



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

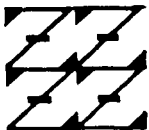
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

EVALUACION DEL QUIMERISMO EN NIÑOS CON LEUCEMIA POST-TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ALICIA GUADALUPE } GUERRERO SEGURA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO NUMERO 1 JE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

OCTUBRE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA DEL HOSPITAL INFANTIL
"FEDERICO GÓMEZ" BAJO LA SUPERVISIÓN DE LA M. en C.
MONICA MORENO GALVÁN Y DEL JEFE DEL DEPARTAMENTO
DE TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA Dr. EUGENIO VAZQUEZ
MERAZ

A MIS PADRES

POR SER COMO SON,
POR ENSEÑARME A LUCHAR,
POR LO QUE SE QUIERE,
POR MOSTRARME A VALORAR
CADA LOGRO EN LA VIDA,
GRACIAS POR GUIAR MIS PASOS
Y ENSEÑARME A ENFRENTAR
LAS TRISTEZAS Y ALEGRÍAS,
POR ESO Y MAS LES DEDICO
CON MUCHO AMOR ESTE
GRAN PASO, QUE SIN USTEDES
JAMAS HUBIERA PODIDO DAR.

CON AMOR

A MIS HERMANOS

POR CONTAR CON SU APOYO
EN CADA MOMENTO DE MI VIDA
Y SABER QUE SIN USTEDES, LA
VIDA NO SERIA IGUAL.

CON CARÍÑO

A ANGY

POR SER UNA NUEVA LUZ,
QUE ILUMINA MI VIDA Y
SER UN MOTIVO PARA
CRECER DÍA A DÍA, Y DAR
LO MEJOR DE MÍ EN CADA
PASO.

A MIS AMIGOS

ROSAURA, MARY, ALE, LUZ MA Y ARTURO:

POR ESTAR JUNTO A MÍ EN
LAS BUENAS Y LAS MALAS.

A MONI

POR AYUDARME EN CADA PASO
DE LA ELABORACIÓN DE ESTE
TRABAJO Y ENSEÑARME CON
PACIENCIA Y DEDICACIÓN.
GRACIAS POR TU APOYO
ERES UNA PERSONA MUY
LINDA Y ESPECIAL.

UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO A TODAS AQUELLAS
PERSONAS QUE COLABORARÓN EN LA ELABORACIÓN DE
ESTA INVESTIGACIÓN.

Q. F. B. LOURDES VEGA

Q. F. B. EMMA MENDOZA

Dra. TERESA AYOMETZI

M. en C. JOSE ARELLANO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DEL QUIMERISMO EN NIÑOS CON
LEUCEMIA POST-TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA**

NOMBRE:

GUERRERO SEGURA ALICIA GUADALUPE

DIRECTOR:

M. en C. MONICA MORENO GALVAN

ASESOR:

Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
LEUCEMIAS	3
CLASIFICACIÓN DE LEUCEMIAS	4
TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA	7
VNTR'S	9
QUIMERISMO	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
HIPÓTESIS	17
METODOLOGÍA	18
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	35
APÉNDICE I	36
APÉNDICE II	37
APÉNDICE III	38
APÉNDICE IV	41
APÉNDICE V	43
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

En los últimos años el TMO ha sido de gran utilidad como tratamiento en los casos de leucemia. Sin embargo uno de los problemas que lo afectan es la recaída y/o rechazo del trasplante, por lo tanto es necesario monitorear el tranplante para identificar una posible recaída. El análisis del quimerismo es esencial en el seguimiento de pacientes sometidos a Transplante de Médula Ósea alogénico (TMO-alo). Empleando para ello VNTR's marcadores polimórficos genéticos que consisten de una secuencia de DNA específica la cual es repetida un número variable de veces dentro de un locus genético, con este procedimiento se detecta la aparición de células del paciente y el estado quimerico durante el seguimiento del TMO. En este estudio se analizaron 8 pacientes pediátricos sometidos a TMO-alo.

Se obtuvo el DNA a partir de sangre periférica pre-trasplante y post-trasplante, a los cuales se realizó el PCR con ayuda de los iniciadores de 3 marcadores polimórficos D1S80, HUMARA Y HumTH01. El producto de PCR fue separado en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con Bromuro de Etidio y fotografiado. El análisis se realiza comparando las bandas teñidas del paciente pre-trasplante y del donador, y en caso de los marcadores informativos con las del paciente post-trasplante. Los resultados muestran que al menos 6 pacientes presentaron quimerismo completo sin recaída. Dos pacientes desarrollaron complicaciones. Uno de los cuales presentó falla de toma del injerto en 2 ocasiones y finalmente después del 3º TMO-alo se recuperó y mostró quimerismo completo y toma de injerto sostenido; y en el otro caso el paciente presentó quimerismo mixto con falla de toma de injerto, al cual se le realizaron dos infusiones de linfocitos del donador (DLI), el cual finalmente presentó quimerismo mixto, pero clínicamente estable. De esta forma encontramos que los D1S80, HUMARA, HumTH01 fueron marcadores polimórficos útiles para el seguimiento de TMO.

INTRODUCCIÓN

Leucemias.

La leucemia es una enfermedad maligna, progresiva, producida por la proliferación desordenada de una célula de origen hematopoyético a nivel de médula ósea (M.O.) La célula leucémica prolifera y reemplaza los elementos normales en todas las regiones de la médula. Dependiendo de su agresividad y del grado de diferenciación de las células neoplásicas, la leucemia se presenta en dos formas principales, aguda y crónica [1].

Las leucemias agudas se caracterizan por una acumulación de células inmaduras en M.O. predominantemente blastos. El curso de la enfermedad es corto y la muerte ocurre en los siguientes meses del diagnóstico, a no ser de que se logre una remisión.

En las leucemias crónicas, la médula ósea presenta acumulación de elementos bien diferenciados linfocitos o mielocíticos [2]. Estas células entran a la circulación produciendo una leucocitosis; los pacientes con leucemia crónica generalmente sobreviven más de 1 año después del comienzo de los síntomas, si no se produce una remisión por ello se considera que este tipo de leucemias progresa con lentitud [3].

Clasificación de leucemias.

