edad avanzada y en aquellos otros con un estado alteraciones clínico-biológicas que contraindicarían un alo-TPH convencional (McSweeney & Storb, 1999).

Los alo-TPH clásicamente considerados se administran dosis supraletales de quimioterapia y/o de irradiación corporal total con el fin de erradicar la hemopatía. Sin embargo, en las últimas décadas se ha hecho evidente que el efecto terapéutico de los alo-TPH radica además en el efecto inmunoterapéutico del injerto alogénico (Weiden *et al.*, 1979; Antin J, 1993) mediado por sus células inmunocompetentes y estrechamente vinculados a la EICH. Así, en los alo-TIR el posible beneficio terapéutico se basa, más que en la quimioterapia o radioterapia administradas, en el efecto ICL (Giralt *et al.*, 1997; Slavin *et al.*, 1998). Este efecto antitumoral forma parte de un efecto aloimmune general contra el receptor o EICH, el cual tiene particular actividad contra la linfohemopoyesis residual, a la que puede erradicar por completo. Por ello estos TPH también pueden ser finalmente mieloablativos (Slavin *et al.*, 1998; McSweeney & Storb, 1999; Childs *et al.*, 1999) , y la denominación de alo-TPH “no mieloablativo” puede inducir a error.

VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS TRASPLANTES CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA

Durante los últimos años se han utilizado varias estrategias de alo-TIR o submieloablativos para el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas malignas, genéticas o autoinmunes en pacientes incluso mayores de 70 años (McSweeney & Storb, 1999; Sykes *et al.*, 1997; Spitzer *et al.*, 2000; Carella *et al.*, 2000; Khouri *et al.*, 1998). El esquema terapéutico utilizado por la mayoría de autores incluye tres etapas bien diferenciadas: a) obtención del QM/QC, b) manipulación de dicho quimerismo, en función de la respuesta de la enfermedad y de los posibles complicaciones surgidas tras el alo-TPH, c) utilización de inmunoterapia adoptiva con ILD, en caso de no haberse logrado la respuesta adecuada.

Globalmente, los distintos autores, en la primera etapa del proceso, administran un acondicionamiento preTPH más inmunosupresor que mielosupresor, seguido de la infusión de PH, sobre todo de sangre periférica, y de la profilaxis de las reacciones inmunológicas EICH, ICL y HCI utilizando diferentes combinaciones de agentes inmunodepresores. A continuación, tras un corto periodo de mielosupresión con escasas manifestaciones de toxicidad y pocos requerimientos transfusionales, se establece, acompañando al implante, el QM/QC. Después este va a ser modificado en función de la necesidad de lograr el mayor efecto ICL posible, dependiendo del tipo y fase de la enfermedad tratada. Así, en pacientes con QM y persistencia de enfermedad se procede a la retirada rápida de la inmunosupresión. Algunos autores proponen incluso una retirada programada de ésta, en una fecha fijada del postrasplante (McSweeney & Storb, 1999) o en función del quimerismo de los linfocitos T (Childs *et al.*, 1999). En caso de que con todo ello, la EICH aún no se haya presentado y persistan el QM o la enfermedad visible, la mayoría de los autores continúa el programa con ILD, utilizando

linfocitos T frescos del donante. La finalidad es convertir el QM en QC el cual, a través de sus efectos EICH e ICL, erradique la linfohemopoyesis residual del receptor y con ella la enfermedad neoplásica (Childs *et al.*, 1999; Sykes *et al.*, 1997; Spitzer *et al.*, 2000).

El abanico de acondicionamientos utilizados es muy amplio, incluyendo desde su ausencia, esquema utilizado para tratar inmunodeficiencias severas por el grupo de Seattle (McSweeney & Storb, 1999), hasta los más mielosupresores, utilizados por los grupos de Hadassah (Slavin *et al.*, 1998) y MD Anderson (Giralt *et al.*, 1997). Diversas enfermedades genéticas, no neoplásicas, como es el caso de las talasemias o ciertas enfermedades autoinmunes, sólo precisan lograr un QM estable para que sean clínicamente silentes (McSweeney & Storb, 1999), por lo que, en su tratamiento, se utilizan los acondicionamientos menos tóxicos. Sin embargo, para corregir las manifestaciones de ciertos pacientes con anemias hemolíticas, a veces es preciso lograr un QC, en cuyo caso se procede a completar el alo-TIR con las ILD necesarias (McSweeney & Storb, 1999).

En el caso de enfermedades malignas, por el contrario, el logro de QC parece necesario, en la mayoría de las series, para la consecución de una respuesta completa (McSweeney & Storb, 1999; Childs *et al.*, 1999; Spitzer *et al.*, 2000). Este hecho favorece el uso de acondicionamientos más intensos y obliga a completar el esquema del alo-TIR mencionado, hasta conseguir el QC, incluyendo para ello, si es preciso, las ILD.

En los últimos años existe una tendencia a utilizar acondicionamientos más atenuados para el tratamiento de pacientes con enfermedades poco tratadas preTPH (leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico), observándose un mayor índice de QM en el día +30, y porcentajes menores de EICH (20-40%) (McSweeney & Storb, 1999; Spitzer *et al.*, 2000; Carella *et al.*, 2000). Sin embargo, estos pacientes presentan una mayor incidencia de rechazos inmunológicos del injerto (16-30%) que aquellos que reciben un acondicionamiento más intenso (Slavin *et al.*, 1998). El grupo de Seattle evitaron la aparición de rechazos incorporando fludarabina 90 mg/m² a su régimen de 2 Gy en pacientes con LMC (McSweeney *et al.*, 1999). En cambio, los pacientes que han recibido varias líneas de tratamiento previo al alo-TIR incluyendo el autotrasplante (Carella *et al.*, 2000; Garban *et al.*, 2001), o que reciben acondicionamientos más intensos (Slavin *et al.*, 1998, Giralt *et al.*, 1997, Michallet *et al.*, 2001), no suelen mostrar rechazo del implante, presentan con frecuencia QC el día +30 y sufren mayor incidencia de EICH (50-75%).

Los efectos adversos más importantes de los alo-TIR, aparte del rechazo inmunológico o fallo de implante, siguen siendo, como en los alo-TPH convencionales, la EICH y la recaída o falta de respuesta de la enfermedad (Carella *et al.*, 2000; Michallet *et al.*, 2001). Hay autores que proponen la realización de los alo-TPH atenuados con ELT del inóculo, bien por métodos *ex vivo* (Craddock *et al.*, 2000) o utilizando *in vivo* el anticuerpo Campath 1G (Cull *et al.*, 2000), que disminuyen la incidencia de EICH al 0-13%.

QUIMERISMO

CONCEPTO

En medicina, el término quimera se utiliza para designar a un organismo que contiene poblaciones celulares que proceden de individuos genéticamente distintos, bien sean de la misma especie o de otra diferente (McCann *et al.*, 1993). En 1956, Ford introdujo el término "*quimera post-radiación*" para designar a un ratón en el que, tras la administración de irradiación corporal total, su sistema hemopoyético había sido reconstituído mediante el trasplante de PH de otro ratón (Ford *et al.*, 1956).

El alo-TPH da lugar a una situación de quimerismo, ya que el paciente posee en su organismo células de estirpe hemopoyética derivadas de otro individuo. Según la ausencia o persistencia de células hematopoyéticas del paciente tras el trasplante, podemos distinguir las siguientes situaciones de quimerismo:

1) *QC*: situación en la que todas las células hemopoyéticas proceden del donante.

2) *QM*: cuando coexisten células hemopoyéticas del donante con células hemopoyéticas del paciente. Un tipo especial de quimerismo mixto es el denominado "*quimerismo disociado*" (Forbes *et al.*, 1995; McSweeney, 1996) que se utiliza para describir aquella situación en la que las células mieloides y linfoides tienen un origen distinto entre sí (ej. linfocitos del donante y macrófagos del receptor).

EVALUACION DEL QUIMERISMO

Existe una gran variedad de técnicas de laboratorio para analizar el quimerismo post-trasplante. Todas ellas se basan en la detección de marcadores genotípicos o fenotípicos que permite distinguir las células hemopoyéticas del donante de las del receptor. En la Tabla 5 se resumen las técnicas utilizadas para el estudio del quimerismo. En las páginas siguientes se exponen en detalle.

Tabla 5. Métodos de estudio del quimerismo

- Tipaje eritrocitario: antígenos, enzimas
 - Proteínas leucocitarias
 - Alotipos inmunoglobulínicos
 - Citogenética: cromosomas sexuales, autosómicos
 - FISH: cromosomas sexuales
 - Polimorfismos de ADN:
 - RFLP
 - VNTR
 - STR
-

En el momento actual, los tres primeros métodos citados en la tabla 4 han caído en desuso por su baja sensibilidad y escasa aplicabilidad en el estudio del quimerismo hemopoyético.

1. CITOGENÉTICA

El análisis citogenético ha constituido durante muchos años la principal técnica de estudio del quimerismo. Si el donante y el paciente son de distinto sexo, la existencia de quimerismo puede confirmarse por la presencia de células con los cromosomas sexuales del donante (Lawler *et al.*, 1984). En los casos en que el donante y el paciente son del mismo sexo las diferencias cromosómicas pueden ponerse de manifiesto mediante técnicas de bandedo (Friedman *et al.*, 1992; Petz., 1994). Además, si la enfermedad del paciente posee anomalías cromosómicas, éstas pueden utilizarse para la detección de células del receptor posttrasplante (Offit *et al.*, 1990). Sin embargo, la citogenética presenta algunos inconvenientes como: 1) Escasa sensibilidad para detectar QM (>10%); 2) Puede favorecer el crecimiento de las células del donante sobre las del receptor, o viceversa, lo cual daría lugar a resultados equívocos; 3) Sólo es útil en aquellos casos en los que el donante y el paciente son de sexo distinto, y sobre todo cuando el donante es varón.

2. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU

La FISH es una técnica molecular que permite el análisis del ADN de las células que están en metafase o en interfase. Se basa en el mismo principio que el Southern blot, es decir, en la unión de una cadena sencilla de ADN -sonda- al ADN complementario de la célula a estudiar. En el caso de la FISH, la sonda incorpora un nucleótido marcado con una enzima (Le Beau., 1993). Mediante esta técnica se puede estudiar el quimerismo (Lapointe *et al.*, 1996; Palka *et al.*, 1996; van Tol *et al.*, 1998) utilizando sondas para el cromosoma X e Y, cuando existen diferencias de sexo entre el donante y el paciente. Las principales ventajas sobre la citogenética convencional son

su mayor sensibilidad (1%) y la posibilidad de cuantificar las células sin necesidad de que estén en división.

3. POLIMORFISMOS DE ADN

En genética, se dice que existe un polimorfismo de ADN cuando en una población existen dos o más alelos para un determinado locus, de tal forma que su frecuencia no pueda ser debida a una mutación recurrente. Los polimorfismos son diferencias genéticas que crean variación dentro de una especie. Todos los polimorfismos reflejan, en última instancia, alteraciones en la secuencia del ADN. Dichas alteraciones pueden producir cambios en la estructura de diversas proteínas, los cuales pueden demostrarse por cambios en su actividad enzimática, en la termoestabilidad o en la movilidad electroforética. Algunos polimorfismos se producen, sin embargo, en regiones del ADN que no son codificadoras, de manera que no tienen una expresión fenotípica.

Los polimorfismos de ADN utilizados para el análisis el quimerismo pueden dividirse en dos grandes grupos:

1. Aquellos originados por alteraciones de los sitios de corte de enzimas de restricción en la secuencia del ADN; se denominan RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).
2. Aquellos basados en las diferencias en la longitud de las secuencias de ADN repetitivas.

RFLP

El conocimiento de estos polimorfismos de ADN fue posible gracias al uso de las endonucleasas de restricción. Actúan reconociendo una secuencia específica, en

general corta (de 4 a 8 pares de bases), y rompen el ADN en esa zona (Watson *et al.*, 1992). Cuando el ADN genómico de una persona se digiere con enzimas de restricción se producirán varios fragmentos de tamaños diferentes, según las enzimas utilizadas. A estas diferencias en la longitud de las secuencias de ADN se denominan RFLP (Gusella., 1986) y permiten distinguir entre dos individuos, por lo que son útiles para el estudio del quimerismo (Blazar *et al.*, 1985). Existen, fundamentalmente, dos mecanismos por los que se produce una pérdida o una ganancia de un sitio de restricción:

- 1) Mutaciones en un nucleótido en la zona de reconocimiento de una enzima de restricción.
- 2) Inserción/delección de nucleótidos en la secuencia reconocida por la enzima de restricción.

Los RFLP se heredan como un rasgo codominante mendeliano y suelen detectarse mediante la técnica de Southern blot. Un marcador basado en este polimorfismo tendrá sólo dos alelos (sitio de corte presente o ausente) y por tanto el índice de heterocigosidad será como máximo del 50%. Cuando se realiza un trasplante entre hermanos, un 25% de los casos tendrá el mismo marcador para un determinado locus y esta frecuencia es mayor si los padres comparten un alelo o son homocigotos para ese marcador. Por ello, en la práctica, se analizan varios marcadores, de forma que se puedan demostrar diferencias genotípicas entre el donante y el receptor en el 100% de los casos. Sin embargo, este método tiene tres inconvenientes: 1) Requiere una gran cantidad de ADN y por tanto de número de células. 2) Es laborioso y hay que esperar, al menos, una semana hasta la obtención del resultado. 3) La sensibilidad de la mayoría de los marcadores para detectar QM es baja (5%-10%) (Blazar *et al.*, 1985). Por estos motivos, para el estudio del quimerismo los RFLP han sido sustituidos por otros polimorfismos de ADN más sensibles y fáciles de detectar.

