UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

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

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

Barcelona, Julio de 1990

UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

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

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

Barcelona, Julio de 1990

HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
HOSPITAL UNIVERSITARI DE LA FACULTAT DE MEDICINA DE
LA UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

Av. San Antonio Mª Claret, 167
BARCELONA-25

Da. Montserrat Baiget Bastús, doctora en Farmacia, D. Andreu Domingo Albós, profesor titular de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y D. Miquel Ll. Rutllant Bañeres, profesor titular de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, como directores y ponente de la Tesis Doctoral titulada "**CONTRIBUCION DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN AL ESTUDIO DEL IMPLANTE MEDULAR Y DE LAS QUIMERAS EN EL TRASPLANTE ALOGENICO DE MEDULA OSEA**" realizada por la Licenciada Da. Salut **BRUNET MAURI**, hacen constar que dicha Tesis Doctoral está en condiciones de ser leida y juzgada.

Dra. M. Baiget Dr. M.Ll. Rutllant Dr. A. Domingo

Barcelona, 17 de Julio de 1990

521.515

Al Carles.
Al Xavier i a la Laia

AGRAIMENTS

A la Dra Montserrat Baiget, Cap de Secció de Genètica Molecular, per acceptar la co-direcció d'aquesta Tesi, pels seus valuosos consells i racionalitat a l'hora de treballar i per la seva amistat.

Al Dr Andreu Domingo-Albós, Cap de la Unitat d'Hematologia Clínica, per acceptar co-dirigir la Tesi, pels seus inestimables consells i pel seu recolzament.

Al Dr Miquel Rutllant, Cap del Servei d'Hematologia, per posar les bases necessàries per fer una Hematologia multidisciplinaria.

A la Dra Anna Aventín per haver estat, des de que vam fer la Residencia, un estímul constant en la aprofundització del coneixement de l'Hematologia, haver fet possible la realització de l'estudi citogenètic i per la seva amistat. A Montserrat Espadaler i Elisabet Moltó per la seva col.laboració tècnica.

Al Dr. Pedro Madoz per la seva desinteressada ajuda en la realització de l'estudi del fenotip eritrocitari i per la seva amistat.

A les companyes de Residencia, Dres Cristina Guanyabens i Mercé López, per tot el que vam apendre i per la seva amistat.

Al Dr Jesús Soler per la seva amistat, per fer-me partícip dels seus coneixements i per haver sigut per a mi un estímul constant de superació.

A Teresa Casals, Elisabet del Rio, Juanjo Fuentes i Nuría Godessart, per la seva ajuda técnica i a tots els qui treballen a la Unitat de Genética Molecular per la seva col.laboració i ajuda moral.

Als Drs Enric Carreras i Jordi Sierra de l'Escola d'Hematalogia Farreras Valentí i Joan Mazzara, del Servei d'Hemoteràpia de l'Hospital Clinic de Barcelona i a la Dra Badell, del nostre Hospital, per l'envio de mostres i ajuda en la recollida de dades.

Als Drs. Ramon Ayats i Angel Remacha per la seva desinteressada ajuda en la realització de l'estudi estadístic i per la seva amistat.

A Nuria Munell el meu agraïment per la seva eficiència en el treball quotidià i per la seva amistat i a la Paquita Soler per la seva ajuda, què va més enllà de la simple amistat.

Als Residents i Infermeres de la Unitat d'Hematologia Clínica per tots els moments que hem passat junts.

A Antonio Fernández i Joan Carles Nieto per la seva paciència i excel.lent treball mecanogràfic.

La meva gratitut als malalts i a les seves famílies per la seva confiança i comprensió.

Al Dr. Carles Paré, per les renúncies personals i professionals que aquest treball li ha comportat i al Xavier i a la Laia per haver aguantat tant de temps el que la mare "estigués fent tesi".

Als meus Pares per haver fet tot el possible perquè pogués estudiar.

INDICE

1 INTRODUCCION

1.1 TRASPLANTE ALOGENICO DE MEDULA OSEA 2
1.1.2 HISTORIA 2
1.1.2.1 CONCEPTO DE QUIMERA 5
1.1.3 INDICACIONES 8
1.1.3.1 LEUCEMIA AGUDA NO LINFOBLASTICA 8
1.1.3.2 LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA 10
1.1.3.3 APLASIA MEDULAR GRAVE 11
1.1.3.4 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA 12
1.1.3.5 MIELOMA MULTIPLE 14
1.1.3.6 TALASEMIA MAJOR Y OTRAS ENFERMEDADES GENETICAS 15
1.1.3.7 ENFERMEDAD DE HODGKIN 16
1.1.3.8 OTRAS 17
1.1.4 ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUESPED ... 18
1.1.4.1 FORMA AGUDA 20
1.1.4.2 FORMA CRONICA 21
1.1.4.3 EFECTO INJERTO VERSUS LEUCEMIA 23
1.1.4.4 PREVENCION 24
1.1.5 RECHAZO DEL INJERTO 30
1.1.6 COMPLICACIONES INFECCIOSAS 32
1.1.7 QUIMERAS MIXTAS 35
1.1.8 RECAIDA LEUCEMICA POST-TMO 36
1.1.9 DEMOSTRACION DEL IMPLANTE 38

1.2 MARCADORES GENETICOS EN EL ESTUDIO DEL INJERTO MEDULAR 39

1.2.1 ESTUDIO INTENSO DE LOS HEMATIES 39
1.2.1.1 ANTIGENOS ERITROCITARIOS 39
1.2.1.2 ENZIMAS ERITROCITARIOS 41
1.2.2 ALOTIPOS DE LAS INMUNOGLOBULINAS 41
1.2.3 CITOGENETICA 42
1.2.3.1 OTROS 44

1.3 LA BIOLOGIA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DEL IMPLANTE MEDULAR 45
1.3.1 LOS POLIMORFISMOS DEL ADN 45
1.3.2 TIPOS DE POLIMORFISMOS 46
1.3.3 CONTENIDO DE INFORMACION DE UN POLIMORFISMO (CIP) 48
1.3.4 DEFINICION DE POLIMORFISMO INFORMATIVO 49
1.3.5 TECNICAS DEL ADN RECOMBINANTE EN EL ESTUDIO DEL IMPLANTE MEDULAR 50

2 OBJETIVOS 62

3 PACIENTES Y METODOS 65
3.1 PACIENTES 66
3.1.1 FASE PRE-TMO 67
3.1.2 FASE POST-TMO 68
3.1.3 RECOGIDA DE MUESTRAS 69
3.1.4 DEFINICION DE IMPLANTE, QUIMERA TOTAL QUIMERA MIXTA 70

3.2 METODOS 81
3.2.1 ANTIGENOS ERITROCITARIOS 82
3.2.1.1 REACTIVOS 82

3.2.1.2 MUESTRAS PRE-TMO: PACIENTE Y DONANTE 83
3.2.1.3 MUESTRAS POST-TMO DEL PACIENTE 83
3.2.1.4 TECNICAS 85
3.2.1.5 POBLACIONES ERITROCITARIAS MENORES 88
3.2.2 ESTUDIO CITOGENETICO 92
3.2.2.1 TAMPONES Y REACTIVOS 92
3.2.2.2 RECOGIDA DE LAS MUESTRAS 93
3.2.2.3 CULTIVO CELULAR 93
3.2.2.4 SINCRONIZACION CELULAR 94
3.2.2.5 SACRIFICIO DEL CULTIVO 94
3.2.2.6 PREPARACION DE LAS EXTENSIONES 95
3.2.2.7 TECNICAS DE BANDEO 95
3.2.2.8 ANALISIS AL MICROSCOPIO 95
3.2.2.9 CARIOTIPAJE E INTERPRETACION 96
3.2.3 ESTUDIOS MOLECULARES 96
3.2.3.1 TAMPONES Y REACTIVOS 96
3.2.3.2 SONDAS EMPLEADAS 102
3.2.3.3 METODOS GENERALES PARA EL ESTUDIO DEL ADN HUMANO 102
3.2.3.4 METODOS PARA LA PREPARACION DE SONDAS 111
3.2.3.5 SENSIBILIDAD 115

3.3 CALCULOS ESTADISTICOS 115

4 RESULTADOS 119
4.1 EN LA FASE PRE-TMO 120
4.1.1 DEL FENOTIPO ERITROCITARIO EN PAREJAS DONANTE-RECEPTOR 120
4.1.2 DEL ESTUDIO CITOGENETICO 120
4.1.3 DEL ESTUDIO DE LOS FRLP 121

4.2 EN LA FASE POST-TMO 123
4.2.1 DE CADA PACIENTE 123
4.2.2 DEL ESTUDIO DEL FENOTIPO ERITROCITARIO 228
4.2.3 DEL ESTUDIO CITOGENETICO 230
4.2.4 DEL ANALISIS DE LOS FRLP DEL ADN 232
4.2.5 UTILIDAD DE LOS DISTINTOS METODOS PARA VALORAR EL IMPLANTE MEDULAR 236
4.2.6 UTILIDAD DE LOS DISTINTOS METODOS PARA VALORAR EL ESTADO QUIMERICO 237
4.2.6.1 A LOS +90 D AS 238
4.2.6.2 A LOS +180 D AS 239
4.2.6.3 CONCORDANCIA DE RESULTADOS ENTRE LOS DISTINTOS METODOS 240
4.2.7 UTILIDAD DE LOS DIFERENTES METODOS EN EL ESTUDIO DE LA RECAIDA MEDULAR 242

5 DISCUSION 274

5.1 FASE PRE-TMO 275

5.2 FASE POST-TMO 278
5.2.1 VALORACION DEL IMPLANTE MEDULAR 278
5.2.2 ESTUDIO DE LAS QUIMERAS MIXTAS 282
5.2.2.1 MEDIANTE EL ESTUDIO DEL FENOTIPO ERITROCITARIO 283
5.2.2.2 MEDIANTE EL ANALISIS CITOGENETICO 287
5.2.2.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN 294
5.2.3 RECAIDAS LEUCEMICAS 302

6 RESUMEN Y CONCLUSIONES 312

6.1 RESUMEN 313

6.2 CONCLUSIONES 318

7 BIBLIOGRAFIA 321

SF: Suero fisiológico

SP: Sangre Periférica

SP+: Sangre periférica con PHA

TA: Temperatura ambiente

TMO: Trasplante alogénico de médula ósea

V: Varón

MOTIVACION PERSONAL

Desde que inicié la Residencia en la especialidad de Hematología y a lo largo de mi dedicación a la Hematología Clínica, he podido asistir a numerosos cambios en la estrategia terapéutica a la que son sometidos los pacientes con hemopatías malignas. Uno de los hechos más importantes que han modificado sustancialmente su expectativa de vida ha sido la inclusión del TMO, alogénico o autológo, como parte principal del tratamiento. Este hecho ha puesto de manifiesto el carácter multidisciplinario de la Hematología, principalmente en áreas en las que se ha producido un extraordinario avance tecnológico.

El disponer el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de un laboratorio de Genética Molecular y ser, al mismo tiempo, un Centro de Referencia para el TMO ha propiciado el plantearse como objetivo la incorporación de la tecnología del ADN recombinante al estudio de algunas de las incógnitas que tienen lugar al realizar un TMO.

Estas incógnitas se plantean fundamentalmente por los cambios que supone el reemplazamiento del sistema linfohematopoyético del receptor por el del donante y, como consecuencia, la instauración de un estado plenamente quimérico.

Para la demostración del origen de las poblaciones celulares post-TMO, se dispone de diversos marcadores genéticos que nos permiten evaluar al paciente en las distintas etapas de su evolución. En el período inicial post-TMO es de especial interés averiguar si la médula del donante ha implantado; más adelante es importante, en la valoración de

la evolución clínica del paciente, la persistencia de quimera total o la aparición de quimera mixta, en cuyo caso, si este hecho está o no relacionado con un mayor riesgo de recaída y por último, en caso de recaída, el poder filiar su origen.

La tecnología del ADN, "ha invadido" todos los campos de la medicina, entre ellos el de la Hematología. La introducción de este método en el estudio de la clonalidad de diversas hemopatías, entre otras facetas, y su utilización en el estudio de las enfermedades genéticas está haciendo posible, además, el control y sobre todo la prevención de las mismas.

Nuestra intención, al realizar esta Tesis, ha sido valorar la contribución de esta tecnología al estudio del trasplante de médula ósea, en diversos momentos de su evolución, y las ventajas que supone su incorporación al estudio de los pacientes sometidos a TMO, con respecto a dos métodos "clásicos" del estudio de la quimera, como son el análisis del fenotipo eritrocitario y el estudio citogenético.

1 INTRODUCCION

1.1 TRASPLANTE ALOGENICO DE MEDULA OSEA (TMO)

Muchos años de investigaciones, fracasos y adelantos han surcado las vidas de muchos colegas que, dedicando su profesión al estudio de los mecanismos de histocompatibilidad en el hombre y al desarrollo de tratamientos inmunosupresores, han hecho posible la plena consolidación del TMO como terapéutica de las hemopatías malignas.

1.1.2 HISTORIA

El objetivo del tratamiento del cáncer es la erradicación de las células malignas. La cantidad de células exterminadas depende de la sensibilidad de las células y de la dosis de quimio o radioterapia administrada. Para la mayoría de modalidades terapéuticas el factor dosis limitante más importante es la mielosupresión. Esto implica que, en la mayoría de casos, sea imposible dar el máximo de dosis deseable, puesto que los pacientes podrían fallecer a causa de la aplasia medular y complicaciones asociadas tales como hemorragias e infecciones.

Los primeros intentos de utilización terapéutica de la médula ósea datan de 1891, realizados por Brown-Sequard d'Arsonaval (Quine 1896), al tratar pacientes con anemia mediante la administración de médula ósea por via oral. Schretzenmayr (1937), fué el primero que administró médula ósea mediante una técnica que podría haber hecho posible su implantación en el receptor. Administró la médula ósea autóloga o alogénica por vía intramuscular a pacientes que

tenían anemia por malaria e infecciones helmínticas. A pesar de los alentadores resultados, estos hechos no despertaron en la época muchas expectativas. De acuerdo con Migdalska (1958), fué Rasjek en 1939 el primero que realizó un injerto medular en un paciente con anemia perniciosa y leucemia linfática. Los primeros detalles técnicos fueron publicados por Morrison et al (1940), los cuales describieron la recuperación de un paciente con anemia aplástica grave despues de recibir tres inyecciones de médula ósea aspirada a su hermano, totalizando un total de 13 ml de médula. Osgood et al (1939) fueron los primeros en publicar la utilización de la vía intravenosa como método de infusión de médula ósea viva en un paciente con anemia aplástica grave. El intento fué infructuoso y en todos los casos descritos no hubo ningún implante. Estos hechos tuvieron lugar antes de que se tuviera conocimiento del sistema de histocompatibilidad en humanos y de la necesidad de tratamiento con inmunosupresores.

Los sucesos de Alamogordo, Nuevo Mexico el 16 de Julio de 1945, supusieron un nuevo estímulo en la investigación del TMO. En este centro se investigaron los resultados de la aplicación de la irradiación corporal total (ICT) en animales a diferentes dosis. Los primeros datos demostraron la existencia de tres síndromes letales con la utilización de ésta forma de tratamiento: síndrome de la médula ósea (aplasia medular con infección y hemorragia) a una dosis de 500-700 rads, síndrome intestinal (daño intestinal con pérdida de fluidos y electrolitos) a la dosis de 1200-10000 rads y un síndrome cerebral (daño del sistema nerviosos central con temblores y funciones incontroladas del sistema

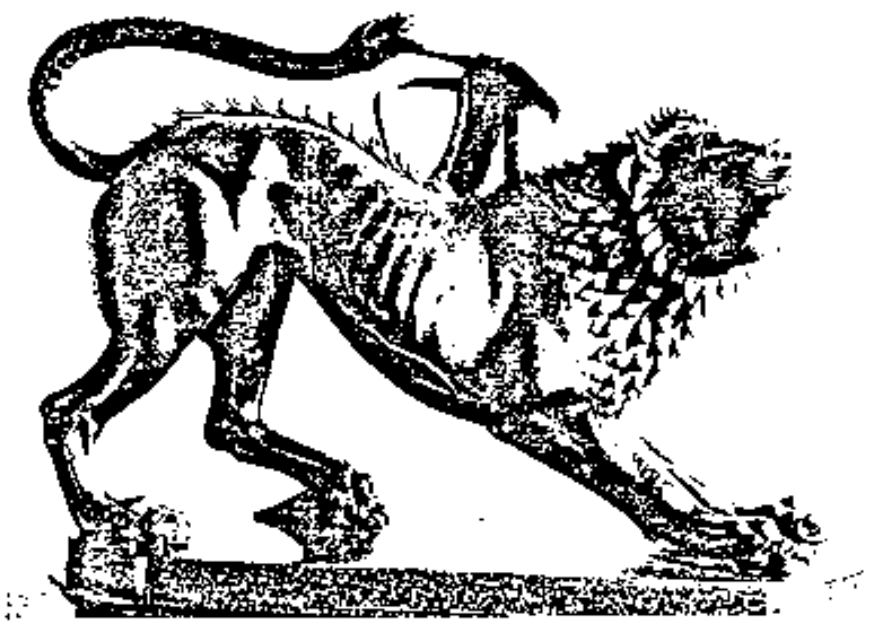
simpático y parasimpático) a la dosis de 12000-1000000 rads. En 1949 Jacobson et al observaron que los ratones irradiados con dosis mas altas que aquellas que implicaban aplasia medular, pero más bajas que las que ocasionaban un síndrome intestinal letal, podían sobrevivir si se les protegía el bazo, o si alternativamente se trasplantaba o bien el bazo o bien células esplénicas al ratón irradiado. Estos experimentos fueron realizados exteriorizando el bazo, para permitir la protección adecuada frente a la irradiación. A veces ocurría que el bazo quedaba infartado, pero el animal quedaba protegido frente a la irradiación. Con notable intuición Jacobson et al en 1951 concluyeron que los bazos infartados eran probablemente equivalentes a un autotrasplante de bazo y publicaron que la implantación de un bazo autólogo no irradiado, despues de la ICT, tenía un efecto terapéutico similar. Además, fueron capaces de demostrar que la inyección intraperitoneal de suspensión de células singénicas era terapéuticamente efectiva. En el mismo año Lorenz et al (1951), demostró que los ratones y cobayas podían ser protegidos mediante la administración parenteral de médula singénica siguiendo ICT. En publicaciones posteriores (Lorenz et al, 1952; Lorenz et al, 1954), demostraron la eficacia terapéutica de suspensiones de médula ósea alogénica o xenogénica al valorar la supervivencia a los 20 o 30 días.

Inicialmente Jacobsen (1952) pensó que el factor protector era humoral. Sin embargo en 1956, algunos laboratorios demostraron, con una amplia gama de marcadores genéticos, que el factor de protección frente a la irradiación letal era debido a la colonización de la médula del receptor por

células del donante (Lindsley et al 1955; Ford et al 1956; Mitchison, 1956).

1.1.2.1 CONCEPTO DE QUIMERA

En la mitología griega Quimera era la descendiente de Equidna y Tifón. De acuerdo con una descripción, tenía la frente de un león, el cuerpo de una cabra y la espalda de una serpiente.



Quimera, la criatura mitológica griega

Hesíodoro la describe con tres cabezas y vomitando fuego;

una cabeza era la de un ceñudo león, otra la de una cabra y la tercera la de una serpiente. Siempre se consideró como la encarnación de las fuerzas físicas destructivas que, además, devoraba hombres y animales. Amisodaro, Rey de Caria la persiguió. Cuando Yobates, rey de Licia, quiso, a petición de su yerno, deshacerse de Belerofontes, le encargó que matase a la Quimera. Con la ayuda del caballo alado, Pegaso, Belerofontes consiguió introducir en la garganta de la bestia un trozo de plomo. Fundido el plomo, por el calor de la llama de la Quimera, le abrasó las entrañas.

Científicamente, el término quimera se utiliza para designar un organismo cuyo cuerpo contiene poblaciones celulares derivadas de individuos de la misma o diferente especie, lo cual puede ocurrir de manera espontánea o bien puede ser producida artificialmente. Se han observado quimeras sanguíneas que ocurren de manera natural en algunos gemelos dizigotos de ciertas especies de ganado, cordero, y tambien en humanos (Gill, 1977).