A cada tipo de leucemia se le clasifica de acuerdo con la línea afectada que predomina en la proliferación, así se reconocen 4 tipos de leucemias:

- a) Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)
- b) Leucemia Mielocítica Crónica (LMC o LGC)
- c) Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y
- d) Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) [4]

a) Leucemia LMA

Esta compuesta por células inmaduras (sean mieloblastos, promielocitos, eritroblastos, monoblastos, megacarioblastos según el caso) que proliferan pero no maduran, desplazan a las células hematopoyéticas normales con la consecuente anemia, neutropenia y trombocitopenia. Representa del 15-20% de las leucemias agudas y de acuerdo a sus características morfológicas y a las propiedades de tinción histoquímicas de las células blásticas de la médula se clasifican principalmente en: 7 subtipos (M1-M7) Apéndice I [2,5].

La LMA se puede presentar en la infancia, pero es más característica del adulto. El paciente sufre palidez, fatiga, dolores óseos y articulares, debilidad por la anemia, trombocitopenia, en el 50% de los pacientes se presenta hepatoesplenomegalia [2].

En el tratamiento se emplean diversos agentes quimioterapéuticos y el trasplante de médula ósea el cual significa un importante avance terapéutico con relación al

tratamiento, el resultado del trasplante es mejor cuanto más joven es el paciente [1].

b) Leucemia LMC o LGC

Es un crecimiento neoplásico primario de células mieloides en la médula ósea con elevación extrema de esta línea celular en sangre periférica. Esta enfermedad presenta diversas etapas: fase inicial o crónica, la fase acelerada la cual precede a la aparición de la última etapa fase terminal o crisis blástica que marca el fin de la enfermedad del paciente [5]. Se presenta en alrededor del 2% de los casos de leucemias en niños pero principalmente se encuentra en adultos jóvenes y de edad avanzada. Genéticamente alrededor del 95% de los casos reportan el cromosoma Filadelfia (Ph).

El individuo presenta: Pérdida de peso, astenia, anorexia, diaforesis, esplenomegalia, equimosis [1].

El tratamiento con busulfán, hidroxiurea e interferon α suelen controlar el curso de la enfermedad por cierto periodo de tiempo. El trasplante de médula ósea precedido de quimioterapia masiva ha permitido la curación de LGC con una sobrevivida de la enfermedad del 60% a los 5 años; el trasplante tiene una escasa sobrevivida del paciente en fase terminal o crisis blástica [1].

c) Leucemia LLA

Se caracteriza por una proliferación maligna de células precursoras linfoides, sin tratamiento la sobrevivencia es corta, las características clínicas principales son: Fatiga, palidez, aparición de púrpura peteiquial, dolores óseos o artralgias, hepato-

megalia, esplenomegalia, anemia, granulocitopenia absoluta e hipereosinofilia [1]. Representa el 80% de las leucemias infantiles.

Existen 3 subtipos de LLA dependiendo de la morfología y de la heterogeneidad de los linfoblastos en la M.O. (L1, L2 y L3). Apéndice II [5].

El trasplante de médula ósea se recomienda como una buena opción después de haber recibido un periodo de quimioterapia para incrementar así su supervivencia del paciente libre de la enfermedad [1].

d) Leucemia LLC

Se caracteriza por un enorme aumento del número de linfocitos maduros en la médula ósea y en los ganglios linfáticos, posteriormente invaden la sangre periférica donde alcanzan un número muy elevado y finalmente se infiltran en los diversos órganos. Se presenta mayormente en adultos, en el 90% de los casos se inicia después de 50 años.

El individuo presenta adenopatías frecuentemente en el cuello, axilas y se disemina a otros tejidos linfoides, esplenomegalia, astenia, disnea de esfuerzo, trombocitopenia, el 70% de los linfocitos son de tipo B [6].

El pronóstico depende de la presencia de síntomas o signos clínicos; para contrarrestar el progreso de la enfermedad se proporciona al paciente una fuerte dosis de quimioterapia.

Transplante de médula ósea.

El transplante de médula ósea es un procedimiento que se utiliza en el tratamiento de muchos tipos de enfermedades. El cual consiste en la administración de células progenitoras hematopoyéticas después de la administración de la quimioterapia, radioterapia y/o inmunosupresión (www.etmo.net/html/pacesp/principal/htm).

En los años 60's el transplante alogénico de M.O. fue utilizado por primera vez para tratar deficiencias inmunológicas congénitas y otros desordenes hematológicos no malignos [1,7].

En los 70's Thomas y col. demostraron que algunos pacientes con leucemia aguda vivieron libres de leucemia después de altas dosis de terapia y transplante con donador HLA idéntico [7].

Actualmente existen 2 tipos de transplante clínicamente importantes: alogénico y autólogo.

En el transplante alogénico: El paciente recibe células hematopoyéticas capaces de reiniciar la producción de sangre proveniente de personas con HLA idéntico (habitualmente un hermano o familiar) [1,2].

En el transplante de médula autólogo: Se utilizan las propias células de M.O del paciente precedidas de criopreservación, la cual ha sido extraída previamente durante el proceso de quimioterapia; se estima que un tercio de los pacientes que efectúan este proceso tienen una sobrevivida larga [1,2, (www.etmo.net/html/pacesp/principal/htm)].

El trasplante de médula ósea precedido de quimioterapia masiva es hasta el momento la única medida que ha permitido la curación de la LMC o LGC; en pacientes jóvenes transplantados antes de 1 año de su diagnóstico, el pronóstico de vida es de hasta el 70% (2,3), con una supervivida libre de la enfermedad del 60% hasta los 5 años post-trasplante; pero la mortalidad es de alrededor del 40 %. El trasplante tiene escaso efecto beneficioso en la fase terminal o crisis blástica [1,2,6].

La definición del sistema HLA y el establecimiento de técnicas de tipificación permiten una mejor selección del donador, estableciéndose las condiciones y características que permiten que el TMO se efectúe con mayor seguridad, disminuyendo el riesgo de rechazo y la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) [8]. Se consideran como factores que afectan al establecimiento del TMO: diagnóstico del paciente, estado que guarda la enfermedad (enf. activa vs. enf. en remisión, vs. 2º o 3º remisión, etc.), edad, compatibilidad HLA con el donador.

La quimioterapia intensiva seguida de un trasplante alogénico de M.O. se utiliza cada vez con mas frecuencia en el tratamiento de los pacientes con LLA, en especial los que sufren reactivaciones medulares.

Los resultados del TMO varían de acuerdo al padecimiento que se presente y la etapa en la cual se realiza el mismo. En la LMA durante la 1º remisión completa la supervivida libre de la enfermedad (SVLE) en un periodo de 2 años es del 50% si es autólogo y del 72% si es alogénico. Con respecto a la LAL en 2º remisión, si el TMO es autólogo la SVLE es del 40% y del 60% si es alogénico en un periodo comprendido de 2 años. Y en la LMC en 1º fase crónica el TMO reportó una SVLE del 70% en un periodo de alrededor de 2 años [8].

