

4.1 QUIMERISMO

4.1.1 QUIMERISMO MIXTO E INTERVALOS DE CONFIANZA

Para establecer a partir de qué valores se considera presencia de un QM aplicando la técnica de FISH, se ha realizado un estudio control donde los intervalos de confianza observados oscilaron entre un $0,64\pm 0,025\%$ para células XX y un $0,79\pm 0,025\%$ para células XY. En la literatura los valores varían mucho de unos estudios a otros, mientras Huss et al (1996) en un estudio realizado sobre pacientes afectados de LMC y de anemia aplásica severa consideraban presencia de un QM cuando se detectaban más de un 5% de células del paciente, Bernasconi et al (1997) fijan unos intervalos de confianza de $0,791\pm 0,013\%$ para células XX y de $0,477\pm 0,013\%$ para células XY a partir de los cuales consideraban presencia de uno u otro tipo celular. En un estudio realizado por Díez-Martín et al (1998) consideran presencia de células XY cuando detectan más de un 2,6% y presencia de células XX cuando detectaban más de un 1,5%.

La variación en los porcentajes citados se deben, principalmente a la variabilidad metodológica, y a la utilización de muestras diferentes, así en los trabajos realizados por Huss et al (1996) y por Díez-Martín et al (1998) en los que utilizan muestras de MO y SP, los porcentajes umbral a partir de los cuales consideran presencia de un QM son superiores, mientras que en nuestra serie y en la serie de Bernasconi et al (1997) trabajando sobre muestras de MO los porcentajes son inferiores.

En el presente trabajo según el estudio control realizado y teniendo en cuenta que las muestras eran cultivos de 24h de MO donde la contaminación por células del estroma es inferior al 1% , se consideró presencia de un QM cuando se detectaba más de un 1% de células del paciente.

4.1.2 VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL SEGUIMIENTO DEL QUIMERISMO

Tanto la técnica de FISH dual como el estudio citogenético han permitido valorar de forma cuantitativa la evolución de la población residual de células del paciente.

En la presente serie con la técnica de FISH se ha obtenido resultado en todos los controles realizados, alcanzando un 100% de eficacia. Es una técnica fácil de aplicar y rápida. Se han requerido tres días para obtener un resultado, incluyendo las 24 horas del cultivo celular. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten realizar la hibridación sobre muestras directas (sin cultivo celular) con las que se consigue resultado el mismo día de recibir la muestra (Smith et al, 1999). La realización de la FISH sobre muestras directas de pacientes trasplantados fue descrita por Wessman et al en 1993, señalando que existía un riesgo al utilizar este tipo de muestras ya que observaron que la contaminación por células del estroma medular era mayor en éstas que en las muestras obtenidas tras el cultivo celular (3% vs <1%).

La aplicación del estudio citogenético en el seguimiento del quimerismo ha sido menos eficaz que la técnica de FISH, ya que no se han obtenido metafases suficientes para el estudio en el 12% de las muestras analizadas.

La aplicación del estudio citogenético al estudio del quimerismo y de la EMR se ve limitado por el número de metafases analizables, aumentando la sensibilidad de la técnica al aumentar el número de metafases estudiadas. En este trabajo se intentó contar como mínimo 50 metafases por muestra. Para aumentar el índice mitótico (número de divisiones celulares), siempre que se disponía de suficiente material se realizaron dos cultivos de 24h uno de ellos incubado toda la noche con colcemid.

Así, si comparamos nuestros resultados con un estudio similar realizado por Palka et al en 1996, en nuestra serie al analizar un número más elevado de metafases (50 metafases por muestra vs 20 metafases) la sensibilidad de la técnica ha sido mayor. Palka et al (1996) encontraron por citogenética células del paciente cuando por FISH observaban más de un 10% de células residuales. En nuestra serie, por citogenética se han detectado células del paciente cuando por FISH se habían observado un 2,7% de células residuales.

Aún así, y como era de esperar, la técnica de FISH ha sido más sensible. Se ha detectado un QM en el 42% de los casos analizados, mientras que por citogenética sólo

se han detectado células del paciente en el 16% de los casos estudiados, sin tener en cuenta los casos en los que la detección coincidió con la recaída clínica del paciente. En las series publicadas, el porcentaje de pacientes con QM oscila entre el 33% en la serie publicada por Bader et al (1998) utilizando la técnica de PCR cuantitativa y el 51% en una serie publicada por Huss et al (1996) utilizando la técnica de FISH dual con las sondas X/Y. Díez-Martín et al (1998) y Choi et al (2000) utilizando técnicas de FISH y PCR, respectivamente, encuentran un QM en el 47% de los casos estudiados.

Otro aspecto a considerar es la capacidad de la técnica en predecir la recaída del paciente. En nuestra serie sólo se ha indicado la posibilidad de recaída en uno de los tres pacientes que han recaído (caso 1 afecto de AF y un SMD) detectándose una evolución de progresivo incremento de células del paciente, mientras que en los otros dos pacientes (casos 37 y 43 afectados de LMA y LLA respectivamente) se pasó de detectar un QC a un QM coincidiendo con la recaída clínica del paciente. Se podría considerar que la técnica no fue lo suficientemente sensible en estos casos para detectar las células residuales. Sin embargo, Bader et al (1997) utilizando la técnica de PCR cuantitativa, mucho más sensible que la FISH (detecta 1 célula/10⁶ vs 1 célula/10³), estudian 46 niños de los cuales 11 recaen, en ocho encuentra un incremento de células del paciente antes del momento de la recaída, mientras que en tres se pasa directamente de un QC a un QM, sin detectar células del paciente en controles intermedios. Los mismos autores indican que desde que detectan un QC hasta la recaída del paciente pasan más de seis meses, tiempo suficiente, sobre todo en las leucemias agudas, para que la hematopoyesis del paciente rebrote y de lugar a las nuevas células neoplásicas responsables de la recaída. En los casos citados de nuestra serie, también han pasado más de seis meses desde el último control hasta que se detecta la recaída. Estos autores al igual que nosotros, consideran que en pacientes de alto riesgo el seguimiento debería ser más estrecho, acortando el tiempo transcurrido entre cada estudio.

4.1.3 EVOLUCIÓN DEL QUIMERISMO POST-TPH

Tal y como se describe en la literatura, durante el estudio del quimerismo pueden encontrarse células del paciente a lo largo de todo el seguimiento.

En nuestra serie la media del porcentaje de células residuales (Tabla 3.8, pag. 111), ha oscilado entre un 3% y un 6% durante los primeros seis meses, alrededor del 14% al año y sobre el 3% a los dos años de seguimiento, resultados que son ligeramente

superiores a los descritos por Wessman et al 1993, Palka et al 1996 y Bernasconi et al 1997 (series en las que consideran presencia de QM a partir del 1%) que encuentran entre un 1% y un 7% de células del paciente durante los primeros meses y más de un 1% a los dos años de seguimiento. En nuestra serie la media del porcentaje de células del paciente observadas ha aumentado al año (14%) y después de los dos años de seguimiento (46%) porque en estos periodos se ha producido la mayoría de las recaídas.

Otro factor que se debe tener en cuenta es que no existe una unificación de criterios sobre en el protocolo de seguimiento, que determine a qué intervalos de tiempo post-trasplante se han de recoger las muestras para el estudio del quimerismo. En los pocos estudios realizados los intervalos y la duración del seguimiento difieren considerablemente de unos a otros: desde realizar controles cada mes post-TPH o realizarlos coincidiendo con los controles clínicos y hematológicos del paciente.

Se están estandarizando los protocolos de seguimiento, en los estudios multicéntricos en curso, para el estudio de la EMR y centrados en el seguimiento de la evolución del paciente desde el inicio de la enfermedad. Un ejemplo claro es el protocolo de monitorización molecular de la leucemia promielocítica aguda dentro del grupo PETHEMA, protocolo-LPA-96, en el cual se establece que las muestras se han de analizar al diagnóstico, al final del tratamiento de inducción, al finalizar la consolidación, y en el tratamiento de mantenimiento cada dos meses durante los ocho primeros, cada tres meses en los 16 meses siguientes y cada cuatro o seis meses en el resto de seguimiento.

En el presente trabajo, se planteó recoger las muestras cada tres meses durante el primer año y cada seis durante el segundo año, finalizando el seguimiento a los dos años que es cuando se completa la recuperación hematoinmunológica del paciente. Cabe indicar que en pocos pacientes se han realizado todos los controles, bien por que el momento de inclusión del paciente en el estudio no ha permitido completar el seguimiento, bien porque el paciente ha fallecido o bien porque en función del estado clínico del paciente no se ha estimado necesario la práctica del mismo. Más tarde se creyó conveniente iniciar el estudio cuando el paciente empezaba a recuperarse hematológicamente, sobre el día 21 post-trasplante, aspecto que como se verá más adelante, es importante porque permite detectar de forma rápida los fallos de implante precoces.