El término "quimera de irradiación" fué introducido por Ford et al (1956), para designar a un animal que tiene un sistema hematopoyético extraño, como resultado de ICT, seguido de trasplante de células hematopoyéticas derivadas de otro animal. Es difícil establecer exactamente cuando se produjeron las primeras quimeras de irradiación, puesto que la investigación en este campo no fué reconocida como tal hasta 1955. Posteriormente, el término irradiación fué retirado, puesto que las quimeras pueden producirse por muchas vías. Pronto se demostró que se podían producir quimerismos en ratones, cobayas, conejos, perros, monos y

en el hombre. Además, se estableció que la administración intravenosa de células de la médula ósea, era el camino más efectivo para establecer un estado quimérico despues de ICT y que el número de células alogénicas requeridas para la óptima reconstitución hematopoyética era de 10-80 veces la requerida por médulas singénicas (van Beckkum, 1967). Rápidamente se observó que esto era cierto para la irradiación, pero no lo era necesariamente para otras formas de tratamientos ablativos-inmunosupresores (Santos, 1968), sugiriendo que la ICT no era totalmente inmunosupresora, aún utilizando las dosis máximas toleradas.
La estabilidad y el conseguir un estado plenamente quimérico parece estar relacionado directamente a la dosis de ICT empleada. Aunque la mayoría de animales sometidos a TMO, depues de dosis supraletales de irradiación, son quimeras linfohematopoyéticas completas, unos pueden perder su estado quimérico y otros tener recuperación parcial y coexistir como quimeras mixtas (van Bekkum, 1967). Trabajos recientes (Branch et al, 1982, Roy et al 1990), demuestran que en el hombre pueden existir células linfohematopoyéticas del receptor, en una minoría de casos durante largo tiempo, a pesar de TMO seguido de altas dosis de quimioterapia y dosis letales de irradiación.
Thomas et al, (1957) demostraron que se podian infundir grandes cantidades de médula ósea sin problemas y describieron un implante transitorio en un hombre. En 1959, Mathé intentó, sin éxito, el tratamiento con TMO a las seis víctimas de un accidente en una central nuclear de Yugoslavia y en 1963 describió el primer TMO en un paciente con leucemia que sobrevivió 6 meses. En 1968, Gatti (1968)

publicaba el primer TMO con exito en un niño con inmunodeficiencia congénita. Simultáneamente Thomas et al iniciaban la era "moderna" del TMO en Marzo de 1969, al realizar, tambien con exito, un TMO alogénico (Thomas, 1971).

1.1.3 INDICACIONES

El trasplante de médula ósea no es un último y desesperado esfuerzo para salvar pacientes con enfermedad avanzada. Hasta 1975 los TMO se llevaron a cabo en pacientes con leucemia aguda (LA) en recaída o refractarias a la quimioterapia convencional (Thomas et al 1977). En 1990, el trasplante de médula ósea (tanto alogénico como autólogo), es una modalidad terapéutica bien establecida, la cual puede representar el tratamiento de elección en un paciente dado, y así, debe formar parte de la planificación terapéutica global del paciente. Los resultados dependen de una serie de factores tales como la edad, estadío de la enfermedad, histocompatibilidad, edad del posible donante, y condición clínica global del paciente.
En la Tabla 11.1 se exponen la lista de diagnósticos para los cuales el TMO alogénico es hoy una posiblidad terapéutica.

1.1.3.1 LEUCEMIA AGUDA NO LINFOBLASTICA

Los pacientes con leucemia aguda no linfoblástica (LANL)

que dispongan de un donante histocompatible, tienen mejor pronóstico si son sometidos a TMO en 1ª remisión completa (RC), (Thomas et al, 1983; Clift et al, 1987; Santos, 1989). Se han publicado supervivencias libres de enfermedad en el 45-57% de los pacientes a los 2-5 años despues del TMO; mientras, las recaídas post TMO oscilan entre el 0% y el 30% (Clift et al, 1987; Gratwhohl et al, 1986; Blume et al, 1983; O'Reilly et al, 1987; Santos et al, 1986; Bostrom et al, 1985). El exito del TMO en la RC parece estar relacionado con la edad. Tanto los datos del grupo de Seattle, como del Memorial Sloan-Kettering, el Working Party on Leukemia, European group for Bone Marrow transplantation, así como los del International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR), están de acuerdo en que los pacientes menores de 25 años, sobreviven significativamente más que los mayores de 25 años (Thomas et al, 1983b; Dinsmore et al, 1984; Hurd, 1987, Gratwhol et al, 1988). Diversos grupos han comparado los resultados del tratamiento en la LANL con quimioterapia en aquellos pacientes que no disponían de donante histocompatible versus TMO en 1ª RC. En la mayoría de casos, si bien se ha discutido la metodología utilizada al analizar los resultados, los datos muestran una mayor probabilidad de permanecer en remisión para aquellos pacientes sometidos a TMO en 1ª RC (Champlin et al, 1985; Appelbaum et al, 1984; Appelbaum et al, 1988). Si el TMO no puede llevarse a cabo en 1ª RC, es preferible realizarlo en 1ª recaída precoz a realizarlo en 2ª RC (Buckner et al, 1988).

1.1.3.2 LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA

Los primeros TMO, en pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAL), se realizaron en pacientes con enfermedad avanzada resistente, que no habían respondido a la quimioterapia convencional (Gale et al, 1983). El tratamiento con dosis altas de ciclofosfamida e irradiación corporal total, seguido de TMO alogénico dió como resultado una supervivencia prolongada del 10-20% de pacientes. La principal causa de fracaso del tratamiento fué la recidiva de la enfermedad, con probablidades de recaída superiores al 60%. Ademas, un 25-35% de los pacientes fallecieron de complicaciones relacionadas con el procedimiento, como son la enfermedad del injerto contra el huesped (EICH) o la neumonía intersticial. Con todo, el TMO es superior a las otras alternativas quimioterápicas en pacientes refractarios al tratamiento. Posteriormente, estos resultados mejoraron al realizarse el TMO en 1ª o subsecuentes RC (Champlin et al, 1987a; Dinsmore et al, 1983; Gale et al, 1983, Johnson et al, 1981; Johonson et al, 1987; Woods et al, 1983; Gratwhool et al, 1988). Los pacientes sometidos a TMO alogénico en 1ª o 2ª RC tienen una probabilidad de recaída más baja, aproximadamente un 30% y entre un 30-50% de los pacientes están vivos a los 2-4 años. El TMO en niños con LAL de riesgo standard no debe ser considerado en 1ª RC dado que con quimioterapia se obtienen exelentes resultados (Champlin et al, 1989). Diversos estudios comparando quimioterapia convencional versus TMO alogénico en 2ª o subsecuentes remisiones en niños, adolescentes y adultos indican mejores resultados y supervivencias libres de enfermedad menores

del 10% frente al 30%, con TMO (Johnson, et al 1981; Woods et al, 1983; Thomas et al, 1983a). Estos datos indican una clara ventaja del TMO en 2ª RC para los pacientes que presentan recaída medular mientras recibian tratamiento de mantenimiento, especialmente en aquellos que recaen durante los primeros 18 meses (Champlin et al, 1987a). En cambio, los pacientes que recaen una vez finalizado el tratamiento o presentan recaída extramedular tienen mejor pronóstico con quimioterapia. En este caso no está claro que el TMO mejore la supervivencia (Champlin et al, 1987a). La recaída leucémica sigue siendo el principal problema del TMO en la LAL, con una incidencia del 30%. Diversas terapéuticas pre y post TMO se utilizan actualmente, para intentar disminuir el índice de recaídas (Sullivan et al, 1986; Tutschka et al, 1987; Coccia et al, 1988;), pero hasta ahora los resultados no son concluyentes.

1.1.3.3 APLASIA MEDULAR GRAVE

El TMO es una terapéutica efectiva para la aplasia medular (AA) grave y es considerado el tratamiento de elección para pacientes jóvenes que dispongan de un donante histocompatible (Bortin et al, 1981; Camitta et al, 1982; Champlin et al, 1987). Estudios recientes muestran que un 55-80% de los pacientes pueden ser curados con el TMO (McGlave et al, 1987; Devergie and Gluckman, 1982; Anasetti ert al, 1986; Storb et al, 1986). El TMO debe realizarse tan pronto como sea posible, despues del diagnóstico para evitar la sensibilización del receptor a las múltiples transfusiones,

que por otra parte necesita. El fallo del implante es una de las principales causas de mortalidad en el TMO alogénico. Ocurre en un 5-60% de pacientes, según los diversos regímenes de tratamientos inmunosupresores utilizados tanto en el pre como en el post-TMO (Storb et al, 1983; Deeg et al, 1986; Champlin et al, 1989a). Champlin et al (1989a) analizaron las causas del fracaso del implante y encontraron que la utilización de ciclofosfamida como tratamiento de acondicionamiento, asociado a las transfusiones previas al TMO incrementaba el riesgo de fracaso del implante, mientras que éste se reducía en aquellos casos que recibieron corticoesteroides antes del TMO. Los principales factores asociados a una disminución del riesgo de fallo de implante fueron: la utilización de radioterapia como tratamiento pre TMO, el tratamiento con ciclosporina (CSA) más que con methotrexate (MTX) o la depleción de las células T del donante como profilaxis de la EICH. Ni el número de células infundidas ni la administración de "buffy coat" afectaron a la capacidad del implante. En cuanto a la supervivencia, la utilización de la radioterapia no la mejoró, mientras que el tratamiento post-trasplante con ciclosporina y el evitar las transfusiones pre-TMO implicó una mejor supervivencia.

1.1.3.4 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC)

La única posibilidad, actualmente, de curar la LMC es con la utilización de dosis supraletales de quimioradioterapia seguido de TMO durante la fase crónica. Los primeros TMO se

realizaron en pacientes en crisis blástica (CB), pero la mayoría fallecieron de recaída leucémica o de causas relacionadas con el TMO (Storb et al, 1983a). Posteriormente, se iniciaron estudios de TMO en fase crónica en pacientes que disponían de donante univitelino, con muy buenos resultados (Fefer et al, 1982). Desde entonces se han descrito varios estudios sobre pacientes sometidos a TMO los cuales muestran supervivencias a los 2 años del orden del 60, 30 y 15% para el TMO, en la fase crónica, en la de aceleración y en la de CB respectivamente (Clift et al 1982; Champlin et al, 1982). Datos recientes del Registro Internacional, aún no publicados, señalan una caida de estas cifras al 40% a los 4 años para el TMO en la fase crónica y a menos del 20% en la fase de aceleración (Cervantes, 1990). Uno de los principales problemas que se plantean ante un paciente con LMC, que dispone de un donante de médula, es determinar cuando debe realizarse el TMO. Si bien el grupo de Seattle observó una correlación inversa entre el intervalo de tiempo hasta el momento del trasplante en fase crónica y la probabilidad de supervivencia tras el mismo (Thomas et al, 1986), tal extremo no se ha confirmado en un análisis más amplio del Registro Internacional de Trasplante de Médula Osea (Goldman et al, 1986). Es necesario valorar los factores de mal pronóstico, así como los factores de riesgo para el TMO para intentar encontrar el momento adecuado para llevarlo a cabo. Recientemente, se ha intentado conjugar ambos tipos de datos en un programa computerizado, al objeto de disponer de una aproximación matemática al problema de la elección para el TMO en cada enfermo (Simon et al, 1988).

Los pacientes con LMC, trasplantados en fase crónica, que sobreviven a los primeros meses del TMO pueden considerarse curados. No obstante, existe una posibilidad de recaída del 19% a los 4 años (Thomas et al, 1986; Goldman et al, 1988). La elevada mortalidad del TMO en la LMC ocurre sobretodo a corto plazo y obedece fundamentalmente a dos complicaciones: La EICH y la neumonía intersticial (Goldman et al 1986; Thomas et al, 1982). Dicha mortalidad aumenta en los pacientes mayores de 20 años y tiene que ver tambien con el tipo de donante utilizado, particularmente desfavorable cuando la donante es mujer multípara, debido a la mayor incidencia de EICH. Se han intentado modificaciones en la estrategia del TMO (Goldman et al, 1988; Storb et al, 1986), sin que se haya mejorado la supervivencia, puesto que al disminuir la mortalidad por EICH ha aumentado el índice de recaídas.

1.1.3.5 MIELOMA MULTIPLE (MM)

Aunque la mayoría de pacientes con MM tienen más de 50 años, esta enfermedad tambien puede presentarse en pacientes jóvenes que, caso de disponer de un donante histocompatible, pueden beneficiarse del TMO. El primer TMO se realizó en un paciente con donante gemelo univitelino (Osserman et al 1982). En este caso el paciente recayó a los 18 meses, pero se puso de manifiesto la posibilidad de conseguir una larga remisión en pacientes con mieloma multiple. Posteriormente, se publicó otro caso de TMO singénico, que recayó a los 3 años (Wolff et al, 1987). El

European Group for Bone Marrow transplantation publicó (Gahrton et al, 1987) los resultados obtenidos en 14 pacientes acondicionados de acuerdo con el protocolo de Seattle modificado (Thomas et al, 1977). De estos pacientes, 10 han sobrevivido entre 6 y 34 meses, 4 fallecieron, 2 de recaída, 1 de EICH severa y 1 de hemorragia gastrointestinal (Gahrton et al 1987). Es difícil decidir, a partir de estos casos, el momento óptimo de practicar el TMO, pero se puede deducir que pacientes refractarios al tratamiento convencional, con mieloma IgD y con un alto índice de incorporación de timidina marcada serían candidatos a TMO, si se dispone de un donante.

1.1.3.6 TALASEMIA MAJOR Y OTRAS ENFERMEDADES GENETICAS

Durante los últimos 25 años se ha reconocido que el TMO constituía una terapéutica efectiva para las enfermedades hereditarias. El objetivo sería destruir la médula genéticamente anormal y reemplazarla por otra normal, de otro individuo. Ha habido una cierta resistencia a utilizar el TMO, que tiene una morbilidad y mortalidad, no despreciables, puesto que la mayoría de los pacientes con enfermedades genéticas pueden vivir algunos años con tratamiento sintomático. En 1982, Thomas publicó los resultados del primer paciente sometido a TMO. Posteriormente, otros grupos, sobretodo los italianos que tienen en Sicilia la mayor concentración mundial de talasemia major, demostraron que el TMO producía largas supervivencias libres de enfermedad y que este tratamiento es, hasta la actualidad, la

única forma de erradicar la enfermedad. Lucarelli et al (1985) publicaron los resultados en 30 pacientes con ß-talasemia homozigota con edades que oscilaban entre los 6 meses y los 7 años y acondicionados con busulfan y ciclofosfamida. La supervivencia actuarial fué del 86% y la supervivencia actuarial libre de enfermedad del 73%. Datos más recientes indican que si el TMO se realiza antes de los 16 años existe una alta probabilidad de supervivencia libre de enfermedad, siempre y cuando no exista hepatomegalia ni fibrosis portal (Lucarelli et al 1990).
Existe una larga y creciente lista de enfermedades genéticas susceptible de TMO alogénico. (Rappeport et al, 1983).

1.1.3.7 ENFERMEDAD DE HODGKIN (EH)

Con la utilización de quimioterapia convencional, tipo MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, procarbazina y prednisona) sola o combinada con AVBD (adriamicina, vinblastina, bleomicina y dacarbazina), la mayoría de pacientes con EH pueden ser curados. Sin embargo, hay pacientes que recaen y existen pacientes resistentes a la quimioterapia incluso a tratamientos de tercera línea. El autotrasplante de médula ósea ha mostrado ser muy efectivo cuando han fracasado las demás estrategias terapéuticas (Jagannath et al, 1986). La experiencia de TMO alogénico en EH es escasa. El grupo de Seattle publicó, en 1985, los resultados en 8 pacientes resistentes a la quimioterapia convencional. De los 8 pacientes, 2 permanecen vivos a los 38 y 39 meses post TMO. Los 6 pacientes restantes fallecieron por recaí-

da, en 2 casos y por causas relacionadas con el TMO en 4 casos (Appelbaum et al, 1985). La ventaja de este procedimiento es que la médula ósea a infundir está libre de posible contaminación por EH, si bien debe tenerse en cuenta la mortalidad inherente al alotrasplante. El objetivo, en ésta enfermedad, es la intensificación de la quimioterapia con autotrasplante de médula ósea como medida de soporte, cuando fracasa el tratamiento convencional.

1.1.3.8 OTRAS

Muchas otras enfermedades son susceptibles de TMO alogénico. Las indicaciones, probablemente, aumentarán en cuanto se avance en el control de una de sus más serias limitaciones, la EICH. Entre las enfermedades malignas destacan los síndromes linfoproliferativos crónicos tipo LLC y macroglobulinemia de Waldenstrom. Recientemente, el European Bone Marrow Transplantation Group ha publicado los resultados del TMO en pacientes con LLC, que incluye un caso sometido a TMO por nuestro grupo (Michallet et al 1988), destacando la buena tolerancia, la escasa incidencia de EICH y los buenos resultados, si bien el nº de pacientes es escaso. Además, nuestro grupo practicó, hace 9 meses, un TMO alogénico a una paciente con enfermedad de Waldenström resistente (Domingo-Albós et al 1990) con muy buena respuesta.

Tambien son candidatos a TMO alogénico los pacientes jóvenes con síndrome mielodisplásico que posean un donante histocompatible (Belanger et al, 1988) y aquellos con

hemoglobinuria paroxística nocturna (Antin et al, 1985).

1.1.4 ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUESPED

El objetivo del TMO es el reemplazamiento de las células linfohematopoyéticas del receptor por células del donante. Así, en contraste con el trasplante de órganos sólidos donde el sistema inmune del receptor sigue activo y el objetivo es evitar la reacción de las células del receptor contra el órgano trasplantado, en el TMO alogénico la dirección es básicamente la inversa. Aunque una médula ósea también puede ser rechazada, una vez se ha conseguido el implante, el organismo del receptor es "invadido" por el sistema inmune del donante. En consecuencia, las complicaciones potenciales son las que aparecen al reaccionar las células del donante contra los tejidos y órganos del receptor.

A pesar de que la EICH es una de la principales complicaciones en el post TMO, su existencia no fué renocida hasta al cabo de unos años de trabajos en el campo del TMO experimental. En los inicios del TMO no se había contemplado la EICH como una complicación esperada (VanBeckum and de Vries, 1967). La primera publicación sobre la existencia de la llamada "enfermedad secundaria" fué la de Barnes y Loutit (1954), que describieron que la mayoría de ratones que habían recibido infusiones de células esplénicas alogénicas y que habían sobrevivido más de 30 dias, fallecían antes de los 100 días de la irradiación. En contraste, los ratones a los que se les había infundido

células singénicas esplénicas no presentaban problemas. Este síndrome que producía mortalidad retrasada se denominó inicialmente "enfermedad secundaria" para diferenciarla de la que ocurría como consecuencia de la irradiación. Despues de un período de intensas investigaciones se llegó a la conclusión de que la "enfermedad secundaria" era una reacción inmunológica del injerto contra el receptor. En 1966 Billingham enumeró los requerimientos esenciales para el desarrollo de EICH:

a) El implante debe contener células inmunocompetentes.
b) El receptor tiene que expresar relevantes antígenos de histompatibilidad que no están presentes en el donante y, en consecuencia, es capaz de estimularlo inmunológicamente.
c) El receptor tiene que ser inmunológicamente deficiente, esto implica que sea incapaz de provocar una respuesta inmune que podría dar lugar a la destrucción de las células infundidas.

A mediados de los años 70 se evidenció que los linfocitos T jugaban un papel muy importante en la EICH. Posteriormente, ya en la década de los 80, diversos estudios conceden un papel importante a las células supresoras. En este sentido, se ha demostrado la ausencia de células supresoras no específicas, en el post TMO inmediato, en pacientes con o sin EICH agudo y en largos supervivientes sin EICH crónica, mientras que dichas células están presentes en muchos pacientes con EICH crónico. Hoy se admite que las células supresoras no específicas están asociadas con la presencia de EICH, especialmente en su forma crónica, mientras que las células supresoras específicas, posiblemente por la

mediación del aborto clonal, están implicadas en el desarrollo de tolerancia al trasplante (Deeg et al, 1988).