El trasplante de M.O. se ha realizado a través de diversas técnicas que han ido evolucionando a través del tiempo para dar una mayor confiabilidad y calidad en el diagnóstico del paciente. Sin embargo, el rechazo del injerto o la recaída de la enfermedad sigue siendo un factor que limita el éxito del TMO. La identificación y el monitoreo del origen hematopoyético después del TMO ha sido una herramienta para prevenir la recaída de la enfermedad [29]. Por lo cual se han desarrollado técnicas como citogenética, fenotipación de células rojas, fragmentos polimórficos de longitud variable (RFLP), técnicas las cuales resultan en muchos casos confusas, demasiado lentas o de sensibilidad baja.

Actualmente la técnica más empleada es el análisis de los VNTR's (Variable number tandem repeat) mediante PCR [19].

VNTR's

La tipificación del DNA es una poderosa herramienta para el establecimiento de asociaciones o exclusiones entre especies. De tal forma que el genoma de los organismos eucarióticos albergan principalmente 2 diferentes clases de DNA: DNA de una copia simple la cual se presenta una vez en una serie de cromosomas haploides, mientras que el DNA repetitivo puede existir en algunas cuantas a algunos cientos de miles (o millones) de copias. Las secuencias pueden comprender desde menos del 10% a más del 90% de los genomas en las diferentes especies animales o en plantas (en el hombre es cerca del 30%)

Por ello la amplificación del DNA por PCR ha sido aplicada con un sistema informativo de marcaje tal como los VNTR's / STR de esta forma el sistema proporciona una gran especificidad individual en los resultados emitidos.

Las pruebas de identidad, como son las de paternidad y forenses, se basan en la identificación de diferencias genéticas entre individuos. En la actualidad los VNTR junto con los STR son los marcadores genéticos más informativos para la caracterización genética.

Los VNTR (del inglés variable number tandem repeat) o STR (del inglés short tandem repeat) son loci que consisten de una secuencia de DNA específica la cual es repetida en un número variable de veces dentro de un locus genético [9]. El término VNTR, también conocido como minisatélite, se relaciona con el número de pares de bases que se encuentran repetidas. Un VNTR o minisatélite tiene repeticiones de 8-50 pares de bases [10], mientras que las secuencias de los STR o microsatélites van de 2-8 pares de bases [11].

Los loci demostrados por los VNTR / STR pueden ser identificados en todo el genoma humano con algunos loci altamente polimórficos, demostrándose así mas de 30 alelos.

El polimorfismo de los VNTR's se debe a la variación en el número de secuencias repetidas, que difieren entre individuos. Debido a que muchos individuos son heterocigotos, estos marcadores han sido utilizados en estudios poblacionales donde se ha determinado la frecuencia de heterocigocidad de este sistema lo que permite definir un marcador útil que de información en estudios familiares ligados a enfermedades, paternidad y en el seguimiento de trasplante como es el caso de este estudio [12-14].

La evaluación del injerto después del trasplante de M.O. puede ser realizado por el análisis polimórfico genético a través de los VNTR's / STR loci; el cual resulta un método exitoso para identificar las células del huésped original o del donador, para definir si hay

recurrencia maligna o un síndrome linfoproliferativo originado desde las células del huésped o donador, identificar si las células transfundidas por el donador pueden implicar enfermedad injerto contra huésped, predecir una recalda (principalmente en pacientes con leucemias crónicas), y para realizar el seguimiento del trasplante y la terapia, a partir de muestras de sangre periférica o de médula ósea [15-17].

QUIMERISMO

En el área médica, el término quimera se utiliza para designar a un organismo cuyo cuerpo contiene poblaciones celulares derivadas de diferentes individuos de la misma o diferente especie, la cual puede presentarse de forma espontánea o producirse artificialmente por intervenciones médicas [18].

El desarrollo del estado quimerico se da en casi todos los casos después de un trasplante de médula ósea (TMO) alogénico o de trasplante de células tallo de sangre periférica (PBSCT). En el caso de TMO alogénico la mielorreducción y la efectividad inmunosupresiva del tratamiento permite el crecimiento de la nueva población celular del donador original. De cualquier modo en ciertos casos las células sanas del huésped sobreviven y participan en la reconstitución del sistema hematológico e inmunológico.

Después de un TMO se pueden presentar diferentes estados de quimerismo:

1) Quimerismo completo.

En este estado, hay erradicación completa de las células progenitoras del receptor, y todas las poblaciones hematopoyéticas son de origen del donador (Fig. 1) [19].

2) Quimerismo en mosaico.

Aquí, un pequeño número de células del receptor persisten después del TMO y posiblemente con el tiempo estas células re-emerjan provocando una recaída.

La presencia de estas células está asociada con enfermedad mínima residual (MRD) (Fig. 1) [19].

3) Quimerismo mixto.

Todas las células leucémicas son destruidas, pero permanecen algunas células aparentemente normales del receptor junto con las células hematopoyéticas del donador (Fig. 1) [19].

El estado de quimera es uno de los factores principales que influyen en el curso del periodo post-transplante los cuales son: Historia clínica del donador, severidad de la Enfermedad injerto contra el huésped (GVHD), el rango de recaída y características del injerto [18-20].

La detección del quimerismo depende de los marcadores polimórficos que tenga el donador de tal modo que se puedan diferenciar de los que presente el receptor. Existen varios métodos para detectar el quimerismo con diferentes sensibilidades. La detección de marcadores citogenéticos (diferenciadas entre XX y XY) o en translocaciones asociadas con alguna malignidad es el método más utilizado con una sensibilidad del 12%-20% [21-23]. Recientemente se han utilizado técnicas en biología molecular como lo

son los Fragmentos Polimórficos de Longitud Variable (RFLP) con una sensibilidad de 5%-10% [24-26] y permite analizar todos los tipos celulares y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para análisis de marcadores polimórficos con secuencias repetidas como lo son los VNTR (del inglés variable number tandem repeat) con una sensibilidad 0.1%-2% [19].