POLIMORFISMOS BASADOS EN EL ADN REPETITIVO

Solo un 2-3% del ADN genómico humano codifica proteínas. La gran mayoría del ADN no es codificante (Strachan., 1992). Este ADN puede existir como una simple copia de ADN y actuar, por ejemplo, como un espaciador entre regiones de ADN codificante, o puede estar presente en múltiples copias a lo largo del genoma. Este último es el llamado ADN repetitivo. Este ADN, que puede llegar a constituir el 30% de todo el genoma, no se transcribe en ARN ni se expresa como productos génicos. Sin embargo, posee la capacidad de amplificar su número de copias y de distribuirse por todo el genoma.

El ADN repetitivo puede clasificarse según el tamaño de la unidad de repetición y su distribución en el genoma. En general, se describen dos clases de ADN repetitivo:

- Secuencias dispersas.
- Secuencias repetidas en tándem.

1. SECUENCIAS DISPERSAS

Son regiones de ADN con un número de bases variable que se encuentran distribuidas de forma aislada y repetitiva por todo el genoma. Según el tamaño de dicha secuencia se dividen en dos clases: SINES (*Short interspersed elements*-secuencias esparcidas cortas) y LINES (*Long interspersed elements*-secuencias esparcidas largas). La función de estas secuencias de ADN es desconocida.

2. SECUENCIAS REPETIDAS EN TANDEM

Este tipo de secuencias se denomina genéricamente satélites y se caracterizan por presentarse como bloques de nucleótidos, en número variable, que se repiten en tándem ampliamente distribuidos por el genoma.

Cuando el ADN genómico se centrifuga en gradientes de cloruro o sulfato de cesio aparece un patrón de bandas de ADN de diferentes densidades. Estas bandas satélite están constituidas por ADN repetitivo y mediante técnicas de FISH se ha demostrado que se localizan en las regiones centroméricas de los cromosomas (Gosden *et al.*, 1975).

En función del tamaño, número de pares de bases, de las secuencias repetitivas el ADN satélite se divide en:

- Minisatélite.
- Microsatélite.

MINISATELITES

Los minisatélites son polimorfismos constituidos por una secuencia de nucleótidos que se repite en tándem un número determinado de veces. El número de veces que se repite la secuencia puede variar de una persona a otra, bien aumentando bien disminuyendo el número total de unidades de repetición. Es, pues, un polimorfismo de longitud.

Al ser estos loci regiones de ADN no codificante, y no estar sujetos a una presión evolutiva intensa, tienen unos niveles de variación en su secuencia muy

grandes. Esto se traduce en un gran número de secuencias de diferentes tamaños para un mismo locus.

El descubrimiento de los minisatélites como secuencias polimórficas fue realizado por Jeffreys y cols. al encontrar una secuencia de 33 pares de bases que se repetía 4 veces en un intrón del gen de la mioglobina humana (Jeffreys *et al.*, 1985). Posteriormente, Nakamura y cols. acuñaron el término VNTR (*variable number of tandem repeat*) para referirse a estos polimorfismos (Nakamura *et al.*, 1987). En el caso de los VNTR, las unidades de repetición tienen una longitud que varía entre 8 y 80 pares de bases. Dado el gran tamaño de estos polimorfismos, se utilizó la técnica de Southern blot para su detección (Housman., 1995); tras la digestión del ADN con enzimas de restricción se realiza una hibridación con una sonda específica para la secuencia que se quiere detectar.

Algunos de estos VNTR, debido a su menor tamaño, pueden ser detectados mediante la PCR, convirtiéndose ésta en una técnica muy útil para su análisis. A estos polimorfismos también se les denominan Amp-FLPs (*amplifiable fragment length polymorphisms*- polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificables) (Pascali *et al.* 1994). En la Tabla 6 se muestran algunos de los VNTR más importantes utilizados para el estudio del quimerismo.

Tabla 6. Minisatélites utilizados en el estudio del quimerismo

VNTR	Cromosoma
33.6	1q23
33.1	9q
YNZ22	17p13
3'-HVR	16p13

MS51	11q13
λ g3	7q36
YNH24	2p
MS31	7q22
COL2A1	12q14
D1S80	1

MICROSATELITES

Son secuencias de ADN repetitivo en tándem en las que el número de nucleótidos de la unidad de repetición es muy pequeño, de dos a cinco pares de bases. Por esta razón también se les denomina STR (*short tandem repeats*). Los STR son secuencias muy polimórficas, con una alta frecuencia de distribución en el genoma humano (un STR cada seis kilobases) (Beckman *et al.*, 1992). Según el número de nucleótidos de la unidad de repetición se pueden distinguir cuatro tipos de STR: diméricos, triméricos, tetraméricos y pentaméricos. Los STR tetraméricos son los más frecuentes y los que preferentemente se utilizan para el estudio del quimerismo (Tabla 7).

Tabla 7. Marcadores STR .

STR	Cromosoma	Tamaño (pares de bases)
D3S1358	3p	114-142
VWA	12p12-ter	157-197
FGA	4q28	219-267
D16S539	16q24-qter	234-274
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	107 113
TH01	11p15.5	169-189

Introducción

Quimerismo

TPOX	2P23-2ter	218-242
CSF1PO	5q33.3-34	281-317
D7S820	7q11.21-22	258-294
D5S818	5q22-31	135-171
D13S317	13q22-31	206-234

Se pueden utilizar otros microsatélites; lo importante es escoger los más polimórficos para que permitan discriminar mejor entre el paciente y el donante.

Para que un marcador genético sea útil en el estudio del quimerismo hemopoyético debe cumplir una serie de requisitos que se detallan en la Tabla 8 se detallan los hemopoyético:

Tabla 8. Requisitos de un marcador genético para el estudio del quimerismo

- Patrón de herencia bien establecido
 - Alto grado de polimorfismo
 - Alto grado de heterocigosidad
 - Fácil detección y reproductibilidad
 - Posibilidad de detección a partir de un material escaso
-

Aunque en el apartado dedicado a la discusión de esta Tesis Doctoral se profundizará en la técnica de estudio molecular del quimerismo hemopoyético mediante el análisis de microsatélites por PCR (PCR/STR), en la Tabla 9 se resumen los sistemas más utilizados para el análisis de STRs tras su amplificación mediante PCR.

Tabla 9. Sistemas de detección de STR

- Tinción con bromuro de etidio + fotografía mediante transiluminación UV¹
- Tinción con nitrato de plata²
- Incorporación de nucleótidos radiactivos a la PCR^{3,4}
- Utilización de cebadores marcados con fluorocromos⁵
- Electroforesis capilar⁶
- Quimioluminiscencia⁷

-
1. Bader *et al.*, 1999; 2. Mattsson *et al.*, 2001a; 3. Lawler *et al.*, 1991; 4. Oberkircher *et al.*, 1995;
 5. Thiede *et al.*, 1999; 6. Merel *et al.*, 1995; 7. Poli *et al.*, 1997. La utilización de cebadores marcados y posterior detección de fluorescencia mediante electroforesis capilar es uno de los métodos más rápidos, fiables y de fácil realización. Además, permiten realizar un análisis cuantitativo.

3. ANÁLISIS DEL QUIMERISMO: SANGRE PERIFÉRICA/MÉDULA ÓSEA

El estudio del quimerismo hemopoyético se puede realizar utilizando dos fuentes: sangre periférica o médula ósea. Se han comunicado casos esporádicos en los que la médula ósea resultó más sensible que la sangre periférica (Bader *et al.*, 1998). Sin embargo, algunos autores (Simmons *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1994) han observado que las células estromales de la médula ósea pueden tener el genotipo del receptor mientras que los macrófagos son originarios del donante. Así, el potencial riesgo de resultados falsos positivos puede estar aumentado cuando se realiza el análisis del quimerismo en muestras de médula ósea por la contaminación con células

Introducción

Quimerismo

estromales. Este hecho, junto con la mayor facilidad y comodidad de obtención, ha condicionado que en la actualidad la sangre periférica se haya impuesto como fuente de estudio del quimerismo hemopoyético.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es analizar, utilizando una técnica molecular de PCR/STR, cual es el patrón de quimerismo más frecuente tras el alo-TSP/ELT y tras el alo-TIR “no mieloablativo”. Además, analizaremos la relación del patrón de quimerismo hemopoyético con la recidiva leucémica y con el rechazo del injerto alogénico.

Para ello se ha estudiado:

1. El quimerismo en un grupo de pacientes sometidos a un alo-TSP/ELT mediante selección positiva de las células CD34⁺, comparándolo con un grupo de alo-TSP y de alo-TMO.

2. El quimerismo en pacientes sometidos a un alo-TIR “no mieloablativo” en pacientes con hemopatías malignas y con un seguimiento mediano superior a doce meses.

ESTUDIO MOLECULAR DEL QUIMERISMO

En los últimos años, las técnicas basadas en el análisis del ADN se han constituido en la principal herramienta para el estudio del quimerismo. Si bien el Southern blot era la técnica más usada, ésta ha sido sustituida por la PCR. Además, también han ido cambiando los distintos tipos de polimorfismos de ADN utilizados para distinguir al donante del paciente. Así, de los RFLP se ha pasado al uso, cada vez más generalizado, de secuencias polimórficas repetitivas tipo VNTR o STR.

Para un correcto estudio del quimerismo, los marcadores utilizados deben ser capaces de distinguir el ADN de dos individuos emparentados, esto es ser *informativos*, y la técnica empleada debe poder detectar material genético de ambos aun cuando la cantidad de uno de ellos esté muy poco representada en la muestra biológica, es decir ha de ser suficientemente *sensible*. El cumplimiento de estos dos conceptos es crucial para una correcta clasificación de los pacientes en cuanto a su “estado quimérico”.

La sensibilidad obtenida va a depender de la técnica utilizada para el estudio, aunque existen otros factores que, como se verá más adelante, también pueden influir. En general, la PCR es la técnica de mayor sensibilidad y por lo tanto, la recomendada para el análisis del quimerismo (Thiede *et al.*, 1999).

La elección de los marcadores polimórficos que se van a analizar es igualmente importante para obtener un resultado correcto y evitar interpretaciones erróneas. Deben de cumplir dos requisitos: 1) Un alto índice de heterocigosidad y 2) Un número elevado de alelos en la población. Lo ideal es que el donante y el paciente no tengan ningún alelo en común, y en el caso de que lo tuvieran, el donante y el paciente han de tener un alelo específico de cada uno no compartido.

Los STR presentan las características que ha de tener todo marcador genético susceptible de ser utilizado en el análisis del quimerismo; por otra parte, el pequeño tamaño de las secuencias hace que todas ellas se puedan detectar mediante PCR y, en muchos casos, incluso es posible el estudio simultáneo de varios *loci* STR mediante la PCR multiplex. La técnica de la PCR/STR tiene tres inconvenientes para su empleo sistematizado en el seguimiento y la evaluación del implante hemopoyético tras un alo-TPH (Briones *et al.*, 1998). En primer lugar, aunque se han comercializado geles de agarosas que permiten distinguir fragmentos de ADN muy pequeños, en el estudio de Briones y cols. fue necesario el empleo de geles más laboriosos, del tipo de la poliacrilamida. En segundo lugar, en ese mismo estudio, con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método, se hizo necesaria la incorporación de nucleótidos radiactivos a la PCR (PCR radiactiva). En tercer lugar, la PCR/STR convencional no permite efectuar una estimación cuantitativa de la participación de la hemopoyesis del donante y del receptor en el caso del QM. Estos tres inconvenientes se han solventado en nuestro estudio empleando una técnica automatizada (ABI Prism) de tinción multicolor de los cebadores, definición del tamaño de los diferentes fragmentos amplificados y cuantificación de cada uno de ellos (Thiede *et al.*, 2001a, Thiede *et al.*, 2001b).

Las muestras analizadas fueron obtenidas a partir de la sangre periférica. Se realizó así para evitar QM falsos debidos a la amplificación del ADN de las células no hemopoyéticas del estroma, que tras el alo-TPH continúan siendo del receptor (Simmons *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1994).

El estado del quimerismo hemopoyético se analizó en poblaciones celulares puras de linfocitos T y de neutrófilos, que habían sido separadas mediante un método inmunomagnético (MiniMacs; Miltenyi) utilizando un *kit* de separación Pan T (Miltenyi), y un gradiente de densidad (el botón celular se obtuvo mediante gradiente

de Ficoll-Dextrano), respectivamente. En la fracción linfoide T, más del 95% de las células eran CD3⁺, detectadas mediante citometría de flujo (**Figura 1**).