Por otro lado, aunque en el protocolo diseñado, el estudio debía finalizar a los dos años se ha observado que en la serie en la que se ha realizado el estudio del quimerismo,

dos de los tres pacientes que han recaído lo han hecho después de los dos años del trasplante, indicando que, sobre todo en pacientes de alto riesgo, el seguimiento debe continuar.

4.1.4 FACTORES ASOCIADOS A LA PERSISTENCIA DE UN QUIMERISMO MIXTO O COMPLETO

Uno de los objetivos que se plantearon fue determinar si había factores que podían favorecer el desarrollo de un QM o un QC. Así, se relacionó el tipo de quimerismo con la edad, con el sexo del paciente, con el tipo de enfermedad, con el estadio de las enfermedades neoplásicas en el momento del trasplante, con el tipo de donante, con el tipo de régimen de acondicionamiento utilizado y con la profilaxis contra la EICH administrada.

En el presente trabajo, al igual que Choi et al, (2000), no se han encontrado diferencias significativas entre la presencia de un QM o un QC y la edad del paciente, el tipo de enfermedad, el estadio de éstas al trasplante, ni con el tipo de donante utilizado. Sin embargo, van Leeuwen et al (1994) encuentran diferencias en relación a la edad del paciente, observan que el QM se da con mayor frecuencia en pacientes jóvenes, aunque consideran que es una variable dependiente del tipo de régimen de acondicionamiento utilizado ya que en niños menores de dos años no se utiliza la ICT. Como se verá a continuación, el tipo de régimen de acondicionamiento utilizado está estrechamente relacionado con el tipo de quimerismo desarrollado.

En nuestro estudio se han encontrado diferencias significativas ($p=0,011$) según el sexo del paciente: 18 de 20 pacientes de sexo masculino han presentado un QC, mientras que de 16 pacientes de sexo femenino, la mitad ha presentado un QM y la otra mitad un QC (Tabla 3.10, pag. 117). En la mayoría de trabajos no se observan diferencias significativas para esta variable. En nuestro caso pensamos que estas diferencias podrían deberse a que no se trata de una variable independiente, ya que el grupo de pacientes de sexo femenino recibieron, casualmente, en su mayoría (10/16), un régimen de acondicionamiento sin ICT, bien con BU o con irradiación nodal, factores que favorecen el desarrollo de un QM.

En el presente trabajo no se han observado diferencias al comparar el tipo de quimerismo desarrollado entre el grupo de pacientes con enfermedades neoplásicas y el

grupo de pacientes con enfermedades no neoplásicas, aunque los únicos dos pacientes que han presentando un fallo de implante precoz con recuperación autóloga presentaron una enfermedad no neoplásica tras someterse a un TPH de un donante HLA no idéntico con manipulación del producto y con un régimen de acondicionamiento sin ICT. Existen pocos trabajos que estudien un número considerable de pacientes de los dos tipos de enfermedades que permitan valorar si la evolución del quimerismo es diferente en ambas. Huss et al, (1996) estudian dos grupos de pacientes, uno afecto de AAA (n=63) y otro de LMC (n=100) y no encuentran diferencias en la incidencia de QM o QC entre ambos grupos. En los pacientes con enfermedades neoplásicas, tampoco hemos encontrado diferencias en la incidencia de uno u otro tipo de quimerismo considerando los pacientes trasplantados en primera o en segunda RC. Los mismos resultados fueron observados por van Leeuwen et al, (1994).

En la mayoría de estudios, los análisis se refieren a pacientes que han sido trasplantados con un donante HLA idéntico (Bertheas et al, 1991, Huss et al, 1996, Choi et al, 2000). En nuestra serie no se han observado diferencias en el desarrollo de un QM o un QC según el donante fuera o no HLA idéntico, sin embargo, la comparación no tiene valor estadístico ya que de los 37 pacientes que recibieron un trasplante alogénico de un donante de diferente sexo, 30 fueron donantes HLA idéntico y sólo siete HLA no idéntico. van Leeuwen et al, (1994), encuentran una mayor incidencia de QM en pacientes que fueron trasplantados con un donante HLA no idéntico, pero relacionan esta mayor incidencia con otros factores ya que son pacientes jóvenes que reciben dosis bajas de ICT y la médula trasplantada en la mayoría de los casos está deplecionada de linfocitos T. Estos autores comparan pacientes que recibían MO deplecionada de linfocitos T y pacientes que la recibían sin depleccionar, encontrando que la incidencia de QM era mayor y de forma significativa en aquellos que recibían MO deplecionada.

El único factor que parece influir de forma clara ($p=0,039$) sobre el desarrollo futuro de un QM es el tipo de régimen de acondicionamiento administrado (Tabla 3.10, pag 117). La utilización de radioterapia combinada con quimioterapia favorece el establecimiento de QC, mientras que la utilización únicamente de quimioterapia favorece el desarrollo de QM. Estos resultados coinciden con los descritos en la literatura, en los que no sólo encuentran una relación significativa entre el tipo de régimen de acondicionamiento utilizado y el tipo de quimerismo desarrollado, sino que además encuentran relación con la dosis de ICT administrada. Así, van Leeuwen et al (1994) estudiando 115 pacientes con diferentes enfermedades hematológicas encuentran una

relación significativa con la dosis de ICT utilizada; estos autores, para comprobar realmente la influencia de la dosis de ICT usada, realizan el análisis estadístico eliminando del estudio aquellos pacientes que habían sido acondicionados con BU en lugar de ICT, y la relación les sigue resultando significativa. Posteriormente Huss et al, (1996) encuentran que en pacientes con LMC la dosis de ICT utilizada estaba inversamente correlacionada con el desarrollo de un QM. Y el mismo año, Ramírez et al, estudian 15 niños afectos de LLA, y también obtienen una relación significativa entre el tipo de régimen de acondicionamiento utilizado y el tipo de quimerismo desarrollado.

En cuanto al tipo de profilaxis contra la EICH utilizada, en la mayoría de estudios no encuentran, al igual que nosotros, diferencias significativas entre ella y el tipo de quimerismo desarrollado. Sin embargo, van Leeuwen et al, (1994) observaron que la utilización de Cs se asociaba de forma significativa con una alta incidencia de QM, aunque los mismos autores indicaban que en esta correlación no se podían eliminar otros factores ya que la mayoría de pacientes que habían recibido Cs también habían recibido dosis bajas de ICT. Por otro lado, como los estudios de van Leeuwen et al, (1994) y Ramírez et al, (1996), en la presente serie no se ha encontrado ninguna relación significativa entre el tipo de EICH y el tipo de quimerismo aunque la mayoría de pacientes que desarrollaron una EICH de grado superior a II presentaron un QC (12/15). Existen trabajos en los que sugieren que la presencia de un QM está asociado a una baja incidencia de EICH aguda. Bertheas et al (1991) ya indicaban que en aquellos casos que presentaban más de un 10% de células del paciente la incidencia de la EICH aguda de grado superior a II era significativamente menor, al igual que nosotros estos autores no encontraron diferencias significativas en el desarrollo de una EICH crónica, sin embargo es importante señalar que en la presente serie de los 8 pacientes que desarrollaron una EICH crónica sólo uno había presentado un QM. Más recientemente, Huss et al (1996) encuentran que en pacientes con anemia aplásica que habían recibido una única droga (Cs o MTX) como profilaxis contra la EICH, la incidencia de EICH de grado superior a II era significativamente menor en pacientes con QM que en pacientes con QC.

4.1.5 VALOR PRONOSTICO DEL QUIMERISMO EN LA EVOLUCIÓN POST-TRASPLANTE DEL PACIENTE

Se debe distinguir entre el significado de la presencia de un QM en un periodo inicial post-trasplante, alrededor de los 100 días después del trasplante y su pronóstico una vez superado este periodo inicial.

Durante los primeros días del trasplante el paciente permanece inmunosuprimido, y se produce la recuperación hematológica de forma lenta. En este periodo los principales problemas a los que se enfrenta son el fallo de implante y el desarrollo de la EICH aguda. Para el tratamiento de ambas complicaciones es importante detectar y cuantificar la presencia de QM. En nuestra serie dos pacientes presentaron fallo de implante y una recuperación autóloga a expensas de células del enfermo (casos 12 y 53), detectándose un porcentaje elevado de células del paciente al mes y a los tres meses del trasplante. Aunque en el caso 53 se realizó una segunda infusión de células del donante al mes y medio de la primera, ambos pacientes fallecieron detectándose por FISH una hemopoyesis total del paciente.