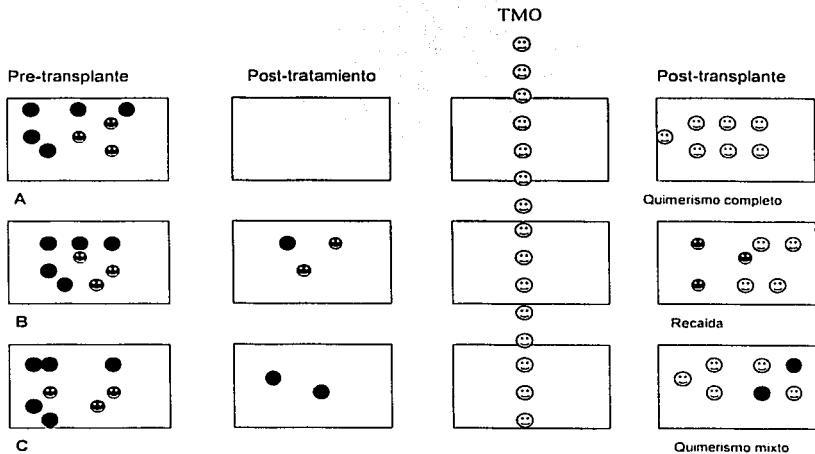


Fig. 1 Posibilidades de reconstitución hematopoyética después de la realización del TMO alogénico

Varios estudios han dirigido el significado clínico del estado de quimerismo para predecir alguna recaída después del TMO, principalmente en LGC. Recientemente Bader et al. evaluó el quimerismo en 55 pacientes infantiles con leucemia aguda y reportó que un incremento en las células autólogas aumentan significativamente el riesgo de desarrollar una recaída ($p < 0.001$), así mismo hay una correlación significativa entre el

quimerismo mixto (MC) y la recaída de la leucemia aguda [27], correlación que también se ha reportado en pacientes con LLA transplantados con M.O sin células T de donadores no relacionados [25]. Esto demuestra la gran relevancia que tiene el conocimiento del quimerismo en el seguimiento de TMO.

Por lo anterior, en el laboratorio de trasplante de médula ósea del Hospital Infantil Federico Gómez, estamos implementando las técnicas necesarias para realizar el seguimiento del TMO en pacientes pediátricos mediante el análisis de los VNTR's, identificando el estado de quimerismo del paciente para detectar tempranamente el posible rechazo del trasplante o recaída o así mismo el establecimiento del trasplante es decir, libre de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

LA POBLACIÓN INFANTIL QUE HA RECIBIDO UN TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA, REQUIERE EL MONITOREO DETALLADO DEL QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO, EN EL PERIODO DE POST-TRANSPLANTE, PERMITIENDO ESTO LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON UN ALTO RIESGO DE RECAÍDA, POR LO QUE ES NECESARIO IMPLEMENTAR TÉCNICAS SENCILLAS, CONFIABLES Y SENSIBLES QUE SIRVAN DE APOYO AL DIAGNÓSTICO, POR LO CUAL LA TÉCNICA DE VNTR'S REPRESENTA UN MÉTODO RÁPIDO Y EFICAZ QUE PUEDE EMPLEARSE PARA EL SEGUIMIENTO DEL QUIMERISMO EN LOS PACIENTES POST-TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA, UTILIZANDO PARA ELLO 3 MARCADORES POLIMÓRFICOS D1S80, HUMARA y HumTH01, DE LOS CUALES AL MENOS UNO SERA INFORMATIVO.

OBJETIVO GENERAL

IDENTIFICAR EL QUIMERISMO PARA EL SEGUIMIENTO DEL TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSEA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS.

OBJETIVOS PARTICULARES

IMPLEMENTAR LAS CONDICIONES PARA IDENTIFICAR AL MENOS 3 VNTR's.

IDENTIFICAR AL MENOS UN MARCADOR INFORMATIVO PARA CADA PACIENTE.

REALIZAR EL SEGUIMIENTO DEL TRANSPLANTE DE MÈDULA ÓSEA.

HIPÓTESIS

LA TÉCNICA DE VNTR'S REPRESENTA UN MÉTODO RÁPIDO Y EFICAZ QUE PUEDE UTILIZARSE PARA EL SEGUIMIENTO DEL QUIMERISMO EN LOS PACIENTES POST-TRANSPLANTE DE MÈDULA ÓSEA, LA HETEROCIGOCIDAD DE D1S80, HUMARA Y TH01 SE HA REPORTADO DE UN 80.8%, 90.7% Y UN 75% RESPECTIVAMENTE, POR LO TANTO AL UTILIZAR ESOS 3 MARCADORES, AL MENOS UNO SERA INFORMATIVO.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio.- Se trata de una investigación de tipo observacional, longitudinal, prospectivo y descriptivo.

Criterios de inclusión

- a) Diagnóstico Leucemia linfoblástica aguda
- b) Transplante de Médula Ósea alogénico

Criterios de eliminación

- a) Otros síndromes mielodisplásicos.
- b) Realización de transplante autólogo.

Población

En el presente trabajo se estudiaron 8 pacientes pediátricos diagnosticados con LLA por los oncólogos del Hospital Infantil de México, " Federico Gómez " SSA, sometidos a transplante de médula ósea.

Muestras de trabajo.

Muestra de paciente pre-transplante, donador y paciente post-transplante; la cual puede ser de sangre periférica o de Médula ósea.

El análisis se realizó cada 8 días después del transplante hasta los 3 meses, del tercer mes al sexto, cada 15 días, finalmente del mes sexto en adelante una vez al mes.

Extracción de DNA.

Se obtienen 5 mL de sangre periférica o 5 mL de M.O.

- 1.- El volumen de sangre periférica o de médula ósea se centrifuga a 2500 rpm./5 min./T. Amb.
- 2.- Separar el paquete de células blancas (Leucocitos) y se lavan con una solución de lisis para eritrocitos.
- 3.- El paquete celular se resuspende en SSC 1X, se añadieron 4 mL de solución de lisis de glóbulos blancos, y se incuban a 53°C durante 12-18 hrs.
- 4.- Se añaden 5mL de fenol equilibrado y se centrifuga a 3000rpm durante 15 min/4°C.
- 5.- Se realiza una extracción más con fenol equilibrado, dos con fenol/cloroformo alcohol isoamílico, y una con cloroformo alcohol isoamílico.
- 6.- El DNA se precipita con 120 μ L de NaCl 5M y un volumen de isopropanol, se lava con etanol al 70% y se resuspende en 400 μ L de TE 1X.

Cuantificación de DNA.

- 1.- Para verificar la cantidad y pureza del DNA, se hace una dilución 1:50 y se lee a 240 nm, 260 nm y 280 nm.
- 2.- La concentración de DNA se calcula con la fórmula:
$$DO_{260} \times 50 \times \text{factor de dilución} = \mu\text{g}/\mu\text{L}.$$
- 3.- Se calcula la pureza del DNA por las relaciones 260/240 para fenol y 260/280 para proteínas. La relación debe estar entre 1.7 y 2.0.

