

TRASPLANTE DE MEDULA OSEA EN LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA*

JORGE H. MILONE, JAVIER BORDONE, ORLANDO ETCHEGOYEN, JUAN NAPAL,
MARIA VIRGINIA PRATES, VICTOR H. MORALES

Instituto de Trasplante de Médula Osea (ITMO), Fundación Dr. José M. Mainetti, Gonnet, La Plata

Resumen La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un proceso oncohematológico caracterizado por una proliferación clonal que afecta a la célula hematopoyética primitiva. Un 95% de pacientes presenta una alteración citogenética característica conocida como Cromosoma Philadelphia (Ph1), producto de una traslocación cromosómica 9: 22, que da lugar a un gen híbrido BCR/ABL. Diecinueve pacientes con LMC recibieron Trasplante Alogeneico de Médula Osea (TMO), 9 fueron de sexo femenino y 10 de sexo masculino. La media de edad fue de 32 años (rango 9-47); 15 de los pacientes estaban en fase crónica (FC) y 4 en fase acelerada (FA). Todos los pacientes al momento del diagnóstico fueron Ph₁⁺, BCR/ABL⁺. El régimen de acondicionamiento consistió en Busulfán y Ciclofosfamida, con el agregado de Etoposido en los pacientes en FA. La profilaxis de EICH se efectuó con Ciclosporina A, Metotrexato y Metilprednisona en 17 pacientes y con las 2 primeras drogas en 2 pacientes. La traslocación 9:22 se estudió mediante técnica de RT-PCR, con empleo de las sondas NB1+, Abl3, B2A, CA3 y A2. La sensibilidad del método fue de 1 x 10⁻⁶. De 19 pacientes que ingresaron al protocolo, 14 permanecen vivos y en remisión clínica, hematológica y citogenética (Ph₁ negativo); 3 pacientes fallecieron de EICH agudo, 1 de fallo de "engraftment" y 1 de síndrome urémico hemolítico. De 4 pacientes trasplantados en FA, 3 están vivos y en remisión completa. Los pacientes con LMC trasplantados presentaron una sobrevida del 74%, con un seguimiento medio de 655 días. El quimerismo hematopoyético completo se demostró en 16 pacientes, mediante el estudio de 3 loci, D1S80, APO B y D17S30. No se encontró ninguna relación entre la presencia post TMO del híbrido BCR/ABL (RT.PCR) y la recaída de la enfermedad; la presencia de EICH agudo y/o crónico no tuvo influencia sobre la positividad del BCR/ABL. El TMO ha demostrado ser en nuestra experiencia la única alternativa terapéutica para la LMC con obtención de remisión completa, clínica, hematológica y citogenética, con una sobrevida media del 74% comparable a la de centros internacionales de trasplante.

Abstract *Bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia.* Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is an oncohematological disease characterized by a clonal proliferation concerning the primitive hematopoietic cell. A typical cytogenetic alteration known as Philadelphia Chromosome (Ph1), a 9:22 chromosomal translocation which produces a hybrid gene BCR/ABL, is present in 95% of the patients. Nineteen CML patients (9 female and 10 male) underwent Bone Marrow Transplantation (BMT). Median age was 32 years (range 9 to 47); 15 of them were in chronic phase (CP), and 4 in accelerated phase (AP). At diagnosis, all patients were Ph1⁺, BCR/ABL⁺. The conditioning regimen consisted of busulphan and cyclophosphamide while patients in AP received etoposide as well. Seventeen patients received ciclosporine A, methotrexate and methylprednisone as prophylaxis for Graft Versus Host Disease (GVHD) while 2 patients received only the first two drugs. The 9.22 translocation was determined by means of RT-PCT technique using the primers NB1+, Abl3, B2A, CA3 and A2. The sensitivity of the method was 1 x 10⁻⁶. Among the 19 patients who entered the protocol, 14 are alive and in clinical, hematological and cytogenetic remission (Ph₁⁻) and 3 patients died due to acute GVHD, 1 due to graft failure and 1 due to Hemolytic Uremic Syndrome. Of the 4 transplanted patients in AP, 3 are alive and in complete remission. The patients had a 74% survival, with a median follow-up of 655 days. Complete hematopoietic chimerism was demonstrated in 16 patients, with the study of 3 loci, D1S80, APO B and D17S30. No relationship was found between post BMT hybrid BCR/ABL (RT.PCR) persistence and disease relapse; the presence of acute and/or chronic GVHD did not influence the BCR/ABL positivity. In our experience, BMT has proved to be the only therapeutic alternative for CML with complete clinical, hematological and cytogenetic remission and a mean survival of 74%, comparable to the international experience.

Key words: bone marrow transplantation, chronic myelogenous leukemia

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una hemopatía maligna, caracterizada por una proliferación clonal que

afecta a la célula hematopoyética primitiva, involucrando a las líneas progenitoras mieloide, eritroide, megacariocítica, linfóide B y en ocasiones linfóide T¹⁻⁴.

La enfermedad presenta diferentes fases: crónica (FC), acelerada (FA) y aguda (FAG), variando los porcentajes de mortalidad según el momento evolutivo. El 95% de los casos de LMC presenta una alteración citogenética característica conocida como cromosoma Philadelphia (Ph₁). Este marcador citogenético de la enfermedad, identificado en 1960⁵, fue la primera asociación demostrada

Recibido: 8-VII-1998

Aceptado: 9-XI-1998

* Premio Bernardino Rivadavia, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, 1998

Dirección postal: Dr. Víctor H. Morales, Instituto de Trasplante de Médula Osea, Fundación Dr. José M. Mainetti, Calle 508 e/ 16 y 18, Gonnet, 1897 La Plata, Argentina
Fax: 54-021-71-4744; E-mail: itmo@netverk.com.ar

entre una anomalía cromosómica y una enfermedad maligna⁶. La existencia del Ph₁ es el resultado de una traslocación recíproca de material genético entre los cromosomas 9 y 22: t(9; 22)-(q 34.1; q 11.21)⁷. A nivel del cromosoma 9 el punto de ruptura será el 34.1 y en el cromosoma 22 el punto 11.21 (breakpoint cluster region-bcr), traslocándose a esta región el gen *abl* procedente del cromosoma 9, y constituyendo el gen quimérico BCR/ABL^{8,9} (Fig. 1).

El RNA mensajero (mRNA) transcrito por el gen de fusión es de 8.5 kb y codifica una proteína quimérica anormal de PM 210.000 daltons (p-210).

La terapéutica óptima para la LMC en FC es motivo de controversias. Entre los fármacos utilizados se destacan el Busulfan (Bu) y la Hidroxiurea(HIU) que si bien controlan hematológicamente la enfermedad no consiguen remisiones citogenéticas ni tampoco curaciones¹⁰⁻¹².

