

# Marcadores moleculares en el trasplante alogénico de médula ósea

Salut Brunet Mauri

Unitat d'Hematología Clínica

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

## Introducción

Actualmente el trasplante alogénico de médula ósea (TMO) forma parte del tratamiento de elección de diversas hemopatías malignas (1): la leucemia aguda no linfoblástica en 1ª remisión completa (RC), la leucemia linfoblástica aguda en 2ª o sucesivas RC(2), la leucemia mieloide en fase crónica (3), en otras enfermedades hematológicas como la aplasia medular severa (4) y en diversas enfermedades genéticas (5,6), incrementándose continuamente el espectro de indicaciones.

Con el tratamiento habitual de acondicionamiento con altas dosis de ciclofosfamida (CY) e irradiación corporal total (ICT), seguido del TMO alogénico, se consigue una desaparición de todo el tejido linfohematopoyético del receptor, el cual es reemplazado por células linfohematopoyéticas del donante, obteniéndose así una quimera “pura” (7).

Desde un punto de vista etimológico, Quimera era, en la mitología griega, 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. 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.

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 producido artificialmente. El término "quimera de irradiación" fue introducido por Ford et al (8), 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. Posteriormente, el término irradiación fue retirado, puesto que las quimeras pueden producirse por muchas vías. 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, después 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 (QM) (9). En los últimos años se han publicado trabajos que demuestran que en el hombre pueden existir células linfohematopoyéticas del receptor, en una minoría de casos durante largo tiempo (10,11).

Entre los marcadores tradicionales utilizados para distinguir células entre donante y receptor, cabe destacar el estudio de los antígenos eritrocitarios (12), isoenzimas leucocitarios (12), isotipos de las inmunoglobulinas (13), análisis de la cromatina de Barr y del cuerpo Y (14), análisis citogenético (15,16), y estudio HLA (17).

La utilización de las secuencias polimórficas del ADN, es un método informativo y versátil para poder distinguir células del donante y del receptor (17-23). 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.

Otra de las ventajas del estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP) es su alto grado de sensibilidad, pudiendo detectar con el método de Southern y mediante la combinación enzima-sonda adecuada, la presencia de hasta un 1% de células residuales del receptor o del donante (22) y con

la técnica de la PCR, del inglés *polymerase chain reaction*, hasta 0.01% de células residuales. 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 los otros métodos de estudio.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (24) es un método extraordinariamente útil e ingenioso que ha tenido, en el ámbito de la biología molecular, un impacto similar al descubrimiento de los enzimas de restricción y la técnica del Southern blotting. La técnica de la PCR es un método diseñado, para producir una amplificación selectiva, de una magnitud de  $10^6$ , de una determinada secuencia de ADN, lo que facilita de modo espectacular las manipulaciones posteriores. Esta técnica, que requiere el uso de dos cebadores ologonucleotídicos (*primers*) complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de ADN que se desea amplificar, se basa en el desarrollo de ciclos repetitivos de desnaturalización de la doble hebra de ADN por calor, la hibridación de los dos cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de ADN gracias a la acción de una ADN polimerasa.

## Obtención de las muestras

En la fase pre-TMO se procede a extracción de sangre periférica y/o médula ósea del donante y del receptor para análisis del ADN y estudio de los antígenos eritrocitarios.

En el post-TMO se procede a extracción de sangre periférica y/o médula ósea del receptor a intervalos secuenciales y en el momento de la recaída medular. Asimismo, en el momento de la recaída medular y si hace más de 3 meses de la última transfusión, se realiza estudio de los antígenos eritrocitarios y en el caso de que donante y receptor sean de diferente sexo se practica estudio citogenético.