La detección de un porcentaje elevado de células del paciente en este periodo indica la presencia de una RA precoz. La detección de QC del donante sin que se produzca una recuperación hematológica completa puede indicar la necesidad de administrar una segunda infusión o la utilización de factores de crecimiento para favorecer la recuperación hematológica. Recientemente, Gyger et al, (1998) publicaron un interesante trabajo en el que aplicaban la FISH dual de los cromosomas X e Y, sobre neutrófilos y linfocitos de pacientes trasplantados, recogidos entre el día 1 y el 100. Relacionaron la evolución del quimerismo en este periodo crucial con el desarrollo de un fallo de implante y con la aparición de la EICH. Llegaron a la conclusión que de los pacientes que sufrían un fallo de implante, los que presentaban neutrófilos, células natural *killer*, y un predominio de linfocitos T del donante, respondían bien al factor de crecimiento G-CSF; y que la eliminación de las células natural *killer* del paciente durante los primeros 10 días post-trasplante, era significativamente más rápida en aquellos pacientes que posteriormente desarrollaban una EICH aguda o crónica que en los que no desarrollaban ningún tipo de EICH. Indicando que la presencia de un QC o un QM, alrededor del día 10 post-trasplante puede ser útil en la identificación de pacientes con retraso del implante, de aquellos con rechazo total irreversible, además de ayudar a predecir el futuro desarrollo de una EICH.

Superado este periodo inicial se puede detectar presencia de QM a lo largo de todo el seguimiento, aunque su detección no implique la recaída del paciente. En nuestro estudio la media del porcentaje de células del paciente ha oscilado entre un 3% y un 46%

en el intervalo estudiado (de un mes a más de dos años), y sólo han recaído aquellos que han presentado un aumento progresivo de células del paciente. Ninguno de los pacientes que ha presentado un QMt, bien por disminución de células del paciente o por desaparición total de éstas, ha recaído; los mismos resultados se han obtenido en otras series utilizando técnicas de amplificación de VNTR por PCR cuantitativa o cualitativa (Ramírez et al, 1996, Bader et al, 1998, Choi et al, 2000).

El origen de las células del paciente responsables de que el paciente presente un QMt es motivo de debate. El por qué aparecen células del paciente después de seis meses o un año de seguimiento que luego van disminuyendo, incluso hasta desaparecer por completo o el por qué hay casos en los que un porcentaje pequeño se mantiene a lo largo de todo el seguimiento, son preguntas que surgen al observar la evolución del quimerismo. En nuestra serie hay pacientes que en el primer control (al mes o a los tres meses) presentan un porcentaje de células del paciente que después va disminuyendo a lo largo del seguimiento (casos 2, 20, 24, 49, y el 56), evolución que se debe, probablemente, a que son células originadas por una hematopoyesis residual del paciente que ha sobrevivido al régimen de acondicionamiento y que es sustituida poco a poco por la nueva hematopoyesis del donante. En cambio en los casos 18 y 48 se ha observado un aumento de células del paciente para después desaparecer y alcanzar un QC. El caso 18 mostró un 4.2% de células residuales a los ocho meses post-TPH, un 22,2 % a los once meses y un QC a los 15 y 24 meses post-TPH; el caso 48 mostró un QC al mes y a los tres meses, un 4,3% de células residuales a los seis meses, un 10,4% a los doce meses y de nuevo un QC a los 18 y 24 meses post-TPH. Explicar estos hechos es difícil si tenemos en cuenta que en el caso 48 durante los primeros tres meses del seguimiento se había observado una hematopoyesis total del donante, y que en el caso 18 las células del paciente detectadas presentaban, además, un cariotipo alterado con una inv(3) clonal. Por otro lado los porcentajes son elevados (10,4% o un 22,2%) como para considerarlos contaminación por células del estroma. Este tipo de evolución se puede considerar como un resurgir de la hematopoyesis del paciente pero otros factores, quizás inmunológicos (ambos pacientes han presentado una EICH aguda de grado II) deben intervenir impidiendo que ésta progrese, ya que los pacientes al final del estudio permanecían vivos sin síntomas de recaída. En este sentido, van Leeuwen et al, (1994), realizando un estudio similar sobre muestras de SP y de MO, y utilizando la técnica de amplificación de VNTR por PCR, observaron que cuando en SP detectaban presencia de un QMt, en MO sólo observaban células del donante, mientras, que cuando encontraban un QM en SP, en

MO detectaban tanto células del donante como del paciente. Esto les llevó a sugerir que la presencia de un QM podía ser el resultado de la supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas del paciente (*stem cells*) y el QMt sería el resultado de la persistencia en SP de células comprometidas de linaje T del paciente que persistirían después del TPH.

La presencia de QMt en MO quizás deba relacionarse con el efecto inmunoterápico antitumoral del aloinjerto o efecto del injerto contra leucemia, el cual tiene particular actividad contra la hematopoyesis residual a la que puede llegar a erradicar por completo (Barta et al, 2000).

Por otro lado, Bourhis et al, (1991) consideraban que aquellos pacientes que presentaban más de un 5% de células del paciente, tenían una mayor probabilidad de recaída. En nuestra serie, cuatro pacientes han presentado más de un 5% de células residuales (entre un 5,3% y un 22%), y hasta el momento ninguno ha recaído. Realmente se ha considerado riesgo de recaída cuando se observaba un aumento progresivo de células del paciente, como ha ocurrido en el caso 1. En nuestra serie la presencia de un QM no ha significado un mayor riesgo de recaída.

En cambio, en estudios con pacientes afectos de AAS y LMC se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de recaída y la presencia de un QM (Hill et al, 1986 y Huss et al, 1996). Huss et al, (1996) encontraron que en pacientes con LMC la incidencia de recaída era significativamente mayor cuando se detectaba un QM después del día 100 post-trasplante. Bader et al, (1997) estudian una serie de 48 niños afectos de enfermedades neoplásicas (incluyendo LA y LMC) y de enfermedades no neoplásicas y encuentran una asociación significativa entre la presencia de un QM y el riesgo de recaída; Bernasconi et al (1997) estudian una serie de 29 pacientes afectos de LA y también observan una relación significativa entre la presencia de células del paciente y la incidencia de recaída, pero sólo consideran predictivo de recaída el aumento progresivo de células del paciente. Recientemente, Roman et al (2000) estudian una serie de 49 pacientes afectos de LMC y observan una asociación significativa entre presencia de células Ph positivas y QM con la probabilidad de recaída, observando que de los nueve pacientes que presentan un QM, éste se manifiesta en seis casos en células CD15+ Ph+ y en tres se restringe a células T Ph -; los seis casos que recaen mostraban un aumento de las células del paciente antes de la recaída.

Una vez se produce la recaída las posibilidades terapéuticas se reducen considerablemente. Se puede realizar un segundo trasplante (como en los casos 1 y 37 de

esta serie) con las complicaciones inherentes al mismo, o bien, como se está utilizando cada vez más en pacientes con LMC en recaída, aplicar distintas formas de inmunoterapia celular con la infusión de linfocitos del donante; ya que se ha comprobado que la inmunoterapia permite incrementar el efecto injerto contra leucemia y reducir la población neoplásica hasta alcanzar la remisión completa (Kolb et al, 1990, 1993). Se ha observado que en pacientes que recaen tras someterse a un TPH alogénico, el establecimiento de un QM confiere un cierto grado de tolerancia inmunológica lo que permite infundir linfocitos del donante sin tener que administrar una inmunosupresión adicional (quimioterapia o radioterapia). En nuestra serie de los tres pacientes que recayeron, dos afectos de LA (casos 37 y 43), lo hicieron de forma agresiva observándose un 97% y un 68% de células del paciente, respectivamente, y uno afecto de una AF con un SMD de forma menos agresiva, detectándose un 37,8% (caso 1); el caso 43 falleció sin poder realizar ningún tipo de tratamiento. En los casos 1 y 37, se realizó un segundo trasplante tras alcanzar la RC; en ambos el tratamiento fue eficaz y actualmente permanecen en remisión después de más de dos años de recibirlo.

Respecto a la influencia del porcentaje de células del paciente detectado en el momento de la recaída, probablemente en el caso 1 con un 37,8% de células del paciente la capacidad para alcanzar la RC en un plazo de tiempo corto debería ser mayor. En este sentido, existen estudios en pacientes con LMC tratados tras la recaída con una ILD que demuestran que el tipo de quimerismo observado antes de la ILD tiene valor pronóstico para predecir la respuesta al tratamiento o el desarrollo de una aplasia severa, principal complicación en este tipo de tratamiento (van Rhee et al, 1994, Rapanotti et al, 1997); Rapanotti et al, (1997), concluyen que el tiempo en alcanzar la RC estaba inversamente relacionado con el porcentaje de células del donante que se encontraba antes de la ILD, y a su vez que el riesgo de aplasia era menor en pacientes que mostraban un QM, es decir en aquellos que en la recaída seguían manteniendo células del donante.