El Interferón (IFN) por su parte logra respuestas citogenéticas con 65% de metafases Ph₁ negativas y con prolongación de la sobrevida. Desafortunadamente, sólo un bajo porcentaje de pacientes responde de esa manera, y son pocos los que alcanzan a negativizarse citogenéticamente en su totalidad; aún en estos casos la traslocación *bcr/abl* es identificable con lo cual la curación de la enfermedad no se logra si definimos a la misma como el estado permanente de negatividad para Ph₁ y para *bcr/abl*¹³⁻¹⁷.

En la actualidad el TMO es el único tratamiento que ha logrado un cambio en la historia natural de la enfermedad al lograr su remisión clínica, citogenética y molecular, logrando la curación al erradicar el clon leucémico. Los resultados del TMO en LMC van modificándose según la fase evolutiva de la enfermedad, consiguiendo entre un 60 a 80% de sobrevida a 5 años, si se efectúa en F.C.

Estos datos indican la necesidad de realizar TMO en LMC entre el primero y segundo año del diagnóstico.

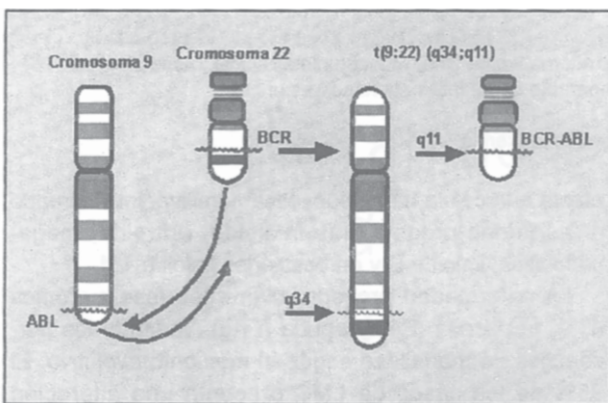


Fig. 1.- Cromosoma Philadelphia, fusión BCR/ABL. Tomada con autorización del autor. Kantarjian H.M et al. *Blood* 1993; 82: 691-703.

El TMO es un procedimiento de altísima complejidad con una mortalidad relacionada al procedimiento elevada ($\pm 20\%$) (Fallo de engraftment, Enfermedad Injerto vs. Huésped (EICH) Aguda, Enfermedad venooclusiva hepática, infecciones, etc.). Otra de las complicaciones es la recaída, la cual ocurre en un 10 al 20% en pacientes trasplantados en FC; la recaída de la enfermedad habla de la incapacidad del régimen acondicionante para eliminar el clon leucémico; lo ideal es lograr con la quimioterapia mieloblástica pre TMO la erradicación de todo el tejido medular funcional del paciente, facilitando así el "engraftment" de la célula progenitora del donante, logrando lo que se define como una quimera hematológica total o completa. (Tejido hematopoyético con características genéticas totales del donante).

La persistencia de clones leucémicos post TMO, se conoce como Enfermedad Residual Mínima (ERM), siendo ésta una causa de las señaladas como responsable de la recaída de la enfermedad. En la actualidad mediante el empleo de técnicas de biología molecular de alta sensibilidad, mediante RT-PCR, se puede determinar a nivel molecular la presencia del mRNA transcrito quimérico (traslocación BCR-ABL), y su relación con la recaída de la LMC.

Objetivos: 1) Determinar en pacientes sometidos a TMO, afectados de LMC, la sobrevida actuarial y el grado de remisión clínica, hematológica y citogenética. 2) Analizar el grado de quimerismo total logrado post TMO con empleo de microsatélites (VNTR) y su relación con la recaída de la enfermedad. 3) Estudiar la presencia de ERM en pacientes con LMC y sometidos a TMO, mediante RT-PCR para la traslocación BCR-ABL, su evolución post TMO y eventual relación con la recaída de la enfermedad.

Material y métodos

Pacientes. Un grupo de 19 pacientes con diagnóstico de LMC que recibieron TMO entre los años 1994 y 1997, en el Instituto de Trasplante de Médula Osea (ITMO), Fundación Mainetti (La Plata), fueron incorporados a este protocolo. De ellos 15 fueron trasplantados en fase crónica y 4 en fase acelerada. Todos los pacientes presentaron al diagnóstico un estudio citogenético positivo, presencia del Ph₁, y el RNAm híbrido BCR-ABL.

Los regímenes de acondicionamiento utilizados fueron: para los pacientes en fase crónica, Busulfan (Bu) 4 mg/kg/día durante 4 días y Ciclofosfamida (Cy) 60 mg/kg/día en 2 días consecutivos; para los trasplantados en fase acelerada al esquema anterior se agregó Etoposido (VP 16) 300 mg/kg en dosis única. La profilaxis de Enfermedad Injerto vs Huésped (EICH) se realizó en los primeros 2 pacientes trasplantados con Ciclosporina, EV, (CsA) 3 mg/kg/día, y Metotrexato, EV, (MTX), 4 dosis, en día +1, 15 mg/m², y en días +3, +6 y +11, 10 mg/m²; en los restantes 17 trasplantes al esquema anterior se agregó Metilprednisona (MP) 1 mg/kg a partir del día +15, con disminución de la dosis luego del día +120.

Las características clínicas pretrasplante de los pacientes pueden ser observados en la Tabla 1.

TABLA 1.- TMO: Características clínicas de los pacientes

Paciente	Edad	Sexo D/R	Status al TMO	Período Diag-Trasp.	Régimen Condicionante	Profilaxis EICH	Reordenamiento DNA
001	31	F/M	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX	b3a2/b2a2
002	28	F/M	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX	b3a2
003	44	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2/b2a2
004	9	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
005	35	F/M	FC	> 2 años	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
006	45	F/M	FA	< 1 año	Bu/Cy/Ep	CsA+MTX+MP	b3a2
007	25	F/M	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
008	43	F/M	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2/b2a2
009	39	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
010	37	F/M	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
011	43	M/F	FA	> 2 años	Bu/Cy/Ep	CsA+MTX+MP	b3a2
012	44	F/M	FC	e/1-2 años	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
013	47	F/M	FA	e/1-2 años	Bu/Cy/Ep	CsA+MTX+MP	b3a2/b2a2
014	31	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
015	31	M/F	FC	e/1-2 años	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2/b2a2
016	20	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
017	15	M/F	FA	< 1 año	Bu/Cy/Ep	CsA+MTX+MP	b3a2
018	39	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2
019	38	M/F	FC	< 1 año	Bu/Cy	CsA+MTX+MP	b3a2/b2a2

D: Donante; R: Receptor; M: Masculino; FC: Fase Crónica; FA: Fase Acelerada; F: Femenino; Bu: Busulfán; Cy: Ciclofosfamida; Ep: Etoposido; CsA: Ciclosporina; MTX: Metrotexato; MP: Metilprednisona. Profilaxis EICH: Profilaxis Enfermedad Injerto vs. Huésped

El trasplante se efectuó en todos los casos sin efectuar depleción de linfocitos T; 9 pacientes fueron de sexo femenino y 10 de sexo masculino. La media de edad fue de 32 años con un rango de 9 a 47 años.