## Métodos

### a.- Método de Southern

El ADN se obtiene a partir de las células nucleadas de sangre periférica o de médula ósea por precipitación con cloruro sódico (25). Se digieren 5  $\mu$ g de ADN de cada una de las muestras con los enzimas de restricción TaqI, HincII,

HinfI y EcoRI de acuerdo con las instrucciones de las casas comerciales suministradoras. El ADN, así digerido, se somete a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, a 30-40 mA, durante 16 horas, en presencia de un marcador de pesos moleculares (fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Pseudo X174 digerido con Hae III). Una vez separados los distintos fragmentos de ADN, en razón a su tamaño, se transfieren a un filtro de nylon según el método de Southern (26), uniéndose covalentemente al filtro mediante calor (80° C durante 2 horas). Los filtros se prehibridan y, posteriormente, hibridan con las distintas sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  mediante el método de "oligolabelling" (27). En todos los casos la actividad específica de la sonda es del orden de  $2\text{-}5 \times 10^9$  cpm/ng de ADN. La hibridación se realiza durante 16 horas a 65°C. Transcurrido este tiempo, los filtros se lavan y exponen a película Rx-Omat en presencia de placas intensificadoras, durante 1 a 7 días a -80° C. Al revelar las autorradiografías se ponen de manifiesto los fragmentos de ADN hibridados con la sonda radioactiva.

Los polimorfismos estudiados mediante técnica de Southern se detectan empleando las combinaciones enzima-sonda que se detallan en la tabla I. Las características de las sondas se muestran en la tabla II.

**TABLA I. Características de los Polimorfismo estudiados mediante método de Southern**

SONDA	ENZIMA	Nº DE ALELOS	C.I.P.*
Met H	Taq I	2	0.36
St-14	Taq I	10	0.76
Pseudo $\beta$ **	Hinc II	2	0.24
Epsilon	Hinc II	2	0.16
XJ 2.3	Taq I	2	0.42
pERT87.15	Taq I	2	0.44
XV 2C	Taq I	2	0.37
MS1	Hinf I	elevado	1.0
MS31	Hinf I	elevado	1.0
paw101	EcoRI	elevado	0.85

\* Informatividad. HUMAN GENE MAPPING, 10 (1989).

\*\* Esta combinación detecta 2 polimorfismos distintos.

**TABLA II. Características de las sondas empleadas mediante técnica de Southern**

LOCALIZACION CROMOSOMICA	SIMBOLOS	SONDA	TAMAÑO (KB)	LUGAR DE INSERCION	VECTOR
11p 5.5	-	pseudo $\beta$	4.0	BamH1	pBR322
11p 5.5	-	Epsilon	0.7	BamH1	pBR322
Xq 28	DXS52	St 14	3.0	EcoR1	pBR322
7q 31	MET	pmet H	1.6	EcoR1	pBR322
7q 31	D7S23	XV2C	2.3	Hind III	pUC 13
Xp 21.2	DXS.206	XJ2.3	1.1	BamH1 EcoR1	pUC 13
Xp 21.2	DX5164	pERT87.15	1.5	Hind III	pUC 18
1p 33	D1S7	MS1	5.6	BamH I	L47.1
7p 22	D7S21	MS31	5.7	BamH I	L47.1
14q 32	D14S1	paW101	5.0	Hind III	pBR322

**b.- Método de la PCR**

Para el análisis de un patrón dialélico del gen CKMM, localizado en el cromosoma 1, se amplifica un segmento de dicho gen, de 1170 pb (28). El producto amplificado se somete a digestión con los enzimas de restricción TaqI y NcoI que evidencian el polimorfismo. La separación electroforética posterior seguida de tinción con bromuro de etidio, bajo un transiluminador UV, permite visualizar la presencia de los diferentes alelos existentes. Para el análisis de la región hipervariable DIS80, localizada en el cromosoma 1, se trata únicamente de amplificar dicha región utilizando los cebadores adecuados y visualizar los VNTR generados mediante separación electroforética y tinción con bromuro de etidio (29).