En este sentido se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas con las que se intenta disminuir la mortalidad relacionada con el TPH reduciendo la toxicidad del TPH disminuyendo la dosis de quimio y radioterapia, con las que se consigue una hemopoyesis estable del donante tras un breve período de QM. Como se ha descrito anteriormente la presencia de un QM se favorece si se utiliza un régimen de acondicionamiento atenuado, con dosis bajas de quimio y radioterapia, a la vez que se ha demostrado que la presencia de un breve periodo con QM puede favorecer el desarrollo del eICL. El protocolo utilizado en estos TPH atenuados o minialotrasplantes, incluye

tres etapas, una primera de obtención del QM, una segunda de manipulación del propio quimerismo, en función de la respuesta de la enfermedad y de las posibles complicaciones surgidas tras el TPH y una tercera de utilización de inmunoterapia adoptiva con ILD en caso de no haberse logrado la respuesta adecuada. Así en la primera etapa del proceso se administraría un régimen de acondicionamiento poco agresivo (las dosis dependerían del tipo de patología), seguido de la infusión de abundantes progenitores hemopoyéticos, sobre todo de SP y la profilaxis contra la EICH. A continuación se produce el prendimiento y se establece un QM o QC que va a ser modificado en función de la necesidad de potenciar el efecto ICL. Así en una segunda etapa, en caso de pacientes sin manifestación de la EICH con QM y/o persistencia de enfermedad neoplásica se procede a la retirada de la inmunosupresión o profilaxis de la EICH. Y en una tercera etapa, si no aparece la EICH y persiste la presencia de un QM, la mayoría de autores administran linfocitos T del donante, con el fin de convertir el QM en QC, y que a través de su efecto ICH e ICL, erradique la hematopoyesis residual del receptor y con ella la enfermedad neoplásica (Childs et al, 1999, Sykes et al, 1999 y Spitzer et al, 2000). Al igual que en los TPHs convencionales, las complicaciones más importantes de éste tipo de trasplantes, además del rechazo siguen siendo el desarrollo de la EICH y la recaída. Debido a que el QM juega un papel central en todo el proceso se hace necesario el análisis genético del mismo y el estudio de la dinámica de su instauración.

En relación al valor pronóstico de la presencia de un QM o un QC con respecto a la SG y SLE, en nuestra serie el grupo de pacientes con QM presentaron una mediana de supervivencia mayor, pero no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la SG y a la SLE para ambos grupos, aunque la SLE fue superior para el grupo de pacientes con QC (75% vs 51%) (Tabla 3.10, pag. 117). Existen pocos trabajos en los que se hayan estudiado suficiente número de pacientes para poder realizar una estimación estadística del valor pronóstico de la presencia de un QM y al mismo tiempo los resultados son muy dispares. Mientras que Bertheas et al, (1991), van Leeuwen, et al (1994), y Ramírez et al, (1996), no encuentran diferencias significativas para SG y la SLE según el tipo de quimerismo desarrollado, Huss et al, (1996) observaron en un grupo de pacientes afectos de LMC, que la SG y la SLE eran superiores de forma significativa en los que desarrollaban un QM. Los mismos autores sugieren que esta ventaja en la supervivencia en pacientes con QM, se podría deber a que en estos pacientes la incidencia de la EICH es baja.

Según nuestros resultados, los pacientes que desarrollaron un QM presentaron una baja incidencia de EICH, tanto aguda como crónica, una mediana de supervivencia superior a los que desarrollaron un QC y una probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a los dos años menor que los que presentan un QC. Indicando que la presencia de un QM puede favorecer la recaída del paciente y la ausencia de una EICH de alta intensidad, disminuyendo las complicaciones que se derivan de ésta.

4.2 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

4.2.1 VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

En el presente trabajo, el seguimiento de la EMR se ha realizado analizando la presencia de las alteraciones cromosómicas detectadas al diagnóstico de la enfermedad. Para ello se han utilizado las técnicas citogenéticas, el análisis de pintado cromosómico y para la detección de la reorganización resultante de la t(9;22)(q34;q11) la hibridación *in situ* con la sonda BCR-ABL.

Mientras que las técnicas de hibridación *in situ* han mostrado una eficacia del 95% (18/19), en el estudio citogenético ha sido del 83% (86/104). Por otro lado, por medio de las técnicas de hibridación *in situ* se ha podido realizar el seguimiento en todos los pacientes estudiados, mientras que en el 10% de los mismos no se pudo realizar el seguimiento citogenético. Estos resultados indican, como ya se ha descrito en la literatura, la limitación de la citogenética en el estudio de la EMR que requiere metafases de buena calidad para su estudio y la ventaja de la FISH que permite realizar el estudio en metafases de mala calidad o analizando núcleos interfásicos (Cuneo et al, 1997).

En cuanto a los controles realizados para determinar los intervalos de confianza para la detección de la EMR, se ha de indicar la ventaja de la citogenética frente a la FISH ya que la localización de una metafase con la alteración descrita al diagnóstico ha

sido suficiente para indicar la presencia de una célula residual, mientras que se ha requerido de la presencia de más de un 6% de células BCR-ABL positivas para la detección del reordenamiento BCR-ABL, debido a la presencia de falsos positivos. En la literatura el porcentaje de falsos positivos de esta sonda oscila entre el 5% y el 7% (Negrin, 1998).

La sensibilidad de la citogenética está directamente relacionada con el número de metafases estudiadas (como se ha indicado en el apartado 4.1.2), en este sentido se planteó estudiar como mínimo 50 metafases por muestra. Sin embargo, sólo en el 41% de las muestras se ha podido analizar 50 o más metafase (Tabla 3.15, pag 121). Es de destacar que en el único caso en el que se ha detectado la EMR antes de la recaída clínica se pudieron analizar 70 metafases. También es importante tener en cuenta la dificultad de obtener metafases suficientes para el estudio, durante los primeros tres meses del trasplante, periodo en el que el paciente puede padecer una aplasia medular causada por el tratamiento mieloablativo al que ha sido sometido. En el presente trabajo, en 18 muestras no se obtuvieron metafases, 11 de ellas pertenecían a los controles realizados en los tres primeros meses del trasplante. En este periodo ha resultado ser más eficaz la utilización de las técnicas de FISH aplicadas sobre núcleos interfásicos para la detección del quimerismo y del reordenamiento BCR-ABL. Así, se han podido estudiar pacientes como los casos 3 y 54 en los que sólo se ha realizado un control al mes del estudio sin obtener metafases para el estudio citogenético pero en los que se ha comprobado la presencia de un QC del donante mediante la FISH utilizando la sonda X e Y; y al igual que en los casos 14 y 77 en los que no se obtuvieron metafases suficientes en los controles realizados a los 38 meses y al mes del trasplante respectivamente, la aplicación de la técnica de FISH utilizando la sonda BCR-ABL permitió detectar la presencia del reordenamiento en un 15% y en un 8,9% de los núcleos, respectivamente (Tabla 3.19, pag 132).

4.2.3 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL PRE-TRASPLANTE

Uno de los primeros objetivos que se plantearon fue el realizar el estudio de la EMR sobre muestras recogidas antes de que el paciente se sometiera al régimen de acondicionamiento. Se estudiaron sólo cuatro pacientes antes de recibir el trasplante: dos afectos de LMC Ph+ (caso 14 y 77), uno afecto de LAL-T con una t(1;14) (caso 9), y uno afecto de una LMMoC con una monosomía 7 (caso 64). Los pacientes afectos de LMC,

no habían hecho respuesta citogenética al tratamiento previo y seguían mostrando células Ph positivas (54,5% y un 88,2%, respectivamente). El paciente con LLA se encontraba en inicio de recidiva y presentó un 9% de células con la translocación. Y el paciente con la LMMoC seguía presentando en el 100% de las metafases analizadas la monosomía 7. Todos recayeron entre los tres y los 36 meses post-trasplante.. Es importante destacar que el paciente afecto de LAL-T presentó un 9% de células residuales se encontraba en inicio de recidiva y recayó a los tres meses de recibir el trasplante alogénico de un donante emparentado HLA idéntico, mientras que el paciente afecto de LMC presentó un 54,5% y recayó a los 36 meses de recibir un trasplante alogénico de sangre de cordón umbilical, también de un donante HLA idéntico. Estos resultados reflejan las diferencias en el proceso de leucemogénesis de ambas enfermedades.

Otro aspecto a considerar en éste grupo de pacientes que presentan una población neoplásica residual importante, es si antes de recibir el TPH se debería ajustar los regímenes de acondicionamiento (aumentando las dosis en la medida de las posibilidades) o si en caso de recibir un trasplante autólogo se debería realizar un tratamiento *ex vivo* del producto infundido. Existen bastantes estudios en los que se relaciona el tratamiento *ex vivo* o no del producto y la probabilidad de recaída. En estos trabajos los resultados son contradictorios y parece ser que la probabilidad de recaída no se ve modificada en función de si trata o no el producto antes de infundirlo, ya que la probabilidad de recaída sigue siendo mayor en los trasplantes autólogos que en los alogénicos tratando o no el producto infundido (Roberts, 1994, Gale et al, 1994). Sin embargo, recientemente, en pacientes con LMC que van a recibir un trasplante autólogo de SP, se han estudiado mediante FISH, , la población de células Ph positivas presentes en las células CD34+ de la MO al final de la quimioterapia y en células CD34+ en aféresis de SP movilizadas después de la quimioterapia, y la relacionan con la probabilidad de recaída. Estos estudios indican que el nivel de células Ph negativas tras el trasplante autólogo está correlacionado con el número de células CD34+ Ph negativas trasplantadas (Talpaz et al, 1995, Irving et al, 1999). Por otro lado, Meloni et al, en (1997) publican una serie de 15 pacientes afectos de LMA tipo M3 con la t(15;17) estudiando mediante RT-PCR el transcrito PML/RAR α en muestras de MO antes de recibir un trasplante autólogo no manipulado. Todos los pacientes en los que se detectó el transcrito recayeron con una media de cinco meses después del trasplante (7/15), mientras que seis de los ocho que presentaron una PCR negativa permanecían en remisión con una media de seguimiento de 28 meses. Otro trabajo interesante es el realizado por Guglielmelli et al, (1999) en el que en dos

pacientes con LMA M4 y trisomía 8 en RC, valoran mediante FISH con la sonda centromérica del cromosoma 8 la población de células con trisomía 8 en MO y en aféresis de SP recogidas tras la movilización al final de la quimioterapia. En ambos pacientes, encuentran un porcentaje de células con trisomía 8 superior al 3% en MO y entre un 2% y un 1,2% en las aféresis recogidas. Ambos recayeron durante los cuatro primeros meses post-trasplante autólogo de SP. Sugieren que la presencia de células residuales en las aféresis recogidas confiere mal pronóstico y la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para este tipo de pacientes.