(PCR) Reacción en cadena de la polimerasa

Debido a su alto porcentaje de heterocigocidad se eligieron 3 VNTR / STR (D1S80, HUMARA Y HumTH01) la tabla 1 muestra las principales características que conforman a cada uno de ellos.

MARCADOR	HETEROCIGOCIDAD (%)	CROMOSOMA	TAMAÑO DEL ALELO	REFERENCIA
D1S80	80.8	1	224-640bp	14
HUMARA	90.7	X	183-207bp	14
HumTH01	75.0	11	261-312bp	15

TABLA 1. Características de los iniciadores

En la tabla 2 se muestra la secuencia específica de los iniciadores de cada marcador.

MARCADOR	SECUENCIA DE INICIADORES	REFERENCIA
D1S80		14
<i>D1S80_A</i>	5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC-3'	
<i>D1S80_B</i>	5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC- 3'	
HUMARA		14
<i>HUMARA_A</i>	5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC-3'	
<i>HUMARA_B</i>	5'-GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT-3'	
HumTH01		15
<i>HumTH01_A</i>	5' -GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT-3'	
<i>HumTH01_B</i>	5' -ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG-3'	

TABLA 2. Secuencia de iniciadores.

Condiciones de amplificación

La PCR se realiza con 200 nanogramos (ng) de DNA y una concentración final de 1X Buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.0 a 25° C), 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glicerol, 0.5% Tween 20 y 0.5% Nonidet- P40), 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de mix-dntp's, 12.5 pmol de Iniciadores (primers) y 1 μ L de taq DNA polimerasa.

Las condiciones de ciclaje para D1S80 son:

Un ciclo: 96°C 3 min.

30 ciclos: 94°C 1 min. , 65°C 1 min. , 72°C 1:30 min.

Un ciclo final: 72°C 10 min.

Las condiciones de ciclaje para HUMARA Y HumTHO1 son:

Un ciclo inicial: 96°C 15 min.

34ciclos: 96°C 45 seg. , 65°C 45 seg. , 72°C 1:30 min.

Un ciclo final: 72°C 10 min.

El producto de la amplificación de los VNTR' S se corrobora en un gel de agarosa al 2%.

Electroforesis del gel de poliacrilamida

1. El producto de PCR se separa en un gel de acrilamida / bisacrilamida al 6%.
2. El gel se corre durante 2 horas en la cámara de electroforesis vertical a un voltaje de 80 Volts.
3. Se realiza la tinción del gel con bromuro de etidio durante 30 minutos.
4. Se observa en un transiluminador de luz ultravioleta (UV), para posteriormente ser fotografiado.
5. Se compara el patrón de bandeo.

RESULTADOS.

En el presente estudio, se muestra el seguimiento de 8 pacientes pediátricos (entre 5 y 12 años) diagnosticados con LLA, a los cuales se les realizó el TMO. En la tabla 3 se muestran las características clínicas de cada uno de los pacientes.

A cada uno de los pacientes se le realizó la búsqueda de un marcador informativo empleando para ello los marcadores D1S80, HUMTH01 y HUMARA.

TABLA 3. Características clínicas de los pacientes.

PACIENTE (#)	SEXO	EDAD (Años)	DIAGNÓSTICO	DONADOR
1	F	12	LLA	HERMANA
2	F	9	LLA	HERMANA
3	F	8	LLA	HERMANA
4	M	6	LLA	HERMANO
5	M	5	LLA	HERMANO
6	F	6	LLA	MADRE
7	F	5	LLA	MADRE
8	M	9	LLA	PADRE

F: Femenino

M: Masculino

En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de cada marcador polimórfico con respecto al total de los pacientes. Considerándose como un VNTR/STR informativo a aquél que tiene la capacidad de identificar específicamente las células del huésped original o del donador. El marcador informativo para la mayoría de los casos fue D1S80 (87.5%) seguido por HumTHO1 (62.5%) y HUMARA (25%).

En el cuadro 2 se muestra el seguimiento de cada uno de los 8 casos; 6 pacientes presentaron un quimerismo completo y dos quimerismo mixto (caso #5 y #7). Los 6 casos que presentaron quimerismo completo evolucionaron sin complicaciones, la realización de su seguimiento se hizo dentro de los primeros días (día +15 al +20).

El caso #5 se desarrolló con rechazo de injerto en dos ocasiones, cada vez precedido por quimerismo mixto (Fig.2), después del tercer trasplante el quimerismo a partir del día +15 fue completo y sostenido, así como la toma de injerto (capacidad del organismo del huésped para aceptar las células hematopoyéticas del donador).

En el caso #7, se presentó quimerismo completo al día +18 y recaída precedida de quimerismo mixto al día +21, después se realizaron 2 infusiones de linfocitos del donador (DLI), presentando un quimerismo completo a partir del día +17, al día +54 presentó quimerismo mixto (fig. 3), pero clínicamente estable (cuadro 2).

En la fig. 4 se observa el marcador polimórfico HumTHO1 seguimiento del caso # 4 con un quimerismo completo.

CUADRO 1. Resultados de las ampliaciones de cada uno de los VNTR/STR utilizados para cada paciente.

PACIENTE (#)	MARCADOR PRESENTE (VNTR/ STR)		
	D1S80	HUMTHO1	HUMARA
1	INF	INF	INF
2	INF	INF	NO INF.
3	NO INF.	INF	INF
4	INF	INF	NO INF.
5	INF	NO INF.	NO INF.
6	INF	INF	NO INF.
7	INF	NO INF.	NO INF.
8	INF	NO INF.	NO INF.
Informativo %	87.5	62.5	25

INF: Marcador informativo

NO INF: Marcador no informativo

Cuadro 2. Seguimiento de los pacientes que recibieron un TMO.