1.1.4.1 ENFERMEDAD AGUDA DEL INJERTO CONTRA EL HUESPED

La EICH, en su forma aguda, aparece normalmente entre las 2-10 semanas post TMO. Si bien los criterios de clasificación son los establecidos por el grupo de Seattle (Glucksberg et al, 1974), a lo largo del tiempo se han ido incluyendo algunas modificaciones, tales como el contemplar la fiebre y retención de líquidos como parte de la EICH hiperaguda que aparece sobre todo en pacientes sometidos a TMO no compatible. El inicio de la enfermedad viene marcado usualmente por la aparición de un eritema maculopapular que afecta a la cara, las palmas de las manos y las plantas de los pies. Posteriormente, se extiende y puede afectar a todo el cuerpo. Pueden formarse bullas. Simultáneamente o subsecuentemente, la bilirrubina aumenta con una elevación de las fosfatasas alcalinas y de las transaminasas. Puede haber tambien naúseas y vómitos, junto con diarrea acuosa o sanguinolenta y dolor abdominal. La clasificación histológica se resume en la Tabla 11.2. Aunque la mortalidad directa relacionada con la EICH es escasa, entre un 5-10% de los pacientes fallecerán a consecuencia de las complicaciones asociadas. Los datos recientes del registro Internacional del Trasplante de Médula Osea indican que entre un 20-80% de los receptores de un TMO histocompatible sufrirán una EICH aguda moderada o grave (Gale et al, 1987). Las razones de esta variabilidad en su incidencia

son difíciles de establecer y probablemente reflejan algunos factores, tales como la selección de pacientes, diferencias en el diagnóstico y en el grado de EICH, en las medidas profilácticas y en la variabilidad al reportar la causa del fracaso del tratamiento. De 2036 pacientes analizados, la EICH aguda moderada o grave se presentó en un 45 ± 2%, independientemente de la prevención utilizada. El factor adverso más importante para la aparición de EICH agudo, fue el hecho de que el donante fuera mujer y multípara en receptores de sexo masculino y tambien el ser donante de sexo femenino en receptores de sexo masculino en comparación con otras combinaciones de igual sexo. El tratamiento de la EICH establecida es difícil y viene condicionado por la extensión de la enfermedad. Entre los fármacos utilizados en los grados II-IV destacan los corticoesteroides a altas dosis, globulina anti-timocítica (Storb et al, 1974; Doney et al 1981), ciclosporina A o anticuerpos monoclonales. Es de destacar que todas las opciones terapéuticas son inmunosupresoras. Es decir, si a pesar del tratamiento profiláctico se desarrolla una EICH, aparece un estado profundo de inmunosupresión. Con todas las modalidades terapéuticas se obtienen aproximadamente un 30% de respuestas que permiten controlar el proceso. Un dato muy importante en el manejo de estos pacientes es la hiperalimentación y el control estricto de las infecciones.

1.1.4.2 ENFERMEDAD CRONICA DEL INJERTO CONTRA EL HUESPED

La EICH crónica aparece usualmente a partir de los 3 meses

post-TMO y difiere de la forma aguda en la distribución de los órganos diana y la presentación clínica. La mayoría de pacientes desarrollan previamente EICH aguda. Los síntomas pueden presentarse, ya sea como una progresión extensa de EICH agudo o siguiendo un periodo quiescente despues de la resolución de EICH aguda. Sin embargo, un 20-30% de pacientes presentarán la enfermedad de "novo". Diversos estudios muestran que este último grupo de pacientes tiene mejor pronóstico. El espectro de manifestaciones clínicas de la EICH crónica recuerda al de las enfermedades del colágeno, tales como escleroderma, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, liquen plano, cirrosis biliar primaria y artritis reumatoidea. Sin embargo, a diferencia de estas enfermedades, la afectación renal es rara. En la Tabla 11.3 se detalla la clasificación clinicopatológica, de acuerdo con el grupo de Seattle (Shulman et al, 1980). La alteración inmunológica, en pacientes con EICH, predispone a la aparición de infecciones tardías, la mayoría por bacterias encapsuladas. La Neumonía intersticial, que aparece a partir del día +100 post-TMO, ocurre casi exclusivamente en pacientes con EICH crónica.

En un reciente estudio un 19% de pacientes con larga supervivencia y con EICH aguda previa, grados 0-I, desarrollaron EICH crónica, comparado con el 57% de supervivientes con EICH aguda, grados II-IV. Si en el curso de una revisión practicada aproximadamente en el día +100, aparece una biopsia de piel o mucosa positiva, este hecho tiene un valor predictivo, pues implica que en el caso de que éste sea el único signo de EICH crónica (EICH subclínica), existe un 70% de posibilidades de desarrollarla meses despues

(Sullivan et al, 1981).

El pronostico en pacientes, que tienen la forma limitada, es normalmente muy bueno, pero es desfavorable en aquellos con enfermedad extensa no tratada. Además, tiene mucho mejor pronóstico la EICH de novo, que la EICH progresiva a partir de EICH aguda, mientras que la EICH con inicio quiescente (que aparece despues de la completa resolución de EICH aguda), tiene un pronóstico intermedio.

Anteriormente, el tratamiento de la EICH crónica era poco satisfactorio. Actualmente, los tratamientos con ciclosporina y corticoides o la combinación de azatioprina más corticoides han demostrado su efectividad en el control de la EICH crónica (Sullivan et al, 1988; Sullivan et al, 1988a). Recientemente, se ha ensayado la Talidomida como tratamiento de EICH crónica (Vogelsang et al 1988). Las medidas generales incluyen tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol, lágrimas artificiales y cremas antisolares protectoras (Sullivan et al, 1982).

1.1.4.3 EFECTO INJERTO VERSUS LEUCEMIA

Hace más de 30 años que se demostró que la médula trasplantada era capaz de destruir células tumorales residuales en el ratón letalmente irradiado (Barnes y Loutit, 1956). Se ha sugerido que la EICH podría ser utilizada contra la leucemia en la llamada "inmunoterapia adoptiva". Se ha publicado, además, la desaparación de la leucemia durante episodios de EICH en humanos (Odom et al, 1978). Estudios previos han demostrado que la probabilidad de recaída leu-

cémica post-TMO era 2,5 veces menor en pacientes con EICH aguda, grados II-IV (Butturini et al, 1987; Sullivan et al, 1981). Por otra parte, la incidencia de recaídas leucémicas es 2 veces mayor en aquellos pacientes sometidos a TMO singénico (Gale, 1982). Así mismo, la EICH crónica ha demostrado un efecto antileucémico, sobre todo en pacientes trasplantados en recaída (Weiden et al, 1981). Sin embargo, el incremento de la efectividad antitumoral asociada a la EICH ha sido contrarrestada por el aumento de la mortalidad asociada a la misma. Los intentos de utilizar el efecto antitumoral de la EICH como modalidad terapéutica no han mostrado efectividad (Sullivan et al 1989). Muy recientemente, Hill et al (1986) han publicado un estudio en pacientes con aplasia medular grave, acondicionados sólo con quimioterapia, que demuestra que la presencia de quimeras mixtas se asocia a un mayor riesgo de rechazos del implante y a una menor incidencia de EICH. En este trabajo se valora que el efecto injerto versus leucemia, observado en pacientes con LA sometidos a TMO, podría deberse a que las celulas leucémicas residuales solas o bien con otros elementos del receptor serían capaces de suprimir la reacción injerto contra receptor. El objetivo sería modular la reactividad donante-receptor para lograr un menor índice de recaídas leucémicas y de rechazos en aplasias graves.

1.1.4.4 PREVENCION

Desde el punto de vista teórico, una manera de evitar la EICH sería tratar la médula ósea que va a ser trasplantada,

mientras todavía reside en las cavidades medulares del donante. Se ha realizado algún intento clínico, pero los resultados no mostraron ninguna ventaja sobre los métodos estándares (Deeg et al, 1988).

CON FARMACOS

Basados en trabajos de investigación animal, la mayoría de estudios clínicos han utilizado el tratamiento post-TMO del receptor con agentes inmunosupresores. Hasta la actualidad, los 2 fármacos más utilizados son el MTX y la CSA. La administración de MTX a bajas dosis, de manera intermitente durante 3 meses, o de CSA sola o en combinación con el MTX ha demostrado ser un método efectivo para combatir la gravedad de la EICH (Tutschka et al, 1983; Storb et al, 1986; Storb et al, 1986a; Storb et al, 1987) tanto en pacientes con LA como en pacientes con AA. En los seguimientos efectuados entre los 3-4,5 años en pacientes con leucemia, aleatorizados para recibir tratamiento con MTX más CSA versus CSA sola, se ha podido demostrar una menor incidencia de EICH aguda en los pacientes que tomaron MTX y CSA, mientras que la de la EICH crónica fué idéntica en ambos grupos. Asímismo, en pacientes con LMC, la incidencia de recaídas fué igual en ambos grupos mientras que ésta fue mayor (29% versus 16%) en los pacientes con LANL (Storb et al, 1989), sin llegar o observarse diferencias estadísticamente significativas. En el grupo de pacientes con AA, el seguimiento, con un mínimo de 3 años, ha demostrado también una menor incidencia de EICH aguda en los pacientes tratados con MTX más CSA, mientras que la de EICH crónica fué más alta en el grupo con MTX más CSA (Storb et al,

1988). El grupo de City Hope encontró una incidencia del 28% de EICH cuando los pacientes eran tratados con CSA más prednisona (Forman et al, 1987). Otro de los fármacos utilizados para la prevención de la EICH es la globulina antilinfocítica. Ramsay et al, (1982), encuentra una incidencia de un 21% de EICH versus un 48% en un grupo control tratado únicamente con MTX.

Una de las cuestiones más importantes a responder era la necesidad del tratamiento inmunosupresor para prevenir la EICH. Un estudio realizado por Lazarus et al (1984), reveló una incidencia de EICH similar para los pacientes tratados con MTX versus aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento profilactico. De igual manera, un estudio del Dana Farber Cancer Center demostró una incidencia un poco más alta de EICH, entre un 60-70%, tanto en aquellos pacientes tratados con pauta corta de MTX como en los que recibieron la pauta de 3 meses. El grupo de Seattle (Sullivan et al, 1986), realizó un análisis comparativo en pacientes menores de 30 años sometidos a TMO histocompatible y demostró una incidencia de un 25% de EICH en aquellos pacientes tratados con MTX a dosis habituales, de un 65% de EICH en aquellos en los que se administró pauta corta de MTX y de un 100% en los que no se administró ningún tipo de tratamiento. Estos resultados sugieren, de una manera bastante clara, que el tratamiento inmunosupresor post-TMO es efectivo y que no puede realizarse ningún TMO sin tratamiento profiláctico contra la EICH.

CON DEPLECCION DE CELULAS T "IN VITRO"

Para demostrar que los linfocitos T jugaban un papel fundamental en la iniciación de la EICH se llevaron a cabo en modelos animales numerosos estudios. Se objetivó que los ratones sometidos a TMO con médula ósea depleccionada de linfocitos T no desarrollaban EICH y una vez reconstituida la médula ósea llegaban a ser quimeras totales inmunocompetentes. Basados en estos estudios se iniciaron los ensayos clínicos. Rodt et al, (1982) utilizaron un heteroantisuero dirigido contra linfocitos humanos y lo incubaron con la médula ósea del donante, antes de ser infundida al receptor sin utilizar complemento. Se trataron 20 pacientes y solo 6 desarrollaron signos de EICH. Es de destacar, sin embargo, que en 2 pacientes no se consiguió el implante. Con la utilización de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra subpoblaciones específicas de células humanas ha sido posible el tratamiento con anticuerpos, uno o varios, con complemento de conejo para eliminar los linfocitos T de la médula del donante "in vitro". Esta forma de tratamiento se ha utilizado tanto para los TMO idénticos como para los no compatibles. Existen numerosos ensayos clínicos que demuestran que si bien es cierta una importante disminución en la incidencia de EICH aguda, mientras que la disminución en la EICH crónica es muy difícil de determinar. Con este tipo de tratamiento empezaron a observarse los primeros problemas de fallo del implante, sobretodo en casos de TMO no histocompatible, donde el fallo puede llegar a ser de hasta un 60% (Powles et al, 1983). Se pensó en la posibilidad de inmunosuprimir más al paciente, en un intento de

disminuir los fallos de implante (Prentice et al, 1982). En este sentido Hervé et al (1987) publicaron unos excelentes resultados sin observarse fallos de implante en pacientes tratados con deplección de células T al aumentar el tratamiento de acondicionamiento y con un menor nivel de deplección de linfocitos T (≈ 94%). También se observó que la incidencia de recaídas aumentaba con este tipo de tratamiento, por lo que en el computo global la supervivencia no mejoraba (Irle et al, 1988; Mitsuyasu et al, 1986). El seguimiento de estos pacientes tratados con anticuerpos monoclonales pan-T reveló, además, un aumento del riesgo de recaída leucémica, sobre todo en la LMC (Pollard et al, 1986; Apperley et al, 1986; Goldman et al, 1988). Parece ser que al eliminar todas las células T de la médula ósea se eliminan las células que causan la EICH y, además, se eliminan las subpoblaciones que ejercen el efecto injerto versus leucemia.

Otra manera de eliminar los linfocitos T con anticuerpos monoclonales, sin necesidad de utilizar complemento, son los métodos físicos que los eliminan al unirse a inmunotoxinas, a partículas magnéticas o a lectinas y los métodos inmunológicos basados en la inmunoabsorción de las células con un sustrato, ya sean hematíes con formación de rosetas E y posterior separación mediante centrifugación en gradientes de densidad (Reisner et al, 1980; Filipovich et al, 1984; Prentice et al, 1984; Martin et al, 1985).

AMBIENTE CON FLUJO LAMINAR

La utilización de ambiente con flujo laminar para los pacientes sometidos a TMO despues de descontaminación cutánea e intestinal ha sido un problema debatido y difícil de evaluar. Buckner et al (1983) demostraron la dificultad de lograr una descontaminación intestinal eficaz, debido a la dificultad que tienen los pacientes para tomar todas las dosis del tratamiento. Se ha observado que en animales sometidos a trasplante alogénico, en ambiente estéril y con descontaminación intestinal, la incidencia de EICH aguda era muy baja. (Connell et al, 1965; Truitt et al, 1979). Por otra parte, diversos autores mostraron mejores resultados en pacientes con hemopatías malignas tratados en ambiente con flujo laminar y con antibióticos no absorbibles (Yates et al, 1973; Levine et al, 1973; Bodey et al, 1971). Por todo ello, el grupo de Seattle (Buckner et al 1978) llevó a cabo un estudio prospectivo para evaluar su eficacia en pacientes con LA sometidos a TMO alogénico. Los resultados no mostraron diferencias estadisticamente significativas en relación a la supervivencia, si bien se observó un menor índice de infecciones en los pacientes tratados en ambiente protegido. Tampoco se observaron diferencias en la incidencia de EICH (Buckner et al 1983). En cambio, en otro análisis realizado por el mismo grupo de Seattle, esta vez en pacientes con AA grave, se observó una notable disminución de la EICH en los pacientes tratados en ambiente con flujo laminar (Storb et al, 1983).

1.1.5 RECHAZO DEL INJERTO

Para obtener un injerto estable hay que administrar un tratamiento inmunosupresor, para destruir el sistema inmune del receptor y permitir que las células derivadas del donante reemplacen al sistema linfohematopoyético del receptor. En condiciones experimentales se puede diferenciar entre fracaso del implante debido a sensibilización previa y fracaso de implante sostenido en un receptor no sensiblizado, en base a la resistencia genética (híbrida o alogénica). En el hombre estos mecanismos son más dificiles de dilucidar. Existen tres situaciones que se pueden intentar diferenciar en el caso de fracaso del implante

a) **Paciente presensibilizado, al que se le infunde una médula sin tratamiento "in vitro"**: Este es el caso de pacientes con AA. Los pacientes que son sometidos a TMO y acondicionados con ciclofosfamida y que previamente han recibido múltiples transfusiones tienen entre un 30-60% de probabilidades de rechazar la médula, frente a un 5% de los pacientes no sometidos a transfusiones previas (Champlin et al 1984; Storb et al, 1983; Champlin et al 1989a). Los estudios experimentales sugieren que el rechazo es debido a la sensibilización del receptor a antígenos menores de histocompatibilidad por transfusiones previas. La exposición a aquellos mismos antígenos en el momento del TMO representa una respuesta inmune secundaria más difícil de suprimir con métodos convencionales que la que se puede dar en pacientes no sensibilizados. Se han utilizado diversos regímenes de acondicionamiento para disminuir la incidencia del rechazo, bien con la adición de la capa de leucocitos

periféricos a la infusión de médula ósea (Storb et a, 1982) o bien con la utilización de irradiación toracoabdominal (Devergie et al, 1982). Con estas medidas se ha logrado disminuir a un 5%, aproximadamente, el índice de rechazos.

b) **TMO no histocompatibles:** El rechazo del injerto en pacientes con LA sometidos a TMO histocompatible es casi anecdótico (menos de un 1%), pero con la práctica de TMO no histocompatibles se ha visto que incluso utilizando dosis más altas de radioterapia, éstas son insuficientes para suprimir la respuesta inmunológica del receptor contra los antígenos mayores de histocompatibilidad. Se han descrito un 15% de fracasos de implante o reconstitución incompleta de la hematopoyesis (Deeg et al, 1988). En estos pacientes el fracaso del injerto ocurre, o bien en la forma de fallo primario de implante o bien con evidencia inicial de implante seguido de perdida ulterior del mismo. En algunos aspectos el fallo de implante se parece al mostrado en animales de experimentación, los cuales presentan el fenómeno de resistencia genética. Este término se refiere al fracaso de injerto sostenido de una médula no histoincompatible en un lugar donde habitualmente implanta con facilidad una médula histocompatible. Además, como la incidencia de EICH es mucho más alta en este grupo de pacientes, es precisamente en ellos en donde se ensayan tratamientos para la prevención de la EICH como es el tratamiento de la médula ósea "in vitro" con anticuerpos monoclonales anti-T (Kernan et al, 1987).

c) **Depleción de células T:** Ya hemos comentado anteriormente cómo este tipo de tratamiento, si bien reduce la incidencia de EICH aguda, ha supuesto un mayor índice de fracasos de

implante, del orden del 15-35%, en TMO histocompatibles y mucho más alta en TMO no histocompatibles. Se acepta que el rechazo del injerto, o la no aceptación, a diferencia del rechazo en pacientes con aplasia medular, no está relacionado con la historia pretransfusional previa. La resistencia genética puede controlarse con una inmunosupresión más profunda del receptor o con medidas dirigidas más específicamente a las células del receptor involucradas en este fenomeno. Independientemente del mecanismo, estos datos implican que la presencia de linfocitos T en la médula del donante pueden tener un efecto inmunosupresor, ya sea directamente o via inducción de una reacción injerto versus leucemia, que podria generar el medio adecuado para un implante sostenido. Por otra parte, los linfocitos T pueden tener un efecto amplificador sobre las células madre hematopoyéticas, generando así una potenciación del crecimiento y conduciendo a una "toma" del receptor. En relación con estas observaciones, el objetivo ha sido el de intensificar el régimen de acondicionamiento (Martin et al, 1985).

1.1.6 COMPLICACIONES INFECCIOSAS

Virtualmente todos los receptores de médula ósea, independientemente de la fuente medular, permanecen severamente inmunodeprimidos a lo largo de varios meses post-TMO. Además, la recuperación inmunológica es gradual y variable y algunos procesos como la EICH y los tratamientos para la misma, son también inmunosupresores. Por todo esto no es de extrañar que las infecciones aparezcan en casi todos los

receptores post-TMO y que, asociados o no a la EICH, sean una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el post-TMO.

Analizaremos las infecciones según las diversas fases del TMO (Buckner et al, 1983; Winston et al, 1979)

a) **Fase pre-TMO**: El estado del sistema inmune en esta fase, y por tanto la predisposición a infecciones, dependerá del estado clínico del enfermo en este momento. Los pacientes con LA en RC estarán menos inmunodeprimidos que aquellos que estén en recaída, mientras que los pacientes con LMC en fase crónica tienen, en principio, un sistema inmune normal.

b) **Fase post TMO inmediata (hasta el día +30)**: Durante este período, aparace una profunda neutropenia ($<0.1 \times 10^9/l$) y los problemas son los habituales en esta situación, esto es, infecciones bacterianas y fúngicas. La mucositis grave, consecuencia del tratamiento de acondicionamiento, predispone también a las infecciones, especialmente a las causadas por la flora intestinal. Estos factores más las infecciones por catéteres centrales venosos son la principal causa de problemas durante esta fase, por lo que actualmente las infecciones por gérmenes gram positivos, sobre todo staphylococci coagulasa positivos y coagulasa negativos, sobrepasan a la incidencia de gérmenes gram negativos. Tanto el diagnóstico como el control de estos pacientes es difícil. La fiebre no es un signo guía y habitualmente no hay evidencia de foco infeccioso, debido a la profunda neutropenia. Actualmente, no se recomienda la utilización de transfusiones profilácticas de granulocitos. Es interesante destacar que a pesar de la profunda granulopenia del

paciente, en esta etapa, existe una relativa baja mortalidad secundaria a infecciones. Esto probablemente es debido a que los métodos de prevención de la infección son bastante efectivos, a que en un enfermo estándar el período de extrema granulopenia es corto y a la persistencia de algún elemento de la inmunidad residual del receptor o a la transferencia de la inmunidad del donante.

c) **Fase post TMO intermedia (días +30-100)**: Despues de la recuperación hematológica, las infecciones bacterianas y fúngicas habitualmente mejoran, si bien persiste la inmunodeficiencia, tanto humoral como celular. Además, es en este período cuando la incidencia de EICH aguda es más alta, requiriendo a veces tratamiento inmunosupresor. Así las infecciones más graves aparecen en enfermos con EICH y afectan principalmente a los pulmones y son causadas en este orden por bacterias y hongos. Frecuentemente, sin embargo, aparece un infiltrado pulmonar intersticial debido, o bien a CMV, a pneumocystis carinii, a adenovirus o a herpes simplex. El tratamiento profiláctico con cotrimoxazol y la utilización de hemoderivados CMV seronegativos pueden ayudar a prevenir la aparición de estas neumonías.

d) **Fase post TMO tardía (a partir del día +100)**: A partir de este momento, el riesgo de infeccciones es más bajo, salvo en aquellos pacientes que presentan EICH crónica, en los cuales pueden aparecer infecciones bacterianas, especialmente bacterias encapsuladas. También son frecuentes las infecciones virales, sobre todo por varicela zoster.