Se realizaron los siguientes controles post TMO: estudio citogenético cada 6 meses y detección del grado de quimerismo y del mRNA leucémico BCR/ABL por PCR en 3 ocasiones con un intervalo de 6 meses.

Trasplante de Médula Osea. Todos los pacientes que recibieron TMO fueron internados en unidades de aislamiento con flujo de aire estéril. El día del trasplante se procedió a tomar médula ósea del donante.

El volumen medio colectado fue de 1 000 ml, y el volumen infundido fue de 202 ml (rango 73 a 570 ml). La media de células nucleadas totales fue de 3.10×10^9 /kg (rango 2.03 a 4.78×10^9 /kg) y de células mononucleadas de 1.85×10^9 /kg (rango 1.02 a 2.96×10^9 /kg).

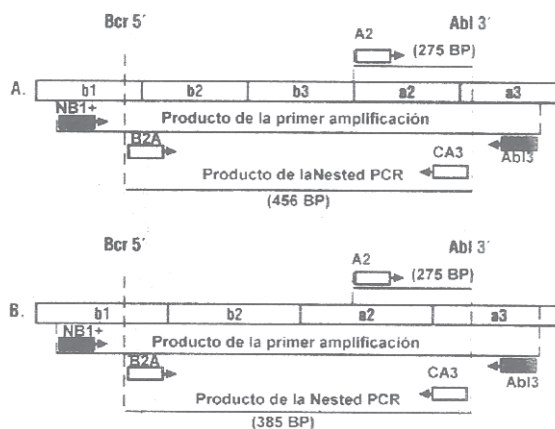
La identificación de células progenitoras se efectuó mediante la determinación de células CD34 por citometría de flujo. Se infundió una media de células CD34+ de 2.83×10^9 /kg (rango 0.80 a 6.95×10^9 /kg).

En cuatro casos existió incompatibilidad eritrocitaria ABO mayor; donante A - receptor 0. En estos casos se procedió mediante el agregado de HES a sedimentar y eliminar los glóbulos rojos incompatibles, efectuándose la infusión en todos los casos sin ningún inconveniente para el receptor.

Estudio citogenético. Se efectuó con células de la médula ósea. Se empleó un método standard y bandeó G. Se analizaron 30 metafases. La sensibilidad del método fue del 5%.

Detección del RNAm híbrido BCR/ABL. Luego de producida la traslocación 9:22, durante la transcripción del DNA, el splicing del RNAm da como resultado a 2 productos alternativos que surgen de la unión del exón 2 o exón 3 del locus

bcr con el exón 2 del locus ABL, formando el mensajero b2a2 o b3a2 respectivamente. Es decir que mediante la detección molecular del RNAm híbrido bcr-abl se determinarán las dos configuraciones exónicas.



A: Configuración exónica b3a2 B: Configuración exónica b2a2

NB1+: 5' GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA 3'
 Abl3 : 5' GGTACCAGGAGTGTCTCCAGACTG 3'
 B2A: 5' TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT 3'
 CA3: 5' TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'
 A2: 5' TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT 3'

Fig. 2.- Producto de amplificación y primers utilizados

Preparación del RNA. Se separaron las células mononucleadas de sangre periférica en gradiente de ficoll-hypaque. El RNA total fue extraído de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi¹⁸. El RNA obtenido fue cuantificado mediante lectura en espectrofotómetro a OD 260 y OD 280.

Oligonucleótidos. Se utilizaron los primers NB1+, Abl3, B2A, CA3 y A2. (Fig. 2).

Amplificación por PCR. Se empleó la técnica de transcripción reversa y nested PCR en 2 etapas. En la 1ª Etapa se efectúa la retrotranscripción con empleo de la enzima transcriptasa reversa AMV obteniéndose cDNA; a continuación y en el mismo tubo con empleo de Tfl DNA polimerasa y de los primers NB1+ y Abl 3 se efectúa la primera amplificación. El volumen final de la reacción es de 50 µl y la mezcla de reacción está constituida por: primers NB1+ y Abl3 1 µM, SO₄Mg 1 mM, dNTPs 0.2 mM buffer AMV-Tfl 1x(Promega) y RNA 1 µg. El esquema de la reacción fue: 94°C, 1 min; 48°C, 1 min. (Se agregaron las enzimas AMV transcriptasa reversa 0.1 µl/µl y Tfl DNA polimerasa 0.1 µl/µl); 48°C, 46 min; 94°C, 2 min; 35 ciclos de: 94°C, 1 min; 64°C, 1 min; 72°C, 1 min. Para finalizar 73°C, 10 min.

En la segunda etapa se realizan 2 amplificaciones: una destinada a detectar al gen genérico BCR/ABL y la otra para amplificar el gen ABL. Esta última se utiliza como control del material extraído y debe dar positivo para todas las reacciones.

Para cada muestra se colocarán 5 µl del producto de la primera etapa en cada tubo más 15 µl de la mezcla de reacción para efectuar la Nested-PCR. (vf: 20 µl). La mezcla de reacción empleada es la siguiente: 1 µM de cada primer (CA3 y B2A para BCR/ABL y A2 y CA3 para ABL), 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM Cl₂Mg, 0.5 µl/µl Taq. DNA polimerasa (Promega), PCR buffer 1 x constituido por TRIS-CIH (ph 9.0), 50 mM ClK y Triton-X 100 0.1%. La mezcla se colocó a 98°C, 20 seg; 35 ciclos a: 96°C, 1 min; 64°C, 1 min; 72°C, 1 min. La reacción finalizó a 73°C durante 10 minutos.

Como controles negativos se utilizaron células negativas para la traslocación BCR/ABL, en todos los procedimientos de extracción del RNA. Se empleó un control positivo, constituido por células K562. Se tomaron rigurosas medidas para evitar contaminación adoptándose las recomendaciones de Kwok y Higushi¹⁹.

Determinación de la sensibilidad del método. Se determina empleando células mononucleadas de la línea celular K562. Se detectó una célula K562 en 10⁶ células normales (sensibilidad 1/10⁶). (Fig. 3).