4.2.4 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL POST-TRASPLANTE

Durante el seguimiento post-trasplante se han detectado las alteraciones cromosómicas observadas en el diagnóstico, en el 26% (10/38) de los pacientes. Excepto dos que sólo siguieron mostrando el mismo cariotipo observado al diagnóstico, el resto presentó además nuevas alteraciones adicionales indicativas de la progresión de ésta (Tabla 3.21, pag 137). En estas alteraciones adicionales se han visto implicados los cromosomas X, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8,11,13, 16, y 17. Los cromosomas 5, 7, 11, y 17 suelen estar implicados en alteraciones secundarias y generalmente se asocian a una evolución agresiva de la enfermedad y a mal pronóstico (Mitelman et al, 1995). De hecho, seis pacientes han fallecido tras la recaída, en uno no se pudo realizar el estudio citogenético, dos presentaron las alteraciones observadas al diagnóstico una t(4;11) y una monosomía 7, y los otros tres han presentado como alteraciones adicionales t(2;8), del(7), t(11;13), y der(17) en un paciente con LLA-T con t(1;14); una del(5q) en un paciente con una LMC Ph +, y una add(17p) en un paciente con LMC Ph+. Los cuatro pacientes restantes que han sobrevivido a la recaída tras someterse a un segundo trasplante, han presentado como alteraciones adicionales una t(3;4), un der(16), un der(X), un der(1), una add(13q) y un i(13q).

Es importante destacar que en la mayoría de los pacientes la detección coincidió con el primer control post-trasplante y con la recaída hematológica, y que en cuatro (casos 1, 9, 14 y 37) se realizó un seguimiento (más de un control) (Tabla 3.22, pag. 138). De estos cuatro, en dos afectos de una AF/SMD con monosomía 7 y de una LMC Ph'+ (casos 1 y 14), tanto mediante FISH como por citogenética se detectaron células leucémicas antes de la recaída clínica, mientras que en los casos 9 y 37 afectos de

leucemias agudas, LLA-T con una t(1;14) y LAM-M5 con una t(11;17) respectivamente, no se detectaron células residuales antes de la recaída clínica. Además, el paciente 43 afecto de LLA-B, incluido en el protocolo de seguimiento para quimerismo, también recayó sin que se detectaran previamente células residuales. En el paciente 9 sin embargo, después de dos meses, aplicando las técnicas citogenéticas y de pintado cromosómico se pudieron analizar más de 100 metafases, pero no permitieron detectar células residuales. Algunos autores, aplicando técnicas de citometría de flujo han sugerido que los falsos negativos podrían deberse a que las células leucémicas no se encuentran distribuidas de forma homogénea en la MO (Farahat et al, 1998). En los casos 37 y 43 (como ya se ha comentado en el apartado de 4.1.3), transcurrieron más de seis meses entre el último control y el momento de la recaída, dada la agresividad de la forma de las recaídas en las LAs, en pacientes de alto riesgo, el estudio de la EMR debería realizarse a intervalos de tiempo más cortos.

Si bien en el seguimiento post-quimioterapia se están estandarizando los protocolos con los intervalos de cuando se deben analizar las muestras, en el seguimiento de pacientes trasplantados no está establecido. En este sentido, es importante para determinar el valor pronóstico de la EMR en pacientes sometidos a un trasplante, que en futuros estudios se determinen los momentos exactos en los que se van a tomar las muestras con el fin de estandarizar protocolos de seguimiento post-trasplante. En resumen, la capacidad en la detección y el valor pronóstico de la detección de la EMR, depende de la sensibilidad de las técnicas que se utilizan, del tipo de enfermedad y además de la frecuencia de controles.

Utilizando técnicas como la citometría de flujo o técnicas más sensibles como la PCR cuantitativa, se ha observado que en leucemias agudas existe un elevado riesgo de recaída cuando el tamaño de la población neoplásica es superior a 10^{-3} . Cuando el valor es inferior la relación no es tan clara ya que se encuentran persistencia de células neoplásicas asociadas a largos periodos de remisión, independientemente del tipo de neoplasia y del marcador utilizado en la detección (Seale et al, 1996, Jacquy, et al 1997, Ciudad et al, 1998, van Dongen et al, 1998, Ciudad et al, 1999). Actualmente, se está encontrando correlación entre la detección de la EMR y la probabilidad de recaída en pacientes no trasplantados en la fase inicial del tratamiento de la enfermedad. Así, en pacientes con LMA tipo M3 mediante la detección del transcrito PML/RAR α por PCR se sabe que el 50% de los pacientes expresan el transcrito al final de la terapia de inducción, mientras que el 95% no lo expresan tras la terapia de consolidación. La detección del

reordenamiento PML/RAR α al final de la misma se asocia a riesgo elevado de recaída y a una corta supervivencia (Diverio et al, 1998, Burnett et al, 1999). Los mismos resultados se han encontrado para la detección de la presencia del reordenamiento AML1/ETO [t(8;21)] en pacientes con LMA tipo M2 (Tobal et al, 2000). En LLA, Jacquy et al, (1997) estudiaron 51 niños con LLA-B y detectaron los reordenamientos de las inmunoglobulinas por PCR cuantitativa, concluyeron que aquellos pacientes que presentaban presencia del reordenamiento al final del tratamiento de inducción y en niveles por encima de 10^{-3} presentaban mal pronóstico. Así mismo, Coustan-Smith et al (1998) publicaron una serie de 158 niños afectados de LLA en los que estudian la EMR mediante citometría de flujo, recogiendo las muestras al final de la inducción, al final de la consolidación y al final del tratamiento de mantenimiento, concluyeron que la detección de la EMR y su correlación con la probabilidad de recaída estaba asociada al momento en que eran examinadas las muestras. Observaron que la incidencia de la recaída en pacientes en los que se había detectado células residuales al final de la inducción era del 32% frente al 7% en aquellos que no se detectaban células residuales, y del 42% frente al 6% cuando la detección se realizaba en la semana 14 después de la consolidación. Estos autores observan pacientes que sin presentar células residuales recaen, al igual que en otras series utilizando la misma técnica (Farahat et al, 1998) o técnicas más sensibles como el estudio por PCR de las reorganizaciones de los genes de las inmunoglobulinas (Ito et al, 1993). Con todo ello Coustan-Smith et al (1998), sugieren que la no detección de células residuales al final del tratamiento, independientemente de la técnica que se utilice, no garantiza de modo absoluto remisiones duraderas.

El valor pronóstico de la detección de la EMR en pacientes trasplantados, está aún por determinar y depende del tipo de enfermedad que se estudie. En el seguimiento con técnicas muy sensibles, como la RT-PCR cuantitativa, aunque en la mayoría de estudios asocian la detección de la EMR con un mayor riesgo de recaída, también se observan casos con persistencia de EMR asociadas a remisiones duraderas (Jurlander et al 1996, Radich et al 1997, Cross, 1998). Jurlander et al (1996), estudiaron pacientes afectados de LMA tipo M2 sometidos a un trasplante alogénico, y observaron que la presencia del transcrito AML1/ETO no implicaba la recaída del paciente. En un estudio sobre el seguimiento de la EMR en una serie de pacientes afectados de LMC sometidos a un trasplante alogénico, mediante la detección del transcrito BCR-ABL por RT-PCR, Cross (1998) indicó que la mayoría de pacientes presentaban niveles de detección del transcrito durante largos periodos sin que la detección del transcrito se asociara a un mayor riesgo

de recaída; a su vez indica que la RT-PCR cuantitativa puede diferenciar entre aquellos pacientes que presentan niveles bajos del transcrito de aquellos que presentan un incremento seriado del mismo, indicando en éstos un riesgo mayor de recaída.

En pacientes sometidos a trasplante es importante no sólo la detección de la EMR sino la cuantificación de la misma. Por lo tanto se necesitan técnicas sensibles pero que a la vez permitan realizar un seguimiento cuantitativo, siendo esto último lo realmente predictivo de recaída, así en el estudio del quimerismo, sólo la detección de un incremento progresivo del número de células residuales es predictivo de recaída.