PACIENTE (#)	SEGUIMIENTO	OBSERVACIONES
1	Completo a partir del día +20	Quimerismo completo
2	Completo a partir del día +18	Quimerismo completo
3	Completo a partir del día +20	Quimerismo completo
4	Completo a partir del día +21	Quimerismo completo
5	Mixto a partir del día +20 1° transplante. Completo al día +15 después del 3° transplante.	Quimerismo mixto y rechazo de injerto en 2 ocasiones después del 3° TMO. desarrolló quimerismo completo
6	Completo a partir del día + 17	Quimerismo completo
7	1° transplante mixto a partir del día +21. Completo al día +17 después de 2 infusiones de linfocitos y mixto a partir del día +54.	Quimerismo mixto desde el día +54 a la fecha. Estado clínico actual estable.
8	Completo a partir del día +20	Quimerismo completo

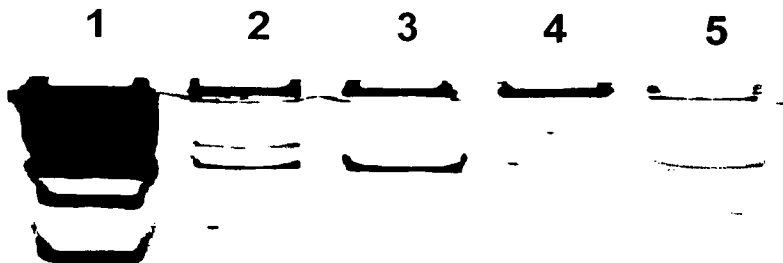


Fig. 2 CASO No. 5 QUIMERISMO COMPLETO CON D1S80.

1. Marcador de peso molecular ϕ -HAE III
2. Marcador del receptor pre-transplante
3. Marcador del Donador
4. Quimerismo mixto post-transplante
5. Quimerismo completo después del 3° transplante

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

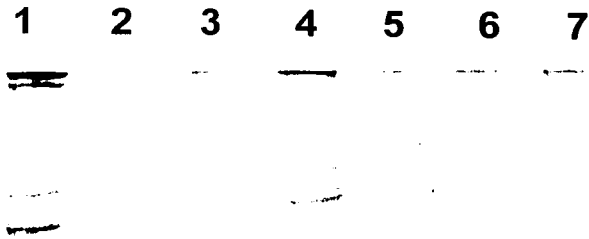


Fig. 3 QUIMERISMO MIXTO CASO No. 7 CON D1S80.

1. Marcador del receptor Pre-transplante
2. Marcador del Donador
3. Post-transplante día +21
4. Quimerismo mixto día +40
5. Quimerismo completo día + 17 después de 2 DLI
6. Quimerismo mixto día + 54
7. Quimerismo mixto día +95

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

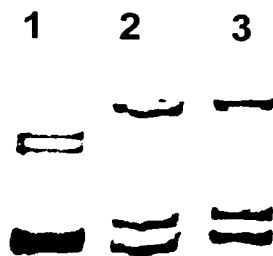


Fig. 4 QUIMERISMO COMPLETO CASO No. 4 CON TH01

1. Marcador Pre-transplante del receptor
2. Marcador del Donador
3. Post-transplante Quimerismo completo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

Hoy en día, la leucemia es uno de los cánceres más comunes en los niños llegando a representar la tercera parte de todas las enfermedades oncológicas pediátricas [33].

En la población infantil mexicana se reporta que la leucemia aguda presenta alrededor de 2-3 casos por cada 100 000 personas (www.tusalud.com.mx/120612hlm).

El trasplante de médula ósea, tanto en niños como en adultos se ha practicado desde hace más de 30 años para el tratamiento de algunos padecimientos hematológicos como leucemias, linfomas, anemias, etc; Sin embargo el rechazo del trasplante y la recaída de la enfermedad son complicaciones de importancia en este procedimiento.

El análisis de los VNTR's en el área de trasplante de médula ósea ha sido un método exitoso para identificar células residuales o recurrentes del paciente; para predecir una recaída (principalmente en pacientes con leucemias crónicas), realizar el seguimiento del trasplante y de la terapia.

Para monitorear el Post-TMO, varios investigadores han utilizado el análisis del quimerismo empleando la detección de los loci altamente polimórficos, como los VNTR's. Esta técnica permite identificar y cuantificar relativamente la proporción de las células del donador y del receptor. Aunque el quimerismo no puede detectar directamente la leucemia residual, permite la definición de patrones específicos, como el incremento de hematopoyésis autóloga (quimerismo mixto).

En este estudio analizamos la dinámica del quimerismo mediante el análisis de los VNTR's de 8 pacientes en edad pediátrica con diferentes tipos de leucemias sometidos a

TMO-alo. En el cuadro 1 se observa claramente como los marcadores D1S80 y HumTH01 fueron más representativos e informativos, en 7 de 8 pacientes y en 5 de 8 pacientes respectivamente y con respecto a HUMARA en 2 de 8 pacientes.

D1S80 se ha reportado con un 80% de heterogeneidad en la población caucásica por lo que se recomienda para ser utilizado en estudios genéticos de poblaciones[14].

Dicho marcador fue sugerido en el 17avo. Taller de histocompatibilidad para utilizarse como rutina en el seguimiento de TMO donde Smith y col. reportaron que D1S80 como informativo en el 49.3% de trasplantes relacionados (20). Estos datos no concuerdan con los obtenidos en el presente estudio donde se encontró que D1S80 fue informativo para el 87.5% de los trasplantes (cuadro 1). La discrepancia entre los resultados puede ser debida al número de trasplantes estudiados (78 vs. 8 respectivamente) y la población estudiada siendo para el primero caucásica y en este estudio población infantil mestiza mexicana. Los datos de este estudio sugieren que D1S80 es un buen marcador que puede ser utilizado con éxito (al menos en población infantil mestiza mexicana) en el seguimiento del TMO.

La utilización de VNTR's con alto porcentaje de heterocigocidad para el seguimiento de TMO aumenta la probabilidad de encontrar un marcador informativo[14-15]. En este contexto HumTH01 esta reportado con un 75% de heterocigocidad y para el seguimiento de TMO HumTH01 fue informativo para el 62.5% de los pacientes. En cuanto HUMARA se reporta con un 90.7% de heterocigocidad en población México-Americana. En el presente encontramos que HUMARA es informativo solo para el 25% de los casos, lo que sugiere que la elección de VNTR's para seguir el TMO deben ser probados y adecuados a cada estudio y población.

Varios estudios han dirigido el significado clínico del quimerismo mixto en predecir la recaída después del TMO-Alo, principalmente en LGC. Recientemente Bader et al[29] evaluarón el quimerismo en 55 pacientes pediátricos con leucemia aguda y reportó que un incremento en las células autólogas aumentan significativamente el riesgo de desarrollar recaída ($p < 0.001$). Correlación que también se ha reportado en pacientes con leucemia linfoblástica aguda transplantados de TMO-Alo de donadores no familiares. Nuestra observación de quimerismo mixto al día +20 en el caso 5 confirma que puede predecir la falla de toma de injerto (rechazo del organismo del paciente para aceptar las células hematopoyéticas del donador).