Evaluación de la amplificación. Se realizó mediante corrida electroforética (5 a 20 v/cm) 30 a 60 minutos, en gel agarosa (Metaphor MFC al 2%) teñida con Bromuro de Etilio (0.5 µg/ml). Se sembró 5 µl del producto obtenido. Se utilizó un control de pares de bases (bp) 100 bp Ladder Promega. En todas las muestras se debe obtener una banda correspondiente al gen abl de 275 bp (control del material extraído). En el caso de existir el transcripto quimérico b3a2 el producto poseía y mostraba una banda en 456 bp y si presentaba la configuración exónica b2a2 poseía y mostraba una banda 385 bp.

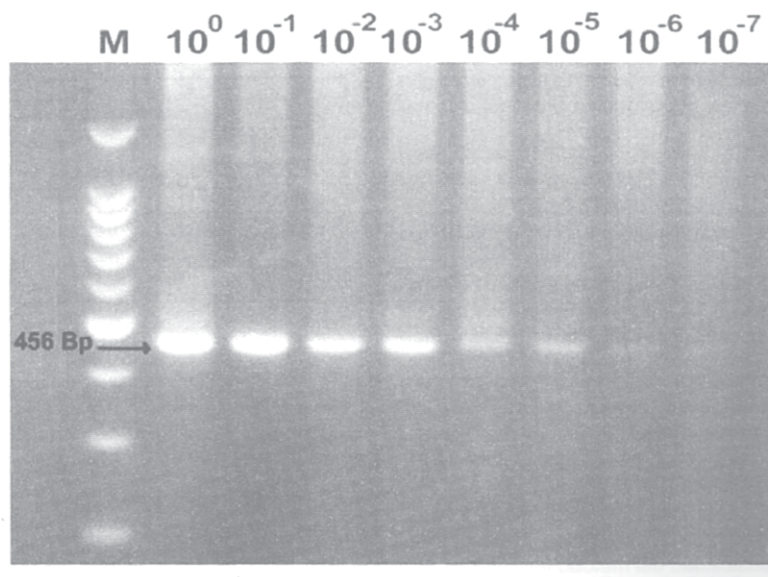
Los controles negativos no deben dar banda de amplificación y el control positivo (células K562) debe dar una banda de 456 bp.

Quimerismo. Para comprobar el grado de "engraftment" obtenido post TMO se estudiaron los VNTR (número variable en tandem repetitivos) en 16 pacientes. Los VNTRS son secuencias de DNA de 11 a 70 pares de base, altamente repetitivas y en tandem que en un número variable se encuentran en diferentes individuos. Se estudiaron los siguientes loci: Locus D1S80: 16 bp; Locus APO B: 11-16 bp; Locus D17S30: 70 bp.

Extracción del DNA: se emplea el método salting-out modificado para pequeña escala (método rápido) a 500 µl de sangre periférica.

Amplificación del DNA: Se emplearon primers específicos para cada locus. La mezcla de la reacción consistió en: Buffer 1x Promega; Cl₂Mg 1.5 mM; dNTPs 0.30 mM, Primers 77 pmol; ADN 0.5 a 1 µg tubo; Taq. Pol. 1 UI.

La determinación de VNTR se efectuó previo al TMO en el receptor y en el donante; posteriormente al receptor en forma simultánea a la determinación del ERM mediante RT-PCR para la traslocación 9:22 (ABL-BCR). Para la detección de VNTR se efectuó electroforesis en gel de agarosa Metaphor MFC al 2% teñido con bromuro de etidio 0.6 µg/ml. Se sembró 10 µl y se corrió a 70 v de 4 a 5 horas. Posteriormente se compararon los patrones del receptor (R) y del donante (D), pre y post TMO.



M: Marcador 100 pb ladder, 10⁰: Células k562 puras. 10⁻¹-10⁻⁷: Diluciones de células K562 con células normales

Fig. 3.- Gel de agarosa, mostrando la sensibilidad del método

Resultados

Todos los pacientes que ingresaron al protocolo de estudio presentaron al diagnóstico el Ph₁ y fueron positivos para el RNAm BCR/ABL por PCR. La frecuencia de la configuración exónica b3a2 fue del 68%, (13 pacientes) y el 32% restante fue b3a2/b2a2 (6 pacientes).

De los 19 pacientes ingresados, 14 de ellos están vivos, en remisión clínica, hematológica y citogenética (ausencia del Ph₁) y 5 pacientes fallecieron siendo las causas: en un caso un síndrome urémico hemolítico (SUH) con fallo multiorgánico a los 4 meses (Pac. 3); un fallo de "engraftment" a los 2 meses (Pac. 17), y en tres casos EICH agudo, estadio IV histológico, a pesar de la profilaxis de EICH instituida, a los 8 y 5 meses (Pac. 18, 1 y 12 respectivamente). De los 4 pacientes trasplantados en FA, 3 están vivos con un seguimiento de 33, 29 y 23 meses (Pac. 6, 11, 13): el paciente que obitó lo hizo por un fallo de engraftment (Pac. 17). La sobrevida actuarial libre de enfermedad fue del 74% con un seguimiento medio de 655 días. (Fig. 4).

La presencia y evaluación de EICH se realizó teniendo en cuenta los criterios clínicos establecidos por el Grupo Cooperativo Europeo²⁰.

El 89% de los pacientes presentó EICH agudo (16 pacientes sobre 18 evaluados), y el 71% EICH crónico (10 pacientes de 14 evaluados); 8 pacientes presentaron sólo EICH agudo, 2 pacientes sólo EICH crónico y 8 pacientes EICH agudo + EICH crónico. (Tabla 2).

Quimerismo. Empleo de VNTRs. El empleo de los VNTRs se utilizó para comprobar el grado de "engraftment" logrado post TMO. Sobre 16 pacientes estudiados en un 44% de los casos se pudo establecer la presencia de un quimerismo total mediante empleo de D1S80; cuando se utilizó D1S80 y APO B la frecuencia aumentó al 80%; el agregado de las determinaciones anteriores de D17S30 llevó el grado de determinación de quimerismo al 100% (Tabla 3).