Aunque, actualmente en los protocolos de quimioterapia ya se están estableciendo diferentes pautas de actuación en función de sí se detecta o no la EMR al final de tratamiento de consolidación (por ejemplo en el protocolo PHETHEMA/LPA-96), en el seguimiento de pacientes trasplantados, la consecuencia terapéutica de la detección de la EMR es un reto para estudios futuros.

Los problemas futuros que se plantean en el seguimiento de la EMR en pacientes trasplantados se podrían resumir en las siguientes cuestiones:

- ¿ Se detectan células residuales después del trasplante?.

La eficacia de la técnica en la detección y el valor pronóstico de ésta parece estar en función del tipo de enfermedad y del marcador que se estudia.

- ¿Cuál es la técnica más fiable y reproducible para la detección de la EMR?.

Por un lado, con técnicas como la citogenética convencional o la FISH los falsos negativos, se deben a la baja sensibilidad de la técnica, y a que probablemente las células neoplásicas no se distribuyen de forma homogénea a través de la médula, a la variabilidad del inmunofenotipo de las células neoplásicas que también puede dar lugar a falsos negativos si se utiliza la citometría de flujo. Con técnicas más sensibles como la PCR el problema son los falsos positivos, o persistencia de células residuales cuyo valor pronóstico se desconoce. Generalmente son debidos a problemas de contaminación, a detectar una célula neoplásica en estado de apoptósis en la que la reorganización se amplifica hasta niveles detectables o a que realmente no basta sólo con la detección del marcador que se estudia para identificar la célula neoplásica para que realmente esto implique la recaída del paciente sino que se precise de un evento adicional para que se desencadene otra vez el proceso neoplásico (teoría de *múltiple steps*).

- ¿Influye el tamaño de la población neoplásica trasplantada en la probabilidad de recaída? Si es así ¿se debe cuantificar la población neoplásica en los productos a infundir e intentar erradicarla? ¿los sistemas de purgado son capaces de ello?
- ¿Tanto si se utilizan técnicas cualitativas como cuantitativas a partir de cuando se puede considerar que el paciente va a recaer?

Un reto futuro es establecer cuando la detección de la EMR se puede considerar un factor pronóstico real, a partir de que cantidad de células residuales se puede considerar que el paciente va a recaer en un periodo corto de tiempo.

- ¿ La detección de la EMR se puede producir con suficiente antelación como para poder actuar a nivel terapéutico?.

Para que el estudio sea realmente eficaz no se necesita que éste sea sólo predictivo de recaída, sino que la detección tenga lugar con tiempo suficiente para actuar, de forma que la recaída clínica no se produzca o al menos que el tamaño de la población neoplásica sea lo más reducido posible en el momento de la recaída.

- ¿ La detección de la EMR es lo suficientemente fiable como para actuar a nivel terapéutico ?.

Para ello es de especial interés realizar futuros estudios en los que se estandaricen las técnicas y los protocolos de seguimiento para determinar factores pronóstico que delimiten grupos de riesgo y permitan adoptar a tiempo nuevas opciones terapéuticas de las que puedan beneficiarse los pacientes.

4.3 CARIOTIPO Y EVOLUCIÓN POST- TRASPLANTE

4.3.1 ESTUDIO CITOGENÉTICO POST-TRASPLANTE

El análisis citogenético es indispensable en el estudio de las neoplasias hematológicas porque proporciona información diagnóstica valiosa y constituye el marcador pronóstico independiente más importante, que ha permitido establecer grupos de riesgo que pueden beneficiarse de tratamientos más adecuados.

En el momento actual, entre un 60% y un 80% de los pacientes con LMA primaria o de *novo* alcanzan la remisión completa (Löwenberg et al 1999). Una vez alcanzada la RC las recaídas son muy frecuentes, por lo que la proporción de pacientes en RC que se curan es minoritaria. Generalmente las terapias que se utilizan para el

mantenimiento de la remisión son la quimioterapia adicional o el TPH. En este grupo de pacientes es importante poder determinar grupos de riesgo que puedan beneficiarse del tratamiento más efectivo reduciendo al mínimo la toxicidad. En este sentido se ha planteado si el valor pronóstico de la citogenética al diagnóstico también puede actuar como factor pronóstico independiente en los tratamientos post-remisión. Actualmente en las LLA infantiles la presencia de una t(9;22) o de la reordenación del gen MLL condiciona a un grupo de pacientes que necesitan de un tratamiento post-remisión adicional, un TPH, para alcanzar remisiones duraderas. Así mismo en las LMA de buen pronóstico con t(8;21) o con alteraciones en 16q22, se está observando que presentan la misma evolución aquellos que reciben quimioterapia adicional que los que se someten a un TMO alogénico, tanto en la LMA infantil como en la del adulto, indicándose en estos pacientes el TPH sólo en segunda RC. Del mismo modo, en la LMA tipo M3 con la t(15;17) y fusión PML/RAR con los tratamientos actuales con antraciclinas y ácido trans-retinoico se obtienen resultados superiores a los obtenidos con el TPH (Wheatly et al 1999).

En el presente estudio, se ha observado que el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas detectadas al diagnóstico de la enfermedad, se mantiene al considerarlo después del TPH. Así, los pacientes que han presentado un cariotipo de buen pronóstico (hiperdiploidía en LLA, t(8;21), inv(16), t(9;11), y +21 en LMA) se encontraban en remisión al final del estudio. Los pacientes que han presentado un cariotipo de pronóstico intermedio (t(11;16), der(1), 14q11, cariotipo normal, y der(19)t(1;19) en LLA, +8, +4, y der(6)t(3;6) en LMA, del7q en SMD) han presentado una supervivencia más baja y los que han presentado un pronóstico desfavorable (cariotipos complejos, 11q23, Ph+, y monosomía 7) engloban a la mayoría de pacientes han recaído y/o fallecido. En este sentido es interesante realizar estudios con un mayor número de pacientes que permitan definir mejor el valor pronóstico de alteraciones que actualmente se consideran de pronóstico intermedio.

Se ha observado que en el grupo de pacientes con alteraciones en 11q23 la evolución ha sido diferente según fueran diagnosticados de LLA o LMA. Ocho pacientes han presentado alteraciones en 11q23, cuatro afectados de LLA con una t(4;11), y cuatro afectados de LMA, dos con una t(1;11), uno con una t(9;11) y uno con una t(11;17). Mientras que de los cuatro pacientes con LLA y t(4;11), sólo uno permanecía en remisión completa, recayendo dos y falleciendo dos, uno tras la recaída; de los cuatro pacientes afectados de LMA sólo ha recaído el paciente con la t(11;17) y los tres restantes

permanecieron en remisión hasta el final del estudio. Los ocho pacientes, tenían edades que oscilaban entre los tres meses y los siete años dentro de los pacientes afectados de LLA, y entre diez meses y cinco años en el grupo de pacientes afectados de LMA; todos ellos fueron trasplantados en primera RC, seis recibieron un TPH alogénico, de los que han recaído dos (uno afecto de LLA y otro de LMA) y dos un TPH autólogo ambos afectados de LLA de los que ha recaído uno. Aunque la serie es pequeña se evidencia la mala evolución de las alteraciones en 11q23 en las LLA, y una evolución no tan desfavorable en las LMA. Sin embargo, si consideramos todos los pacientes afectados de LLA y de LMA, se ha observado que han recaído tres afectados de LLA, dos con una t(4;11) y una con una t(1;14), y dentro de los pacientes afectados de LMA han recaído dos, uno con una t(11;17) y otro con t(3;6). Es decir en ambas enfermedades el grupo de pacientes que ha presentado una mayor proporción de recaídas ha sido aquel que al diagnóstico han presentado alteraciones en 11q23, indicando el mal pronóstico de ésta alteración en ambas patologías (Martínez-Climent et al, 1997, Raimondi et al, 1999, Pui et al, 2000).

Otro aspecto a considerar en la presente serie, es la mala evolución que han mostrado los pacientes con SMD. De los cinco pacientes diagnosticados de SMD, dos además con una AF, tres presentaban una monosomía 7, uno una delección en 7q y uno un cariotipo complejo. Todos recibieron un TPH alogénico en primera RC a excepción de uno con una monosomía 7 que lo recibió en segunda RC. Algunos autores asocian la presencia de la -7/del7q con un pronóstico intermedio e incluso sin impacto en la supervivencia (Luna-Fineman et al, 1999). En nuestro caso y aún siendo pacientes trasplantados, de los cuatro pacientes que han presentado -7/del 7q recayeron dos, los dos con una monosomía 7 y fallecieron dos, uno tras la recaída con una monosomía 7 y otro con una del 7q.