**Definición de Polimorfismo informativo**

Cuando los análisis, con una sonda determinada, detectan dos patrones distintos, pudiéndose distinguir claramente uno de otro, se clasifica como polimorfismo informativo. Cuando los patrones son idénticos se clasifica como no informativo (Fig 1, muestras receptor-R- y donante-D, nº 2). Si un polimorfismo

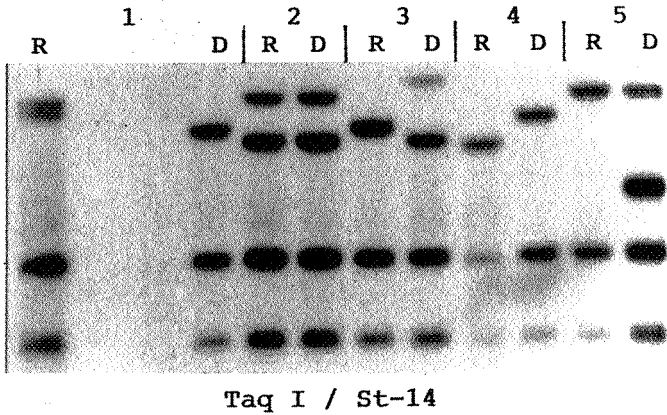


Figura 1. Autorradiografía que muestra el patrón obtenido al estudiar 5 parejas donante-receptor mediante digestión con el enzima Taq I y posterior hibridación con la sonda St-14, mediante técnica de Southern.

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”. 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” (Fig 1, 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” (Fig 1 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 (30).

## Resultados

En todos los casos estudiados se ha podido demostrar inicialmente que la recuperación hematológica provenía de células hematopoyéticas del donante. A modo de ejemplo presentamos los resultados de la autorradiografía de la paciente UPN 53 diagnosticada de LANL y sometida a TMO alogénico a partir de un hermano histocompatible. En el estudio pre-TMO mediante la combinación enzima de restricción TaqI y sonda St.14 se obtuvo un polimorfismo informativo receptor y donante. El patrón obtenido desde el día +21 hasta la actualidad

con un seguimiento de +900 días demuestra que la hemopoyesis pertenece exclusivamente al donante (Fig 2).

En 6 de 46 pacientes estudiados hemos detectado la presencia de una qui-

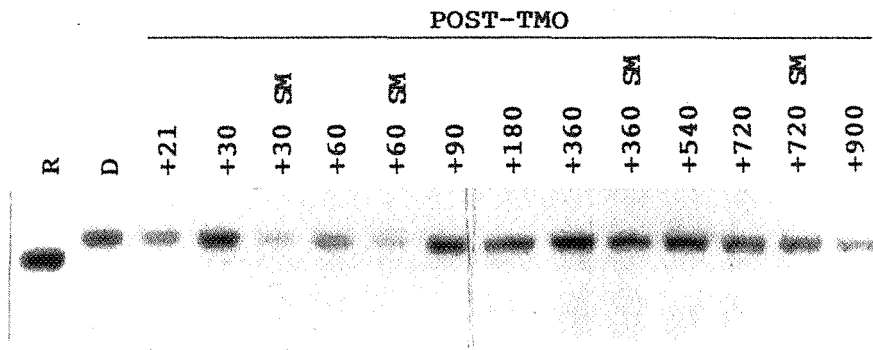


Figura 2.- Autorradiografía que muestra, con técnica de Southern, el estudio secuencial del post TMO en una paciente (UPN 53) con un seguimiento de 1 año en el que puede observarse que toda la hemopoyesis es del donante.

mera mixta. En la mayoría, ésta no ha sido seguida por la recaída del paciente y se ha mantenido estable a lo largo del tiempo. Este es el caso del paciente 267 diagnosticado de LAL y sometido a TMO a partir de un donante HLA compatible. En el pre-TMO mediante técnica de PCR, se amplificó la región hipervariable localizada en D1S111 y se detectó un polimorfismo informativo 100% D/R. En el post-TMO (Fig 3) a partir del día +21 se evidenció implante medular del donante y a partir del día +30 se detectó en sangre medular (SM) la presencia de una QM de intensidad creciente. Actualmente, a los +6 meses del TMO se evidencia que la mayor parte de la hemopoyesis pertenece al receptor sin que se objetive recaída medular ni periférica.