1.1.7 QUIMERAS MIXTAS

Uno de los problemas que suscita mayor especulación en el ámbito del TMO, es la incidencia de quimeras mixtas y su relación con la recaída leucémica. A pesar de que los regímenes de acondicionamiento se pensaba que eran erradicativos, se publicaron algunos casos que demostraron la recuperación de la hemopoyesis del receptor post-TMO (Thomas et al, 1975a, Sparkes et al, 1977). Las células que sobreviven al TMO pueden ser células residuales normales o bien tumorales. Cuando se identifican células neoplásicas del receptor en el post-TMO, a menudo, aunque no siempre implican recaída leucémica (Thomas et al, 1982; Zaccaria et al, 1987; Arthur et al, 1988; Frassoni et al, 1988). Cuando éstas son células hematopoyéticas normales del receptor, pueden rechazar al donante (Bosserman et al, 1989; Kernan et al, 1987; Champlin et al, 1987a) o bien llegar a ser tolerantes con la médula del donante y contribuyen al establecimiento de quimeras mixtas (Lawler et al, 1984, Schmitz et al, 1985, Walker et al, 1986). En los inicios del TMO se habían publicado pocos casos de quimeras mixtas (Branch et al, 1982; Singer et al, 1983) con tratamientos de acondicionamiento habituales, pero con la inclusión de métodos más sensibles para su detección, como es el estudio de los polimorfismos del ADN, se ha visto que la incidencia de las mismas es mucho mayor, oscilando entre un 11-57% de los pacientes sometidos a TMO, sin tratamiento "ex vivo" de la médula (Thomas et al, 1982; Lawler et al, 1984; Blazar et al, 1985; Ginsburg et al, 1985; Vincent et al, 1986; Hill et al, 1986; Walker et al, 1986; Petz et al, 1987; Yam

et al, 1987; Bertheas et al, 1988). Con las modificaciones de los tratamientos de acondicionamiento, el tratamiento de la médula ósea "ex vivo", esta incidencia se sitúa por encima del 60% de los casos (Powles et al, 1983; Schimdt et al, 1985; Blazar et al, 1985; Walker et al, 1986; Bretagne et al, 1987; de Witte et al, 1987; Bertheas et al, 1988; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990). En los casos de incompatibilidad ABO mayor y debido a la detección de aloanticuerpos, Petz et al (1987) encontraron una mayor incidencia de quimeras mixtas, reflejando probablemente una mayor sensibilidad de las técnicas de estudio. Hill et al (1986) demostraron, mediante estudio citogenético, una alta incidencia de quimeras mixtas en pacientes con AA acondicionados sólo con quimioterapia. En este estudio la mayoría de pacientes revertieron a quimera total al año del TMO. Si bien algunos estudios indican que el hecho de tener una quimera mixta implica un mayor riesgo de recaída leucémica (Lawler et al, 1984; Walker et al, 1986; Bretagne et al, 1987), análisis más recientes sugieren que no existe mayor incidencia de recaída (Schmitz et al, 1985; Petz et al, 1987; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990).

1.1.8 RECAIDA LEUCEMICA POST TRASPLANTE DE MEDULA OSEA

Uno de los problemas más serios que presentan los pacientes sometidos a TMO alogénico es la recaída leucémica. Esta se observa en un 20-60% de los pacientes, dependiendo del tipo de leucemia y del estado en que se realizó el TMO (Thomas et al, 1983a; Thomas et al, 1983b; Barrett et al, 1989;).

Estudios no controlados muestran que la incidencia de recidiva leucémica en la LANL oscila entre el 0-40% (Thomas et al, 1979; Clift et al, 1987; Champlin et al, 1985). Recientemente, Barrett et al (1989) ha publicado la incidencia de recaídas post-TMO en pacientes con LAL, analizando los datos del International Bone Marrow Registry. De 690 pacientes estudiados, la probabilidad de recaída, a los 5 años, fué de un 27% en pacientes menores de 16 años y de un 30% en adultos trasplantados en 1ª RC, mientras que la probabilidad de recaída, a los 5 años, en pacientes trasplantados en 2ª RC fué de un 52%, tanto en niños como en adultos. La recidiva leucémica suele aparecer entre 1 y 36 meses post-TMO (Boyd et al, 1982). El grupo de Seattle analizó el índice de recaídas tardías post-TMO en pacientes con más de 2 años de seguimiento (Witherspoon et al, 1986). De 232 pacientes con LA y con un seguimiento de entre 2-14,2 años, encontraron 17 recaídas, que aparecieron entre los 2-6,3 años post-TMO. A partir de los 6,3 años no se ha descrito ninguna recaída (Elfenbein et al, 1978; Olif et al 1978; Witherspoon et al 1986), siendo la descrita por Witherspoon, que ocurrió a los 6 del TMO, la más tardía. De los 11 casos en que pudo estudiarse el origen de la recaída, en 5 fué a partir de células residuales del receptor, en otros 5 casos no se disponía de marcadores y en 1 caso el estudio con los polimorfismos del ADN demostró recaída a partir de células del donante (Witherspoon et al, 1985). Las recidivas que aparecen a partir de 2 años post TMO se tratan, probablemente, de segundas neoplasias (Witherspoon et al, 1986). La mayoría se originan a partir de células residuales del receptor, aunque se han descrito varios

casos de recaídas leucémicas a partir de células del donante (Tabla 11.4). Boyd et al, (1982) valoró que la incidencia de recidivas a partir de células del donante era de un 5%. Es de destacar que de todos los casos publicados como recidivas del donante en solo 5 se realizó estudio molecular para su documentación. Dos casos de recidiva del donante se demostraron a partir del estudio de los isoenzimas leucocitarios y el resto se hicieron únicamente con análisis citogenético. Muy recientemente Stein et al (1989) y Naoe et al, (1989), publican dos casos de recidiva leucémica post TMO, estudiando el origen de la recidiva mediante estudio citogenético y analisis molecular con los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (FRLP). En ambos trabajos, el estudio citogenético demostró que la recaída se originaba a partir de células del donante, mientras que el estudio molecular demostró, en ambos, que la misma tenía su origen en las células residuales del receptor. Estos resultados muestran la dificultad para asignar definitivamente un origen determinado a las recaídas post TMO.

1.1.9 DEMOSTRACION DEL IMPLANTE

El objetivo del TMO es el reemplazamiento de las células linfohematopoyéticas del receptor por un sistema linfohematopoyético de un donante sano. Para documentar y caracterizar el implante post-TMO las células del receptor y del donante deben distinguirse unas de otras. En la Tabla 11.5 se muestran las pruebas necesarias para ello.

1.2 MARCADORES GENETICOS EN EL ESTUDIO DEL INJERTO MEDULAR

Una vez se ha procedido a la infusión de médula ósea, el paciente permanece aplásico durante 2-4 semanas, despues de las cuales se inicia una lenta recuperación periférica. Finalmente, todas las células hematopoyéticas, incluyendo los linfocitos y las células del sistema mononuclear-fagocítico, serán derivadas de las células del donante. En cuanto al origen de las células del estroma en el post-TMO, mientras algunos autores han demostrado un genotipo igual al del receptor (Simmons et al, 1987), otros han objetivado que se originan a partir de células del donante (Keating et al, 1982).

1.2.1 ESTUDIO EXTENSO DE HEMATIES

1.2.1.1 ANTIGENOS ERITROCITARIOS

El estudio del fenotipo eritrocitario es uno de los marcadores genéticos más frecuentemente utilizados en el post-TMO, para la demostración del implante (Sparkes et al, 1977; Blume et al, 1980; Branch et al, 1982). Al utilizar un amplio panel de antígenos se ha visto que entre un 3 y 9% de parejas donante-receptor analizadas en el pre-TMO, según las series, no disponen de marcadores eritrocitarios diferenciados para el estudio post-TMO, si se utilizan los antisueros más frecuentes (Petz et al, 1987; Bär et al, 1989). El estudio de los antígenos eritrocitarios es un

método fácil de realizar y altamente sensible, si bien en ocasiones es difícil analizar el fenotipo pretrasplante del receptor debido a las múltiples transfusiones que puede haber recibido el paciente. Las transfusiones post-TMO hacen difícil de evaluar el injerto hasta que no hayan pasado más de 3-4 meses de la última transfusion (Petz et al, 1987). Sin embargo, Van Dijk et al (1987) demuestran con la aplicación de un programa transfusional el implante a las 2 semanas del TMO y, en el 71% de los casos, al mes del TMO. Un hecho a tener en cuenta es que el estudio de los antigenos eritrocitarios analiza solamente una línea celular, la eritrocítica.

Otra técnica útil para determinar la quimera de serie roja en el post TMO es la utilización de microesferas fluorescentes unidas a anti IgG humano (de Man et al, 1988; Bär et al, 1989). La sensibilidad de la técnica es según los autores muy alta permitiendo detectar 1 célula positiva por cada 10.000 hematies negativos y posee también una alta especificidad.

DEFINICION DE MARCADORES DEL RECEPTOR Y DEL DONANTE

Cuando el receptor posee un antígeno eritrocitario del que carece el donante se dice que este antígeno es un marcador del receptor.

Por el contrario, cuando el donante posee un antígeno eritrocitario que no se encuentra presente en los hematíes del receptor se dice que ese antígeno es un marcador del donante.

1.2.1.2 ENZIMAS ERITROCITARIOS

El estudio de los enzimas eritrocitarios es otro de los métodos empleados para el análisis del implante, pero adolece de los mismos problemas que el estudio del fenotipo eritrocitario, además, de que no es un método tan fácil de realizar y no está a disposición de todos los laboratorios.

1.2.2 ALOTIPOS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Otro de los métodos utilizados para evaluar la quimera es la determinación de los alotipos de las inmunoglobulinas, pero tiene el mismo incoveniente que el estudio del fenotipo eritrocitario, esto es la necesidad de efectuar el estudio en ausencia de transfusiones previas y que caracterizar los alotipos de las inmunoglobulinas es un método caro y no disponible, como el estudio del fenotipo eritrocitario. El grupo de Seattle (Witherspoon et al, 1978) de 420 TMO alogénicos sólo pudieron efectuar estudio de quimera, por este método, en 29 pacientes. Con esta técnica determinaron que las inmunoglobulinas post-TMO eran del donante, en 5 pacientes. Este, según Petz et al, (1987), es el método más sensible para la detección de quimeras mixtas.

1.2.3 ESTUDIO CITOGENETICO

El estudio citogenético se ha utilizado frecuentemente en el post-TMO para diferenciar células del donante y del receptor en aquellos casos en que no existe identidad sexual o bien en caso de identidad sexual, cuando existen regiones polimórficas características o marcadores cromosómicos no constitucionales que permiten diferenciar al donante del receptor en células en división (Lawler et al 1984; Schimtz et al, 1985; Godde-Salz, 1986; Walker et al, 1986; Lawler et al, 1987; Khokhar et al, 1987; Bertheas et al, 1988; Hill et al, 1986; Arthur et al, 1988; Przeporka et al, 1988; Sessarego et al, 1989).

El estudio citogenético post-TMO tiene como principales limitaciones el que en cada análisis se evaluan sólo de 20 a 50 células. Por otra parte, el citogenetista depende de las leyes de la probabilidad y debe examinar 30 metafases para excluir con un 95% de confianza que 1 de cada 10 células se originan en el receptor y más de 59 metafases para excluir la presencia de un 5% de células del receptor (Hook, 1977). Además, el análisis cromosómico evalúa sólo la fracción de células que están en mitosis.

En un estudio realizado por Lawler et al (1984) pudieron demostrar implante a las 2 semanas del TMO, mientras que en 7 de 39 pacientes encontraron células residuales del receptor a partir de la novena semana post-TMO. En otros estudios Walker et al (1986) encontraron que en aquellos casos en que antes de las 6 semanas post-TMO se detectaba hemopoyesis del receptor tenían buen pronóstico, mientras que en aquellos en que la detección de hemopoyesis del

receptor aparecía a partir de las 6 semanas la mayoría presentó recaída. En los casos de TMO con médula ósea tratada "in vitro" la incidencia de quimeras mixtas detectadas con el análisis citogenético es mucho más alta con persistencia de anomalías cromosómicas no clonales (Lawler et al, 1987). En los pacientes diagnosticados de LMC cromosoma Ph'+ y sometidos a TMO el estudio cromosómico secuencial demostró en 84 pacientes estudiados por Arthur et al (1988), la persistencia de metafases Ph'+ en 24 de 48 pacientes, en 16 casos antes del primer año y en 8 más tardiamente. En los casos de receptores de médulas tratadas con anticuerpos anti-T "in vitro" la aparición de células Ph'+ fué más frecuente que en los casos de médula no tratada (19 de 28 versus 5 de 20) (Arthur et al, 1988). Mientras que en 9 casos su aparición precedió a la recaída leucémica en 11 pacientes no implicó recaída. En los casos de recaída post-TMO el estudio citogenético ha mostrado tambien su efectividad, sobre todo en los casos en que habia anomalías cromosómicas no constitucionales (Deeg et al, 1984; Arthur et al, 1988; Offit et al, 1990). Se han publicado hasta el momento 2 casos en que, mediante el análisis citogenético, se demostró que la recaída medular provenía de las células del donante y el estudio molecular demostró, al contrario, que la misma se originaba a partir de células del receptor (Naoe et al, 1989; Stein et el, 1989). Al analizar las recaídas leucémicas post-TMO a partir de células del donante publicadas hasta ahora, se observa que en la mayoría de casos (Fialkow et al 1971; Thomas et al, 1972; Goh et al, 1977; Newburger et al, 1981; Elfenbeim et al, 1978; Smith et al, 1985; Schmitz et al, 1987; Marmont et al, 1984), el

estudio se ha basado únicamente en el análisis citogenético.

1.2.3.1 OTROS

La utilización de las técnicas de visualización de la cromatina de Barr y el análisis del cuerpo Y son otros métodos empleados para el estudio de la quimera (Singer et al, 1983; Boyd et al, 1982, Thomas et al, 1972, Ribera et al, 1988). Como limitaciones presenta el hecho de que, al igual que en el estudio citogenético, requiere un número adecuado de células en mitosis y la no identidad sexual entre donante y receptor, pero tiene la ventaja de que permite saber el tipo de célula que se está analizando. Otro de los problemas es que, en el mejor de los casos, el porcentaje de células Y en el hombre es entre 48-84% y en las mujeres entre el 0-5%, lo que dificulta su valoración (Coccia et al, 1980; Keating et al, 1982).

1.3 LA BIOLOGIA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DEL INJERTO MEDULAR

Para el estudio del ADN existen dos técnicas fundamentales: la rotura específica del ADN mediante los enzimas de restricción y la identificación de las secuencias de ADN de interés, gracias al método Southern y a la utilización de sondas.

Los enzimas de restricción rompen el ADN cuando existe en el mismo una señal específica llamada diana de restricción y lo hacen de forma distinta según el enzima (Figura 13.1).

Las sondas genéticas son fragmentos de ADN que se utilizan para la localización de secuencias de interés y pueden corresponder a un fragmento de ADN genómico (contiene intrones y exones) o a un ADN complementario obtenido a partir de un ARN mensajero mediante la acción de la transcriptasa reversa.

Las sondas pueden corresponder y por tanto identificar un gen conocido y se denominan sondas específicas o bien pueden reconocer una zona del genoma cuya función se desconozca y se denominan, en este caso, sondas anónimas.

1.3.1 LOS POLIMORFISMOS DEL ADN

Si bien etimológicamente la palabra polimorfismo significa simplemente varias formas, se ha definido como polimorfismo genético el rasgo que transmitido con caracter mendeliano existe en una población determinada presentando como mínimo dos fenotipos, ambos con una frecuencia superior al 1%. Esta definición se aplica también a los polimorfismos del

ADN.

En el ADN humano, uno de cada pocos cientos de nucleótidos varia de un individuo a otro y en algunos casos las diferencias de las secuencias del ADN en una población determinada son polimórficas. El primer hallazgo, en humanos, de la aplicación de uno de estos polimorfismos se debe a Kan and Dozy que en 1978 observaron que cuando el ADN de distintos individuos se digiere con el enzima de restricción HpaI, el fragmento que contiene el gen de la globina beta, visualizado por el método de Southern, es de longitud diferente de un individuo a otro, midiendo según los casos 7.0, 7.6 ó 13 kilobases (Kb). Esta diferencia se debe a un polimorfismo de ciertas secuencias de ADN localizadas cerca del gen de la globina beta (Figura 13.2). Debido al cambio de un nucleótido que modifica una diana de restricción del enzima HpaI, éste no puede cortar el ADN hasta que aparece otra de sus dianas de restricción, lo que da lugar a un fragmento más largo (13 kb). En otros casos el polimorfismo, en lugar de suprimir una diana, crea una nueva: es el origen del fragmento de 7.0 Kb.

1.3.2 TIPO DE POLIMORFISMOS

Existen básicamente dos tipos de polimorfismos: los dialélicos y los multialélicos.

Los polimorfismos dialélicos son los más frecuentes y corresponden a polimorfismos debidos a una mutación puntual que eliminan o crean un sitio de restricción para un determinado enzima.

Los polimorfismos multialélicos aparecen como consecuencia de reordenamientos o de repetición de secuencias de ADN. Se trata, muy a menudo, de una secuencia repetida en tandem en un determinado lugar del genoma. El número de unidades de repeticion varía de un individuo a otro dando lugar a los diferentes alelos. Parece ser que la existencia de secuencias repetidas favorece los sobrecruzamientos no homólogos responsables de la aparición de cromosomas recombinantes que poseen un número variable de secuencias. Se denominan minisatélites o VNTR (variable number tandems repeats), las regiones del genoma que poseen, en una distancia relativamente corta, una organización de ADN satélite (aglomeración de secuencias repetitivas en tandem). Las sondas que corresponden a regiones hipervariables minisatélites fueron descubiertas por Jeffreys (1985). Son secuencias que tienen en común un motivo central de 11 a 16 pares de bases y que so.. repetitivas, dispersas y muy polimórficas. Se han localizado en todos los cromosomas excepto en el X y en el Y. Este tipo de sondas es muy útil precisamente para diferenciar individuos genéticamente similares como son las parejas donante-receptor en el TMO.

Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP), representan una fuente casi ilimitada de marcadores genéticos del genoma humano y su existencia puede evidenciarse empleando cualquier célula nucleada del organismo como fuente de ADN.

1.3.3 CONTENIDO DE INFORMACION DE UN POLIMORFISMO (CIP)

Para que un FRLP pueda ser utilizado como marcador genético debe corresponder a un locus individualizado y ser informativo.

El grado de información se define por la probabilidad para un individuo de ser heterozigoto en un locus determinado, es decir de llevar a la vez 2 alelos diferentes. Esta probabilidad depende de la frecuencia de los aleios en la población. Para los situados en el cromosoma X, solo las mujeres pueden ser heterozigotas. Dicha probabilidad se expresa como el CIP o contenido de información de un polimorfismo, que se calcula a partir de la frecuencia de los alelos en una población determinada y es una medida de la probabilidad de que la contribución de los cromosomas paternos pueda ser determinado en la descendencia. Para las sondas con un CIP más alto, la probabilidad predictiva de distinguir hermanos se aproxima al máximo teórico de un 75% (Knowlton et al, 1986). El resultado de los estudios realizados por Knowlton et al (1986), con 12 sondas altamente polimórficas, mostró que la probabilidad de que 2 hermanos sean idénticos es sólo de $1,3x10^{-6}$.