Por otro lado, en el estudio citogenético de pacientes trasplantados, está por definir el significado de la aparición de nuevas alteraciones clonales que se detectan sin la presencia de las alteraciones presentes al diagnóstico de la enfermedad. En nuestra serie dos de los 65 pacientes estudiados, han presentado alteraciones cromosómicas post-TPH sin que se haya observado recaída clínica. Uno afecto de LLA con un cariotipo desconocido al diagnóstico ha presentado una inv(3)(p12q29) (Tabla 3.17, pag 126) y otro afecto de una LMA M5 con una t(9;11) ha presentado una t(2;17)(q31;q23) (Tabla 3.18, pag 129). Ambos permanecían vivos y sin síntomas de enfermedad al final del estudio, después de dos años de recibir el trasplante. En un estudio realizado por Imrie et al (1998) encuentran nuevas alteraciones cromosómicas en siete de 62 pacientes afectados

de LMA sometidos a un TPH autólogo; todos ellos se encontraban bien después de 70 meses de detectar el clon anómalo, y sugieren que la detección de nuevas alteraciones cromosómicas post-TPH es frecuente, no parece asociarse al desarrollo de un SMD o una LMA secundaria y que probablemente se relacionen con el uso de ICT y altas dosis de quimioterapia.

4.3.2 VALOR PRONÓSTICO POST-TRASPLANTE DEL CARIOTIPO

Se ha intentado establecer la relación entre el cariotipo al diagnóstico y la evolución post-trasplante. Existen pocos trabajos publicados, todos referidos a pacientes con LMA trasplantados en primera remisión completa (Ferrant et al 1995, Gale et al 1995, Ferrant et al 1997). En este trabajo, por un lado se ha determinado si la evolución era diferente entre los pacientes que presentaban un cariotipo alterado y aquellos que presentaban un cariotipo normal o desconocido, independientemente del tipo de enfermedad y por otro lado la influencia del valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas en la evolución post-TPH.

Teniendo en cuenta el tipo de cariotipo observado, al año del trasplante se ha observado una clara diferencia entre los que presentaban un cariotipo alterado (SG 64% y SLE 68%) frente a los que tenían un cariotipo normal (SG y SLE del 100%) y los que tenían un cariotipo desconocido (SG 81% y SLE 91%), estas diferencias aunque no son significativas se mantienen a lo largo de todo el seguimiento (Tablas 3.23 y 3.24, pags 140 y 142). Sin embargo, si consideramos los pacientes que se han trasplantado en primera RC se ha observado que la diferencia entre los que han presentado un cariotipo normal y el resto de pacientes, aún y existiendo, disminuyen, la SG y la SLE ha sido del 100% para los pacientes con cariotipo normal, del 75% para los de cariotipo desconocido y del 76% para el grupo de pacientes con cariotipo alterado (Tabla 3.25, pag. 143).

Si consideramos sólo los pacientes que han recibido un TPH alogénico en primera RC, se ha observado una clara diferencia entre los que presentaron un cariotipo alterado con una SG del 72% y una SLE del 67% y el resto de pacientes, que han presentado una SG y una SLE del 75% para los de cariotipo desconocido y del 100% para los de cariotipo normal (Tabla 3.26 y 3.27, pags. 144 y 145). Al año del TPH, estas diferencias han aumentado y son significativas al considerar el conjunto de pacientes que han recibido un TPH alogénico, la SG ha sido del 56% para los que han presentado un cariotipo alterado, mientras que los que tenían un cariotipo normal han presentado una

SG del 100% y los que tenían un cariotipo desconocido del 91% (Tabla 3.26, pag. 144). La proporción de recaídas de los pacientes trasplantados en primera RC ha sido del 31% para los de cariotipo alterado y del 0% para el resto, diferencia que ha aumentado al considerar los que reciben un TPH alogénico en primera RC, del 38% para los que tenían un cariotipo alterado y del 0% para el resto.

En resumen, en la presente serie, dada la diferencia en la supervivencia y en la proporción de recaídas entre los que han presentado un cariotipo alterado y el resto, la presencia de un cariotipo alterado constituye un factor de mal pronóstico especialmente en aquellos pacientes que han recibido un TPH alogénico en primera RC .

Si consideramos el valor pronóstico de la alteración cromosómica, se ha observado que han presentado una mejor evolución el grupo de pacientes que han presentado un cariotipo de pronóstico favorable o intermedio. Considerando los pacientes trasplantados en primera RC, para el grupo de pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio la SG y la SLE ha sido del 90% y la PR del 0%, mientras que para los que han presentado un cariotipo de pronóstico desfavorable la SG ha sido del 69%, la SLE del 67% y la PR del 48,8%. Resultados similares se han observado en serie más amplias referidas sólo a LMA (Ferrant, et al 1995, 1997). Diferenciando entre el grupo de pacientes que se ha sometido a un TPH alogénico u autólogo se ha observado que mientras en los que han recibido un TPH alogénico no se han observado grandes diferencias según el pronóstico del cariotipo, en los que se han sometido a un TPH autólogo las diferencias son notables. Así en el grupo de pacientes que recibieron un TPH alogénico la SG ha sido del 59,8%, la SLE del 65,6% y la PR del 11% en el grupo de pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio, y del 51,8%, del 58,3% y del 31% respectivamente, para los de cariotipo con pronóstico desfavorable (Tabla 3.30 y 3.32, pags. 152 y 156). En los pacientes que se han sometido a un TPH autólogo existen mayores diferencias y si son significativas, la SG, ha sido del 100% y la PR del 0% para los pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio, y del 33% y el 75% respectivamente, para los de pronóstico desfavorable (Tabla 3.31 y 3.32, pags. 152 y 156).

Estos resultados indican que en el grupo de pacientes con cariotipo de mal pronóstico la indicación de un TPH autólogo no ha resultado en una mejora en la supervivencia de estos pacientes, que quizás podrían beneficiarse de un TPH alogénico no emparentado. Sin embargo en el grupo de pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio se han obtenido mejores resultados en el grupo de pacientes que

han recibido un TPH autólogo, ya que no ha recaído ninguno y la mortalidad relacionada con el trasplante ha sido nula.

En la serie de Ferrant et al, (1997) en la que se incluyen 999 pacientes afectados de LMA trasplantados en primera RC, consideran grupo de buen pronóstico aquellos que han presentado un cariotipo con la t(8;21) o alteraciones en 16q22, de pronóstico desfavorable los que han presentado alteraciones en 11q23, alteraciones o monosomías de los cromosomas 5 y 7 ó cariotipos hipodiploides, y de riesgo intermedio el resto de anomalías cromosómicas incluyendo la t(15;17). Coincidiendo con nuestros resultados, observan que en ambos grupos, el grupo de pacientes con cariotipo de mal pronóstico ha presentado una supervivencia menor y una tasa de recaídas mayor que el resto de pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio. Encuentran que en TPH alogénicos el grupo con cariotipo de mal pronóstico ha presentado una SG del 32%, una SLE del 29% y una tasa de recaídas del 61% y los de buen pronóstico una SG del 68%, una SLE del 67% y una tasa de recaídas del 1%. En TPH autólogos, observan que el grupo de pacientes de mal pronóstico ha presentado una SG del 33%, una SLE del 21% y una del 77%, y los de riesgo intermedio (en TPH autólogos en el grupo de riesgo intermedio, al igual que nosotros han englobado, a los pacientes con cariotipo de pronóstico favorable e intermedio), una SG del 54%, una SLE del 48% y una tasa de recaída del 46%. Por lo tanto en esta serie para el grupo de pacientes con cariotipo de mal pronóstico los resultados son muy parecidos tanto en TPH alogénicos como en TPH autólogos, aunque en estos últimos la tasa de recaída es mayor, mientras que en el grupo de pacientes que reciben un TPH alogénico se obtienen mejores resultados.

En resumen los resultados obtenidos en la presente serie indican que el cariotipo al diagnóstico mantiene su valor pronóstico en la evolución post-trasplante. No obstante, es necesario realizar estudios prospectivos, aleatorizados y estratificados por tipos de enfermedad y de TPH, que incluyan un mayor número de pacientes, para poder establecer grupos de riesgo que puedan beneficiarse de uno u otro tipo de trasplante.

V. CONCLUSIONES

QUIMERISMO

1. En un estudio control, mediante la técnica de FISH con la sonda dual X/Y, se ha establecido un valor umbral del 1%, para considerar detección de células del paciente.
2. Se ha obtenido resultado en el 100% de las muestras analizadas mediante la técnica de FISH y en el 88% de las muestras analizadas mediante citogenética.
3. Se han detectado células del paciente en el 42% de los casos mediante la técnica de FISH y en el 16% mediante citogenética. De ellos, 20 pacientes han presentado un QC y 18 un QM. De los 18, dos presentaron una RA, seis un QMt que evolucionó hacia un QC y 10 un QM estable, de los cuales seis mostraron un aumento de células del paciente que provocó la recaída clínica en tres; en uno de ellos se detectó el aumento de las células residuales antes de la recaída clínica.
4. Se ha observado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de QM y el sexo del paciente (el 80% con QM eran niñas, y el 69% con QC eran niños) y el régimen de acondicionamiento (el 60% con QM habían recibido únicamente quimioterapia mientras que el 80% con QC habían recibido quimioterapia e ICT). No se han observado diferencias significativas en relación a la edad del paciente, el tipo de enfermedad, la situación de la enfermedad al trasplante, el tipo de donante utilizado y la profilaxis contra la EICH utilizada.
5. En relación a la evolución post-TPH de los pacientes, la presencia de un QM ha indicado una mediana de supervivencia más alta (44 meses vs 30 meses), un mayor riesgo de fallo de implante (10% vs 4%), un mayor riesgo de recaída (30% vs 0%), una menor incidencia de la EICH aguda de grado II (30% vs 46%), una menor incidencia de EICH crónica (12% vs 33%), un menor riesgo de muerte por causas relacionadas con el TPH (0% vs 19%), y aunque la SG ha sido la misma para ambos grupos (65%) una menor SLE (51% vs 75%), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

EMR

6. El estudio citogenético ha permitido realizar el seguimiento de la EMR en el 90% de los casos. En el 77,5% de las muestras estudiadas se han analizado más de 20 metafases y en 41% más de 50.