En otros casos la detección de una QM ha comportado a la larga la recaída leucémica. La paciente UPN 246, diagnosticada de LANL y sometida a TMO alogénico a partir de una donante HLA compatible; en el pre-TMO mediante técnica de PCR, se amplificó la región hipervariable localizada en D1S80 y se detectó un polimorfismo informativo 100% D/R. En el post-TMO (fig 4) se detectó inicialmente una QT. A los +90 días se detectó una QM sin evidencia de recaída. A los +8 meses del TMO la paciente presentó recaída leucémica y el estudio molecular puso de manifiesto que la mayoría de células correspondían

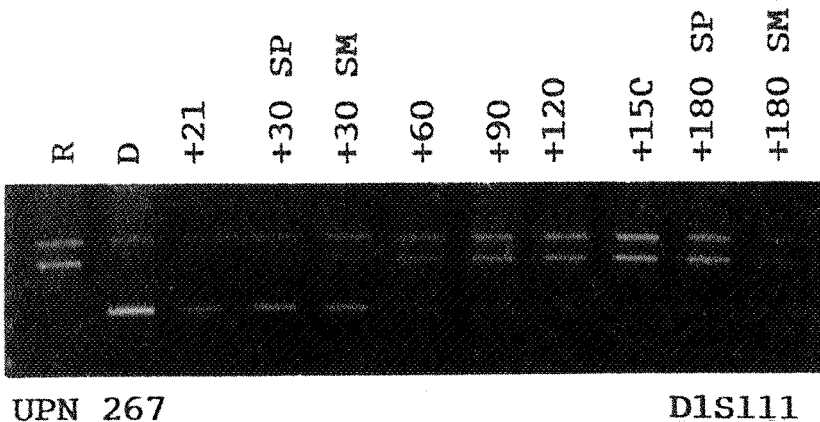


Figura 3.- Bandas de ADN obtenidas tras amplificación mediante PCR de la región D1S111. Puede observarse, implante medular en el día +21 y a partir del día +30 post-TMO, además de demostrarse hemopoyesis del donante, se observa la presencia de una banda de ADN del receptor que aumenta de intensidad a lo largo del tiempo.

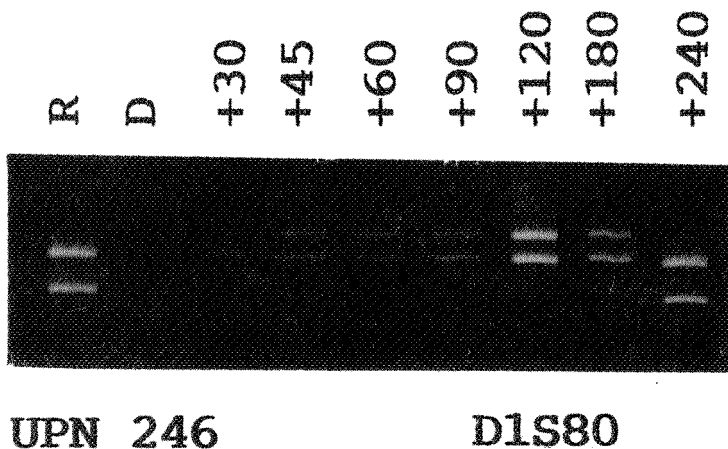


Figura 4.- Bandas de ADN obtenidas tras amplificación mediante PCR de la región D1S80. Puede observarse, como a partir de los +90 días del TMO se observa una la presencia de una banda de ADN del receptor que va aumentando de intensidad a lo largo del tiempo.



al receptor, por lo que se pudo demostrar que la misma se originaba a partir de células leucémicas residuales del receptor.

## Discusión

El TMO alogénico es una terapéutica cada vez más utilizada en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas, viéndose limitada su expansión por la alta morbilidad y mortalidad, debida a la EICH (1). Como ya hemos comentado, el objetivo del TMO es la obtención de una quimera pura. Es muy importante determinar el origen de las células linfohematopoyéticas en el post-TMO, para poder interpretar la evolución del paciente. El estudio del implante, mediante los polimorfismos del ADN, ha demostrado ser un método más sensible, informativo y específico que otros utilizados. En nuestros pacientes y mediante PCR hemos podido demostrar implante medular a los +12 días del TMO.