El CIP de las sondas dialélicas puede calcularse a partir de la ley de Hardy-Weinberg. A partir de dicha ley, se deduce que el porcentaje máximo de heterozigotos es igual al 50% cuando los dos alelos tienen la misma frecuencia en la población (p=q=1). Cuando más alto sea el CIP, más útil será el método. El valor máximo de CIP es de 0,38 para un FRLP autosómico y 0,50 para un FRLP ligado al cromosoma X. Para calcular el CIP de las sondas multialélicas hemos de

recurrir a Botstein et al (1980). En el caso de las sondas multialélicas autosómicas el valor máximo del CIP dependerá del número máximo de alelos del locus y siempre tiende a 1. Asimismo, en el caso de las sondas multialélicas ligadas al sexo el valor máximo de CIP será de 1.

1.3.4 DEFINICION DE POLIMORFISMO INFORMATIVO

Cuando los análisis, con una sonda determinada, detectan dos patrones distintos, uno del genotipo del paciente y otro correspondiente al del donante (pudiéndose distinguir claramente uno de otro) se clasifica como polimorfismo informativo. Cuando los patrones son idénticos se clasifica como no informativo (Figura 13.3, muestras receptor-R- y donante-D- nº 2). Si un polimorfismo informativo resulta de la presencia de una banda en el ADN del paciente, la cual está ausente en el ADN del donante, esta sonda será óptima para detectar niveles muy bajos de células residuales del receptor en el post-TMO y se clasifica como "máxima informativa-paciente" (Figura 13.4, R y D nº 4). De forma análoga, una sonda polimórfica que detecte una única banda en el donante, no presente en el paciente, se clasifica como "máxima informativa-donante" (Figura 13.3, muestras R y D nº 5). A veces, una sonda polimórfica puede detectar una banda única del paciente y una del donante y, entonces, se clasifica como "máxima informativa-paciente y donante" (Figura 13.3, muestras R y D nº 1, 3 y 4).

Para poder demostrar la presencia de células residuales del receptor en el post-TMO, los polimorfismos obtenidos en el

estudio pre-TMO deben ser o bien máximos informativos receptor o máximos informativos donante-receptor (Ginsburg, 1985).

1.3.5 APLICACION DE LAS TECNICAS DEL ADN RECOMBINANTE AL ESTUDIO DEL IMPLANTE MEDULAR

La utilización de las secuencias polimórficas del ADN, es un método informativo y versátil para poder distinguir células del donante y del receptor (Blazar et al, 1985; Ginsburg et al, 1985; Witherspoon et al, 1985; Minden et al, 1985; Schunbach et al, 1982; Knowlton et al, 1986; Yam et al, 1987). Dicha técnica tiene la ventaja, sobre los otros métodos tradicionales, de que es independiente de la identidad o no de sexo, de las transfusiones realizadas en el período inicial post-TMO y de que son susceptibles de análisis todas las células nucleadas. De hecho, pueden ser estudiados todos los pacientes que sean sometidos a TMO alogénico, salvo aquellos que disponen de un donante gemelo univitelino. En estos casos, el estudio de los FRLP puede ser útil para confirmar la monocigocia (Jones et al, 1987). Otra de las ventajas del estudio de los FRLP es su alto grado de sensibilidad, pudiendo detectar mediante la combinación enzima-sonda adecuada, la presencia de hasta un 1% de células residuales del receptor o del donante (Knowlton et al, 1986). Este hecho hace que sea muy útil para poner de manifiesto la presencia de quimeras mixtas, en aquellos casos en que el porcentaje de células residuales sea muy bajo y no puedan ser detectados por otros métodos de es-

tudio. Se han publicado diversos trabajos en que mediante ésta técnica se ha demostrado que la presencia de quimeras mixtas es más frecuente de lo esperado sobre todo en TMO con tratamiento "in vitro" de la médula y quizás, lo que es más importante, que su presencia no se correlaciona con un mayor indice de recaídas leucémicas (Petz et al, 1987; Schattenberg et al, 1989; Roy et al, 1990).

Asímismo, es un método muy sensible para estudiar el origen de las recaídas leucémicas. En la mayoría de casos las recaídas leucémicas estudiadas se originan a partir de células del receptor (Minden et al, 1985; Ginsburg et al, 1985; Ganessan et al, 1987; Min et al, 1988; Brunet et al, 1989). En algunos casos se ha podido demostrar que las recaídas se han originado a partir de células del donante (Witherspoon et al, 1985; Schunbach et al, 1982). Además este método es de gran utilidad en casos en que se ha sospechado recaídas a partir de células del donante mediante análisis citogenético y al realizar el estudio mediante los FRLP se ha demostrado que la misma se originaba a expensas de células del receptor (Naoe et al, 1989; Stein et al, 1989).

TABLA 11.1 ENFERMEDADES SUSCEPTIBLES DE TRASPLANTE ALOGENICO DE MEDULA OSEA

Malignas	No malignas	
	Adquiridas	Congénitas
Leucemia aguda no linfoblástica	Anemia aplastica	Inmunodeficiencias
Leucemia aguda linfoblástica	Hemoglobinuria paroxística nocturna	Talasemia major
Leucemia mielode crónica	Mielofibrosis idiopática	Anemia de Fanconi
Preleucemia		Anemia hipoplastica
Mielofibrosis aguda		Mucopolisacaridosis
Mieloma multiple		Otras enfermedades lisosomales
Leucemia linfática crónica		Defectos óseos
Enfermedad de Waldenström		Mucolipidosis
Tricoleucosis		
Linfoma no Hodgkin		
Enfermedad de Hodgkin		

TABLA 11.2 GRADO HISTOLOGICO DE LA EICH AGUDA

Grado	Piel	Higado	Intestino
I	Degeneración vacuolar de la célula epidérmica basal	< 25% de pequeños ductos biliares anormales (degeneración o necrosis)	Necrosis única de células epiteliales
II	Cambios grado I más "cuerpos eosinofílicos"	25-50% ductos biliares anormales	Necrosis y caida de de las glándulas
III	Cambios grado II + separación de la unión dermo-epidérmica	50-75% ductos biliares anormales	Denudación microscópica focal de la mucosa
IV	Denudación epidérmica franca	> 75% ductos biliares anormales	Denudación difusa de la mucosa

de Glucsberg et al, 1974. Transplantation 18: 295-304

TABLA 11.3 CLASIFICACION CLINICOPATOLOGICA DE LA EICH CRONICA

EICH limitada

Cualquiera de ambos:

1.- Afectación cutánea localizada

2.- Afectación hepática debida a EICH crónica

EICH extensa

Cualquiera:

1.- Afectación cutánea generalizada; o

2.- Afectación localizada de la piel y/o afectación hepática debido a EICH crónico mas:

a.- Histología hepática mostrando hepatitis crónica agresiva, puentes de necrosis o cirrosis; o

b.- Afectación ocular (test de Sirmer con menos de 5 mm de humedad); o

c.- Afectación de las glandulas salivares menores o de la mucosa oral demostrado por biopsia; o

d.- Afectación de cualquier otro órgano

---

de Shulman et al. Am J Med 69:204-217; 1980

TABLA 11.4a RECAIDAS LEUCEMICAS A PARTIR DE CELULAS DEL DONANTE

EDAD/ SEXO	SEXO DON	DIAGNOS-TICO	METODO DE ESTUDIO	DIAGNOSTICO RECAIDA	RESULTADOS CARIOTIPO/FRLP	REFERENCIA
16/M	V	LAL	Citogenética	LAL	46,XY	Fialkow, 1971
7/M	V	LAL	Citogenética	LAL	46,XY	Thomas, 1972
4/M	V	LANL	Citogenética	LANL	46,XX/46,XY/47,XY+F/ 48,XY+F+C/48,XY+F+G	Goh, 1977
22/V	M	LANL	Citogenética	LANL	46,XX/45,X,-X,t(8;21) (q22;q22)	Elfenbeim, 1978
20/V	M	LAL	Isoenzimas	Sarcoma Inmunoblast	Esterasa 2-1	Gosset, 1979
12/V	V	LAL	Citogenética	LAL	46,XY (Polimorfismo Cromosoma 21)	Newburger, 1981
5/V	M	LANL	Citogenética FRLP	Sarcoma Inmunoblast	46,XX Patrón donante	Schubach, 1982
21/M	V	LMC CrPh'+	Citogenética	LMC CrPh'+	46,XY,t(9;22)	Marmont, 1984
19/M	V	LANL	Isoenzimas genéticos	Linf B asoc virus EB	Esterasa D1 Fosfoglucomutasa 1+2+	Martin, 1984

M: mujer; V: varón; LAL:leucemia aguda linfoblástica; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva;

TABLA 11.4b RECAIDAS LEUCEMICAS A PARTIR DE CELULAS DEL DONANTE

EDAD/ SEXO	SEXO DON	DIAGNOS-TICO	METODO DE ESTUDIO	DIAGNOSTICO RECAIDA	RESULTADOS CARIOTIPO/FRLP	REFERENCIA
3/V	M	LANL	Citogenética	Linf B asoc virus EB	46,XX	Martin, 1984
9/V	M	LMC CrPh'+	Citogenética	LAL	46,XX/46,XX, inv(9) (p12;q12)	Smith, 1985
25/M	M	LAL	FRLP	LANL	Patrón donante	Whiterspoon, 1985
22/M	V	LAL	Citogenética	LAL	46,XY,6q-,46,XY 46,X,6q-	Schmitz, 1987
15/V	M	LAL-T	Citogenética FRLP	LAL-B	46,XX Patrón donante	Fieg, 1988
2/V	M	LAL	Citogenética FRLP (pDP105 St-14;S-232)	LAL	46,XX, poliploidia 208 46,X0,9qh Patrón receptor	Stein, 1989
18/M	V	LAL	Citogenética Análisis ADN sondas:JH;CrY	LAL	46,XY Patrón receptor	Naoe, 1989

M: mujer; V: varón; LAL:leucemia aguda linfoblástica; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva

TABLA 11.5 METODOS DE DOCUMENTACION DEL IMPLANTE

Estudio de los hematíes	- Antígenos
	- Enzimas
Estudio citogenético	- Cromosomas sexuales
	- Marcadores cromosómicos
	- Cuerpo Y
Estudio HLA	
Alotipos de las inmunoglobulinas	
Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (FRLP)	

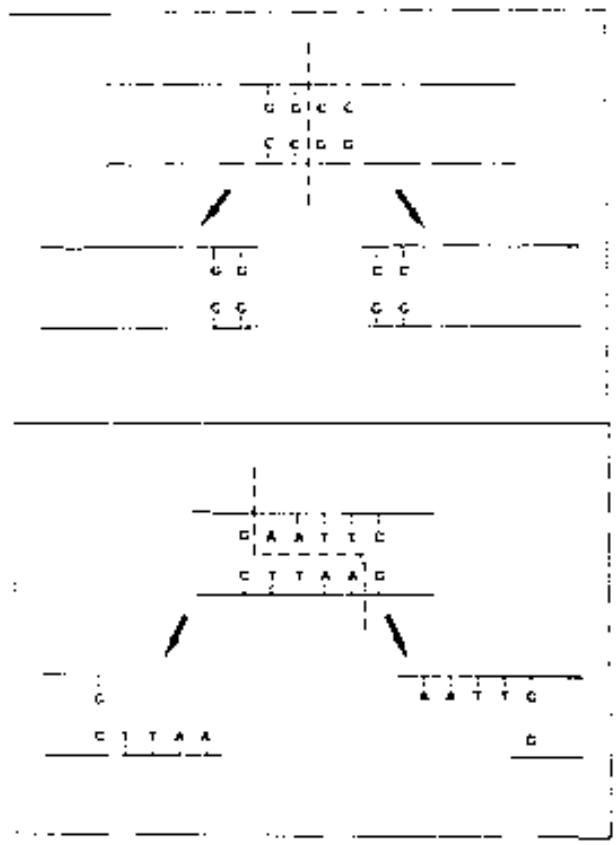


Figura 13.1: Mecanismo de acción de los enzimas de restricción. En la parte superior de la figura se esquematiza cómo algunos enzimas de restricción cortan el ADN en el centro de la diana de restricción. En la parte inferior se esquematiza el modo en que otros enzimas cortan el ADN, reconociendo en cada una de las hebras la diana de restricción.

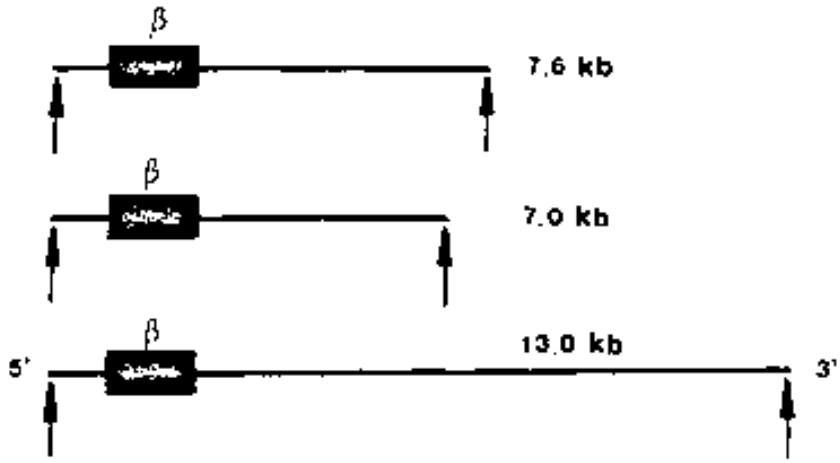


Figura 13.2: Esquema del polimorfismo Hpa I y los fragmentos de restricción polimórficos que contienen el gen de la beta-globina

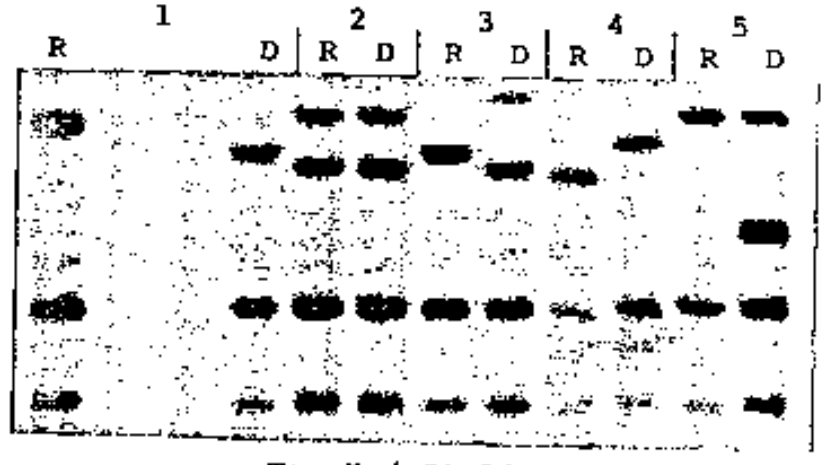


Figura 13.3: Autorradiografía que muestra el patrón obtenido al estudiar 5 parejas donante-receptor mediante digestión con el enzima Taq I y posterior hibridación con la sonda St-14.

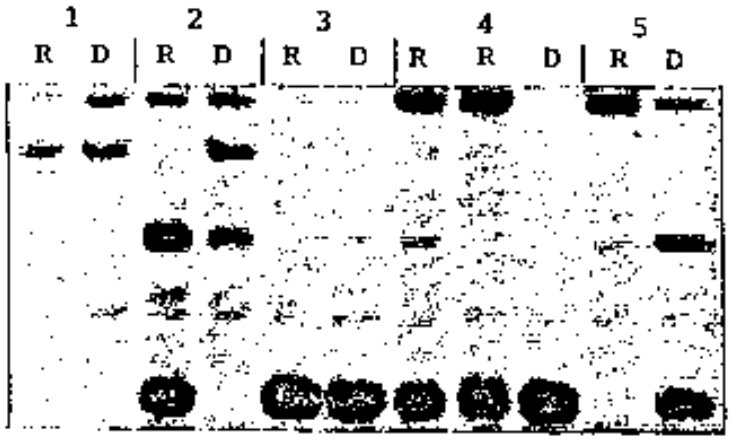


Figura 13.4: Autorradiografía que muestra el patrón obtenido al estudiar 5 parejas donante-receptor mediante digestión con el enzima Hinc II y posterior hibridación con la sonda pseudo-beta.

2 OBJETIVOS

El estudio del fenotipo eritrocitario y el análisis citogenético han sido desde los inicios del TMO los marcadores genéticos más utilizados para la valoración del implante de la médula ósea del donante. Más recientemente, la introducción de la tecnología del ADN recombinante ha permitido profundizar en el estudio del origen de las poblaciones celulares en el post-TMO.

Los objetivos de esta Tesis han sido:

1.- Evaluar la contribución, en la valoración del implante medular, de los tres marcadores genéticos:
   - Estudio del fenotipo eritrocitario
   - Análisis citogenético
   - Análisis de los polimorfismos del ADN

2.- Analizar la utilidad de los distintos métodos en la detección de quimeras totales y mixtas y su relación con el riesgo de recaída.

3.- Determinar el valor de cada uno de los tres métodos en el estudio del origen de la recaída.

3 PACIENTES Y METODOS

3.1 PACIENTES

3.1.1 FASE PRE-TMO

Desde Marzo de 1986 hasta Marzo de 1990 se han estudiado prospectivamente 82 pacientes con sus respectivos donantes. En la Tabla 31.1 se exponen las características clínicas de los 66 pacientes que posteriormente fueron sometidos a TMO. De las 82 parejas donante-receptor estudiadas en 43 había diferencia de sexo entre donante y receptor, en 6 pacientes se practicó estudio citogenético previo al TMO, en 75 se practicó tipaje extenso de hematíes y en 80 parejas se efectuó el estudio de los polimorfismos del ADN (en 2 pacientes no se pudo obtener muestra en la fase pre-TMO, para su estudio).

De los 66 pacientes sometidos a TMO, en 42 el TMO se realizó en la Unitat d'Hematologia Clínica i Servei de Pediatria del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, mientras que en los restantes 24 pacientes el TMO se realizó en la Escuela de Hematología Farreras Valentí de l'Hospital Clínic de Barcelona.

En las Figuras 31.1 y 31.2 se muestra la distribución, por enfermedades, de los 66 pacientes sometidos a TMO. De los 28 pacientes con LAL, 10 fueron sometidos a TMO en 1ª RC, 15 en 2ª RC y 3 pacientes en 3ª o subsecuentes RC. De los 19 pacientes con LANL, 11 fueron sometidos a TMO en 1ª RC, 6 en 2ª RC, 1 paciente en 3ª RC y 1 en recaída. De los pacientes con LMC, 6 estaban en fase crónica de su enfermedad en el momento del TMO y 1 paciente en crisis blástica. Los 2 pacientes con enfermedad de Hodgkin estaban en recaída sensible al tratamiento en 1 caso y en remisión parcial en el otro; En todos los casos excepto en 4 (UPN

27, UPN 74, UPN 100 y UPN 261C), el TMO se realizó a partir de un donante HLA compatible, cultivo mixto linfocitario negativo. En 14 pacientes existía incompatibilidad de grupo sanguíneo ABO mayor entre donante y receptor. Los regímenes de acondicionamiento empleados están expuestos en la Tabla 31.1. En 55 pacientes con leucemia aguda (LA), leucemia mieloide crónica y ARBT el tratamiento de acondicionamiento consistió en ciclofosfamida (CY) a la dosis de 120 mg/kg/2 días e irradiación corporal total 10 Gy o fraccionada en 5 dosis con un total de 12,5 Gy, melfalan (MF) 140 mg/1 día y busulfan (BU) 16/mg/kg/4 días en una paciente. Los pacientes con aplasia medular grave recibieron CY 200 mg/kg/4 días e irradiación toraco-abdominal 6 Gy. Los pacientes diagnosticados de leucemia linfática crónica, mieloma múltiple y enfermedad de Waldenström recibieron CY e ICT fraccionada a las mismas dosis que en los casos de LA más clorambucil 0.6mg/kg/día/4 días. Los pacientes con enfermedad de Hodgkin (UPN 85 y UPN 149), el paciente con talasemia major (UPN 72) y el paciente con Osteopetrosis recibieron BU mas CY.

3.1.2 FASE POST-TMO

De los 66 pacientes sometidos a TMO se ha podio efectuar seguimiento para valorar el implante medular en 50 pacientes. Las causas por las que no se ha podido evaluar el implante en 16 pacientes restantes han sido: a) por exitus en los primeros 21 días post-TMO en 10 casos; b) fracaso del implante en 1 paciente; c) en 3 casos no se recibieron

muestras para efectuar el seguimiento y d) a los 2 últimos casos se les practicó el TMO en el mes que finalizó el estudio. De los 50 pacientes en los que se pudo efectuar estudio post-TMO, para valorar el implante medular, en 25 pacientes se pudo analizar la recuperación hematopoyética mediante estudio del fenotipo eritrocitario, en 17 pacientes se practicó estudio citogenético y en los 50 se efectuó estudio molecular. En 13 casos se ha podido evaluar el implante mediante los 3 métodos (fenotipo eritrocitario, estudio citogenético y molecular) y en 17 pacientes se ha evaluado el implante mediante el estudio citogenético y análisis de los polimorfismos del ADN. En la Tabla 31.2 se muestran las diferencias de sexo, diferencias del fenotipo eritrocitario y diferencias de los polimorfismos del ADN en los 50 pacientes sometidos a TMO.