La inmunoterapia con transfusión de linfocitos del donador en forma temprana puede evitar el rechazo y en caso de recaída, incluso inducir nuevamente a remisión[30]. Nuestro paciente se recuperó hasta después del tercer trasplante con toma de injerto al día +15 y su quimerismo fue completo Fig. 2

El paciente 7 mostró quimerismo completo después de la 2ª infusión de linfocitos del donador (DLI) Fig. 3, sin embargo al día +54 volvió a presentar quimerismo mixto hasta el día +80. Debido a que el paciente está clínicamente estable, no se le aplica ningún tratamiento, sólo deberá observarse que no aumente las células del receptor.

Como se observa en la tabla 3 el 100% de los casos de TMO corresponden a donadores relacionados, ya que ello permite un mayor % de histocompatibilidad y un menor rango de rechazo por compatibilidad entre el huésped y el donador. Tomándose de preferencia al hermano (a) como 1º opción y a los padres como 2º opción.

Todos los pacientes incluidos en este estudio recibieron un TMO-alógeno en donde el paciente recibe células capaces de reiniciar la producción de sangre por partes del

donador. Una vez que el huésped entra en la fase de reconstitución hematológica; las células del donador se implantan en la M.O. del paciente y estas comenzarán a producir nuevas células sanguíneas. La duración de esta fase es variable y va desde el día +15 hasta el día +30 post-TMO en busca de reconocer el estado quimérico del paciente.

Observamos en los resultados que la búsqueda de un marcador informativo que permita realizar un seguimiento confiable del quimerismo hematopoyético, se realiza primeramente con las muestras pre-transplante donador/huésped y para observar el progreso del TMO, las muestras pos-transplante se toman a partir del día +12 o del incremento de leucocitos ($1500-3500 \text{ cél./mm}^3$) en el paciente siendo las primeras muestras el indicador de que tipo de quimerismo hematopoyético se esta presentando (completo o mixto).

En la figura 4. se presenta el marcador polimórfico HumTH01 el cual fue informativo para el paciente # 4 el cual permite el seguimiento del TMO en este caso quimerismo completo, presentando así 4 bandas para la muestra del pre-transplante, una única banda para el donador y en el post-transplante se observa únicamente una banda muy similar a la del donador, confirmando esto que el quimerismo es completo.

CONCLUSIONES.

El seguimiento del TMO a través de la hematopoyésis derivada del donador ha sido considerada esencial para el mantenimiento o sostén del injerto y para la prevención de recaída.

La introducción de los métodos de PCR para la amplificación de las regiones minisatélite han permitido estudiar los mecanismos y cinética del quimerismo después del TMO, rechazo del injerto, de la recurrencia de la leucemia y momentos culminantes en los pacientes con un alto incremento de recaída.

En este caso la población infantil incluida en el estudio reporta que el marcador D1S80 es un excelente marcador polimórfico para evaluar la presencia de células del donador y del huésped en el TMO- alo.

Así mismo reportamos que la combinación de los 3 marcadores polimórficos empleados proporcionan al menos un marcador informativo.

Dentro de las sugerencias para mejorar este tipo de estudios son implementar más marcadores polimórficos (VNTR's) para el seguimiento del TMO y de esta forma ampliar la capacidad de diferenciación.

También sugerimos incrementar el número de pacientes en busca de confirmar o rechazar la capacidad de heterocigocidad dentro de la población pediátrica mexicana.

Así concluimos que la técnica del análisis de VNTR's en gel de acrilamida aplicada en el laboratorio de trasplante de médula ósea en el Hospital infantil de México "Federico Gómez" para el seguimiento del trasplante de médula ósea permite detectar tanto el quimerismo completo como el mixto, complementando así la información clínica de forma integral apoyando así el diagnóstico para poder interactuar de forma temprana, durante el tratamiento del paciente.

APENDICE I.

CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

<i>FAB</i>	<i>MORFOLOGIA</i>
M1: Mieloblástica	Minima maduración. Blastos agranulares y bastones de Auer.
M2: Mieloblástica con maduración	Hay presencia de blastos y promielocitos. Gránulos y bastones de Auer.
M3: Promielocítica	Promielocitos con gránulos prominentes y múltiples bastones de Auer.
M4: Mielomonocítica	Blastos mielomonocíticos. Bifenotípica
M5: Monocítica pura	Monoblastos indiferenciados.
M6: Eritroleucemia	Eritroblastos dismórficos. Bifenotípica.
M7: megacariocítica	Megacarioblastos pleomórficos.

APÉNDICE II

CLASIFICACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

SUBTIPO	CARACTERÍSTICAS
L1	Blastos con un tamaño aproximado del doble de un pequeño. Linfocito, núcleolos poco visibles y de escaso tamaño.
L2	Anisocitosis linfoblástica, aspecto generalmente sarcomatoso
L3	Células de tamaño mediano, citoplasma hiperbasófilo con vacuolas que asemejan células de tipo Burkitt.

APÉNDICE III

MATERIAL y REACTIVOS

EQUIPO

Cámara fotográfica Olympus

Termociclador Perkin Elmer 2400

Espectrofotómetro Gene Quant pro

Micropipetas semiautomáticas Jencons Sealpette (0.5-10 μ L; 5-50 μ L; 50- 200 μ L; 200-1000 μ L)

Puntas para micropipetas semiautomáticas.

Microcentrífuga Hettich Universal 30 RF

Fuente de poder BIO – RAD Power/ Pac 300

Transluminador de UV.

Cámara de electroforesis vertical y horizontal.

Vortex

Baño María a 37°C, 56°C, 70°C

Balanza analítica

Parrilla de agitación y calentamiento.

REACTIVOS

Solución de bromuro de etidio.

TAE 10X buffer de electroforesis.

TBE 10X buffer de electroforesis.

Azul de bromofenol.

Reactivos de PCR.

10X PCR Buffer, 10 mM dNTP's (dGTP dATP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 25 mM,

Amplitaq DNA polimerasa

Marcador de Peso Molecular (PM).

TEMED

Acrilamida / bis- acrilamida

Proteinasa K

Alcohol absoluto y al 70%

TE 1X

Persulfato de amonio

Agarosa

EDTA (Etilendiaminotetraacetato)

Ácido Acético Glacial

Ácido Bórico

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CRISTALERIA y MATERIAL DIVERSO

Vasos de precipitado de 50mL, 100mL, 150 mL, 200mL

Matraz Erlenmeyer 150mL, 250mL

Matraz Volumétrico 100mL, 500mL y 1000mL

Probeta de 50mL, 100mL

Pipetas graduadas de 5mL, 10 mL

Termómetros

Pipetas Pasteur

Gradillas

Tubos Eppendorhoff 100 μ L, 250 μ L, 500 μ L, 1500 μ L

Agitador mecánico

Gasas

Guantes

Algodón

Cronómetro

APÉNDICE IV.