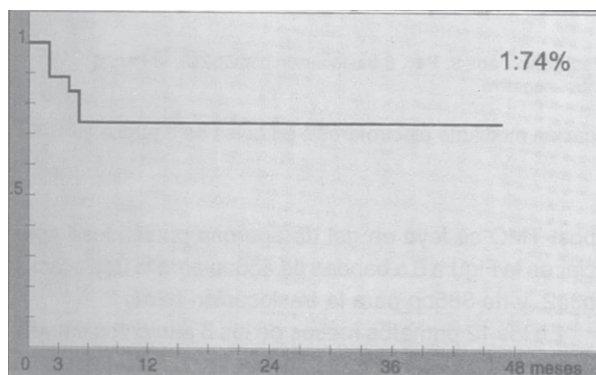


Fig. 4.- TMO en LMC - Sobrevida libre de enfermedad. (Método de Kaplan-Meier)

TABLA 2.- Presencia y Tipo de EICH post TMO

Paciente	Sobrevida (meses)	Eich Agudo (estadio)	Eich Crónico
001	5	SI (IV)	n.e.
002	40	SI (II)	Sistémico
003	4	SI (III)	n.e.
004	31	SI (I)	NO
005	28	SI (II)	Sistémico
006	27	SI (I)	Sistémico
007	26	SI (I)	NO
008	25	SI (II)	Sistémico
009	24	SI (I)	NO
010	23	SI (II)	Sistémico
011	23	SI (II)	Sistémico
012	5	SI (III-IV)	n.e.
013	17	NO	Sistémico
014	17	SI (I)	NO
015	16	SI (I)	Sistémico
016	15	NO	Sistémico
017	2	n.e.	n.e.
018	3	SI (II)	Sistémico
019	1	SI (IV)	n.e.

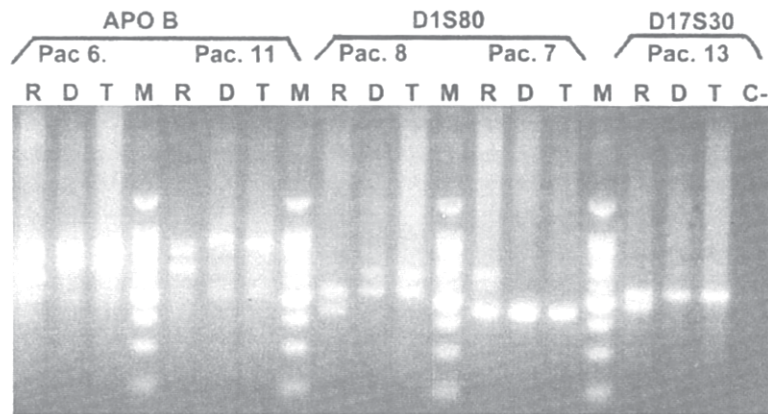
n.e.: no evaluado

TABLA 3.- Determinación de VNTRS

Pacientes	D1S80	APO B	D17S30
002	NI	QC	NI
004	NI	NI	QC
005	NI	QC	NR
006	QC	NR	NR
007	NI	NI	QC
008	NI	QC	NR
009	QC	NR	NR
010	QC	NR	NR
011	QC	NR	NR
012	NI	NI	QC
013	NI	QC	NR
014	NI	QC	NR
015	QC	NR	NR
016	QC	NR	NR
018	QC	NR	NR
019	NI	QC	NR

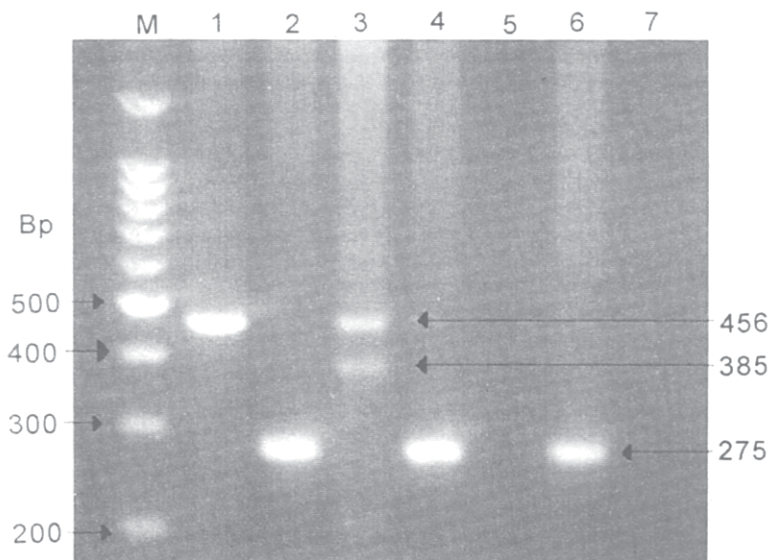
NI: No Informa; NR: No Realizado; QC: Quimera completa

Los resultados obtenidos en algunos pacientes pueden observarse en la Figura 5. Se pueden apreciar distintos pacientes, en los cuales se visualizan bandas del



M: Marcador 100 bp ladder. R: Receptor pre trasplante. D: Donante. T: Receptor post trasplante

Fig. 5.- Quimerismo Hematopoyético



M: Marcador 100 Bp ladder; 1: Pac. 14 traslocación b3a2; 2: Pac. control ab1; 3: Pac. 6 traslocación b3a2/b2a2; 4: Pac. 6 control ab1; 5: Pac. 4 negativo; 6: Pac. 4 control ab1; 7: Control negativo

Fig. 6.- Detección del Gen Quimérico BCR/ABL amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa.

marcador en estudio, en el receptor (R) y en el donante (D) pre TMO y en el receptor (T), post TMO. En los casos mostrados desaparecen bandas en la muestra del receptor siendo reemplazadas post TMO por bandas presentes en la muestra del donante.

Investigación del Gen Quimérico BCR/ABL. El análisis molecular del gen quimérico BCR/ABL y de su producto amplificado efectuado en los pacientes en estudio

post TMO se leyó en gel de agarosa pudiéndose apreciar en la Figura 6 a bandas de 456bp para la traslocación b3a2, y de 385bp para la traslocación b2a2.

En los 12 primeros meses de los 8 pacientes estudiados, 5 fueron PCR+ (62%). Entre los 12 y 24 meses se estudiaron para primera determinación 3 pacientes, siendo positiva una determinación (33%) y negativo el resto (66%). Entre los 24 y 36 meses post-TMO 6 pacientes

fueron estudiados, de los cuales 4 fueron positivos (67%) y 2 negativos (33%).

El seguimiento en el tiempo post TMO y la reiteración del estudio de la traslocación, así como su relación con la presencia de EICH aguda y crónica se puede apreciar en la Figura 7.

Se pudo determinar que 3 pacientes habían negativizado la traslocación (pacientes 04-14-15), persistiendo la misma negativa en 3 y 2 realizaciones posteriores con intervalos de 6 meses entre cada una; 4 pacientes (25%) presentaron una positividad reiterada (pacientes 02-05-08-18), en tres oportunidades post TMO. De ellos el paciente 02 es el que mayor sobrevida posee, con un seguimiento de 48 meses, sin muestra alguna de recaída clínica, hematológica o citogenética de su enfermedad; otro de los pacientes, el 18 posee sus tres determinaciones efectuadas dentro de los primeros 12 meses y los pacientes 5 y 8 entre los 24 y 36 meses; 3 pacientes (19%) viraron su resultado, Neg. > Pos. (pacientes 06-07-10) entre 24 y 36 meses, sin mostrar tampoco signos de recaída.