El ADN de alto peso molecular se extrajo directamente de los linfocitos T y de los neutrófilos que habían sido separados previamente. En las muestras con un contenido celular inferior a 5×10^6 , el ADN se obtuvo utilizando membranas de sílice (Qiam Blood Kit, Qiagen). La cuantificación del ADN se efectuó mediante absorción ultravioleta a 260 nm y todas las muestras fueron diluidas en H₂O hasta una concentración final de 0,2 ng/μl.

Para el análisis del quimerismo mediante PCR/STR utilizamos un *kit* comercial (AmpFISTR Profiler Plus PCR; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) que analiza nueve STR: D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, y un segmento del gen de la amelogenina para distinguir el cromosoma X o Y (Thiede *et al.*, 2001a; Thiede *et al.*, 2001b). La separación y detección de los productos amplificados por PCR se llevó a cabo mediante un secuenciador automático de ADN (ABI Prism 310 automated DNA sequencer; Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos se detecta automáticamente mediante dos métodos informáticos (ABI Prism GeneScan 2.0 y GenoTyper; Applied Biosystems). La tinción con diferentes colores permite identificar alelos de tamaño muy similar. Además, en esta técnica sólo está marcado uno del par de cebadores, evitándose así el problema de los dobletes vistos con el empleo de los geles. Por último, la cuantificación del QM se efectuó calculando el porcentaje de componente del donante y del receptor utilizando las fórmulas que se detallan en la **Figura 2**. Se consideró QM cuando el porcentaje de linfocitos T o de neutrófilos del receptor era superior al 5%.

La sensibilidad de la técnica para detectar la presencia del ADN del paciente en relación con el del donante depende de los marcadores escogidos y de los sistemas de detección utilizados. Si éstos proporcionan una baja sensibilidad, la existencia de una pequeña proporción de ADN del paciente en la muestra no será detectado, por lo que algunos casos de QM serán catalogados como QC. Ya que la eficiencia de la PCR para amplificar un determinado alelo depende del tamaño del mismo, la sensibilidad para detectar QM puede verse disminuida si en la mezcla de alelos pertenecientes al donante y al paciente los que corresponden a éste último son los que tienen mayor tamaño. En esta situación, los alelos más pequeños se amplifican con mayor eficiencia que los grandes, fenómeno conocido como amplificación preferencial (Sajantilla *et al.* 1994), de manera que si los alelos del receptor tienen un tamaño mayor que los del donante y se encuentran en una proporción pequeña, podrían no amplificarse dando lugar a un falso QC del donante. La elección de polimorfismos de pequeño tamaño, como los STR, permite evitar este fenómeno (Schmitt *et al.* 1994).

El método utilizado para la detección de los productos de la PCR es otro de los factores que determina la sensibilidad de la técnica. La mayor sensibilidad se ha obtenido realizando la PCR con incorporación de un nucleótido radioactivo, habitualmente deoxicitidina. De esta forma, se ha llegado a detectar ADN del receptor aún cuando éste constituía tan sólo el 0,1% del total de la muestra (Lawler *et al.* 1991; Ugozzoli *et al.* 1991, Briones *et al.*, 1998). En nuestra experiencia, con la técnica automatizada de PCR/STR (ABI Prism) para el estudio del quimerismo obtuvimos un nivel de sensibilidad del 5% de forma constante (**Figura 3**), aunque en algunas muestras este nivel llegó a ser del 1%.

A parte de los aspectos técnicos que condicionan la sensibilidad del análisis quimerismo hemopoyético mediante PCR/STR, existen dos aspectos prácticos que pueden ayudar a optimizarlo. Por un lado, la obtención de muestras de forma secuencial

y en intervalos de tiempo cortos y, por otro, el análisis del quimerismo en subpoblaciones celulares separadas. En 1995, Socie y cols. (Socie *et al.*, 1995) sugirió que el conocimiento del patrón del quimerismo y su cinética tras el trasplante, realizando el análisis en varias líneas celulares y de forma secuencial, permite monitorizar estrechamente la dinámica del implante hemopoyético y detectar precozmente la recidiva leucémica tras el trasplante (Mattsson *et al.*, 2001b). Mediante la separación de subpoblaciones celulares, la sensibilidad de la PCR puede aumentar al focalizar el estudio en las líneas celulares de interés clínico, reduciendo de esta manera los resultados irrelevantes (Bader *et al.*, 2000; Dubovsky *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 1997; Mattsson *et al.*, 2001b; Roux *et al.*, 1993; Roux *et al.*, 1992; Roux *et al.*, 1996; Thiede *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 1991; van Leeuwen *et al.*, 1993). Dubovsky y cols. (Dubovsky *et al.*, 1999) comunicaron que la separación celular permite detectar pequeños cambios del patrón del quimerismo que pueden pasar inadvertidos cuando el quimerismo se analiza en muestras de sangre total. Thiede y cols. (Thiede *et al.*, 2001) también obtuvieron un incremento significativo de la sensibilidad cuando se realizaba una separación de células CD34⁺, lo cual permitió detectar de forma precoz la recidiva leucémica tras el trasplante.

En nuestro primer estudio analizamos en una serie de pacientes el quimerismo hemopoyético simultáneamente en muestras de sangre total y en subpoblaciones celulares, obteniendo un incremento considerable de sensibilidad de la PCR/STR con la separación celular. Así, mientras que en cuatro muestras de sangre total se detectaba un QC del donante, el análisis en poblaciones separadas de linfocitos T y de neutrófilos identificó un pequeño porcentaje de componente linfoide T del receptor. Además, cuando en dos muestras de sangre total se demostró un QM de pequeña cuantía, el estudio en subpoblaciones celulares objetivó un aumento del porcentaje del componente del receptor a expensas de la fracción linfoide T, mientras que el quimerismo en neutrófilos era completo. Estos resultados enfatizan la utilidad de realizar el estudio del

quimerismo hemopoyético en subpoblaciones celulares, ya que el significado clínico del QM puede ser diferente según se detecte en linfocitos T o en neutrófilos.

Figura 1. Representación de la fracción linfocitaria T (CD3⁺) detectada mediante citometría de flujo.

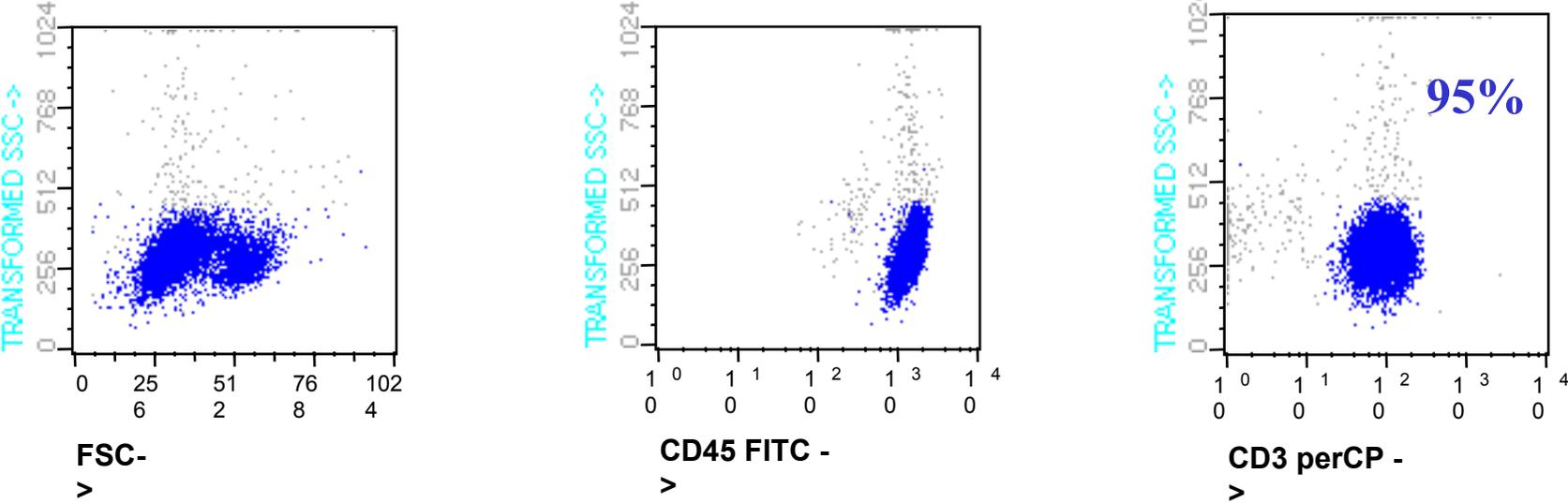
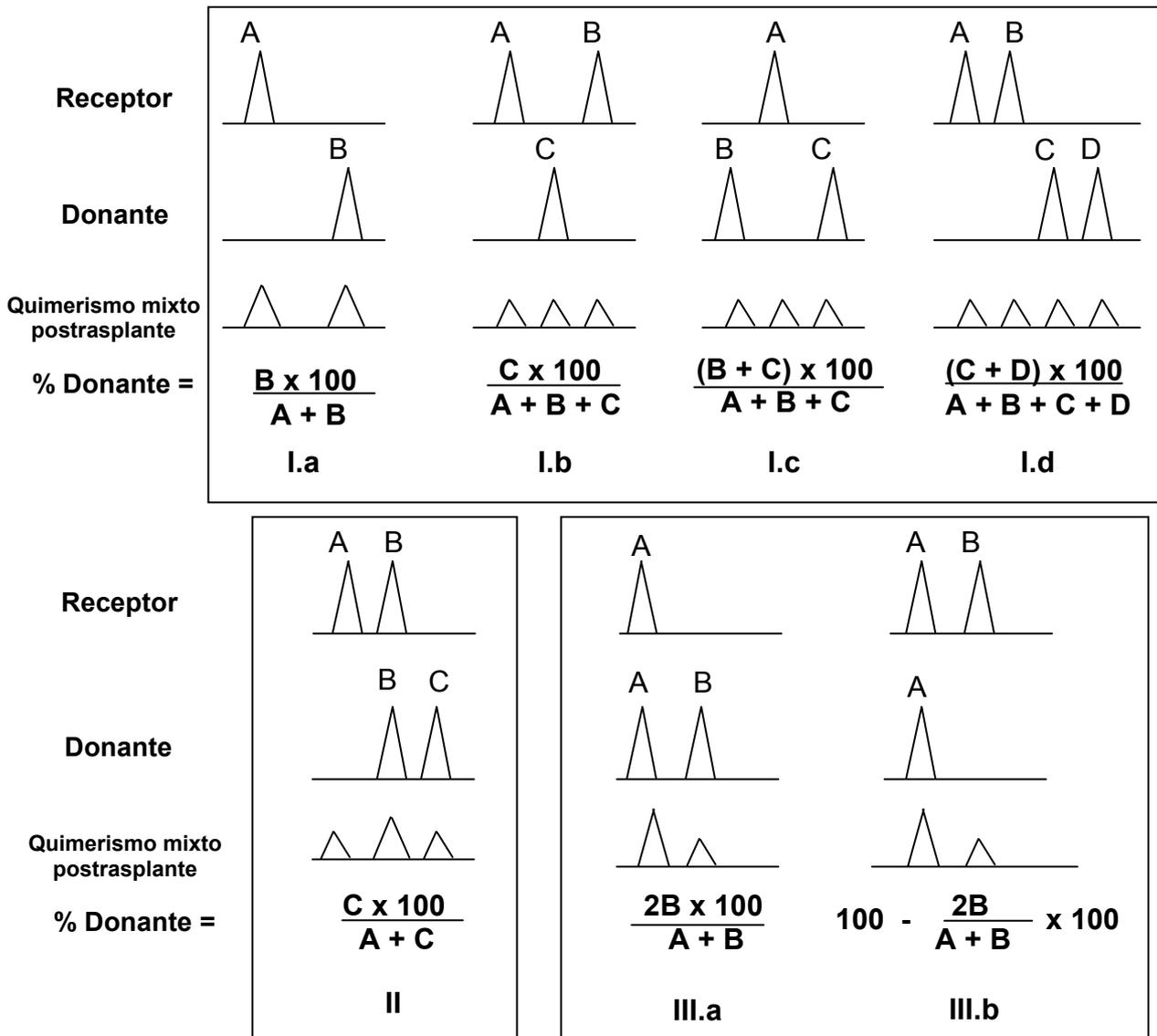