3.1.3 RECOGIDA DE MUESTRAS

En la fase pre-TMO se procedió a la extracción de sangre periférica y/o médula ósea del donante y del receptor para análisis del ADN y estudio de antígenos eritrocitarios.
En el post-TMO se procedió a la extracción de sangre periférica y/o médula ósea del receptor a intervalos semanales entre el día +14 y la recuperación hematológica. Posteriormente una vez al mes hasta los 3 meses, a los 6, 9, 12 meses y anualmente así como en caso de recaída. En 3 casos, en que no se estudió el paciente en la fase pre-TMO con los FRLP, se realizó, en el post-TMO, biopsia de piel con posterior cultivo de fibroblastos para extracción de ADN

somático.

En los casos de incompatibilidad ABO mayor o Rh (receptor-, donante +), la valoración del implante se ha podido realizar en fases más precoces del post-TMO. En el resto de pacientes se ha estudiado el implante a partir de los 3 meses de la última transfusión.

En el caso de que donante y receptor fueran de diferente sexo y/o presentasen un marcador cromosómico no constitucional se ha practicado estudio citogenético a intervalos variables en los pacientes sometidos a TMO.

3.1.4 DEFINICION DE IMPLANTE, QUIMERA TOTAL, QUIMERA MIXTA

Se define que una médula ósea ha implantado cuando se detectan células hematopoyéticas del donante a partir del día +14 del TMO.

Se define a un paciente como "quimera total " cuando, despues del TMO, los estudios con marcadores genéticos detectan sólo células linfohematopoyéticas del donante (Hill et al, 1986).

Se define a un receptor de un TMO como "quimera mixta linfohematopoyética" ó "quimera mixta" cuando, mediante los estudios con marcadores genéticos, se detectan células del donante y del receptor a partir del día +14 del TMO (Hill et al, 1986). A efectos de análisis, no se han excluido los casos en que la quimera mixta fuera el preludio de la recaída leucémica a corto plazo.

TABLA 31.1a CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
9/M	LAL-2ª RC	4	SI	CY+ICT	MTX	NO/SI	53+	RCC
27/V	LAL-2ª RC	17	NO	CY+ICT	MTX	III/SI	17	Rec focal
28/V	LLC	36	SI	CY+ICT+ CLR	MTX	I/NO	48+	Remisión Clín-Biol
34/V	LANL-2ª RC	11	SI	CY+ICT	MTX	I/SI	17	Rec Medular
36/V	LMC CrPh+	22	SI	CY+ICT	CSA	I/SI	42+	RCC
38/M	LANL-3ª RC	36	SI	CY+BU+MF	MTX	II/SI	18	Sepsis Neumoc
45/V	AA	14	SI	CY+ITA	CSA	I/SI	37+	Recuperado
47/M	AA	14	SI	CY+ITA	CSA	II/NO	37+	Recuperada
48/V	LAL-2ª RC	30	SI	CY+ICT	MTX+CSA	-	<1	Sepsis Candida

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RCC: remisión continua completa; LLC: leucemia linfática crónica; CLR: clorambucil; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; MF: melfalán; ITA: irradiación toraco-abdominal; Fr: fraccionada;

TABLA 31.1b CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
53/M	LANL-1ª RC	34	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	36+	RCC
55/V	LAL-1ª RC	16	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	27	Rec test+14 Rec mening+19 Rec medular+26
56/M	LAL-2ª RC	17	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	IV/NO	<1	EICH agudo
61/V	LAL-2ª RC	16	SI	CY+ICT Fr	MTX/CSA	I/NO	10	Rec medular+9
64/V	LAL-2ª RC	5	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	4	Rec medular +2
66/V	MM	43	SI	CY+ICT Fr +CLR	MTX+CSA	-	<1	IRA+ Sepsis
68/V	LANL-1ª RC	30	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	8	Colitis CMV
72/V	TALA MAJOR	8	SI	CY+BU	MTX+CSA	-	24+	Rech implante
74/V	LMC CB CrPh+	17	NO	CY+ICT Fr	MTX+CSA	IV/NO	<1	EICH agudo
79/V	LAL-2ª RC	12	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-	<1	Hemor cerebral

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RC: remisión completa; MM: mieloma multiple; TALA MAJOR: talasemia major; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CB: crisis blástica; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; Fr: fraccionada;

TABLA 31.1c CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
82/M	AA	9	SI	CY+ITA	MTX/CSA	II/SI	22+	Recuperada
84/V	LAL-2ª RC	13	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/NO	6	Rec medular
85/V	HODGKIN	18	SI	CY+BU	MTX+CSA	I/SI	21+	RCC
87/V	LANL-1ª RC	15	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	19+	RCC
91/V	LANL-1ª RC	7	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	18+	RCC
92/M	LANL-1ª RC	43	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/NO	18+	Rec medular+14 RCC +15
94/V	LANL-2ª RC	15	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	2	Hemor Pulmonar
99/V	LAL-2ª RC	12	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	3	Rec medular
100/V	OSTEOPETROSIS	1	NO	CY+BU	-	NO	1	Hemor cerebral
102/M	LAL-1ª RC	6	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	12+	RCC

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RCC: remisión continua completa; AA: aplasia medular; ITA: irradiación toraco-abdominal; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; Fr: fraccionada;

TABLA 31.1d CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
109/V	LMC CrPh+	26	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/SI	12+	RCC
122/V	LAL-1ª RC	13	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/SI	10+	Rec test +8 Rem medular+10
128/V	LAL-1ª RC	10	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	9+	RCC
129/M	WALDENSTROM	33	SI	CY+ICT Fr +CLR	MTX+CSA	I/NO	9+	RCC
135/M	LAL-1ª RC	27	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-	<1	Neumonía
139/V	LANL-1ª RC	7	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-	<1	IRA. Sepsis
141/V	LANL-1ª RC	35	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	IV/NO	3	EICH Neumonia
143/V	LAL-4ª RC	12	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	IV/NO	<1	EICH aguda
147/V	LAL-2ª RC	17	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA		<1	
149/V	HODGKIN	31	SI	CY+BU	MTX+CSA	IV/NO	3	EICH aguda

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RCC: remisión continua completa; AA: aplasia medular; ITA: irradiación toraco-abdominal; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; Fr: fraccionada;

TABLA 31.1e CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
153/V	LAL-1ª RC	16	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I	3+	RCC
157/M	LAL-2ª RC	6	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	2+	RCC
159/M	LANL-Rec	29	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-	1+	RCC
216C/M	LAL-2ª RC	5	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	23+	RCC
218C/V	LAL-1ª RC	14	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	9	Rec medular
220C/V	AA	13	SI	CY+ITA	CSA	III/NO	10+	Recuperado
221C/M	LANL-2ª RC	26	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-/NO	21+	RCC
229C/V	LANL-1ª RC	23	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/SI	19+	RCC
233C/M	LAL-1ª RC	25	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-	<1	Neumonia
240C/M	LANL-1ª RC	24	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/-	2	Hemor cerebral
241C/M	LANL- Rec	47	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	4	Rec medular
242C/M	LAL-2ª RC	21	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	14+	RCC

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RCC: remisión continua completa; AA: aplasia medular; ITA: irradiación toraco-abdominal; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; Fr: fraccionada;

TABLA 31.1f CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
243C/M	LAL-1ª RC	27	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO/SI	14+	RCC EICH Crón
244C/V	LANL-1ª RC	21	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	5	Neumonía
246C/M	LMC CrPh+	37	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/NO	3	Neumonia
248C/V	ARBT	33	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	12+	RCC
253C/V	LAL-3ª RC	25	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	IV/NO	2	Neumonía Asperg
257C/M	LANL-1ª RC	30	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	I/NO	9+	RCC
261C/M	LMC CrPh+	25	NO	CY+ICT Fr	NO	-	<1	Sepsis
262C/V	LAL-1ª RC	21	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/NO	2	Hepatitis
263C/V	LAL-2ª RC	20	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	2	Sepsis Rech
266C/V	LAL-2ª RC	24	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/SI	5+	RCC
269C/M	LAL-2º RC	25	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	II/NO	3+	RCC

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RCC: remisión continua completa; AA: aplasia medular; ITA: irradiación toraco-abdominal; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; Fr: fraccionada;

TABLA 31.1g CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TMO

PACIENTE UPN/SEXO	DIAGNOSTICO	EDAD AÑOS	HISTOCOM-PATIBLE	ACONDICIO-NAMIENTO	PREVENCION EICH	EICH A/C	SUPERVI-VENCIA/M	ESTADO ACTUAL
271C/M	LMC CrPh+	48	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	2+	RCC
272C/V	LAL-2ª RC	21	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	2+	RCC
273C/V	LANL-2ª RC	21	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	NO	2+	RCC
274C/M	LMC CrPh+	30	SI	CY+ICT Fr	MTX+CSA	-	1+	-

UPN: nº identificación paciente; EICH: enfermedad injerto contra huesped; A: aguda; C: crónica; M: mujer; V: varón; LAL: leucemia aguda linfoblástica; CY: Ciclofosfamida; ICT: irradiación corporal total; MTX: methotrexate; RCC: remisión continua completa; AA: aplasia medular; ITA: irradiación toraco-abdominal; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LMC CrPh+: leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positiva; CSA: ciclosporina A; BU: busulfán; Fr: fraccionada

TABLA 31.2 COMPARACION DE LOS TRES METODOS DE ESTUDIO EN LOS 50 PACIENTES CON SEGUIMIENTO

		DONANTE-RECEPTOR		
Nº	DIAGNOSTICO	DIFERENCIA DE SEXO	DIFERENCIASAG ERITROCITARIOS	DIFERENCIAS FRLP
22	LAL	11	19*	21
14	LANL	9	15	15
4	LMC	2	4	4
4**	AA	3	4	2
2	HODGKIN	1	2	2
4	Otros***	1	3*	4
50		27	47	48

*: En 2 casos no se determinó por transfusiones previas y en 1 paciente el fenotipo fué idéntico.

**: En 2 casos no se estudió previamente al receptor.

***: 1 Leucemia linfática crónica; 1 Talasemia major;
1 Macroglobulinemia de Waldenström;
1 Anemia refractaria con mieloblastosis parcial.

Figura 31.1 PACIENTES TRATADOS CON T.M.O.
TIPOS DE LEUCEMIAS

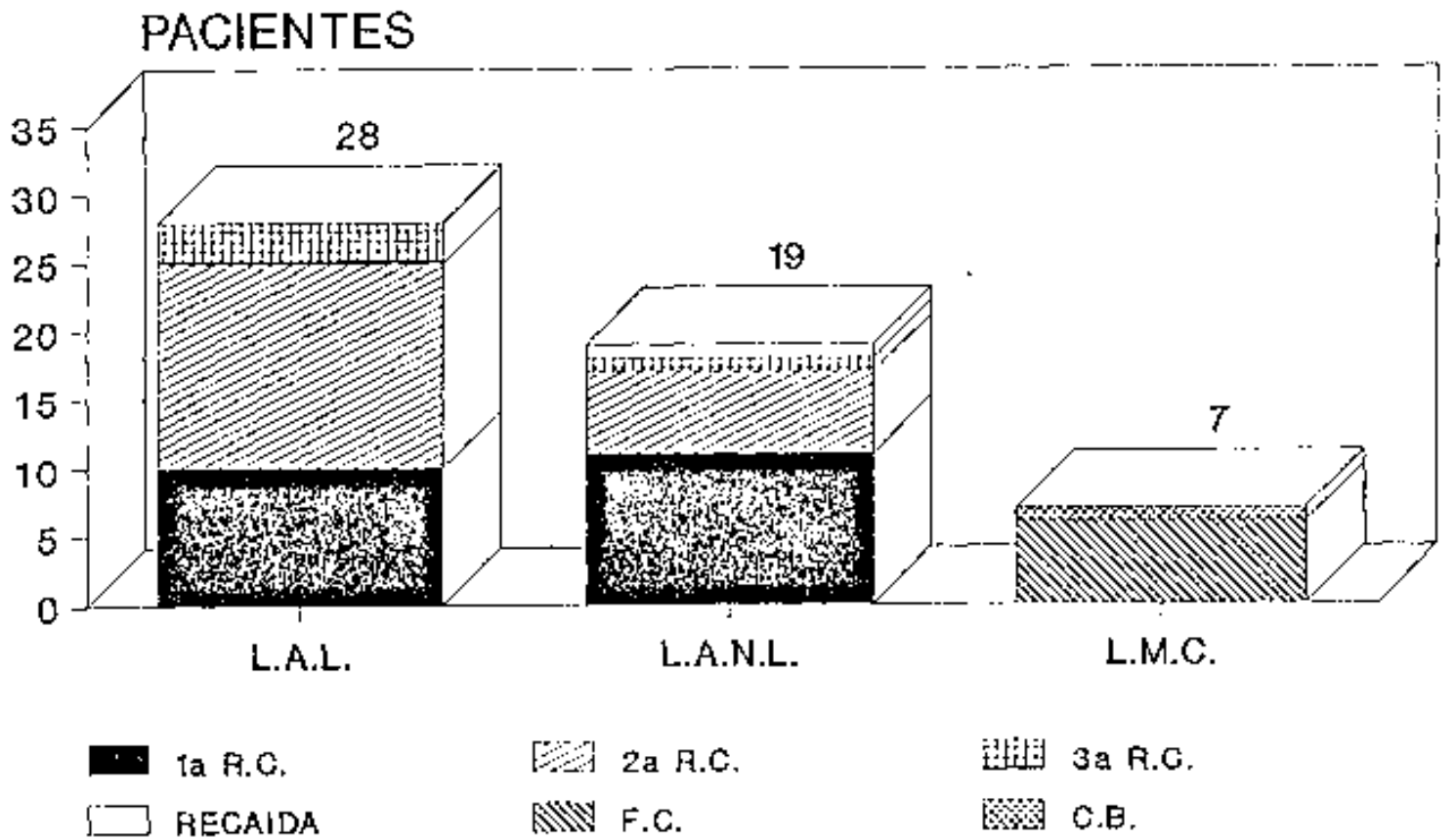
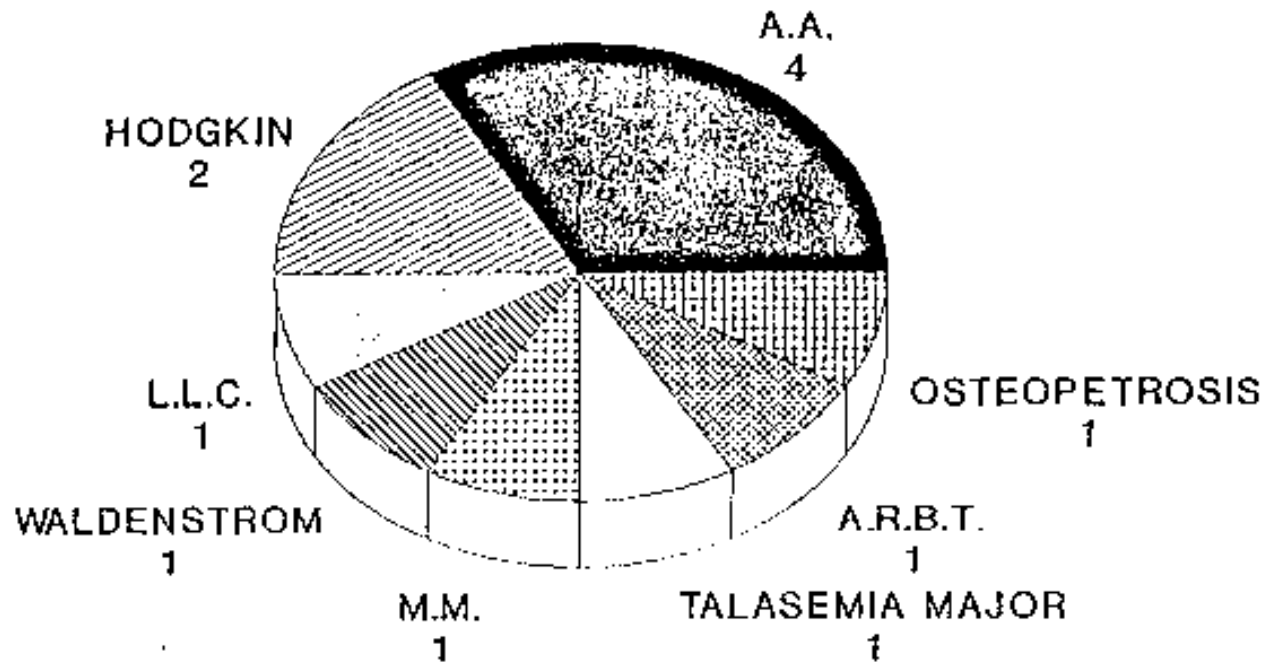


Figura 31.2

PACIENTES TRATADOS CON T.M.O.
TIPOS DE HEMOPATIA



3.2 METODOS

3.2.1 EL ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS ERITROCITARIOS

3.2.1.1.- REACTIVOS

- Albúmina bóvina al 30% en suero fisiológico.
- Cloroquina difosfato 200 mg/ml (Gomma-Quin)
- Cloruro sódico 0,15M (Suero fisiológico)
- Formaldehido al 1% en citrato trisódico al 3,13% en H2O destilada
- Hematíes humanos (He Hu) de grupo A1 en suspensión al 3% en suero fisiológico (SF)
- He Hu de grupo A2 en suspensión al 3% en SF
- He Hu de grupo B en suspensión al 3% en SF
- He Hu de grupo O R1R1 Kk SS Fy (a+b-) Jk(a+b-) en suspensión al 3% en SF
- He Hu de grupo O R2R2 kk ss Fy(a-b+) Jk(a-b+) en suspensión al 3% en SF
- He Hu del grupo O rr Kk SS Fy(a+b+) Jk(a+b+) en suspensión al 3% en SF
- Hidroxietilalmidón (HESPAN) al 6% en SF
- Solución de tampón fosfato isotónico pH 7,3

Na2HPO412H2O	20	gr
KH2PO4	1,4	gr
NaCl	7,2	gr
Suero AB	1	ml
H2O destilada c.s.p.	1000	ml

- Sueros anti-A, anti-B y anti-AB humanos policlonales y monoclonales.
- Sueros anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e humanos albuminosos.

- Sueros anti-A1 y anti H (lectinas)
- Sueros anti-Fya y anti-Fyb humanos
- Sueros anti-Jka y anti-Jkb humanos
- Sueros anti-M (conejo), anti-N (lectina), anti-S y anti-s humanos
- Sueros anti-Lua y anti Lub humanos
- Sueros anti-Kell, anti-Cellano y anti-Kpb humanos y anti-Kpa
- Suero anti-P1 humano

3.2.1.2 **MUESTRAS PRE-TMO: PACIENTE Y DONANTE**

- 5-10 ml de sangre total extraída sobre anticoagulante (EDTA, heparina). En el caso del paciente, intentar hacer el estudio, a ser posible, antes de que sea transfundido.
- Centrifugar 10 min a 3000 rpm y pasar el plasma sobrenadante a un tubo limpio.
- Lavar los He 3 veces con SF, procurando aspirar en cada lavado, la capa de leucocitos.
- Preparar una suspensión de los He lavados en SF a una concentración final de aproximadamente el 3%

3.2.1.3 **MUESTRAS POST-TMO DEL PACIENTE**

- Proceder para la extracción de las muestras como en el apartado anterior.

ESTUDIO DE LA FRACCION RICA EN RETICULOCITOS

Cuando el paciente ha sido transfundido recientemente, para

poder determinar los antígenos eritrocitarios de sus He es necesario separar éstos de los transfundidos. Los He circulantes más jóvenes (reticulocitos) son del paciente y los He más viejos y más densos son los transfundidos.

- En un tubo de vidrio, estrecho y alto, poner 5 ml de sangre total y añadir 3 ml de HESPAN al 6%. Mezclar.
- Colocar el tubo inclinado unos 45º-60º, durante 20-25 minutos.
- Colocar el tubo vertical 5-10 min.
- Aspirar y descartar el sobrenadante rico en leucocitos.
- Añadir otros 3 ml de HESPAN y repetir los pasos antes citados.
- Lavar los He 3 veces con SF.
- Una vez aspirado el sobrenadante del último lavado, llenar 10-12 capilares de microhematocrito con los He lavados y concentrados. Sellar con plastilina por uno de los extremos.
- Centrifugar en una centrifuga de microhematocrito durante 20 min.
- Cortar los capilares y juntar en un tubo de hemólisis los 2-3 mm superiores de los He centrifugados (fracción rica en reticulocitos) (FRR) y en otro tubo los 2-3 mm inferiores (fracción pobre en reticulocitos) (FPR)
- Lavar la FRR y la FPR con abunadante SF
- Ajustar una concentración final de los He del 3% en SF. Proceder al estudio de los antígenos eritrocitarios de cada fracción.