Finalmente en 4 casos, (pacientes 9-11-13-16) el viraje del resultado fue en sentido inverso al anterior, Pos. > Neg. entre los 24 y 36 meses post TMO.

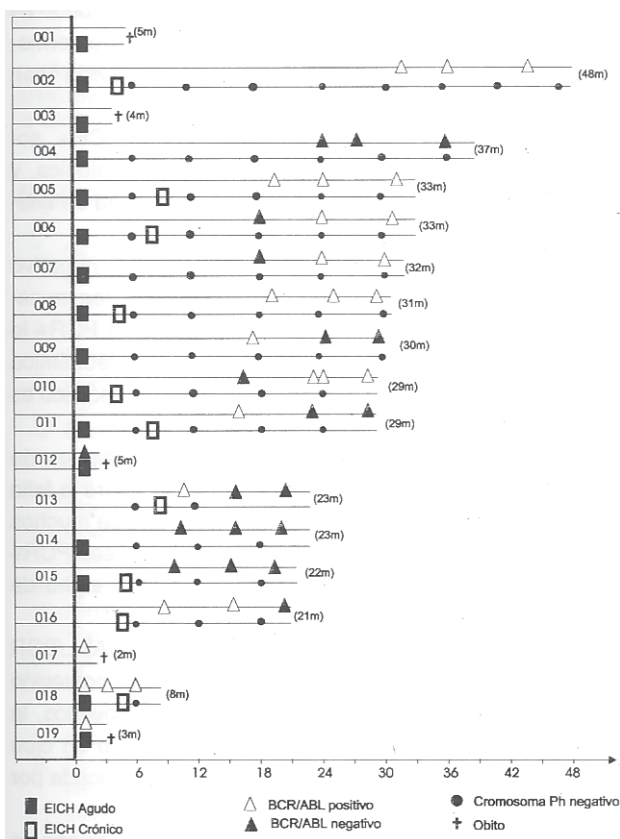


Fig. 7.- Status de los pacientes pre y post trasplante de médula ósea

Discusión

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad clonal, en la cual se describió la primera alteración cromosómica asociada a una enfermedad maligna. Cualquier tratamiento con objetivo curativo busca la erradicación del clon leucémico y la negativización del gen quimérico BCR/ABL.

La terapéutica óptima para el tratamiento de la LMC en FC es motivo de controversias que enfrentan a los tratamientos con drogas versus el trasplante alogénico de médula ósea. Entre los tratamientos comunes figuran la HIU y el IFN; mientras el primero logra controlar las cifras de leucocitos y de plaquetas sin alterar la sobrevida, el segundo llega a producir remisiones citogenéticas, con alguna prolongación de la sobrevida pero sin lograr la curación de la enfermedad²¹⁻²⁴.

La mortalidad relacionada con el tratamiento cuando se emplea el IFN es insignificante y la sobrevida media de 3 a 7 años.

Por su parte, el TMO con donante relacionado histoiéntico tiene su indicación para el tratamiento de la enfermedad en FC en especial en pacientes adultos jóvenes. La sobrevida libre de enfermedad está entre el 50 y el 60%²⁵⁻²⁸, pero en contraste con las terapias medicamentosas posee una mortalidad elevada, entre el 20 y el 30%; influyen en estas cifras la edad del paciente, la existencia de tratamientos con bursulfán anterior al TMO, la depleción de linfocitos T y el intervalo entre el diagnóstico y el trasplante.

A nuestro protocolo de estudio ingresaron 19 pacientes afectados de LMC, 15 de ellos en FC y 4 en FAC. Todos ellos recibieron trasplantes de médula ósea alogeneico, con médula proveniente de un hermano HLA idéntico. La sobrevida actuarial lograda, (Fig. 4) es del 74%, con un seguimiento de 655 días, siendo comparables a los datos de R. Gale y col.²⁹ que oscilan entre un 58% (52 a 64%), para pacientes de bajo riesgo y trasplantados dentro del año de diagnóstico, a 67% (63 a 73%) para pacientes con riesgo intermedio o alto. Por el contrario los tratamientos con HIU o IFN logran a 7 años sobrevidas del 49% (34 al 63%) y del 21% (12 al 31%) para pacientes con bajo riesgo y dentro del año del diagnóstico y para aquellos con riesgo intermedio y alto respectivamente.

En nuestro protocolo el TMO ha demostrado ser un tratamiento adecuado y de elección para los pacientes con LMC, tanto en FC como en FAC.

De los 4 pacientes trasplantados en FA, el 75% (3 pacientes) trasplantados están vivos y en remisión de su enfermedad.

La principal causa de mortalidad fue EICH agudo (3 pacientes) a pesar de la profilaxis establecida con 3 drogas (CsA+MTX+MP) y del tratamiento de dicha compli-

cación. La mortalidad general del 26% está dentro de los parámetros de los diferentes centros que realizan TMO.

Ninguno de los pacientes con un seguimiento de 665 días ha experimentado recaída clínica, hematológica ni citogenética, siendo los estudios realizados para determinar la presencia del Ph₁ reiteradamente negativos.

La incidencia y el significado de una quimera mixta (QM) post TMO es un aspecto no aclarado del TMO^{30,31}. Mediante sofisticadas técnicas moleculares de alta sensibilidad, PCR, se pudo comprobar que la QM no era rara y que diferentes porcentajes de células del receptor, eran encontradas por diferentes grupos de estudio³²⁻³⁶. La presencia de células del receptor, en bajos niveles no estaban asociadas con un incremento en el riesgo de recaída. La existencia de los microsatélites o VNTRs, distribuidos en el genoma humano permite al amplificarlos, su estudio para monitorear el "engraftment" y el estado quimérico hematopoyético post TMO.

En nuestro protocolo se utilizó la determinación de los polimorfismos del DNA, mediante los loci D1S80, APO B y D17S30, para establecer el grado de quimerismo post TMO. La determinación nos permitió establecer un quimerismo completo post TMO en el 100% de los pacientes estudiados, cuando se estudiaron los 3 loci. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gardiner y col.³⁷, que establecen que la quimera mixta es un evento raro en TMO no manipulado, en contraste con aquellos trasplantes depleccionados de linfocitos T en los cuales es un hallazgo bastante común. Los resultados obtenidos por nosotros poseen relación con la ausencia de recaída de la enfermedad, ya que el 100% de los pacientes logró consolidar una quimera completa.