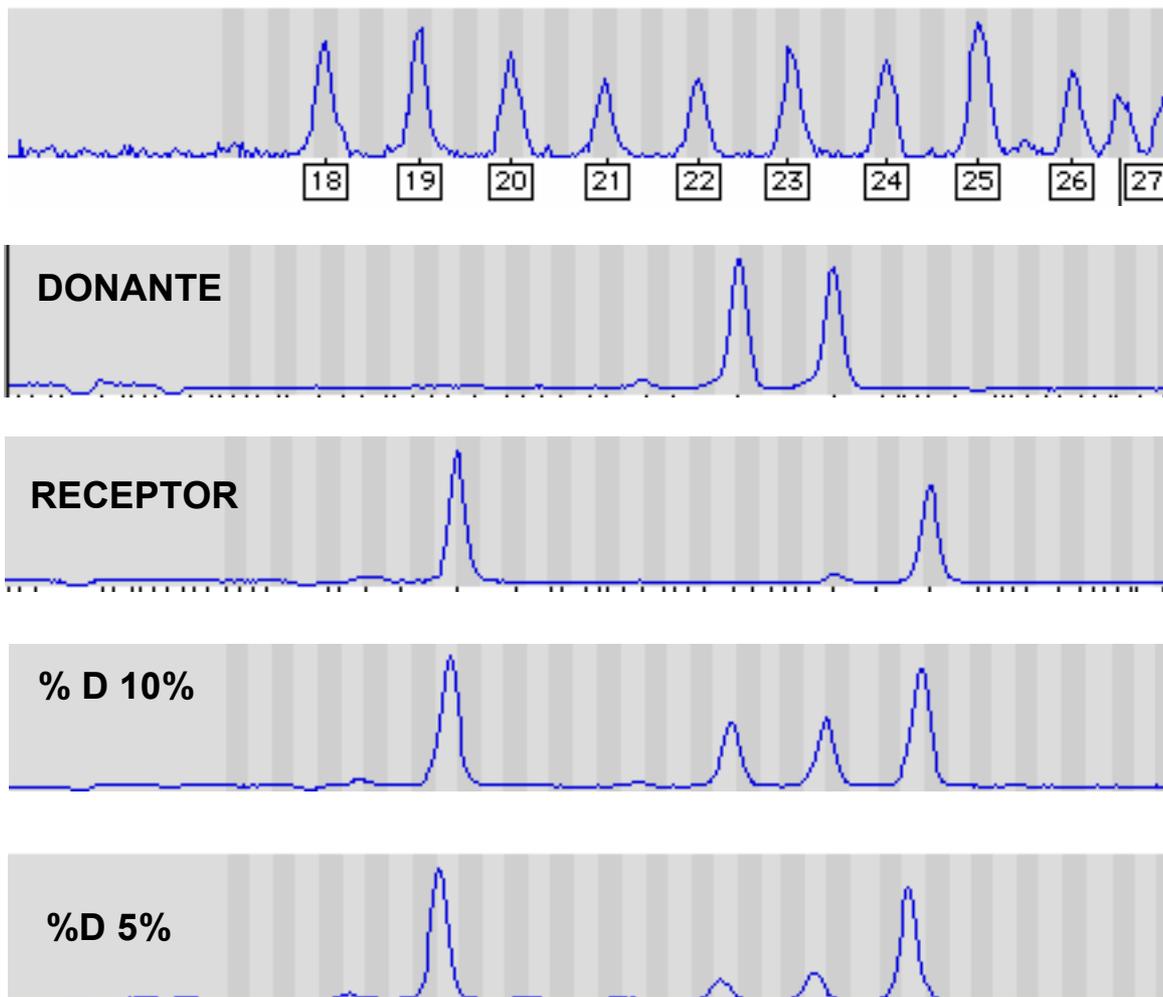
Figura 2. Cuantificación del porcentaje del donante en el quimerismo mixto postrasplante.



I. Las bandas del receptor (R) y del donante (D) son homo-heterocigotas (I.a,I.b,I.c,I.d) y no presentan alelos en común. **II.** R y D son heterocigotos y comparten un alelo. **III.** Cualquier D (III.a) o R (III.b) son heterocigotos y un alelo es idéntico a la banda homocigota del otro.

% Donante: el porcentaje de quimerismo del donante se calcula con la correspondiente fórmula utilizando una hoja del sistema Excel. (Modificado de Leukemia 2001; 15: 303-306)

Figura 3. Sensibilidad de la técnica de la PCR/STR para el análisis del quimerismo hemopoyético.



“% D” corresponde al porcentaje de ADN del donante en la muestra analizada.

QUIMERISMO EN EL TRANSPLANTE ALOGÉNICO CON ELIMINACIÓN DE LINFOCITOS T

La EICH es una de las principales causas de mortalidad en el alo-TPH (Ferrara *et al.* 1991). La ELT *ex vivo* del inóculo es la forma más efectiva de profilaxis de la EICH (Champlin, 1993). Sin embargo, la ELT se asocia a un incremento en los fallos del implante y en las recidivas. Los factores determinantes de la calidad del implante hemopoyético son : 1) La intensidad del régimen de acondicionamiento. 2) La cantidad y características funcionales de las células linfoides contenidas en el inóculo. 3) La cantidad de células CD34⁺ infundidas.

En el contexto del alo-TSP/ELT, el aumento de la dosis de irradiación o la asociación de otros agentes mieloablativos aumentan el implante al eliminar las células inmunocompetentes del paciente que pueden contribuir al rechazo de las células hematopoyéticas (Urbano-Ispizua *et al.*, 2001a). La consecución del implante no sólo requiere de una eficaz inmunodepresión y mieloablación, sino también de la presencia de células linfoides en el inóculo, las cuales facilitan el implante de las células hematopoyéticas del donante, entre otros mecanismos, mediante la eliminación de las células linfoides del paciente que quedan tras el tratamiento de acondicionamiento (Bordignon *et al.*, 1989). En un estudio reciente se ha observado una estrecha relación entre la cantidad de linfocitos T infundidos y la calidad del implante hemopoyético, de tal manera que los pacientes que recibieron una cantidad de linfocitos T igual o inferior a $0,2 \times 10^6/\text{kg}$ presentaron una incidencia significativamente superior de fallo de implante que aquellos a los que se les infundieron $>0,2 \times 10^6/\text{kg}$ (Urbano-Ispizua *et al.*, 2001a). Por último, también se ha demostrado que un alto contenido de células CD34⁺

(>3x10⁶/kg) empeora la supervivencia de los pacientes que recibieron un alo-TSP/ELT debido a una mayor mortalidad relacionada con el trasplante, dado que en este grupo se observa una mayor incidencia y una aparición precoz de la EICH (Urbano-Ispizua *et al.*, 2001b).

En un primer estudio analizamos de forma prospectiva el estado del quimerismo en linfocitos T y en neutrófilos mediante una técnica de análisis molecular (PCR/STR) en 22 pacientes que recibieron un alo-TSP/ELT mediante selección positiva de células CD34⁺. En el 77% (17/22) de los pacientes se detectó un QM a una mediana de 2 (1-16) meses postrasplante (**Figura 4**). En cambio, la frecuencia del QM en pacientes que recibieron un alo-TSP (n=5) o un alo-TMO (n=13) fue sólo del 17% (3/18; p=0,0003). Esta diferencia fue debida a una mayor frecuencia de QMLT en el grupo de pacientes tratados con un alo-TSP/ELT (72,3 vs 5,5%; p=0,0001). Esta alta frecuencia de QMLT en el grupo de alo-TSP/ELT se observó a pesar de que en este grupo de pacientes se administró una dosis mayor de irradiación corporal total (13 Gy vs 12 Gy) y una cantidad mayor de células CD34⁺ (mediana de 4,8x10⁶/kg vs 2,9x10⁶/kg; p=0,04). Estos resultados permiten destacar el papel fundamental que desempeñan los linfocitos T del donante para eliminar las células linfoides T residuales del receptor, las cuales pueden comprometer el implante hemopoyético, sobre todo en el alo-TSP/ELT. Sin embargo, la presencia de un QMLT no se asoció a un fallo del implante hemopoyético en la mayoría de los pacientes. Así, en 13 de los 17 pacientes (76,5%) con un QMLT, la presencia de linfocitos T del receptor fue transitoria o se mantuvo estable a lo largo de muchos meses tras el trasplante, y sólo en 4 casos (23,5%) progresó y se acompañó de pancitopenia o fallo del implante (Mackinnon *et al.*, 1992, Gyger *et al.*, 1998). En estos 4 pacientes el porcentaje de linfocitos T del receptor fue superior al 30% (**Figura 5**), mientras que sólo en uno de ellos se mantuvo a lo largo del tiempo, con un porcentaje entre 15-65% en los 3 años de seguimiento, habiendo presentado únicamente una pancitopenia transitoria. En los tres pacientes en los que el QMLT evolucionó a fallo de

implante se había infundido una dosis de linfocitos T de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$, mientras que se infundieron $0,3 \times 10^6/\text{kg}$ células CD3^+ en el paciente que, aún alcanzando un porcentaje de linfocitos T del receptor superior al 30%, sólo presentó una pancitopenia transitoria. Esta persistencia de QMLT estable tras un alo-TSP/ELT y sin repercusión clínica en el implante hemopoyético ha sido comunicada por otros autores (Roux *et al.*, 1996; van Leeuwen *et al.*, 1993; Schaap *et al.*, 2002; Molloy *et al.*, 1996).

La relación del QMLT con la recidiva leucémica es controvertida. Mientras que algunos autores han comunicado la existencia de una incidencia mayor de recidiva en los pacientes con QMLT respecto a aquellos con QCLT (Mackinnon *et al.*, 1994; Mackinnon *et al.*, 1992), en nuestro estudio, y en otros, no se ha observado dicha asociación (van Leeuwen *et al.*, 1993; van Leeuwen *et al.*, 1994; Mattsson *et al.*, 2001c). Por el contrario, estudios recientes sugieren que la presencia de un cierto grado de componente linfhemopoyético del receptor podría favorecer el efecto antileucémico tras ILD (Billiau *et al.*, 2002; Mapara *et al.*, 2002).

En cuanto a la EICH, algunos autores han observado una tendencia a una incidencia menor de EICH aguda grados II-IV en pacientes con QMLT (Gyger *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 1990; Mattsson *et al.*, 2001d), apoyando el concepto de que las células linfoides T del receptor pueden inducir tolerancia de las células hemopoyéticas del donante (Thomson *et al.*, 1995). Así, en nuestro estudio, ninguno de los 17 pacientes con QMLT desarrolló una EICH aguda grados II-IV, mientras que si lo hicieron 5 de los 23 pacientes con el 100% de linfocitos T del donante ($p=0,06$).

La incidencia de QMMi fue baja y similar en ambos grupos de pacientes. A diferencia de lo observado en los pacientes con QMLT, en los que esta situación podía permanecer estable en el tiempo sin consecuencias clínicas, la presencia de células mieloides del receptor tras el trasplante se acompañó de una recidiva leucémica en 5 de

los 7 (71%) pacientes con QMMi, todos ellos afectados de leucemia mieloide crónica. Roman y cols. (Roman *et al.*, 1998; Roman *et al.*, 2000) demostraron que la existencia de un QMMi con incremento progresivo del componente del receptor tiene un valor adicional como factor predictivo de la evolución clínica en los pacientes con el reordenamiento BCR-ABL positivo tras un alo-TPH. De forma similar, estudios recientes han demostrado que en pacientes que presentaban una recidiva tardía de leucemia aguda o de síndrome mielodisplásico tras un alo-TPH, las únicas células originarias del receptor eran las leucémicas (Bader *et al.*, 2000; Mattsson *et al.*, 2001b). Estos hallazgos permiten enfatizar en la utilidad del análisis secuencial del estado del quimerismo hemopoyético en subpoblaciones celulares separadas que incluyan la línea celular leucémica, con la intención de detectar precozmente la recidiva y así poder interrumpir la administración de fármacos inmunodepresores o de ILD en pacientes con un porcentaje creciente de células receptor, especialmente en aquellos con enfermedades sensibles al efecto ICL.

En definitiva, en base a los datos de este estudio podemos afirmar que el análisis del quimerismo hemopoyético en linfocitos T y en neutrófilos mediante una técnica cuantitativa de PCR/STR es útil para predecir el fallo de implante y la recidiva leucémica tras el alo-TSP/ELT.

Figura 4 Análisis del quimerismo en el alo-TSP/ELT.