1. Soluciones preparadas.

TAE -Tris-acetato

Stock [50X]

Solución por litro.

242g Tris base

57.1mL de Ac. Acético glacial

100 mL 0.5 M EDTA (pH=8.0)

TBE – Tris-borato

Stock [5X]

Solución por litro.

54g Tris base

27.5g Ac. Bórico

20 mL 0.5 M EDTA(pH=8.0)

Acrilamida 30%

Acrilamida 29g

N,N-metileno-bis acrilamida 1g

H₂O c.b.p 100 mL

Calentar a 37°C y disolver los reactivos.

Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio 1g

H₂O c.b.p 10 mL

Almacenar a 4°

Solución de lisis para eritrocitos	NH ₄ Cl 155mM KHCO ₃ EDTA 0.1 mM
SSC 1X	NaCl 0.15M Citrato de sodio 0.15 M
Solución de lisis de glóbulos blancos	Tris-HCl 10mM pH 7.6 EDTA 10 mM pH 8.0 NaCl 50mM SDS 0.2% Proteinasa K 300mg/dL
Fenol-equilibrado	Fenol/Tris HCl 0.1 M pH 8.0 Mercaptoetanol 0.2%
TE 1X	Tris-HCl 10mM pH 8.0 EDTA 0.1 mM pH 8.0

APÉNDICE V.

ABREVIATURAS

DLI	Infusión de linfocitos del donador
GVHD	Enfermedad injerto contra el huésped
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
LGC	Leucemia granulocítica crónica
LMC	Leucemia mielocítica crónica
LLA	Leucemia linfocítica crónica
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
MC	Quimerismo mixto
MRD	Enfermedad mínima residual
M.O	Médula ósea
PBSCT	Transplante de células tallo de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ph	Cromosoma filadelfia
RFLP	Fragmentos polimorficos de longitud variable
STR	Short tandem repeat
SVLE	Sobrevivida libre de la enfermedad
TMO	Transplante de médula ósea
TMO-alo	Transplante de médula ósea alógenico
VNTR	Variable number tandem repeat

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Murphy P, Lawrence W. Oncología clínica. 2º Edición E.U.A: Editorial Organización Panamericana de la salud y OMS, 1996: 562-585.
- 2.- Henry J.B. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio México: Editorial salvat, 1994: 713-718.
- 3.- Rappaport S. Introducción a la hematología. 2º edición. México: Editorial Salvat, 1996: 254-294.
- 4.- Grignaschi V. J. Diagnóstico citológico de las hemopatías. España: Editorial medica panamericana, 1991: 491-494.
- 5.- Mckenzie B. Hematología clínica. México: Editorial Manual Moderno, 1998: 284-291, 315-327.
- 6.- Nathan O. Hematology of infancy and childhood. 5º Edición. USA: Editorial Saunders 1998; Vol. 2: 1147-1182
- 7.- Passweg J.R., Horowitz Mary. Related donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. Hematology/oncology clinics of North America 1998; 12: 81-92
- 8.- Bello Abel. Hematología básica. Tercera edición. México Editorial Prado 2001: 541-55.
- 9.- Creistaing D, Ritter J, Zimmerman M., et al. Does cranial irradiation reduce the resc for bone marrow relapse in acute myelogenous leukemia? Unexpected results o the childhood acute myelogenous leukemia study. J. Clinic Oncol. 1993; 11: 279-286.
- 10.- Phillips M, Richaroli S, Chessells J. Acute myeloid leukemia in childhood : the cost and bone fits of intensive treatment. Br. J. Hematology 1991; 77: 473-477.

- 11- Anajane G. Evaluation of engraftment in the stem cell transplant setting by PCR DNA amplification and analysis of variable number tandem repeat loci. 54-60.
- 12- Jeffreys A. Wilson V. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: Towards DNA fingerprinting of single cells . *Nucleic Acids Res* 1988; 16:10953.
- 13.- Weber J.L. May PE. Abundant class of DNA polymorphism which may be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genetic* 1989; 44: 388.
- 14.- Budowle B, Chakraborty R. Analysis of the VNTR Locus DIS80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J. Hum. Genet.* 1991; 48: 137-144.
- 15.- Edwards A, Hammond H. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-253.
- 16.- Polymeropoulos MH, Rath Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Research* 1992; 20: 1432.
- 17.- Lawler M., Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeats sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 77: 2504-2514.
- 18.- Formánková R. Honzatkova L. Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: 453-456.
- 19.- McCann S.R. Lawler M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow transplantation* 1993; 2:91-94.
- 20.- Analysis of engraftment status after bone marrow transplantation by PCR amplification of variable number tandem repeat loci. *ASHI Régional* 1996; Vancouver.

- 21.- Anikó B. Immunological importance of chimerism in transplantation: New Conditioning Protocol in BMT and the Development of Chimeric State. *Human Immunology* 2000; 61:101-110.
- 22.- Bertheas MF, Lafage M, Levy P. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 1991;78: 3103
- 23.- Sparkes M.C, Crist ML. UCLA transplantation group. Gene markers in human marrow transplantation. *Vox sang.* 1977; 33: 202-205.
- 24.- Blume KG. Genetic markers in human marrow transplantation. *American J Hum Genet* 1980; 32: 414-419.
- 25.- Lawler SD. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using sex chromosomes as markers of cellular origin. *British J Haematology* 1989; 72: 239-245.
- 26.- Minden M.D Origin of leukemic relapse after bone marrow transplantation detected by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Invest* 1985; 75: 91-93.
- 27.- Blazar BR. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1985; 66: 1436-1444.
- 28.- Min GL Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematology* 1988; 68: 195-201.
- 29.- Bader P, Beck J. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism y PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 21: 487-49.
- 30.- Bacigalupo A, Soracco M, et al. Donor leucocyte infusions (DLI) in patients with chronic myeloid leukemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow transplantation* 1997; 19: 927-932.

- 31.- Manuel Merck. Editorial Océano/Mosby, 1992: 1374-1387, 2552-2556.
- 32.- González B, Ordóñez A. Oncología clínica. España: Editorial Interamericana McGraw-Hill, 1992; 2: 493-525.
- 33.- Newton C, Graham A. PCR, Oxford UK: Editorial Bios Scientific Publishers, 1994: 1-25.
- 34.- Pui C, et al. Childhood leukemia's. New engl. J. Med 1995; 332: 1618-1630.