La recaída leucémica post TMO es una de las complicaciones principales post TMO, con cifras que oscilan entre el 10 y el 20%³⁸. Una de las causas atribuidas a la recaída es la incapacidad del régimen mieloablativo para erradicar el clon leucémico. Las modernas técnicas de biología molecular, PCR, permiten detectar la traslocación génica que determina la presencia del gen quimérico BCR/ABL y de su producto. La interpretación de este hallazgo y su relación con la recaída de la enfermedad es algo difícil de establecer.

Todos los pacientes fueron positivos para la traslocación BCR/ABL pre TMO; un 68.4% presentó la traslocación b3a2 y un 31.6% fue positivo para b3a2/b2a2.

En los pacientes que ingresaron al protocolo, existieron cuatro opciones posibles.

La primera representada por los pacientes 4, 14 y 15, quienes en su primer control post TMO habían negativizado la traslocación persistiendo la misma negativa en estudios ulteriores.

La segunda posibilidad la presentan los pacientes 9, 11, 13 y 16 que mostraron PCR+ para negativizarla posteriormente.

La tercera posibilidad la brindan los pacientes 6, 7 y 10 que viraron sus resultados de negativo a positivo, sin que este resultado tenga un correlato con el status de la enfermedad.

La conducta terapéutica con estos pacientes podría ser la inducción de un efecto injerto versus leucemia (IVL) reacción que forma parte de la EICH. Otra alternativa terapéutica sería tratar a estos pacientes con IFN buscando la negativización del híbrido BCR/ABL.

Pero es sin dudas el cuarto grupo, constituido por los pacientes 2, 5, 8 y 18, quienes nunca negativizaron la alteración genética, mostrando resultados reiteradamente positivos, el más intrigante.

Este grupo de pacientes persiste en remisión clínica, hematológica y citogenética, 44, 33, 31 y 8 meses post TMO, con persistencia del gen BCR/ABL, PCR+.

Los cuatro pacientes presentaron EICH aguda y crónica, en especial el número 2 quien presentó EICH agudo grado II y crónico sistémico, que por su manifestación clínica sería de esperar incluya una fuerte reacción IVL, capaz de negativizar la PCR.

En estos pacientes la infusión de linfocitos, buscando provocar la reacción, no tendría indicación, ya que el desarrollo de EICH incluiría IVL; quizás en estos pacientes la inclusión de IFN post TMO agregue un factor importante para negativizar el híbrido BCR/ABL.

Para algunos autores la negativización del híbrido es un requisito necesario para la curación de la enfermedad³⁹⁻⁴⁵. Los pacientes con larga sobrevida son sistemáticamente PCR negativos.

Otros grupos encuentran pacientes con PCR+, sobrevivientes de larga data, sin recaída hematológica, y con años de seguimiento sin que la posibilidad se altere⁴⁶⁻⁵³.

Lo cierto es que aquellos pacientes PCR negativo sobreviven a largo plazo; pero muchos pacientes muestran evidencias de largas sobrevidas aún con PCR+ lo que indicaría la posible existencia del clon leucémico varios años post TMO, por lo cual su valor pronóstico es limitado.

Nuestro trabajo coincide con las conclusiones de Gardiner y col.³⁷ y de Goldman y Hughes⁵⁴ sobre la falta de valor predictivo de una PCR positiva, ya que muchos de los pacientes incorporados al protocolo poseen PCR+ mucho tiempo después del TMO sin ningún signo de recaída de la enfermedad.

Por otra parte la determinación del híbrido ABL/BCR puede estar señalando la existencia de una población mieloide con escaso protagonismo hematopoyético, la existencia de linfocitos T o B de larga vida o un clon leucémico controlado por la reacción IVL provocada por las células trasplantadas.

La alternativa más racional para los pacientes con un viraje Neg. > Post. y para aquellos reiteradamente positivos sería implementar el seguimiento mediante PCR cuantitativa permitiendo de esta manera, monitorear la

masa residual de la enfermedad y frente a un aumento significativo implementar terapias experimentales post TMO tales como IFN o transfusión de linfocitos.

En conclusión, 1) El TMO es un recurso terapéutico válido para pacientes afectados de LMC. La sobrevida actuarial para el grupo en estudio fue del 74%, con un seguimiento medio de 655 días. Todos los pacientes vivos están en remisión clínica, hematológica y citogenética de su enfermedad. La determinación del Ph₁ fue en todas las oportunidades negativa post TMO.

2) Todos los pacientes alcanzaron una quimera hematológica total. Para comprobar la presencia del quimerismo fue necesario el empleo del estudio de 3 loci D1S80, APO B y D17S30. La presencia de una quimera completa además de certificar el "engraftment" del trasplante es un factor que influye de manera positiva para evitar la recaída de la enfermedad.

3) La presencia del transcrito BCR/ABL no es sinónimo de recaída de la enfermedad. La persistencia de estudios PCR+ en pacientes de larga evolución post TMO estaría indicando la presencia de células con escaso protagonismo hematopoyético, o linfocitos de larga vida, sin relación con la recaída de la enfermedad, y detectados por la extrema sensibilidad del método. No se encontró relación entre presencia o ausencia de EICH agudo y/o crónico y positividad para BCR/ABL.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración prestada por la Srta. Roxana Ariet y el Sr. Santiago Milone en la confección del presente trabajo.