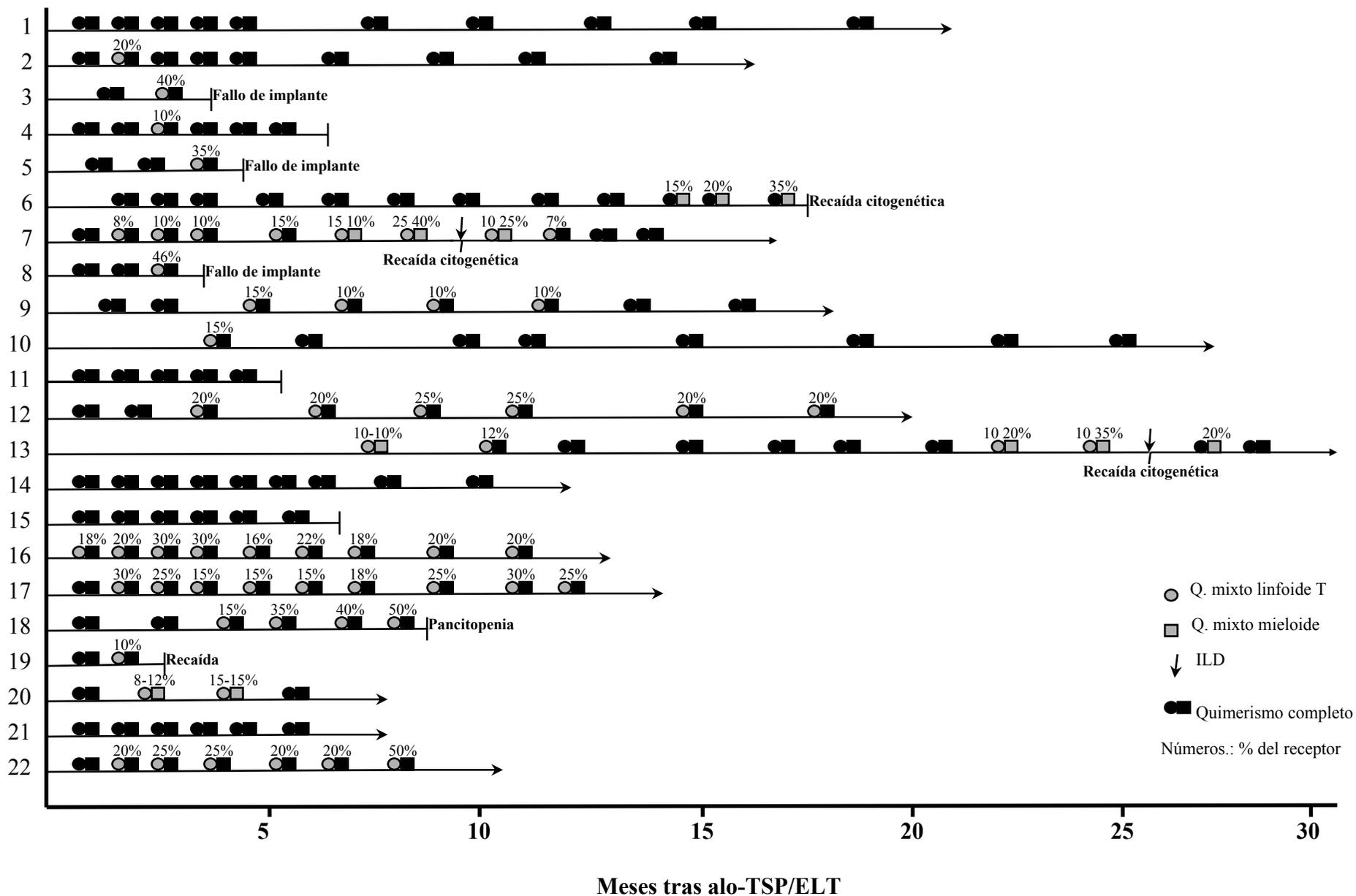
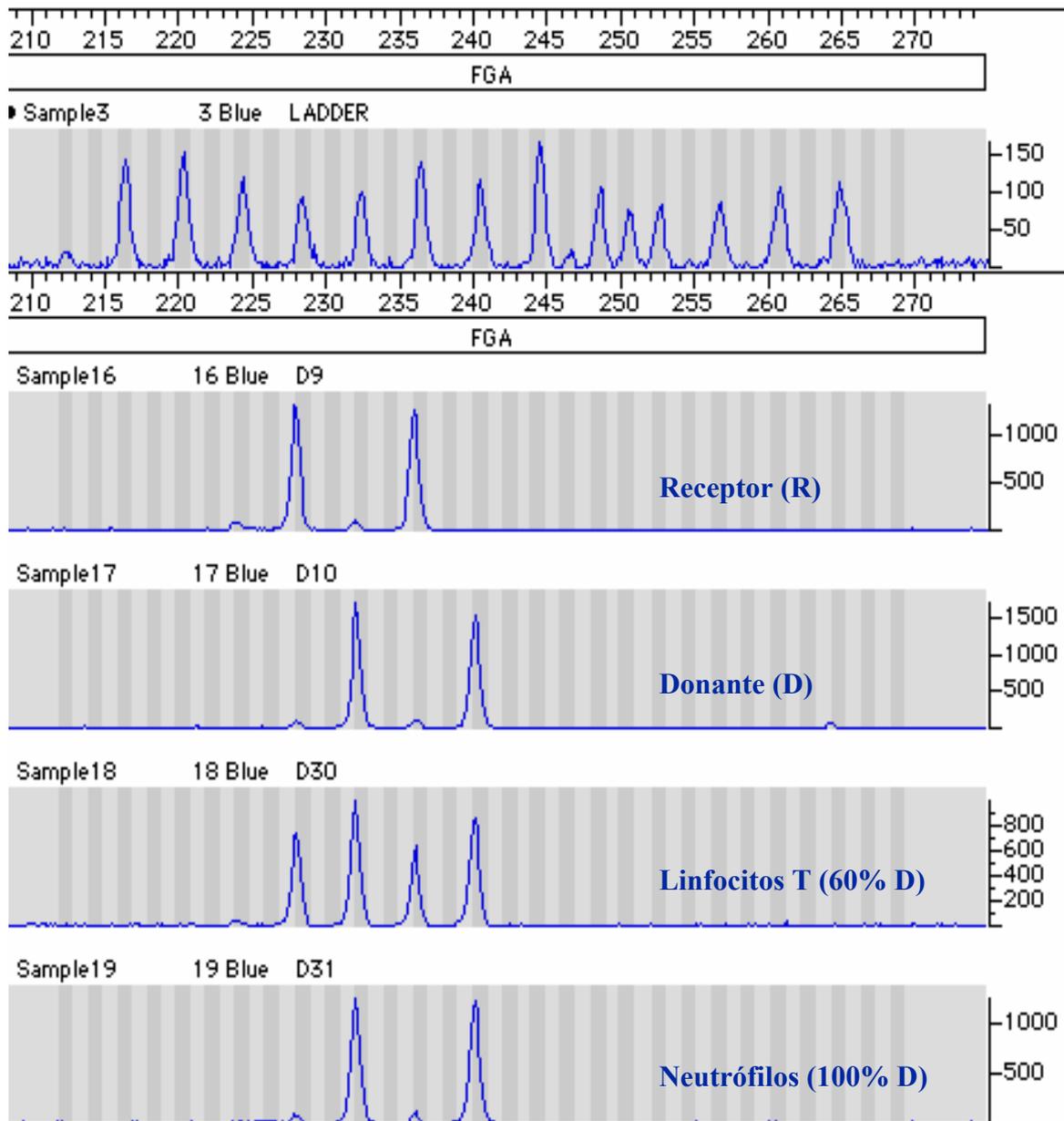


Figura 5. Quimerismo mixto en linfocitos T asociado a fallo de implante (% componente del receptor >30%).



QUIMERISMO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA TIPO "NO MIELOABLATIVO"

En los últimos años se ha hecho evidente que el efecto ICL desempeña un papel fundamental en la curación de algunas enfermedades hematológicas. Este hallazgo ha impulsado el desarrollo de modalidades de alo-TIR en los cuales el régimen de acondicionamiento tiene un papel más inmunodepresor que mieloablativo para, por un lado, reducir la toxicidad y la mortalidad relacionadas con el alo-TPH convencional y, por otro, permitir un implante linfo-hemopoyético rápido, sobre todo de los linfocitos T del donante, que serán los responsables directos del efecto ICL (Slavin *et al.*, 1998; Giralt *et al.*, 1997; Storb *et al.*, 1997). Esta nueva aproximación terapéutica ha sido ampliamente aceptada, de forma que en el año 2001 ya representaba más de una cuarta parte de la actividad en alo-TPH en Europa (Gratwohl *et al.*, 2001).

El tipo de alo-TIR que mejor refleja esta idea es el denominado "no mieloablativo", en el que se emplea un régimen de acondicionamiento con la intensidad mínima necesaria para lograr un implante hemopoyético completo y un efecto ICL con el cual erradicar la hemopatía maligna (McSweeney *et al.*, 1999). A mediados de 1990, Storb y cols. realizaron los primeros estudios en modelos caninos, obteniendo un implante estable en 11 de 12 perros tratados con ICT 200 cGy y la combinación de CsA y MMF, con una mínima toxicidad (Storb *et al.*, 1997; Storb *et al.*, 1999). Posteriormente, este protocolo fue aplicado en pacientes con enfermedades hematológicas malignas y que disponían de un donante HLA idéntico, consiguiendo un QC prolongado en la mayoría de casos. Sin embargo, un 20% de pacientes presentaron un fallo de implante, lo que motivó la asociación del agente inmunodepresor fludarabina a la irradiación corporal total (McSweeney *et al.*, 2001). Los resultados clínicos obtenidos hasta el momento con este tipo de trasplante son esperanzadores

(McSweeney *et al.*, 2001; Niederwieser *et al.*, 2003; Sandmaier *et al.*, 2000; Kobbe *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha hecho evidente la asociación del QCLT con el desarrollo del efecto ICL y con un descenso en la incidencia de la recidiva leucémica (Bertheas *et al.*, 1991; Childs *et al.*, 1999). Asimismo, algunos autores han observado una asociación entre el QMLT y la recidiva tras el alo-TPH (McSweeney *et al.*, 2001; Mackinnon *et al.*, 1994; Spitzer *et al.*, 2000; Mattsson *et al.*, 2001d).

En el segundo estudio de esta Tesis Doctoral hemos utilizado el protocolo de alo-TIR “no mieloablatoivo” y hemos monitorizado el quimerismo hemopoyético mediante la técnica de PCR/STR, en linfocitos T y en neutrófilos, con la finalidad de analizar la relación entre la cinética del implante hemopoyético y la respuesta antitumoral tras este tipo de alo-TPH, en pacientes con enfermedades hematológicas malignas estables o en progresión en el momento del trasplante.

Se han incluido 10 pacientes adultos consecutivos, con enfermedades hematológicas malignas, que disponían de un hermano HLA idéntico. Los pacientes estaban diagnosticados de: leucemia mieloide crónica (n=3), mieloma múltiple tras trasplante autólogo (n=4), leucemia linfática crónica-B (n=1), mielofibrosis idiopática (n=1), y leucemia linfoblástica aguda Ph⁺ positiva (n=1). En cinco de estos pacientes la enfermedad se encontraba en progresión en el momento del trasplante. Todos los pacientes recibieron fludarabina 30 mg/m² I.V. los días -4 a -2, seguida de irradiación corporal total 2 Gy el día 0. Como profilaxis de la EICH se administró CsA desde el día -1 y MMF P.O. desde el día 0. El MMF se interrumpía a los 60 días y la CsA a los 60-120 días si los pacientes no desarrollaban EICH aguda grado >1. La mediana (extremos) de células CD34⁺ infundidas fue de 5x10⁶/kg (2,3-8,7). Todos los pacientes fueron tratados en régimen ambulatorio y la mortalidad relacionada con el trasplante fue de 10%.

En cuanto a los estudios de quimerismo, en todos los pacientes se observó algún grado de implante del donante tras el trasplante (**Figura 6**). El paciente afecto de mielofibrosis idiopática, tras un QMLT y en neutrófilos transitorio, presentó un rechazo del implante recuperando el 100% de la hemopoyesis autóloga (**Figura 7**). El momento en el que se alcanzó un QC fue diferente en el compartimiento linfóide T y en el mieloide, de tal manera que, tras un implante parcial precoz de linfocitos T, el QCMi precedió al QCLT (**Figura 8**). Así, la mediana de días para un QCMi fue de 42 (28-90), mientras que fue de 110 (56-150) en el compartimiento de linfocitos T ($p=0,002$) (**Tabla 1**). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de alo-TIR “no mieloablativo” (Niederwieser *et al.*, 2003; Mattsson *et al.*, 2001c), y contrastan con los observados en series de pacientes tratados con regímenes de acondicionamiento más intensivos, en los cuales el implante linfóide T completo precede al mieloide (Childs *et al.*, 1999; Pérez-Simón *et al.*, 2002). En este mismo sentido, el establecimiento de un QCLT precoz y mantenido tras un alo-TIR se ha considerado un factor fundamental para alcanzar una plena reacción ICL (Childs *et al.*, 1999; McSweeney *et al.*, 2001; Pérez-Simón *et al.*, 2002).

La incidencia de EICH en este tipo de trasplante es elevada (30-50%) (McSweeney *et al.*, 2001; Niederwieser *et al.*, 2003; Sandmaier *et al.*, 2000; Kobbe *et al.*, 2002) y similar a la del alo-TPH convencional en pacientes más jóvenes. Es posible que en grupos de pacientes de edad y fase de enfermedad similares, la incidencia de EICH sea inferior en el grupo que recibe un alo-TIR “no-mieloablativo” (Mielcarek *et al.*, 2003). Por otra parte, la escasa toxicidad del régimen de acondicionamiento podría favorecer la persistencia de células presentadoras de antígenos del receptor que activarían a los linfocitos T del donante responsables directos del desarrollo del efecto ICL con el que poder erradicar la enfermedad hematológica (McSweeney *et al.*, 2001; Michallet *et al.*, 2001). En nuestro estudio la incidencia de EICH crónica fue 62,5%, similar a la descrita por otros autores (McSweeney *et al.*, 2001; Niederwieser *et al.*,

2003; Sandmaier *et al.*, 2000). Sin embargo, sólo uno de los diez pacientes (10%) desarrolló EICH aguda grado II-IV. Este hecho podría estar relacionado con la elevada incidencia de QMLT en los 3 primeros meses postrasplante junto con la prolongación de la inmunodepresión con CsA y MMF en los cinco últimos pacientes tratados.