3.2.1.4 TECNICAS DE ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS ERITROCITARIOS SISTEMA ABO

A.- Prueba hemática

- Etiquetar 3 tubos de hemólisis como anti-A, anti-B y anti-AB.
- En cada tubo poner dos gotas del correspondiente anti-suero y añadir 1 gota de He problema en suspensión al 3% en SF.
- Mezclar y centrifugar 20 sg en una Serofuge
- Leer en busca de aglutinación. La resuspensión homogénea de los He indica una reacción negativa. La presencia de aglutinación indica reacción positiva.

B.- Prueba sérica

- Etiquetar 3 tubos de hemolisis como A1, A2 y B.
- En cada uno de los tubos poner 2 gotas de plasma del paciente.
- Al tubo A1 añadir 1 gota de He-test A1, al tubo A2, He-test A2 y al tubo B He-test B en suspensión salina al 3%. Mezclar.
- Incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 20 sg en la Serofuge. Leer en busca de aglutinación.

C.- Interpretación de los resultados

Prueba Hemática			Prueba Sérica			
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	He A1	He A2	He B	ABO
+	0	+	0	0	+	A
0	+	+	+	+	0	B
+	+	+	0	0	0	AB
0	0	0	+	+	+	0

D.- Subgrupo de A

- En un tubo de hemolisis colocar 2 gotas de anti-A1
- Añadir 1 gota de He problema en suspensión al 3%
- Incubar 5 min a temperatura ambiente
- Centrifugar 20 sg en la Serofuge
- Leer en busca de aglutinación

  Interpretación:

  - Aglutinaciones intensas: He A1
  - Aglutinación moderada: He A intermedios
  - No aglutinación: He A2

SISTEMA Rh

- Etiquetar 6 tubos de hemólisis como anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e y control Rh
- En cada tubo poner 2 gotas del correspondiente antisuero y añadir 1 gota de He problema en suspensión al 3%
- Mezclar e incubar 30 min a 37º C
- Centrifugar 1 min en la Serofuge
- Leer en busca de aglutinación. Anotar los resultados.
- Lavar 4 veces los tubos que den un resultado negativo en la fase anterior.
- Añadir 2 gotas de suero antiglobulina humana polivalente.
- Centrifugar 20 sg en la Serofuge y leer en busca de aglutinación.

Interpretación:

ANTISUERO	CONTROL Rh	RESULTADO
Aglutinación	No aglutinación	He positivos para el antigeno
No aglutinación	No aglutinación	He negativos para el antigeno
Aglutinación	Aglutinación	Resultado no válido

OTROS SISTEMAS ERITROCITARIOS

A.- Técnica General. Para cada antigeno estudiado

- Etiquetar 3 tubos de hemólisis de la siguiente manera:
- Abreviatura del antisuero+MP (muestra problema)

"JKa" "K"

"MP" "MP"

- Abreviatura del antisuero+CP (control positivo).
- Poner en cada uno de los tubos 1-2 gotas del antisuero correspondiente.

  Añadir:

  - Tubo "MP" : 1 gota de He problema en suspensión salina al 3%
  - Tubo "CP":1 gota de He control positivo en suspensión salina al 3%.
  - Incubar el tiempo y a la temperatura óptima para el antisuero escogido.
  - Centrifugar y leer en busca de aglutinación.
- Si el antisuero es solo activo en antiglobulina, prescindir del paso anterior y lavar los He 4 veces con SF.
- Aspirar el sobrenadante del último lavado y añadir 2 gotas de suero antiglobulina humana polivalente.

- Mezclar y centrifugar 20 sg en la Serofuge
- Leer en busca de aglutinación

Interpretación:

MUESTRA PROBLEMA	CONTROL POSITIVO	INTERPRETACION
Aglutinación	Aglutinación	Muestra POSITIVA para el antígeno estudiado
Negativo	Aglutinación	Muestra NEGATIVA para el antígeno estudiado
Aglutinación	Negativo	Resultado no válido

3.2.1.5 POBLACIONES ERITROCITARIAS MENORES

TECNICA GENERAL

- Preparar una suspensión de He al 3-5% en SF de la muestra problema.
- En un tubo de hemólisis poner 2 gotas de un antisuero reactivo con una de las poblaciones de la mezcla, pero no con la otra.
- Incubar el antisuero escogido a la temperatura y tiempo adecuados para el mismo.
- Centrifugar y resuspender suavemente 3 veces
- Leer macroscópica y microscópicamente, buscando aglutinados de He sobre un campo de He no aglutinados. Si el antisuero empleado es activo sólo en antiglobulina, una vez terminada la fase de incubación, lavar 4 veces y añadir 2 gotas de suero antiglobulina

humana polivalente.

- Centrifugar y leer como se ha descrito antes.

TECNICA DE ABSORCION-ELUCION

- Lavar los He problema 4 veces con SF
- En un tubo de hemólisis poner 100 µl de los He lavados y concentrados
- Añadir 500 µl de anti-A o anti-B o anti-AB (según sea el grupo ABO de la población mayor y el de la población menor), policlonal humano
- Incubar 30 min a temperatura ambiente
- Lavar 8-10 veces con abundante SF
- Enfrentar el sobrenadante del último lavado a los He reactivos con el anticuerpo utilizado, en antiglobulina. Si no hay aglutinación seguir con el paso siguiente. En caso contrario, continuar lavando hasta que el sobrenadante no sea reactivo
- Añadir 2 gotas de SF a los He lavados y concentrados
- Tapar el tubo con parafilm y dejar resbalar los He por las paredes del tubo mientras se imprime a éste un movimiento rotatorio, de tal forma que las paredes queden recubiertas de una capa delgada de He
- Congelar a -40º C (unos 20-30 min) con el tubo en posición horizontal
- Descongelar rápidamente.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min.
- Pasar el sobrenadante (hemolizado) a otro tubo dejando los estromas en el tubo original.
- Añadir al hemolizado 1 gota de albumina bovina al 30% y

1 gota de los He-test adecuados, en suspensión salina al 3%.

- Incubar a temperatura ambiente durante 30-60 min.
- Lavar 4 veces.
- Añadir 2 gotas de suero antiglobulina humana.
- Centrifugar durante 20 sg en la serofuge.
- Leer en busca de aglutinación

Interpretación:

Un resultado positivo indica que había He capaces de reaccionar con el antisuero utilizado, aunque su número no fuera apreciable por las pruebas de aglutinación.

PRUEBA DE ROSETAS

- En un tubo de hemólisis colocar 2 gotas de antisuero reactivo con la población menor.
- Añadir 1 gota de los He problema en suspensión o7 3 salina al 3%.
- Incubar a 37º C durante 30 min.
- Lavar 4 vece con SF.
- Añadir 2 gotas de suero antiglobulina humana polivalente y mezclar.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 min agitando frecuentemente.
- Lavar 4 veces con SF.
- Añadir 1 gota de suspensión al 3% de He recubiertos de anticuerpo y mezclar.
- Centrifugar durante 20 sg en la serofuge y resuspender suavemente. Repetir la operación.
- Depositar la suspensión sobre un portaobjetos de vidrio

y leer al microscopio, en busca de "rosetas" en un fondo de He no aglutinados.

CUANTIFICACION DE LAS POBLACIONES DE LA MEZCLA

- En cada uno de los tubos de vidrio poner 0,4 µl del antígeno escogido y añadir 0,2 µl de los He problema a una concentración de $6x10^5/\mu l$ en tampón fosfato isotónico pH 7,3.
- Poner otros 2 tubos como control en los que el antígeno es sustituido por una cantidad similar de tampón fosfato isotónico pH 7,3.
- Tapar los tubos e incubar el antígeno estudiado a la temperatura y tiempo adecuados para el mismo.
- Si el antisuero es activo sólo en antiglobulina, lavar 4 veces y añadir 2 gotas de suero antiglobulina antihumana polivalente.
- Centrifugar y resuspender como en el apartado anterior.
- Añadir 0,5 µl de tampón fosfato isotónico y mezclar.
- Si el antisuero es activo en salina, pasar directamente a la fase de centrifugación-resuspensión y no añadir tampón fosfato.
- Para calcular el porcentaje de He aglutinados tomar una muestra de cada uno de los tubos problema y control, diluir al 1/200 en formaldehido al 1%, en citrato sódico al 3,13% y contar los He libres/µl, utilizando un cámara de Neubauer. Deben contarse, al menos, 8 cámaras de cada suspensión y de cada cámara 80 cuadrados pequeños.

$$He/mm = M \times \frac{1}{0,02} \times 200 = M \times 10000$$

donde M es el número de He encontrados en los 80 cuadrados

$$100 - \frac{\text{Nº de He libres en la muestra problema}}{\text{Nº de He libres de la muestra control}} \times 100 = \% \text{ de He aglutinados}$$

3.2.2 METODO PARA LOS ESTUDIOS CITOGENETICOS

El método utilizado ha sido el de sincronización celular o bandeo de alta resolución descrito por Yunis (1981).

3.2.2.1 TAMPONES Y REACTIVOS

- Bencilpenicilina sódica 1.000.000 UI
- 5 Bromodeoxiuridina (5-BrdU)
- Cloruro potásico, 0,075M:

Cloruro potásico	5,6 g
H2O c.s.p.	1000 ml

- Colcemid, 10 mcg/ml
- Fitohemaglutinina (PHA)
- Glutamina 2%
- Kodak technical pan film 2411
- Medio de cultivo Mc Coy's
- Medio de cultivo RPMI 1603
- Metanol-Acético (3:1)
- Methotrexate
- Suero bovino fetal 15%
- Tampón SSC (2x):

Citrato sódico 0,3M	17,53 g
Cloruro sódico	8,82 g

H2O c.s.p. 1000 ml

- Tampon de Sorensen 15M:

  49 ml solución A + 51 ml solución B (pH 6,8)

  Solución A:

  Fosfato sódico 11,86 g

  H2O c.s.p. 1000 ml

  Solución B:

  Fosfato potásico 9,07 g

  H2O c.s.p. 1000 ml

- Tinción de Wright
- Xilol

3.2.2.2 RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

SANGRE PERIFERICA

Extracción de 5-10 ml de sangre en tubo estéril con 300 UI de heparina libre de conservantes (Rovi).

MEDULA OSEA

Extracción de 2-4 ml de sangre medular en un tubo estéril que contiene 3 ml de medio de cultivo Mc Coy's 5A con 300 UI de heparina libre de conservantes (Rovi).

3.2.2.3 CULTIVO CELULAR

A CORTO TERMINO SIN ESTIMULANTES

- Cultivar de 1-2x10^6 células de médula ósea en 10 ml de

medio de cultivo RPMI 1603 o 1640 suplementado con suero bovino fetal al 15%, penicilina 5000 U/ml y estreptomicina 5000 µg/ml.

- Poner a 37º C, durante 24 horas.

CON ESTIMULANTES

- Cultivar 1 ml de sangre periférica en 10 ml de medio de cultivo RPMI suplementado, como en el apartado anterior y 0,2 ml de PHA, durante 72 horas a 37º C.
- El resto del procedimiento, idéntico al apartado anterior

3.2.2.4 SINCRONIZACION CELULAR

- Añadir methotrexate a concentración final de 10^{-7}M, durante 17 horas
- Centrifugar a 1000 rpm, durante 10 min.
- Cambiar 2 veces el medio de cultivo, añadiendo 5-BrdU ($75x10^{-6}$M) o timidina.
- Incubar a 37º C durante 5 horas.
- Centrifugar a 1000 rpm durante 10 min.

3.2.2.5 SACRIFICIO DEL CULTIVO

- Añadir Colcemid a concentración final de 0,05 µg/ml, durante los últimos 10 minutos.

- Una vez incubadas las células con el antimitótico, colcemid, centrifugar a 1000 rpm durante 10 min. y realizar el choque hipotónico con ClK 0,075M, incubando a 37º C durante 10 min.
- La fijación de las células se lleva a cabo con metanol/acético (3:1), realizando de tres a cuatro fijaciones.

3.2.2.6 PREPARACION DE LAS EXTENSIONES

- Previo lavado de los portas, se hacen las extensiones, secándose al aire o en placa caliente. Las extensiones se guardan a Temperatura ambiente o a 60 ºC de uno a tres días.

3.2.2.7 TECNICAS DE BANDEO

- La técnica de identificación cromosómica utilizada ha sido el bandeo G con tinción de Wright.
- Teñir cada extensión con una dilución de 1:3 de solución madre (0,025% en metanol) en Tampón Fosfato 0,06M, PH 6,8, mezclando bien. El tiempo de tinción varía de 2 a 4 min.
- Lavar las extensiones y cubrirlas.

3.2.2.8 ANALISIS AL MICROSCOPIO

Localizar las metafases al microscopio, seleccionando un mínimo de veinticinco.

3.2.2.9 CARIOTIPAJE E INTERPRETACION

Búsqueda de cromosomas sexuales y/o identificación de marcadores cromosómicos no constitucionales.

3.2.3 METODO PARA LOS ESTUDIOS MOLECULARES

3.2.3.1 TAMPONES Y REACTIVOS

- Acetato potásico, 3M, pH 4,8
- Acetato sódico, 3M
- Acido clorhídrico, 1M
- Acido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,5M
- Agarosa (Miles)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Antibióticos:

  solución de:

  Ampicilina: solución madre de 25 mg/ml agua, filtrar, guardar a -20º C.
  Solución de trabajo 35-50 µg/ml

  Cloramfenicol: solución madre de 34 mg/ml en etanol al 100%, filtrar, guardar a -20º C. Solución de trabajo para amplificación de plásmidos 179 µg/ml y para selección de bacterias resistentes 30 µg/ml.

  Tetraciclina: solución madre de 12,5 mg/ml en etanol/agua (50% v/v), guardar a -20º C. Solución de trabajo 2,5-15 µg/ml. Debe almacenarse en

lugar oscuro.

- Azul de bromofenol:

  solución de:

azul de bromofenol	10% en H2O

- Azul de bromofenol:

  solución de:

azul de bromofenol	0,25%
sacarosa	40% (p/v) en H2O

- B-Mercaptoetanol (BME), 14M
- Bromuro de etidio, 10 mg/ml en H2O
- Células de E. coli, tipo JM103, HB101, etc.
- Cloroformo isoamílico:

  solución de:

Cloroformo	480 ml
Alcohol Isoamílico	20 ml

  Saturado en 500 ml Tris 30 mM, pH8
- Cloruro cálcico, 1M
- Cloruro cálcico, 50 mM esteril
- Cloruro magnésico, 1M
- Cloruro sódico, 5M
- Denhardt:

  solución de (100X)

ficoll	2%
polivinilpirrolidona (PVP)	2%
albúmina de suero bovino (BSA)	2%

- DNA de esperma de salmón , 10 mg/ml en H2O
- Etanol 70% en H2O
- Enzimas:

  Tripsina

  Colagenasa tipo IV

- Fenol-Cloroformo-isoamílico:

  solución de:

Fenol	250 ml
Cloroformo	240 ml
Alcohol Isoamílico	10 ml

  Saturado en 500 ml Tris 20 mM, pH 8

- Formamida desionizada
- Hidróxido sódico, 10M
- Marcadores de peso molecular de ADN:

  ADN de fago lambda, digerido con Hind III

  ADN de bacteriofago X174, digerido con Hae III

- Medio de cultivo:

  Dulbecco's modification of Eagle's Medium

- Medio LB (Luria-Bertani):

Bacto-triptona	10 g
Bacto-yeast extracto	5 g

  NaCl 10 g ajustar el pH a 7,5 con NaOH

- Medio sólido:

  Preparar el medio líquido (medio LB) y antes de introducir en el autoclave añadir 15 g/l de Bacto-agar

- Polimerasa I de E. Coli (Klenow)
- Proteinasa K:

  solución de:

Proteinasa K	100 mg
SDS 10%	5 ml
EDTA 0,25 M	400 µl
H2O c.s.p.	50 ml

  Mantener a -20º C

- RNAsa:

  solución de:

Disolver la RNAsa a razón de 10 mg/ml en H2O. Hervir durante 10 minutos, fraccionar y guardar a -20º C

- Sephadex G-50
- Sodio dodecil sulfato (SDS) 10% en H2O
- Soluciones de lavado de los filtros:

	1ª	2ª	3ª	4ª
SSC 20X	50 ml(2X)	25 ml(1X)	12,5 ml(0,5X)	2,5 ml(0,1X)
SDS 10%	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
H2O c.s.p.	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml

- Solución desnaturalizante:

NaOH 0,5M	20 gr
NaCl 1,5M	80 gr
H2O c.s.p.	1000 ml

- Solución neutralizante:

NaCl 1,5M	88 gr
Tris 0,5M	61 grl
H2O c.s.p.	1000 ml (ajustar a pH 6,0 con HCl)

- Soluciones para efectuar minipreparaciones:

Solución I : Glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM, pH 8,0
EDTA 10 mM
Lisozima 19 mg/ml

Solución II : NaOH 0,2 N
SDS 1%

Solución III : Acetato potásico 3M, pH 4,8 o7 3

- Tampón de lisis eritrocitos (LE):

Tris 2M	5 ml
MgCl2 1M	2,5 ml
H2O c.s.p.	500 ml

- Tampón de lisis leucocitos

Tris 2M	2,5 ml
NaCl 5M	40 ml
EDTA 0,25M	4 ml
H2O c.s.p.	500 ml pH: 8,2

mantener a 4º C

- Tampón TBE, 10X:

Tris base, 1M	121 g
EDTA, 20 mM	7,44 g
Acido bórico, 1M	61,7 g
H2O c.s.p.	2000 ml

- Tampón SSC 20X:

NaCl 3M	175,3 g
Citrato sódico	88,2 g
H2O c.s.p.	1000 ml

- Tampón de prehibridación

Denhardt's (50X)	50 ml
Esperma de salmón (10 mg/ml)	2,5 ml
Tampón fosfato pH 6,8 (0,2M)	125 ml
PPi (5%)	10 ml
SSC (20X)	100 ml
SDS (10%)	25 ml
Heparina	1 ml
H2O c.s.p.	500 ml

- Tampón de hibridación:

Composición idéntica al tampón de pre-hibridación, salvo que en lugar de 500 ml de H2O, contiene 200 ml de dextran sulfato al 25%.

- Tampón para el marcaje mediante "oligollabeling":

Solución 0: 1,25 M tris-HCl

0,125M MgCl2

pH 8

Solución A: 1ml solución 0

18 µl solución 2 Mercaptoetanol (2-BME)

5 µl dATP

5 µl dTTP disueltos en tris EDTA

5 µl dGTP (TE 3/0,2 mM pH 7,4)

Guardar a -20º C

Solución B: 2 M hepes. Se lleva a pH 6,6 con 4M NaOH

Solución C: Hexadeoxirribonucleótidos. Se resuspende con TE 10/1 mM hasta obtener una densidad óptica de 90 U/ml. Guardar a -20º C.

Mezclar las soluciones A, B y C en una proporción 100:250:150 respectivamente

- Tampón salino fosfato (PBS):

KCl	2,68 mmoles
KH2PO4	1,47 mmoles
NaCl	0,137 moles
Na2HPO4.7H20	8,06 mmoles
H20 destilada	1000 ml

pH 7,4

- Tris, 2M a diferentes pH: 7,4; 7,6; 8
- Tris 10 mM/ EDTA 10 mM: (TE 10/10)
- Tris 1 mM/ EDTA 0,1 mM: (TE 1/0,1)
- Tris 10mM/EDTA 0,2 mM: (TE 10/0,2)
- Suero bovino fetal (SBF)

3.2.3.2 CARACTERISTICAS DE LAS SONDAS EMPLEADAS Y POLIMORFISMOS DEL ADN ESTUDIADOS

Las caracteristicas de las sondas empleadas junto con las referencias bibliográficas que las describen se muestran en la Tabla 32.1.

Los polimorfismos del ADN empleados en el estudio del implante medular se muestran en la Tabla 32.2.