Uno de los problemas que suscita mayor especulación en el ámbito del TMO, es la incidencia de QM y su relación con la recaída leucémica. 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 (3). Cuando éstas son células hematopoyéticas normales del receptor, pueden rechazar la médula ósea del donante (31) o bien llegar a ser tolerantes con dicha médula y contribuyen al establecimiento de quimeras mixtas (16,32). En los inicios del TMO se habían publicado pocos casos de QM con tratamientos de acondicionamiento habituales (10,33), 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 (15,17,18,23,34). Con las modificaciones de los tratamientos de acondicionamiento y/o los tratamientos de la médula ósea “ex vivo”, esta incidencia se sitúa por encima del 60% de los casos (11,35,36). Si bien algunos estudios indican que el hecho de tener una QM implica un mayor riesgo de recaída leucémica (16,32,35), análisis más recientes sugieren que no existe mayor incidencia de recaída (11,34,36).

La persistencia de QM indica que el tratamiento con dosis supraletales de quimioradioterapia seguido de infusión de médula ósea del donante no es el único mecanismo por el que se consigue la remisión completa mantenida post-TMO. El efecto injerto "versus" leucemia puede contribuir a mantener la remisión después del TMO, pero este efecto por sí sólo no es esencial puesto que también se logran remisiones estables y duraderas en pacientes sometidos a TMO singénico y en pacientes tratados solamente con quimioterapia, por lo que este hecho sugiere que el subtipo de células responsables del efecto injerto "versus" leucemia es distinto del de aquellas responsables de evitar la reaparición de células hematopoyéticas normales del receptor (11). Przepiorka et al. (37), no encontraron mayor riesgo de recaída en los pacientes con quimera mixta analizados citogenéticamente antes del día +100, al igual que Walker et al. (32). Probablemente uno de los factores a tener en cuenta, es el porcentaje de células residuales del receptor detectadas. En nuestro estudio no han presentado recaída aquellos pacientes en los que este porcentaje ha permanecido estable a lo largo del tiempo (Fig 3), mientras que en aquellos casos en que ha aumentado a lo largo del tiempo, los pacientes han presentado recaída de su hemopatía (38). Estos datos concuerdan con los de Petz et al (34) y Bretagne et al (35), mientras que Roy et al (11) encuentran que aunque el porcentaje de células residuales del receptor se incrementa, este hecho no se correlaciona con un mayor índice de recaídas leucémicas.

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 (2,39). La recaída leucémica suele aparecer entre 1 y 36 meses post TMO (14), no habiéndose descrito recaídas en pacientes que han sobrevivido más de 6.3 años (40). 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 (14,19) valorándose que las recaídas que aparecen a partir de 2 años post TMO, probablemente se traten de nuevas leucemias, es decir que se traten de segundas neoplasias (40). Presenta, por tanto, gran interés el poder distinguir el donante del receptor mediante el estudio molecular y a poder ser análisis citogenético, para poder demostrar el origen de la recaída leucémica, si ésta se presenta. Mediante los análisis de los FRLP, Witherspoon et al. (40), demostraron que la recaída leucémica que presentó un paciente, 6 años después

del TMO, se originó a partir de las células del donante. En otro caso de recaída leucémica Minden et al (20) demostró, gracias al análisis del ADN, que además de originarse a partir de las células del receptor, coexistía con células hemopoyéticas normales del donante.

El estudio de los pacientes que han recaído y que hemos analizado, en todos los casos, mediante estudio molecular y en 2 casos, simultáneamente, con análisis citogenético, ha demostrado que la recaída se originaba en las células del receptor, excepto en un caso (41); con una total concordancia de resultados de ambos métodos de estudio, si bien el análisis de la literatura demuestra en ocasiones discordancias de resultados (42,43). Para filiar de una manera clara el origen de la recaída leucémica se requiere estudio molecular complementado, siempre que sea posible, con análisis cromosómico. En el caso de que se disponga de un cromosoma marcador para el seguimiento post-TMO o que se detecten anomalías clonales, el estudio citogenético ofrece la ventaja de demostrar la clonalidad del proceso, mientras que el estudio con las sondas moleculares demuestra reaparición de hemopoyesis residual del receptor sin presuponer si ésta es o no clonal; a partir de la valoración clínica, es posible sacar conclusiones.