Bibliografía

1. Silver R. Chronic myeloid leukemia-A perspective of clinical and biologic issues of the chronic phase. *Hematol Oncol Clin NA* 1990; 4: 319-35.
2. Canellos GP. Chronic granulocyte leukemia. *Med Clin NA* 1988; 60: 1001-81.
3. Golde DW, Champlin RE. Chronic myelogenous leukemia: Recent Advances. *Blood* 1985; 65: 1039-47.
4. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia. Clonal origin in stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 1977; 63: 125-30.
5. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia. *Science* 1960; 132: 1497-9.
6. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
7. Sandberg AA, Gemmill RM, Hecht BK, Hecht F. The Philadelphia chromosome: A model of cancer and molecular cytogenetic. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 21: 129-46.
8. De Klein A, Van Kessel A, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D. A cellular oncogene is traslocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1982; 300: 765-7.
9. Groffen J, Stephenson JE, Hiesterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosome breakpoints are clustered within a limited region bcr on chromosome 22. *Cells*, 1984; 36: 93-9.
10. Schwartz JH, Canellos GP. Hydroxyurea in the management of the hematologic complications of chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 11-6.
11. Rushing D, Goldman A, Gibbs G, Howe R, Kennedy BJ. Hidroxyurea versus busulfan in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 307-13.
12. Kennedy BJ. The evolution of hidroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 1992; 19: (Suppl 9) 21-6.
13. Kloke O, Niederle N, Qiu JY, Wandt U, Moritz T, Nagel-Hiemke M, et al. Impact of interferon alpha-induced cytogenetic improvement on survival in chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1993; 83: 399-403.
14. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. The Leukemia Service. *Ann Intern Med* 1995; 122: 254-61.
15. Hellmann R, Heimpel H, Hasford J, Kalb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, et al. The German CML Study Group. Randomized comparison of interferon-apha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 84: 4064-77.
16. Allan NC, Richards SM, Shepherd PC. UK Medical Research Council randomized multicentre trial of interferon-alpha for chronic myeloid leukemia. Improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet* 1995; 345: 1392-7.
17. Malinge MC, Mahon FX, Delfau MH, Dagheron L, Kitzis A, Guilhot F, et al. Quantitative determination of the hybrid bcr/abl RNA in patients with chronic myelogenous leukaemia under interferon therapy. *Br J Haematol* 1992; 82 (4): 701-7.
18. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
19. Kwok S, Higushi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-8.
20. Rowe JM, Ciobanu N, Ascensao J, Stadtmauer EA, Weiner RS, Schenkein DP, et al. Recommended guidelines for the management of autologous and allogeneic bone marrow transplantation. A report from the eastern cooperative oncology group (ECOG). *Ann Intern Med* 1994; 120: 143-58.
21. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Eng J. Med* 1994; 330: 820-5.
22. Dexter TM, Chang J. New strategies for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994; 84: 673-5.
23. Ohnishi K, Ohno R, Tomonaga M, Kamada N, Onozawa K, Kuramoto A, et al. A randomized trial comparing interferon α with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 1995; 86: 906-16.
24. Thomas ED, Clift RA, Fefer A, Appelbaum FR, Beatty P, Bensinger W, et al. Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 1986; 104: 155-63.
25. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, et al. Bone Marrow Transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: Increase risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988; 108: 806-14.

26. Thomas ED, Clift RA. Indications for Marrow Transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989; 73: 861-4.
27. Gratwohl A, Hermans J, Niederwieser D, Frassoni F, Arcese W, Gahrton G, et al. Bone Marrow Transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 509-16.
28. Clift RA, Appelbaum FR, Thomas ED. Treatment of chronic myeloid leukemia by marrow transplantation. *Blood* 1993; 82: 1954-6.
29. Gale RP, Hehlmann R, Zhang MJ, Hasford J, Goldman JM, Heimpel H, et al. Survival with bone marrow transplantation versus Hydroxyurea or Interferon for chronic myelogenous Leukemia. *Blood* 1998; 91: 1810-9.
30. Mc Cann SR, Lawler M. Mixed chimaerism: detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 91-4.
31. Socie G, Lawler M, Gluckman E, Mc Cann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular era. *Leukemic Res* 1995; 19: 497-504.
32. Petz LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Knowlton RG, et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation in leukemic HLA matched patient: a cytogenetics documentation. *Blood* 1987; 70: 1331-7.
33. Bertheas MF, Maraninchi D, Lafage M, Fraise J, Blaise D, Stoppa AM, et al. Partial chimerism after T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation in leukemic HLA matched patients: a cytogenetics documentation. *Blood* 1988; 72: 89-93.
34. Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC, et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD 6 depleted allogenic marrow: a stable equilibrium. *Blood* 1990; 75: 296-304.
35. Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, et al. Cytogenetics analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 1346-55.
36. Lawler M, Humphries P, Mc Cann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 77: 2504-2514.
37. Gardiner N, Lawler M, O'Riordan J, De Arce M, Humphries P, McCann SR. Persistent donor chimaerism is consistent with disease free survival following BMT for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 235-41.
38. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: A Concise Update. *Blood* 1993; 82: 691-703.
39. Cross NC, Hughes TP, Feng L, O'Shea P, Bungey J, Marks DI, et al. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft versus host disease and relapse. *Br J Haematol* 1993; 84: 67-74.
40. Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Ginsburg D. Detection of Philadelphia Chromosome-positive cells by the Polymerase Chain Reaction following Bone Marrow Transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989; 74: 882-5.
41. Morgan GJ, Hughes T, Janssen JW, Gow J, Guo AP, Goldman JM, et al. Polymerase chain reaction for detection of residual disease. *Lancet* 1989; 1: 928-9.
42. Sawyers CL, Timson L, Kawasaki ES, Clack SS, Witte ON, Champlin R, et al. Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 563-7.
43. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM. Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood* 1991; 77: 874-8.
44. Radich JP, Gehly G, Gooley T, Bryant E, Clift RA, Collin S, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2632-8.
45. Martiat P, Maisin D, Philippe M, Ferrant A, Michaux JL, Cassiman JJ, et al. Detection of residual bcr/abl transcripts in chronic myeloid leukemia patients in complete remission using the polymerase chain reaction and nested primers. *Br J Haematol* 1990; 75: 355-8.
46. Gabert J, Thuret I, Lafage M, Carcassonne Y, Maraninchi D, Mannoni P. Detection of residual bcr/abl translocation by polymerase chain reaction in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Lancet* 1989; 2: 1125-8.
47. Miyamura K, Barrett AJ, Kodera Y, Saito H. Minimal residual disease after Bone Marrow Transplantation for chronic myeloid leukemia and implication for graft versus leukemia effect: a review of recent results. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 201-9.
48. Lange W, Snyders DS, Castro R, Rossi JJ, Blume KG. Detection by enzymatic amplification of bcr/abl mRNA in peripheral blood and bone marrow cells of patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989; 73: 1735-41.
49. Pignon JM, Henni T, Amselen S, Vidaud M, Duquesnoy P, Vernant JP, et al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long-term survivor after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1990; 4: 83-6.
50. Lee M, Khouri I, Champlin R, Kartarjian H, Talpaz M, Tujillo J, et al. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction of bcr/abl transcription in chronic myelogenous leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1992; 82: 708-14.
51. Delfau MH, Kerckaert JP, D'Hooghe MC, Fernaux P, Lai JL, Janet JP, et al. Detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia* 1990; 4: 1-5.
52. Snyder DS, Rossi JJ, Wang JI, Sniecinski IJ, Slovak ML, Wallace RB, et al. Persistence of bcr-abl gene expression following bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Transplantation* 1991; 51: 1033-40.
53. Morgan GJ, Wiedemann LM. The clinical application of molecular techniques in Philadelphia-positive leukaemia. *Br J Haematol* 1992; 80: 1-5.
54. Hughes TP, Goldman JM. Biological importance of residual leukaemia cells after BMT for CML: does the polymerase chain reaction help? *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 3-6.