3.2.3.3 METODOS GENERALES PARA EL ESTUDIO DEL ADN HUMANO

OBTENCION DEL ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA Y/O MEDULAR

- Extraer de 20 a 25 ml de sangre periférica en anticoagulante (EDTA) y/o de 2 a5 ml de sangre medular tambien en anticoagulante (EDTA).
- Lavar las muestras de sangre con solución fisiologica.
- Centrifugar a 4o C, durante 5 min., a 2500 rpm.
- Descartar el sobrenadante conservando los leucocitos
- Añadir tampón de lisis de eritrocitos hasta un volumen final de 50 ml, manteniendo la mezcla en hielo picado durante 10 min.
- Centrifugar a 4º C, durante 15 min., a 3000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y repetir la operación, añadiendo tampón de lisis de eritrocitos hasta un volumen final de 25 ml.
- Centrifugar a 4º C, durante 15 min., a 3000 rpm. y descartar el sobrenadante.
- Agregar al botón celular 3 ml de tampón de lisis leucocitos. Si el botón contiene un número muy elevado

de celulas, puede añadirse hasta 6 ml de dicho tampón manteniendo la proporción final de SDS y proteinasa

- Agregar 0,2 ml de solución de SDS al 10%.
- Añadir 0,5 ml de solución de proteinasa K
- Agitar vigorosamente y mantener la mezcla en agitación suave, a 37º C durante 18 horas
- Agregar 1 ml de una solución saturada de ClNa (aprox. 5,5 a 6 M)
- Agitar enérgicamente, entre 15 y 30 seg., hasta obtener una emulsión completa.
- Centrifugar a 3400 rpm, durante 20 min., separando el sobrenadante, que se somete a una nueva centrifugación en idénticas condiciones.
- Agregar al sobrenadante, 2 vol. de etanol absoluto, agitando cuidadosamente hasta que aparezca el precipitado de ADN con aspecto de medusa
- Separar la medusa de ADN y lavarla, por inmersión en etanol al 70%.
- Disolver en 1 a 2 ml de Tris-EDTA 10/0,2, la medusa de ADN, manteniendo la mezcla en agitación suave, a 37o C durante 2 horas.
- Conservar la solución de ADN a 4º C.

A PARTIR DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS

- Extraer una muestra de piel, aproximadamente de 4 mm con un punch, del antebrazo del paciente.
- Fragmentar la muestra en trozos, en condiciones estériles, e incubar en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro con:

- 1 ml de medio de cultivo completo:
  DMEM con 10% SBF v/v
  1 mM de piruvato sódico
  2 mM de L-Glutamina,
  100 U/ml de penicilina
  100 µg/ml de Esteptromicina
  50 µg/ml de Gentamicina
- 200 U/ml de colagenasa tipo IV

- Incubar a 37º, en una estufa de cultivo celular, durante 24 horas en atmósfera de CO2 (5%). Durante este tiempo la colagenasa libera los fibroblastos contenidos en la dermis de la muestra. Tras la digestión con colagenasa los fibroblastos de la muestra aparecen bajo dos formas: como células individuales y como pequeños fragmentos de dermis sin digerir.
- Dividir el sobrenadante en fracciones de 330 µl de volumen y sembrar en 3 pocillos que contengan 2,7 ml de medio de cultivo fresco e incubar durante 24 horas a 37ºC.
- Lavar con 2 ml de PBS para eliminar las células muertas y añadir 2 ml de medio de cultivo fresco.
- Renovar el medio de cultivo cada 2-3 días y cuando el cultivo llegue al estado de confluencia, las células se liberan del pocillo mediante un tratamiento con tripsina: lavar las células con PBS y añadir 0,5 ml de una solución de tripsina al 0,1% en PBS (p/v).
- Inactivar la tripsina añadiendo 2,5 ml de medio de cultivo completo y centrifugar a 1200 rpm durante 10 minuntos.
- Resuspender el botón en 6 ml de medio de cultivo y

sembrar en un flascón de 25 cm^2.

- Renovar el medio de cultivo cada 2-3 días y cuando cubran toda la base del flascón añadir tripsina y sembrar en un flascón de cultivo de 75 cm^2. A partir de este momento y a cada nueva división, dividir las células obtenidas a razón de 1:3.

MEDIDA DE LA CONCENTRACION DEL ADN

Dosificación espectrofotométrica

La concentración de una solución de ADN se mide determinando la absorbancia a 260 nm. de dicha solución.
Es posible calcular la concentración según la expresión:

$$C = \frac{DO}{L}$$

El principio de Dalembert relaciona la densidad óptica (DO) con la concentración según la expresión:

$$DO: \log \frac{Io}{I} = L \times C$$

Io= intensidad luminosa de entrada

I = intensidad luminosa de salida

L = coeficiente de extinción molar

C = concentración

El coeficiente de extinción molar para el ADN bicatenario es:

$$L = \frac{1}{50\ \mu g/ml}$$ (si la longitud de onda es de 260 nm)

El coeficiente de extinción molar para el ADN monocatenario es:

$$L = \frac{1}{20\ \mu g/ml}\ \text{(a la misma longitud de onda)}$$

Para efectuar una dosificación espectrofotométrica proceder del siguiente modo:

- Preparar una dilución 1/20 de la muestra problema
- Leer las DO obtenidas a 260 y 280 nn.
- Comprobar la pureza de la muestra determinando la razón DO 260/DO 280. Cuanto más próxima a 2 más pura será la preparación, mientras que valores inferiores a 1,6 indican contaminación proteíca.

Cuantificación mediante tinción con bromuro de etidio

Se emplea preferentemente en los casos en los que el volumen de la solución de ADN a cuantificar es muy pequeño (inferior a 250 µl).

- Preparar una serie de soluciones con concentraciones crecientes de ADN (ADN de fago lambda), desde 0.5 hasta 50 µg/ml.
- Mezclar 2 µl de cada una de las muestras de ADN problema con 0.4 µl de "gel-loading-buffer".
- Hacer migrar los ADN problema y los controles en un minigel al 0.8% de agarosa y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.
- Realizar la electroforesis hasta que el azul de bromofenol haya migrado, aproximadamente 1-2 cm.
- Irradiar con UV y comparar la intensidad de la fluorescencia de los ADN problema con la de los controles y

estimar, así, la concentración para cada una de las muestras.

DIGESTION DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCION

- Digerir 5 µg de ADN de cada una de las muestras
- Preparar una mezcla con un volumen final de 50 µl que contenga:

  5 µg del ADN problema

  5 µl de tampón de restricción 10X

  2 µl de espermidina (0,1M)

  5 µl de BSA (1 mg/ml)

  Cuando se utilice el Taq I, no poner espermidina. Añadir el enzima de restricción necesario y completar, hasta alcanzar el volumen final, con H2O
- Añadir el enzima de restricción a razón de 2-4 U/µg de ADN, en tres dosis a intervalos de dos horas.
- Agitar la mezcla
- Incubar la mezcla de digestión a la temperatura indicada para cada enzima.

ELECTROFORESIS EN EL GEL DE AGAROSA

- Preparar el gel de agarosa a la concentración deseada (en función de los fragmentos de ADN a separar), normalmente al 0,8-1% en tampón TBE 1X. La agarosa se disuelve calentando hasta ebullición.
- Preparar el molde, sellando los extremos y colocando un peine para la formación de pozos en el gel.
- Agregar al gel la solución de bromuro de etidio, a razón

de 5 µl por cada 100 ml de TBE 1X.

- Depositar la solución de Agarosa en el molde y dejar solidificar.
- Sacar el peine, eliminar el sellado y depositar el gel en una cubeta horizontal de electroforesis.
- Añadir 4 µl de solución de azul de bromo-fenol en sacarosa a cada una de las muestras de ADN digeridas.
- Preparar los marcadores de peso molecular:
  6 µl de fago lambda
  1 µl de øX174 y 43 µl de solución de colorante en sacarosa.
- Depositar las muestras en los pozos y cubrir la cubeta de electroforesis con tampón TBE 1X.
- Dejar migrar durante un mínimo de 16 h entre 30 y 50 mA.
- Visualizar la carrera utilizando un transiluminador de UV.
- Finalizada la electroforesis, fotografiar el gel, utilizando una cámara Polaroid MP-H y película Polaroid tipo 667.

TRANSFERENCIA DEL ADN A UN SOPORTE SOLIDO
(Southern blot) Figura 32.1

- Cuando los fragmentos de ADN a transferir sean de tamaño superior a 15 Kb, sumergir el gel en HCl 0,25 N durante 15 min.
- Sumergir el gel en solución desnaturalizante durante 1 h, en agitación, cambiando el tampón a la media hora.
- Neutralizar el pH del gel sumergiéndolo en solución neutralizante durante 1 h, en agitación, cambiando el

tampón a la media hora.

- Cortar el filtro de nylon (Hybond-N) del mismo tamaño que el gel, sumergirlo en agua durante 5 min y a continuación en 10X SSC durante media hora.
- Realizar la transferencia según el método descrito por Southern (1975), durante 16-24 h.
- Una vez tranferido el ADN a la membrana, se coloca entre dos hojas de papel Whatman 3MM y se seca en estufa a 80º C durante 2 h.
- El filtro con el ADN unido covalentemente puede guardarse entre las dos hojas de papel Whatman hasta proceder a su hibridación.

MARCAJE DE LAS SONDAS POR "OLIGOLLABELING"

- Tomar una alícuota de 30 µl de la sonda a marcar y calentar a 65º C durante 10 minutos, con el fin de disolver la agarosa de bajo punto de fusión.
- Añadir 10 µl de tampón de "oligolabelling", 4 µl de BSA 5mg/ml, 4 µl de dCTP 32P con una actividad específica de 800 Ci/mmol y 2 U de Klenow.
- Incubar a temperatura ambiente durante 16 h o a 37º C durante 4-6 h.
- Parar la reacción añadiendo 50 µl de 3X SSC.
- Separar los nucleótidos libres mediante cromatografía en Sephadex G-50.
- Tomar 2 µl para medir la radioactividad por Cerenkov.
- Guardar la sonda marcada a -20º C hasta emplearla en la hibridación.

HIBRIDACION, LAVADO Y AUTORRADIOGRAFIA DE LOS FILTROS

- Colocar el filtro en una bolsa de plástico y añadir tampón de pre-hibridación en cantidad suficiente para empaparlo bien.
- Cerrar la bolsa herméticamente sin dejar burbujas dentro.
- Dejar a 65º C durante un mínimo de 2 horas, con agitación, desechando luego el tampón de la bolsa.
- Desnaturalizar la sonda previamente marcada haciéndola hervir durante 3 minutos. Mantenerla en hielo.
- Añadir la sonda desnaturalizada a un tubo que contenga la cantidad apropiada de tampón de hibridación (de 8 a 30 ml) dependiendo del tamaño del filtro. El volumen de sonda a añadir será el suficiente para conseguir una actividad específica final de 500.000-1.000.000 de cuentas por minuto (c.p.m.) por mililitro de tampón de hibridación.
- Añadir la mezcla a la bolsa y sellar herméticamente, dejándola durante 16-20 horas en un baño a 65º C con agitación.
- Transcurrido este tiempo, lavar el filtro siguiendo el orden de las soluciones de lavado. Entre los sucesivos lavados, controlar la radioactividad del filtro, considerándose limpio cuando el contador Geiger señala alrededor de 2 cuentas por segundo (c.p.s.). (En caso de seguir muy alta pueden continuarse los lavados subiendo la temperatura y/o aumentando la concentración de SDS a partir de la solución del último lavado).
- Una vez limpio el filtro, se deja secar a temperatura

ambiente (no conviene secarlo por completo) y se coloca en una bolsa de plástico fino que se pondrá en un chasis con dos intensificadores de tungsteno y en contacto con una película radiográfica.

- Mantener el chasis a -80º C, de 24 a 48 horas, y revelar la placa mediante procesador automático.

3.2.3.4 METODOS GENERALES PARA LA PREPARACION DE SONDAS

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES MEDIANTE CaCl2

- Añadir, en un tubo Corning esteril, 50 µl de células conservadas en glicerol a 5 ml de medio LB.
- Incubar las células a 37º C con agitación durante toda la noche.
- Tomar 500 µl y poner a crecer en 20 ml de medio LB estéril.
- Incubar las células a 37º C con agitación hasta que la DO del cultivo, a 600 nm, sea aproximadamente 0.3 (entre 2 y 3 horas).
- Centrifugar las células durante 10 minutos a 3000 r.p.m. a 4º C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 4 ml de CaCl2 50 mM, agitando suavemente. Añadir la solución de CaCl2 hasta un volumen final de 10ml.
- Dejar en hielo durante 20 minutos.
- Centrifugar las células durante 10 minutos a 3000 r.p.m. a 4º C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el botón en 2 ml de CaCl2 frío (1/10 del volumen inicial).

- Dejar las células a 4º C durante 24 horas antes de emplearlas para la transformación. Las células son ahora competentes y pueden guardarse en hielo un máximo de 2 días.

TRANSFORMACION DE LAS CELULAS COMPETENTES CON EL PLASMIDO

- Mezclar, en un tubo estéril, de 2 a 8 µl del plásmido (con el inserto) con 200 µl de células competentes e incubar en hielo durante 30 minutos.
- Someter las células a un choque térmico, transfiriendo el tubo a un baño a 42º C durante 2 minutos.
- Añadir 1 ml de medio LB y dejar crecer el cultivo de 45 a 60 minutos a 37º C con agitación.
- Sembrar las células en placas de LB agar, añadiendo el antibiótico apropiado, utilizando distintas cantidades de la mezcla (50, 100 y 200 µl), para obtener un número adecuado de colonias bien separadas. (El resto se deja a 4º C para posteriores siembras).
- Añadir 100 µl de células no transformadas a otra placa con antibiótico, como control negativo.
- Dejar crecer las células durante toda la noche a 37º C. Las colonias aparecerán 12-14 horas despues. De estas colonias pueden obtenerse minipreparaciones para extraer ADN plasmídico o bien conservarlas en glicerol. Para este último paso se procede de la siguiente forma:
  Tomar una única colonia de la placa de Petri con una asa estéril y transferirla a un tubo que contenga 2 ml de medio LB y antibiótico. Hacer crecer la colonia, a 37º C, hasta que el medio esté turbio.

Tomar 0.8 ml del tubo y mezclarlo con 0.2 ml de glicerol en un pequeño tubo estéril.

Congelar las células a -80º C. Las células transformadas pueden recuperarse sembrando un poco de glicerol en una placa con agar y el antibiótico adecuado.

PREPARACION DEL ADN PLASMIDICO POR EL METODO DE LISIS ALCALINA (minipreparaciones)

- Sembrar una colonia bacteriana transformada en 5 ml de medio LB y antibiótico.
- Incubar durante toda la noche a 37º C con agitación.
- Tomar 1,5 ml del cultivo, centrifugar a 14.000 rpm durante 30 minutos, descartar el sobrenadante. Repetir la operación.
- Conservar el resto del cultivo a 4º C.
- Eliminar el sobrenadante, por aspiración, dejando el botón lo más seco posible.
- Resuspender el botón en 10 µl de solución I y mantener durante 5 minutos en hielo.
- Añadir 200 µl de solución II. Mezclar hasta que adquiera un aspecto mucoso y dejar en hielo durante 5 minutos.
- Añadir 150 µl de solución III. Mezclar hasta que adquiera un aspecto semihomogéneo y dejar en hielo durante 10 minutos.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo, filtrándolo mediante una jeringa que contenga una pequeña turunda de lana de vidrio.
- Añadir 2.5 µl de dietilpirocarbonato*. Dejar a 65º C

durante 15 minutos, destapar los tubos y enfriar a temperatura ambiente.

- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos exactos.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar en posición invertida.
- Resuspender en 50 µl de TE 10 mM.
- Agregar 2 µl de RNAsa.
- Conservar a -20º C

OBTENCION DEL INSERTO DE INTERES A PARTIR DE LOS PLASMIDOS PURIFICADOS

Digestión del ADN plasmídico

En general, el procedimiento es el mismo que el descrito para la digestión con enzimas de restricción y la electroforesis en gel de agarosa, con las siguientes modificaciones:

- El tamaño del gel será de 10 x 15 cm
- Emplear una agarosa de bajo punto de fusión
- La concentración de agarosa dependerá del tamaño de los plásmidos y los insertos (del 0.6 al 1.2%)
- La migración debe dejarse transcurrir con lentitud hasta que los dos fragmentos, a separar, estén suficientemente alejados, a fin de poder cortar el fragmento de ADN del inserto, visualizado en el trasiluminador UV.
- Separar el fragmento de ADN correspondiente al inserto y colocarlo en un tubo de ensayo. Con el fin de disolver

completamente la agarosa, mantener a 98º C durante 5 minutos. Hacer alícuotas de 30 µl y conservar a -20º C.

3.2.3.5 SENSIBILIDAD

La sensibilidad del análisis de los FRLP para la demostración de poblaciones residuales ha dependido de las sondas utilizadas. Al hacer las diluciones con muestras del receptor y del donante hemos detectado hasta un 10% de células residuales y en algunos casos hasta un 5%.

3.3 CALCULOS ESTADISTICOS

Para la comparación de la capacidad de detección de las células residuales, mediante los métodos de estudio, se ha utilizado el test exacto de Fisher.
Para el análisis de la incidencia de recaídas, en relación a la detección de quimeras mixtas o quimeras totales mediante el estudio de los polimorfismos del ADN, se ha utilizado el análisis actuarial de Kaplan-Meier y para la comparación de curvas el Log Rank test.

TABLA 32.1 CARACTERISTICAS DE LAS SONDAS EMPLEADAS

LOCALIZACION CROMOSOMICA	SIMBOLOS	SONDA	TAMAÑO (KB)	LUGAR DE INSERCION	VECTOR	REFERENCIA
11p 5.5	-	pseudo β	4.0	BamH1	pBR322	Fritsch (1980)
11p 5.5	-	ϵ	0.7	BamH1	pBR322	Proudfoot (1980)
Xq 28	DXS52	St 14	3.0	EcoR1	pBR322	Oberlé (1985)
7q 31	MET	pmet H	1.6	EcoR1	pBR322	White (1985)
7q 31	D7S23	XV2C	2.3	Hind III	pUC 13	Estivill (1987)
Xp21.2	DXS.206	XJ2.3	1.1	BamH1 EcoR1	pUC 13	Ray (1985)
Xp21.2	DX5164	pERT87.15	1.5	Hind III	pUC 18	Kunkel (1985)
1p33	D1S7	MS1	5.6	BamH I	L47.1	Wong (1987)
7p22	D7S21	MS31	5.7	BamH I	L47.1	Wong (1987)
14q32	D14S1	paW101	5.0	Hind III	pBR322	Wyman (1980)

TABLA 32.2 CARACTERISTICAS DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

SONDA	ENZIMA	Nº DE ALELOS	C.I.P.*	REFERENCIAS
Met H	Taq I	2	0.36	White (1985)
St-14	Taq I	10	0.76	Oberlé (1985)
Pseudoß	Hinc II	2	0.24	Fritsch (1980)
ε	Hinc II	2	0.16	Proudfoot (1980)
XJ 2.3	Taq I	2	0.42	Ray (1985)
pERT87.15	Taq I	2	0.44	Kunkel (1985)
XV 2C	Taq I	2	0.37	Estivill (1987)
MS1	Hinf I	elevado	1.0	Wong (1987)
MS31	Hinf I	elevado	1.0	Wong (1987)
paw101	EcoR1	elevado	0.85	Wyman (1980)

* Informatividad. HUMAN GENE MAPPING, 10 (1989).
** Esta combinación detecta 2 polimorfismos distintos.

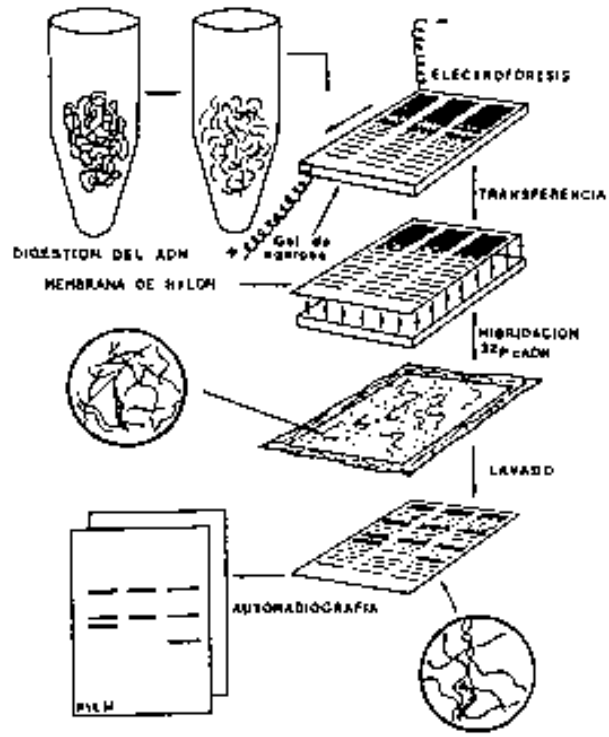


Figura 32.1: Esquema del "Southern blotting": análisis de secuencias de ADN por hibridación con sondas marcadas de los fragmentos transferidos según el método de Southern.