El estudio de los FRLP, fundamentalmente mediante PCR, es el método de elección para demostrar implante medular en el post-TMO inmediato, para caracterizar y documentar la presencia de QM y para estudiar el origen de las recaídas cuando éstas se presentan.

## REFERENCIAS

- 1.- Thomas E. D., Storb R., Clift RA. et al.: Bone marrow transplantation. *N. Eng. J. Med.* 1975; 292: 832-843; 895-902.
- 2.- Thomas E. D. Marrow transplantation for malignant diseases. *J. Clin. Oncol.* 1983; 1:517.
- 3.- Thomas E. D., Clift R. A., Fefer A. et al.: Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.* 1986; 104: 155-163.
- 4.- Storb R., Thomas E. D., Buckner et al. Marrow transplantation for aplastic anemia. *Seminars in Hematology* 1984; 21:27-35.
- 5.- Rappeport J. M., Smith B. R., Parkman R., Rosen F. S.. Application of bone marrow transplantation in genetic diseases. *Clin. Haematol.* 1983; 12:755-773.
- 6.- Lucarelli Q., Polchi P., Galimberti M. et al. Marrow transplantation for thalassaemia following busulphan and cyclophosphamide. *Lancet* 1985; I:1355-1357.
- 7.- Nathan D. G., ed. Bone marrow transplantation. *Clin. Haematol.* 1983; 12.
- 8.- Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. W. H., Loutit J. F. Cytological identification of radiation chimaeras. *Nature* 1956; 177: 452-454.
- 9.- van Bekkum D. W., de Vries J. J. Radiation chimeras. London: Logos 1967; p. 227.
- 10.- Branch D. R, Gallagher M. T., Forman S., Winkler K. J., Petz L.D. Endogenous stem cell repopulation resulting in mixed hematopoietic chimerisms following total body irradiation and marrow transplantation for acute leukemia. *Transplantation* 1982; 34: 226-228.
- 11.- Roy D. C., Tantravahi R., Murray C. et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6- depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. *Blood* 1990; 75: 296-304.
- 12.- Sparkes M. C., Crist M. L., Sparkes R. S., Gale R. D., Feig S. A. and the UCLA transplantation group. Gene markers in human bone marrow transplantation. *Vox. Sang.* 1977; 33: 202-205.
- 13.- Witherspoon R. P., Schanfield M. S., Storb E. D., Giblett E. R. Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation* 1978; 26: 407- 408.

- 14.– Boyd C. N., Ramberg R. C., Thomas E. D. The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after bone marrow transplantation. *Leuk. Res.* 1982; 6: 833-837.
- 15.– Hill R. S., Peterson F. B., Storb R. et al. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with higher risk of graft rejection and a lessened incidence of graft versus host disease. *Blood* 1986; 67: 811-826.
- 16.– Lawler S. D., Baker M. C., Harris H., Morgenstein G. R. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br. J. Haematol.* 1984; 431- 443.
- 17.– Blazar B. R., Orr H. T., Arthur D. C., Kersey J. H., Filipovich A. H. restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1985; 66: 1436-1444.
- 18.– Ginsburg D., Antni J. H., Smith B. R., Orkin H. S., Rapoport J. M. Origin of cell population after bone marrow transplantation. Analysis using DNA sequence polymorphisms.
- 19.– Witherspoon R. P., Schubech W., Neiman P., Martin P., Thomas E. D. donor cell leukemia developing six years after marrow grafting for acute leukemia. *Blood* 1985; 65: 1172-1174.
- 20.– Minden M. D., Messner H. D., Beich A. Origin of leukemic relapse after bone marrow transplantation detected by restriction fragments length polymorphism. *J. Clin. Invest.* 1985; 75: 91-93.
- 21.– Schunbach W. H., Hackman R., Neiman P. E. et al. B monoclonal immunoblastic sarcoma in donor cells bearing Epstein-Barr virus genomes following allogeneic marrow grafting for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1982; 60: 180-187.
- 22.– Knowlton R. G., Brown V. A., Braman C. et al. Use of highly polymorphic ADN probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 1986; 68: 378-385.
- 23.– Yam P. Y., Petz L. D., Knowlton et al. Use of DNA restriction fragment polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 399- 407.