En este estudio hemos observado una progresión o recidiva precoz de la enfermedad de base en el 80% de los pacientes, porcentaje que resulta muy elevado, teniendo en cuenta los resultados tras el alo-TPH convencional (Horowitz *et al.*, 1990). Este hecho ha podido producirse como consecuencia, por un lado, de la administración de un régimen de acondicionamiento con escaso poder antitumoral y, por otro, del retraso en conseguir un QCLT tras el trasplante. Este hecho es especialmente importante, teniendo en cuenta que la mediana de días para la recidiva o la progresión fue de 68 días (15-335). Este es uno de los inconvenientes del alo-TIR “no mieloablatoivo”, dado que la capacidad del alo-TPH convencional para erradicar la hemopatía maligna depende tanto del efecto ICL como de la intensidad del régimen de acondicionamiento (Slattery *et al.*, 1997; Clift *et al.*, 1998). En este sentido, un estudio aleatorizado con dos regímenes de irradiación corporal total en pacientes con leucemia mieloide crónica en primera fase crónica sometidos a un alo-TMO demostró que la probabilidad de recidiva a los 4 años era del 25% en los que recibieron 12 Gy, en comparación con el 0% en los que se administraron 15,75 Gy ($p=0,008$) (Clift *et al.*, 1991). Al escaso poder antitumoral del régimen de acondicionamiento “no mieloablatoivo” se añade el retraso en alcanzar un QCLT tras este tipo de trasplante (Mackinnon *et al.*, 1994; Mackinnon *et al.*, 1992), por lo que nuestros resultados apoyan que la respuesta antitumoral en este tipo de trasplante ocurre exclusivamente en aquellos pacientes en los que se produce un implante hemopoyético del donante prolongado (Childs *et al.*, 1999). Así, sólo 1 de los 9 pacientes (11%) analizados habían alcanzado un QCLT en el momento de la recidiva o progresión. Tras analizar los factores que podían influir para conseguir un implante linfoide T completo tras el alo-

TIR “no mieloablatoivo”, el estado de la enfermedad hematológica en el momento del trasplante fue el más estrechamente asociado con alcanzar un QCLT. Así, los 5 pacientes (100%) con enfermedad en remisión o estable antes del trasplante alcanzaron un QCLT, mientras que esto ocurrió únicamente en 1 de los 5 (20%) que recibieron el trasplante con enfermedad en progresión ($p=0,05$). Por lo tanto, en los pacientes con la enfermedad en progresión podría ser necesario aumentar la intensidad del régimen de acondicionamiento. Otra alternativa sería administrar quimioterapia sistémica o anticuerpos monoclonales conjugados tras el trasplante (Sievers *et al.*, 1999; Matthews *et al.*, 1999), con la finalidad de controlar la actividad de la enfermedad, evitando una progresión precoz, y así permitir el desarrollo del efecto ICL. En este sentido, dos pacientes afectos de leucemia mieloide crónica en fase acelerada recibieron tratamiento con imatinib desde los días 0 y +15 del trasplante, respectivamente. Con este tratamiento pretrasplante asociado al régimen de acondicionamiento se consiguió una reducción significativa de la cifra de leucocitos y permitió alcanzar un implante mieloide completo en ambos casos.

En conclusión, el régimen de acondicionamiento “no mieloablatoivo” con fludarabina e irradiación corporal total 2 Gy permite administrar con una toxicidad escasa una inmunoterapia antitumoral a pacientes con edad avanzada o con factores de co-morbilidad asociados a la enfermedad neoplásica. Por otro lado, la respuesta tras este tipo de trasplante es más frecuente en pacientes con enfermedades malignas con índice proliferativo bajo o en remisión, mientras que este tipo de alo-TPH podría ser ineficaz para el control de enfermedades hematológicas malignas en progresión.

Figura 7. Reconstitución autóloga tras Alo-TIR “no mieloablativo”.

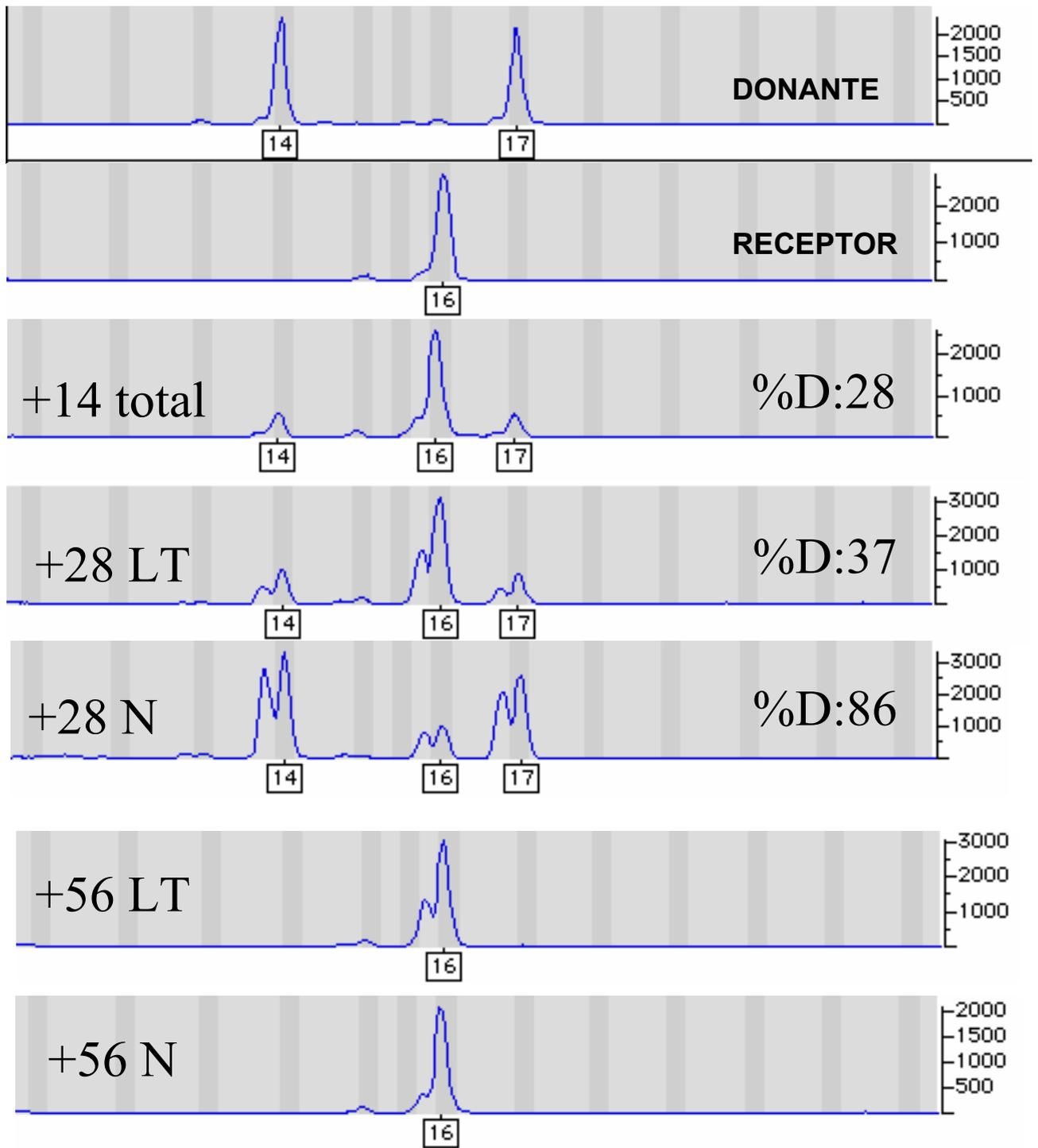


Figura 8. Cinética del implante tras Alo-TIR “no mieloablativo”.

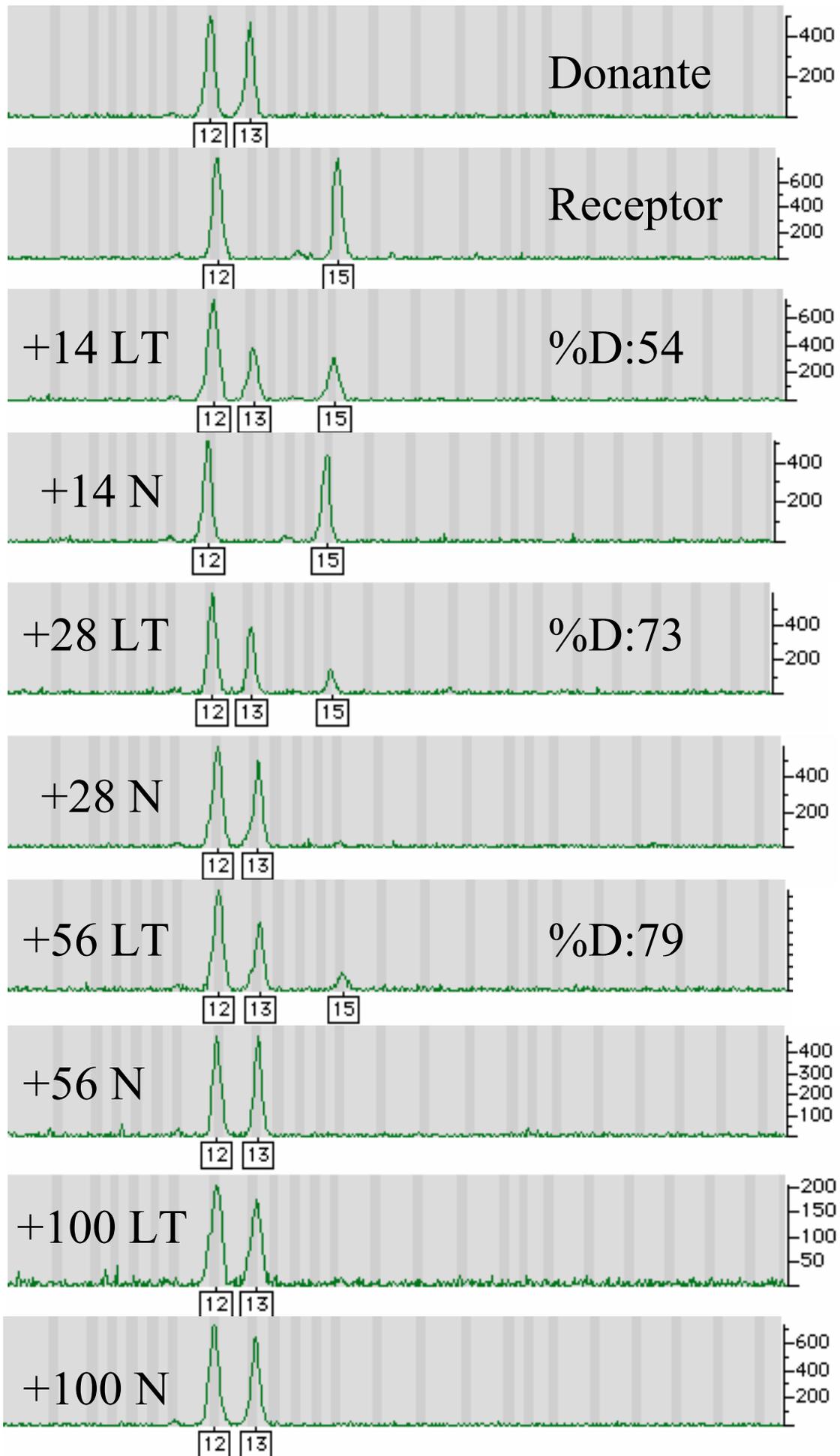


Tabla 1. Análisis del quimerismo en linfocitos T y en neutrófilos tras un alo-TIR “no-mieloablatoivo”.

Líneas celulares	Día +14 (% D) (n=7)	Día +28 (% D) (n=10)	Día +56 (% D) (n=10)	Día +90 (% D) (n=9)	Días para QC (mediana)
Linfocitos T	53 (0-65)	60 (0-85)	65 (35-100)	81(0-100)	110 (56-150) (n=6)
Neutrófilos	0 (0-65)	80 (0-100)	100 (53-100)	100 (0-100)	42 (28-90) (n=9)

% D: Porcentaje de células del donante; QC: quimerismo completo

1. La técnica de la PCR/STR permite realizar un análisis secuencial y cuantitativo del quimerismo hemopoyético tras el alo-TPH con un nivel de sensibilidad suficiente.
2. La ELT del producto de leucaféresis mediante selección positiva de las células CD34⁺ se asocia a un aumento significativo de la frecuencia de QMLT, el cual puede ser predictivo de fallo de implante. En este mismo contexto, el quimerismo mixto mieloide se asocia a recidiva leucémica en pacientes con hemopatías malignas que afectan a esta línea celular (ej. leucemia mieloide crónica).
3. El régimen de acondicionamiento “no mieloablativo” con fludarabina e irradiación corporal total 2 Gy permite alcanzar un implante hemopoyético completo y mantenido, pero con un retraso significativo del injerto en el compartimiento linfoide T, por lo que puede ser útil en pacientes con enfermedades malignas con índice proliferativo bajo o en remisión, pero ineficaz para el control de enfermedades hematológicas malignas en progresión.

Antin J. *Graft-Versus-Leukemia: No longer an epiphenomenon*. **Blood** 82: 2237-2247, 1993.

Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingebiel T. *Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT*. **Bone Marrow Transplantation** 21: 487-495, 1998.

Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF. *Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children*. **Leukemia** 13: 2079-2086, 1999.

Bader P, Stoll K, Huber S, Geiselhart A, Handgretinger R, Niemeyer C, Einsele H, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J, Klingebiel T. *Characterization of lineage-specific chimerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse*. **British Journal of Haematology** 108: 761-768, 2000.

Beatty P, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Storb R. *Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings*. **New England Journal of Medicine** 313: 765-771, 1985.

Beckman JS, Weber JL. *Survey of human and rat microsatellites*. **Genomics** 12: 627-631, 1992.

Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, Storb R, Buckner CD. *Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor*. **Blood** 85: 1655-1658, 1995.

Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. **Blood** 78: 3103-3106, 1991.

Billiau AD, Fevery S, Rutgeerts O, Landuyt W, Waer M. *Crucial role of timing of donor lymphocyte infusion in generating dissociated graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses in mice receiving allogeneic bone marrow transplants.* **Blood** 100: 1894-1902, 2002.

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

Bordignon C, Keever CA, Small TN, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. *Graft failure after T-cell-depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukaemia: II. In vitro analyses of host effector mechanisms.* **Blood** 74: 2237-2243, 1989.

Briones J, Urbano-Ispizua A, Lawler M, Rozman C, Gardiner N, Marin P, Salgado C, Féliz P, McCann S, Montserrat E. *High frequency of donor chimerism following allogeneic transplantation of CD34+ selected peripheral blood cells.* **Experimental Hematology** 26: 415-420, 1998.

Briones J, Urbano-Ispizua A, Rozman C, Marín P, Carreras E, Rovira M, Sierra J, Colomer D, Martínez C, Montserrat E. *Study of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using PCR amplification of short tandem repeats.* **Annals of Hematology** 72: 265-268, 1996.

Carella AM, Giralt S, Slavin S. *Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as treatment of hematologic neoplasia.* **Haematologica** 85: 304-313, 2000.

Champlin R. *T-cell depletion for allogeneic bone marrow transplantation: impact on graft-versus-host disease, engraftment, and graft-versus-leukemia*. **Journal of Hematotherapy** 2: 27-42, 1993.

Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, Read EJ, Carter C, Bahceci E, Young NS, Barrett AJ. *Engraftment kinetics after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses*. **Blood** 94: 3234-3241, 1999.

Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bryant E, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI. *Allogeneic marrow transplantation in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase: A randomized trial of two irradiation regimens*. **Blood** 77: 1660-1665, 1991.

Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Sullivan KM, Storb R, Thomas ED. *Long-term follow-up of a randomised trial of two irradiation regimens for patients receiving allogeneic marrow transplants during first remission of acute myeloid leukemia*. **Blood** 92: 1455-1456, 1998.

Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Camplin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation*. **Journal of Clinical Oncology** 15: 433-444, 1997.

Craddock C. *Haemopoietic stem-cell transplantation: recent progress and future promise*. **Lancet Oncology** 1: 227-234, 2000.

Cull GM, Haynes AP, Byrne JL, Carter GI, Mifflin G, Rebello P, Hale G, Waldmann H, Russell NH. *Preliminary experience of allogeneic stem cell transplantation for lymphoproliferative disorders using BEAM-CAMPATH conditioning: an effective regimen with low procedure-related toxicity*. **British Journal of Haematology** 108: 754-760, 2000.

Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Löffler H, Schmitz N, Schroyens W. *Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation*. **Blood** 81: 1404, 1993.

Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gadner H, Lion T, Muller-Berat N. *Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection*. **Leukemia** 13: 2060-2069, 1999.

Ferrara JLM, Deeg HJ. *Mechanisms of Disease: Graft-versus-host disease*. **New England Journal of Medicine** 324: 667-674, 1991.

Forbes GM, Fogarty J, Meyer B, Collins BJ, Erber WN. *Intestinal mucosal mononuclear cell chimaerism after sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation*. **Bone Marrow Transplantation** 16: 589-593, 1995.

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

Friedman JM. *Markers and mapping*. En: **Genetics**. Friedman JM, Dill F, Hayden MR, McGillivray BC eds. National Medical Series. Williams & Wilkins, p. 59-68, 1992.

Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JA, Bortin MM. *Identical-twin bone marrow transplants for leukemia*. **Annals of Internal Medicine** 120: 646-652, 1994.

Garban F, Attal M, Rossi JF, Payen C, Fegueux N, Sotto JJ. *Immunotherapy by non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma: results of a pilot study as salvage therapy after autologous transplantation*. **Leukemia** 15: 642-646, 2001.

Geller RB, Myers S, Devine S, Larson RA, Williams SF, Park CL, O'Toole K, Chandler C, Topper RL. *Phase I study of busulfan, cyclophosphamide, and timed sequential*

escalating doses of cytarabine followed by bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 9: 41-47, 1992.

Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I, Gajewski J, Mehra R, Claxton D, Andersson B, Beran M, Przepiorka D, Koller C, Kornblau D, Körbling M, Keating M, Kantarjian H, Champlin R. *Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analogue-containing chemotherapy: Harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy.* **Blood** 89: 4531-4536, 1997.

Goodman JW, Hodgson GS. *Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice.* **Blood** 19: 702-714, 1962.

Gosden JR, Mitchell AR, Buckland RA, Clayton RP, Evans HJ. *The location of four human minisatellite DNAs on human chromosomes.* **Experimental Cell Research** 92: 148-158, 1975.

Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, Urbano-Ispizua A. *Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey.* **Bone Marrow Transplantation** 30: 813-831, 2002.

Gusella JF. *DNA polymorphism and human disease.* **Annual Reviews of Biochemistry** 55: 831-854, 1986.

Gyger M, Baron C, Forest L, Lussier P, Lagace F, Bissonnette I, Belanger R, Bonny Y, Busque L, Roy DC, Perreault C. *Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-versus-host disease.* **Experimental Hematology** 26: 426-434, 1998.

Hale G, Cobbold S, Waldmann H. *T-Cell depletion with Campath-1 in allogeneic bone marrow transplantation.* **Transplantation** 45: 753-759, 1988.

Hancock J, Burgess M, Goulden N, Steward C, Knechtli C, Pamphilon D, Potter M, Oakhill. *Same-day determination of chimaeric status in the immediate period following allogeneic bone marrow transplantation.* **British Journal of Haematology** 99: 403-409, 1997.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B. *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.* **Blood** 75: 555-562, 1990.

Housman DE. *DNA on trial: the molecular basis of DNA fingerprinting.* **New England Journal of Medicine** 332: 534-535, 1995.

Ildstad ST, Sachs DH. *Reconstitution with syngenic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts and xenografts.* **Nature** 307: 168-170, 1984.

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

Kernan NA, Collins NM, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. *Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease.* **Blood** 68: 770-773, 1986.

Kernan NA, Bordignon C, Heller G, Cunningham I, Castro-Malaspina H, Shank B, Flomenberg N, Burns J, Yang SY, Black P, Collins NH, O'Reilly RJ. *Graft failure after T-cell-depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukemia: I. Analysis of risk factors and results of secondary transplants.* **Blood** 74: 2227-2236, 1989.

Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, Landmark JD, Dooley DC, Law P, Coccia PF, Warkentin PI, Weisenburger DD, Armitage JO. *Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia.* **Bone Marrow Transplantation** 4: 643-646, 1989.

Khouri IF, Keating M, Körbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von-Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. *Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies*. **Journal of Clinical Oncology** 16: 2817-2824, 1998.

Kobbe G, Schneider P, Aivado M, Zohren F, Schubert D, Fenk R, Neumann F, Kronenwett R, Pape H, Rong A, Royer-Pokora B, Hildebrandt B, Germing U, Gattermann N, Heyll A, Haas R. *Reliable engraftment, low toxicity, and durable remissions following allogeneic blood stem cell transplantation with minimal conditioning*. **Experimental Hematology** 30: 1346-1353, 2002.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, et al; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Graft-vs.-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients*. **Blood** 86: 2041-2050, 1995.

Körbling M, Fliedner TM. *The evolution of clinical peripheral blood stem cell transplantation*. **Bone Marrow Transplantation** 17: 675-678, 1996.

Körbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB. *Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: Potential advantage of blood over marrow graft*. **Blood** 85: 1659-1665, 1995.

Lapointe C, Forest L, Lussier P, Busque L, Lagace F, Perreault C, Roy DC, Gyger M. *Sequential analysis of early hematopoietic reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation with fluorescence in situ hybridisation (FISH)*. **Bone Marrow Transplantation** 17: 1143-1148, 1996.

Lawler M, Humphries P, McCann SR. *Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction.* **Blood** 77: 2504-2514, 1991.

Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR. *Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using sex chromosomes as markers of cellular origin.* **British Journal of Haematology** 56: 431-443, 1984.

Le Beau MM. *Fluorescence in Situ Hybridization in cancer diagnosis.* En: **Important Advances in Oncology 1993.** DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Lippincott Company, Philadelphia, p. 29-45, 1993.

Leitman SF, Read EJ. *Hematopoietic progenitor cells.* **Seminars of Hematology** 33: 341-358, 1996.

Mackinnon S, Barnett L, Bourhis JH, Black P, Heller G, O'Reilly RJ. *Myeloid and lymphoid chimerism after T-cell depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA.* **Blood** 80: 3235-3241, 1992.

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

Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. *Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells.* **Blood** 100: 1903-1909, 2002.

Marmont A, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Diche KA, Goldman JM, Good RA, Herzig RH, Hong R, Masaoka T, Rimm AA, Speck B, Weiner RS, Bortin MM. *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia.* **Blood** 79: 2120-2130, 1991.

Martin PJ, Hansen JA, Torok-Storb B, Durnam D, Przepiorka D, O'Quigley J, Sanders J, Sullivan KM, Witherspoon RP, Deeg HJ. *Graft failure in patients receiving T cell-depleted HLA-identical allogeneic marrow transplants.* **Bone Marrow Transplantation** 3: 445-456, 1988.

Martin PJ. *Donor CD8 cells prevent allogeneic marrow graft rejection in mice: potential implications for marrow transplantation in humans.* **Journal Experimental Medicine** 178:703-712, 1993.

Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Tammik L, Omazic B, Levitsky V, Zou JZ, Hentschke P, Ringden O. *Poor immune reconstitution after four or five major HLA antigens mismatched T cell-depleted allogeneic and autologous stem cell transplantation.* **Clinical Experimental Immunology** 123: 162-169, 2001a.

Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringden O. *Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation.* **Leukemia** 15: 1976-1985, 2001b.

Mattsson J, Uzunel M, Brune M, Hentschke P, Barkholt L, Stierner U, Aschan J, Ringden O. *Mixed chimerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation.* **British Journal of Haematology** 115: 935-944, 2001c.

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

Matthews DC, Appelbaum FR, Eary JF, Fisher DR, Durack LD, Hui TE, Martin PJ, Mitchell D, Press OW, Storb R, Bernstein ID. *Phase I study of (131)I-anti-CD45 antibody plus cyclophosphamide and total body irradiation for advanced acute leukaemia and myelodysplastic syndrome.* **Blood** 94: 1237-1247, 1999.

McCann SR, Lawler M. *Mixed chimaerism: detection and significance following BMT. Bone Marrow Transplantation* 11: 91-94, 1993.

McSweeney PA. *Approaches to evaluation of chimerism and clonality*. En: **Bone Marrow Transplantation**. Burt RK, Deeg HJ, Lothian ST, Santos GW. Chapman & Hall eds. New York, p. 301-308, 1996.

McSweeney P, Storb R. *Mixed chimerism: preclinical studies and clinical applications. Biology of Blood and Marrow Transplantation* 5: 192-203, 1999.

McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S, Appelbaum FR, Bensinger WI, Bryant E, Flowers MED, Georges GE, Grumet FC, Kiem H-P, Torok-Storb B, Yu C, Blume KG, Storb R. *Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. Blood* 97: 3390-3400, 2001.

Merel P, Comeau F, Dupin B, Vezon G. *Robotics and automation in the HLA/DNA typing laboratory (II). 47th American Association for Clinical Chemistry*, Anaheim, CA. July, 1995 (comunicación).

Michallet M, Bilger K, Garban F, Attal M, Huyn A, Blaise D, Milpied N, Moreau P, Bordigoni P, Kuentz M, Sadoun A, Cahn JY, Socie G, Thomas X, Arnaud P, Raus N, Lheritier V, Pigneux A, Boiron JM. *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after nonmyeloablative preparative regimens: impact of pretransplantation and posttransplantation factors on outcome. Journal of Clinical Oncology* 19: 3340-3349, 2001.

Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R. *Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional stem cell transplantation. Blood* 102: 756-762, 2003.

Molloy K, Goulden N, Lawler M, Cornish J, Oakhill A, Pamphilon D, Potter M, Steward C, Langlands K, Humphries P, McCann SR. *Patterns of hematopoietic*

chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia from volunteer unrelated donors. Blood 87: 3027-3031, 1996.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. *Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell* 88: 287-298, 1997.

Murphy WJ, Kumar V, Cope JC, Bennet M. *An absence of T cells in murine bone marrow allografts leads to an increased susceptibility to rejection by natural killer cells and T cells. Journal of Immunology* 144: 3305-3311, 1990.

Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolf R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R. *Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science* 235: 1617-1622, 1987.

Naparstek E, Nagler A, Or R, Slavin S. *Allogeneic cell mediated immunotherapy using donor lymphocytes for prevention of relapse in patients treated with allogeneic BMT for hematological malignancies. Clinical Transplants* 281-286, 1996.

Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B, Lange T, Chauncey T, Deininger M, Pönisch W, Anasetti C, Woolfrey A, Little MT, Blume KG, McSweeney PA, Storb R. *Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. Blood* 101: 1620-1629, 2003.

Oberkircher AR, Strout MP, Herzig GP, Fritz PD, Caligiuri MA. *Description of an efficient and highly informative method for the evaluation of hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation* 16: 695-702, 1995.

Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, O'Reilly RJ, Chaganti RSK. *Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic*

myelogenous leukemia after T-cell depleted bone marrow transplantation. Blood 75: 1346-1355, 1990.

Orlic D, Bodine D. *What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up!*. **Blood** 84: 3991-3994, 1994.

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

Papadopoulos EB, Carabasi MH, Castro-Malaspina H, Childs BH, Mackinnon S, Boulad F, Gillio AP, Kernan NA, Small TN, Szabolcs P, Taylor J, Yahalom J, Collins NH, Bleau SA, Black PM, Heller G, O'Reilly RJ, Young JW. *T-Cell-Depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. Blood* 91: 1083-1090, 1998.

Pascali VL, Dobosz M, d'Aloja E. *PCR in Forensic Science*. En: **PCR Technology. Current Innovations**. Griffin HG & Griffin AM, eds. CRC Press. Boca Ratón. Florida, p. 289-306, 1994.

Pérez-Simón JA, Caballero D, Diez-Campelo M, López-Pérez R, Mateos G, Cañizo C, Vázquez L, Vidriales B, Mateos MV, González M, San Miguel JF. *Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. Leukemia* 16: 1423-1431, 2002.

Petz LD. *Documentation of engraftment and characterization of chimerism following marrow transplantation*. En: **Bone Marrow Transplantation**. Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, eds. Blackwell Scientific Publications. Boston, p. 136-148, 1994.

Poli F, Crespiatico L, Lecchi L, Sirchia G, Scalamogna M, Sirchia SM, Garagiola I, Pedranzini L. *Highly sensitive chemiluminiscent method for the detection of maternall cell contamination in human cord blood stored for allotransplantation: the experience of the Milano cord blood bank. Blood* 89: 3061-3062, 1997.

Román J, Martín C, Torres A, García A, Andrés P, García MJ, Baiget M. *Importance of mixed chimerism to predict relapse in persistently BCR/ABL positive long survivors after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. Leukemia Lymphoma* 28: 541-550, 1998.

Román J, Serrano J, Jiménez A, Castillejo JA, Reina ML, González MG, Rodríguez MC, García I, Sánchez J, Maldonado J, Torres A. *Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. Haematologica* 85: 173-180, 2000.

Roux E, Abdi K, Speiser D, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek. *Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukaemia transplanted with T-cell depleted bone marrow: Involvement of different hematologic lineages before and after relapse. Blood* 81: 243-248, 1993.

Roux E, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. *Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction. Blood* 79: 2775-2783, 1992.

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

Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC, Freedman AS, Nadler LM, Ritz J. *Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. Blood* 75: 296-304, 1990.

Russell JA, Brown C, Bowen T, Luider J, Ruether JD, Stewart D, Chaudhry A, Booth K, Jorgenson K, Coppes MJ, Turner AR, Larrat L, Desai S, Poon MC, Klassen JK. *Allogeneic blood cell transplants for haematological malignancy: preliminary*

comparison of outcomes with bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 17: 703-708, 1996.

Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. *Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation.* **Lancet** 341:1482, 1993.

Russell NH, Hunter AE. *Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation.* **Bone Marrow Transplantation** 13: 353-355, 1994.

Sajantilla A, Peltonen L. *Application of PCR-amplified DNA markers in identification of individuals.* En: **PCR Technology. Current Innovations.** Griffin HG & Griffin AM, eds. CRC Press. Boca Ratón. Florida, p. 277-287, 1994.

Sandmaier BM, McSweeney PA, Yu C, Storb R. *Nonmyeloablative transplants: preclinical and clinical results.* **Seminars in Oncology** 27: 78-81, 2000.

Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, Preijers F, Hillegers M, Knops R, Pennings A, Boezeman J, Geurts van Kessel A, de Pauw B, de Witte T. *Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation.* **Leukemia** 16: 13-21, 2002.

Schmitt C, Schmutzler A, Prinz M, Staak M. *High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphism.* **Forensic Science International** 66: 129-141, 1994.

Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith FO, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID. *Selective ablation of acute myeloid leukaemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate.* **Blood** 93: 3678-3684, 1999.

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

Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, Radich J, Storer B, Bensinger WI, Soll E, Anasetti C, Bowden R, Bryant E, Chauncey T, Deeg HJ, Doney KC, Flowers M, Gooley T, Hansen JA, Martin PJ, McDonald GB, Nash R, Petersdorf EW, Sanders JE, Schoch G, Stewart P, Storb R, Appelbaum FR. *Marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation.* **Blood** 89: 3055-3060, 1997.

Slavin S, Fuks Z, Kaplan HS, Strober S. *Transplantation of allogeneic bone marrow without graft vs host disease using total lymphoid irradiation.* **Journal Experimental Medicine** 147: 963-972, 1978.

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik J, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. *Non-myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytorreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases.* **Blood** 91: 756-763, 1998.

Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. *Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era.* **Leukemia Research** 19: 497-504, 1995.

Soiffer RJ, Fairclough D, Robertson M, Alyea E, Anderson K, Freedman A, Bartlett-Pandite L, Fisher D, Schlossman RL, Stone R, Murray C, Freeman A, Marcus K, Mauch P, Nadler L, Ritz J. *CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission.* **Blood** 89: 3039-3047, 1997.

Spitzer T, MacAfee S, Sackstein R, Colby C, Toh HC, Multani P, Saidman S, Weyouth DW, Preffer F, Poliquin C, Foley A, Cox B, Andrews D, Sachs DH, Sykes M. *Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after non-myeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies.* **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 6: 309-320, 2000.

Starzl TE, Demitris AJ, Trucco M, Zeevi A, Ramos H, Terasaki P, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad S. *Chimerism and donor specific non-reactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation*. **Transplantation** 55: 1272-1277, 1993.

Storb R, Deeg HJ, Pepe M, Appelbaum F, Anasetti C, Beatty P, Bensinger W, Berenson R, Buckner CD, Clift R. *Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of a controlled trial*. **Blood** 73: 1729-1734, 1989.

Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem H-P, Leisenring W, Shulman H. *Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation*. **Blood** 89: 3048-3054, 1997.

Storb R, Yu C, Sandmaier BM, McSweeney P, Georges G, Nash R, Woolfrey A. *Mixed hematopoietic chimerism after hematopoietic stem cell allografts*. **Transplant Procedures** 31: 677-678, 1999.

Strachan T. *Organization and expression of the human genome*. En: **The Human Genome**. Read AP & Brown T, eds. Bios Scientific Publishers. Oxford, p. 1-26, 1992.

Sykes M, Eisenthal A, Sachs DH. *Mechanism of protection from graft-vs-host disease in murine mixed allogeneic chimeras. I. Development of a null cell population suppressive of cell-mediated lympholysis responses and derived from the syngenic bone marrow component*. **Journal Immunology** 140: 2903-2911, 1988.

Sykes M, Szot GL, Swenson KA, Pearson DA. *Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor specific tolerance without myelosuppressive conditioning*. **Nature Medicine** 3: 783-787, 1997.

Tanaka J, Kasai M, Imamura M, Masauzi N, Ohizumi H, Matsuura A, Morii K, Kiyama Y, Naohara T, Saitoh M, Higa T, Sakurada K, Miyazaki M. *Evaluation of chimerism and origin of bone marrow derived fibroblastoid cells after allogeneic bone marrow transplantation*. **British Journal Haematology** 86: 436-438, 1994.

Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. *Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex amplification of short tandem repeat-markers.* **Leukemia** 15: 293-302, 2001.

Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A. *Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection.* **Bone Marrow Transplantation** 23: 1055-1060, 1999.

Thiede C, Lion T. *Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection.* **Leukemia** 15: 303-306, 2001a.

Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. *Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers.* **Leukemia** 15: 293-302, 2001b.

Thomson AW, Lu L, Murase N, Demetris AJ, Rao AS, Starzl TE. *Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance.* **Stem Cells** 13: 622-639, 1995.

Ugozzoli L, Yam P, Petz LD, Ferrara GB, Champlin RE, Forman SJ, Koyal D, Wallace RB. *Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of the chimerism after bone marrow transplantation.* **Blood** 77: 1607-1615, 1991.

Urbano-Ispizua A, Rozman C, Martínez C, Marín P, Briones J, Rovira M, Féliz P, Viguria MC, Merino A, Sierra J, Mazzara R, Carreras E, Montserrat E. *Rapid engraftment without significant graft-versus-host disease after allogeneic*

transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. Blood 89: 3967-3973, 1997.

Urbano-Ispizua A, Solano C, Brunet S, de la Rubia J, Odriazola J, Zuazu J, Figuera A, Caballero D, Martínez C, Garcia J, Sanz G, Torrabadella M, Alegre A, Perez-Oteiza J, Jurado M, Oyonarte S, Sierra J, García-Conde J, Rozman C. *Allogeneic transplantation of selected CD34+ cells from peripheral blood: Experience of 62 cases using immunoadsorption or immunomagnetic technique.* Spanish Group of Allo-PBT. **Bone Marrow Transplantation** 22: 519-525, 1998.

Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, Solano C, de la Rubia J, Brunet S, Pérez-Oteiza J, Ferra C, Zuazu J, Caballero D, Carvalhais A, Díez JL, Espigado I, Martínez C, Campilho F, Sanz MA, Sierra J, García-Conde J, Montserrat E. *The number of donor CD3+ cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. Blood* 97: 383-387, 2001a.

Urbano-Ispizua A, Carreras E, Marín P, Rovira M, Martínez C, Fernández-Avilés F, Xicoy B, Hernández-Boluda JC, Montserrat E. *Allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from human leukocyte antigen-identical siblings: detrimental effect of a high number of donor CD34+ cells?. Blood* 98: 2352-2357, 2001b.

Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, Solano C, de la Rubia J, Brunet S, Pérez-Oteiza J, Ferra C, Zuazu J, Caballero D, Bargay J, Carvalhais A, Díez JL, Espigado I, Alegre A, Rovira M, Campilho F, Odriozola J, Sanz MA, Sierra J, García-Conde J, Montserrat E. *Risk factors for acute graft-versus-host disease in patients undergoing transplantation with CD34+ selected blood cells from HLA-identical siblings. Blood* 100: 724-727, 2002.

van Leeuwen JE, van Tol MJ, Bodzinga BG, Wijnen JT, van der Keur M, Joosten AM, Tanke HJ, Vossen JM, Meera Khan P. *Detection of mixed chimaerism in flow-sorted cell subpopulations by PCR-amplified VNTR markers after allogeneic bone marrow transplantation. British Journal of Haematology* 79: 218-225, 1991.

van Leeuwen JE, Van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Khan PM, Vossen JM. *Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse.* **Blood** 82: 1921-1928, 1993.

van Leeuwen JE, Van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJ, Khan PM, Vossen JM. *Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but is not associated with an increased risk of relapse.* **Blood** 83: 3059-3067, 1994.

van Tol MJ, Langlois van den Bergh R, Mesker W, Ouwerkerk-van Velzen MC, Vossen JM, Tanke HJ. Simultaneous detection of X and Y chromosomes by two-colour fluorescence in situ hybridization in combination with immunophenotyping of single cells to document chimaerism after sex-mismatched bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 21: 497-503, 1998.

van Zant G, de Haan G, Rich IN. *Alternatives to stem cell renewal from a developmental viewpoint.* **Experimental Hematology** 25: 187-192, 1997.

Vogelsang GB, Hess AD. *Graft-versus-host disease: new directions for a persistent problem.* **Blood** 84: 2061-2067, 1994.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. *Methods of creating recombinant DNA molecules.* En: **Recombinant DNA**. Scientific American Books. W. H. Freeman & Co. New York, p. 63-77, 1992.

Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. *Antileukemic effect of graft-versus-host-disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts.* **New England Journal of Medicine** 300: 1068-1073, 1979.

Weiss L, Lubin I, Factorowich Y, Lapidot Z, Reich S, Reisner Y, Slavin S. *Effective graft vs leukemia effects independently of graft vs host disease following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation in a murine model of B-cell*

leukemia/lymphoma (BCL1); role of cell therapy and rIL-2. Journal Immunology 153: 2560-2567, 1994.

Weiss L, Nagler A, Or R, Naparstek E. *Immunotherapy of minimal residual disease by immunocompetent lymphocytes and their activation by cytokines. Cancer Investigation* 10: 221-227, 1992.