- 24.– Eisenstein B. Y. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Eng. J. Med.* 1990; 322: 178-183.
- 25.– Millee S. A., Dyke D. D., Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Ac. Res.* 1988; 16: 1215-1220.
- 26.– Southern E. detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98: 503-508.
- 27.– Feinberg A. P., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1984; 137: 266-267.
- 28.– Brunner H. G., Korneluk R. G., Coerwinkel-Driessen M., et al. Myotonic dystrophy is closely linked to the gene for muscle-type creatine kinase (CKMM). *Hum. Genet.* 1989; 81; 308-310.
- 29.– Budovwle B., Chakraborty R., Giusti A. M., Eisenberg A. J., Allens R. C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48: 137-144.
- 30.– Brunet S., Casals T., Madoz P., Aventín A., Muñiz E., Baiget M. Los polimorfismos del DNA como marcadores de implante en el trasplante alogénico de médula ósea. Valoración preliminar. *Med. Clín.* 1990; 93: 765-771.
- 31.– Champlin R. E., Ho W. G., Mitsuyasu R. et al. Graft failure and leukemia relapse following T lymphocyte-depleted bone marrow transplants: Effect of intensification of immunosuppressive conditioning. *Transplantation* 1987; 43: 842-847.
- 32.– Walker H., Singer C. R. J., Patterson J., Goldstone H. H., Prentice H. G. The significance of host haemopoietic cell detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br. J. Haematol.* 62; 385-391.
- 33.– Singer J. W., Keating A., Ramberg R. et al. Long term stable hematopoietic chimerism following marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: a case report with in vitro marrow culture studies. *Blood* 1983; 62: 869-872.
- 34.– Petz L. D., Yam P., Wallace R. B. et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1987; 70: 1331-1337.

- 35.– Bretagne S., Vidaud M., Kuentz M. et al. Mixed blood chimerism in T-cell depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood* 1987; 70: 1692-1695.
- 36.– Schattenberg A., De Witte M., Salden J. et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 1989; 73:1367-1372.
- 37.– Przepiorka D., Ramberg R., Thomas E. D. Host metaphases after chemoradiotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 1989; 8: 661-665.
- 38.– Brunet S., Aventín A., Madoz P., Baiget M. Detección de quimeras mixtas en el post-trasplante alogénico de médula ósea: estudios moleculares a los +90 y +180 días. Valoración preliminar. *Biol. Clin. Hematol.* 1991; 13:15-22.
- 39.– Thomas E. D., Sanders J. E., Flournoy N. et al. Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia. A long term follow-up. *Blood* 1983; 62: 1139.
- 40.– Witherspoon R., Fluornoy N., Thomas E. D., Ramberg R., Buckner C. D., Storb R. Recurrence of acute leukemia more than two years after allogeneic marrow grafting. *Exp. Hematol.* 1986; 14: 178-181.
- 41.– Brunet S., Aventín A., Muñiz-Diaz E., del Rio E., Baiget M. Origen de las recaídas leucémicas post-trasplante alogénico de médula ósea: estudio molecular, citogenético y del fenotipo eritrocitario, *Biol. Clin. Hematol.* 1991; 13: 115-125.
- 42.– Stein P. A., Zimmerman M., Kochera S. et al. Origin of leukemic relapse after bone marrow transplantation: Comparison of cytogenetic and molecular analyses. *Blood* 1989; 73: 2033-2040.
- 43.– Naoe T., Kiyoi H., Yamanaka K., Naito K., Yamada K. A case of cALL relapse after allogeneic BMT: Recurrence of recipient cell origin, initially determined as being that of donor cell origin by sex chromosome. *Br. J. Haematol.* 1989; 73: 420-421.