7. En el estudio control de la reorganización BCR/ABL mediante FISH, para considerar presencia de la reorganización, se ha establecido un valor umbral del 6% de núcleos con la fusión.

8. Se ha detectado el cariotipo observado al diagnóstico en el 26% (10/38) de los pacientes. De ellos, en el 70% además de las alteraciones cromosómicas detectadas al diagnóstico se han observado alteraciones adicionales, indicativas de la evolución de la enfermedad. Los cromosomas implicados con más frecuencia han sido el 5, el 7, el 13 y el 17.

9. De los 10 pacientes que han presentado la EMR, en ocho la detección coincidió con la recaída clínica y en dos la detección se realizó antes de la recaída.

CARIOTIPO Y EVOLUCION POST-TRASPLANTE

10. Las alteraciones cromosómicas detectadas al diagnóstico de la enfermedad, han mantenido su valor pronóstico después del TPH. Los pacientes con cariotipo de buen pronóstico permanecían en remisión al final del estudio. Los pacientes con cariotipo de pronóstico intermedio han presentado una supervivencia inferior. Y los pacientes con cariotipo de pronóstico desfavorable la mayoría han recaído y/o fallecido.

11. Se ha observado la evidencia de una peor evolución de las alteraciones en 11q23 en las LLA (han fallecido 2/4), y una evolución no tan desfavorable en las LMA (no ha fallecido ninguno de 4). Sin embargo, en ambas enfermedades el grupo de pacientes que ha presentado una mayor proporción de recaídas presentaban alteraciones en 11q23, indicando el mal pronóstico de ésta alteración en ambas patologías.

12. En dos pacientes, se han detectado alteraciones cromosómicas post-TPH, en apariencia no relacionadas con la enfermedad ya que los pacientes no han recaído; posiblemente se podrían relacionar con la utilización de ICT y dosis altas de quimioterapia.

13. En la presente serie, la presencia de un cariotipo alterado ha constituido un factor de mal pronóstico, teniendo en cuenta que la SG, la SLE y la PR ha sido del 64%, 68% y 31% respectivamente, en el grupo de pacientes con cariotipo alterado, del 100%, 100% y 0% respectivamente, en el grupo de pacientes con cariotipo normal y del 81%, 91% y 0%, respectivamente, en el grupo de pacientes con cariotipo desconocido. Las diferencias no han sido estadísticamente significativas.

14. En la presente serie, el valor pronóstico del cariotipo se ha mantenido post-TPH, teniendo en cuenta que la SG, la SLE y la PR ha sido del 69%, 67% y 48% respectivamente, en el grupo de pacientes con cariotipo de pronóstico desfavorable, y del 90%, 90% y 0% respectivamente, en el grupo de pacientes con cariotipo de pronóstico favorable o intermedio. Las diferencias no han sido estadísticamente significativas.

15. En la presente serie, la indicación de un TPH autólogo en el grupo de pacientes con cariotipo de mal pronóstico, no ha resultado en una mejora en la supervivencia de estos, que quizás podrían beneficiarse de un TPH alogénico no emparentado; ya que la SG y la PR ha sido del 51,8% y del 31%, respectivamente para los pacientes que recibieron un TPH alogénico y del 33% y del 75% respectivamente, para los pacientes que recibieron un TPH autólogo, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

-
- **Amiel A**, Yarkoni S, Slavin S, Or R, Lorberboum-Galski H, Feigin M, Nagler A (1994). Detection of minimal residual disease state in chronic myelogenous leukemia patients using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 76:59-64
 - **Anderson JE**, Appelbaum FR, Fisher LD, Schoch G, Shulman H, Anasetti C, Bensinger WI, Bryant E, Buckner CD, Doney K (1993). Allogeneic bone marrow transplantation for 93 patients with myelodysplastic syndrome. Pretreatment variables and outcome. *Blood*, 82:677-681
 - **Badell I**, Ortega JJ, Muñoz A et al (1996). Trasplante alogénico de médula ósea versus autotrasplante en la leucemia aguda linfoblástica en segunda remisión en 112 niños . Resultados del Grupo Español de Trasplante de Médula Ósea en Niños (GETMON). *Sangre*, 41:101-108
 - **Badell I** (1997). Trasplante de progenitores hematopoyéticos en las leucemias agudas linfoblásticas. *Haematologica*, 82(suppl 1):81-88
 - **Bader P**, Hölle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J (1997). Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant*, 19:697-702
 - **Bader P**, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingebiel T (1998). Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*, 21:487-495
 - **Balduzzi A** Gooley T, Anasetti C, Sanders JE, Martin PJ, Petersdorf EW, Appelbaum FR, Buckner CD, Matthews D, Storb R (1995). Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood*, 86:3247-3256
 - **Bär BMAM**, Schatenberg A, Van Dijk BA, de Man AJM, Kunst VAJM, de Witte T (1989). Host and donor erythrocyte repopulation patterns after allogeneic bone marrow transplantation analysed with antibody fluorescent micro spheres. *Br J Haematol*, 72:239-245
 - **Baro J**, Richard C, Sierra J, Garcia-Conde J, Garcia Larana J, Rocha E, Solano C, Caballero D, Carrera D, Leon A (1992). Autologous bone marrow transplantation in 22 adult patients with lymphoblastic lymphoma responsive to conventional dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant*, 10:33-38
 - **Barrett AJ**, Horowitz MM, Pollock BH, Zhang MJ, Bortin MM, Buchanan GR, Camitta BM, Ochs J, Graham-Pole J, Rowlings PA (1994). Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *N Engl J Med*, 331:1253-1258
 - **Barta A**, Batai A, Kelemen E, Lengyel L, Remenyi P, Sipos A, Torbagyi E, Avalos M, Fekete E, Foldi J, Paldi-Haris P, Tamaska J, Gyodi E, Rajczy K, Hoffer I, Jakab J, Petranyi GG, Paloczi K (2000). Immunological importance of chimerism in transplantation: new conditioning protocol in BMT and the development of chimeric state. *Hum Immunol*, 61:101-110

-
- **Beatty PG**, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Storb R (1985). Marrow transplantation for related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med*, 313:765-771
 - **Bedi A**, Zehnbauser BA, Collector MI, Barber JP, Zicha MS, Sharkis SJ, Jones RJ (1993). BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 81:2898-2902
 - **Bennett JM**, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1982). Proposals for the classifications of the Myelodysplastic Syndromes. *Br J Haematol*, 51:189-199
 - **Berenson RJ**, Andrews RG, Besinger WI, Kalamasz D, Knitter G (1988). Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiate baboons. *J Clin Invest*, 81:951-955
 - **Bernasconi P**, Cavigliano PM, Genini E, Alessandrino EP, Colombo A, Klersy C, Malcovatti L, Biaggi G, Martinelli G, Calatroni S, Caresana M, Boni M, Astoti C, Bernasconi C (1997). Assessment of chimerism in sex-mismatched allogeneic bone marrow transplants (allo-BMT) by in situ hybridization and cytogenetics. Is host cell percentage predictive of relapse ? *Leukemia*, 8:1989-1990
 - **Bertheas MF**, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D (1991). Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood*, 78:3103-3106
 - **Billingham RE** (1966). The biology of graft-versus-host reactions. In: *The Harvey Lectures*. Ed by Academic Press, New York, 62:21-78
 - **Blazar BR**, Orr HT, Arthur DC, Kersey JH, Filipovitch AH (1985). Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 66:1437-1444
 - **Bonetti F**, Pession A, Messina C, Porta F, Carella M, Miniero R, Dini G, Faure C, Zecca M, Prete A, Giorgani G, Locatelli F for the AIEOP-BMT Group (1997). Total body irradiation and melphalan as conditioning regimen in autologous BMT for childhood acute myelogenous leukaemia in 1st remission. *Bone Marrow Transplant*, 19(suppl 1):4 (abstract)
 - **Bonini C**, Verzeletti S, Servida P, Rossini S, Traversari C, Ferrari G, Nobili N, Mavilio F, Bordignon C (1994). Transfer of the HSV-TK gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo immunomodulation after allo-BMT. *Blood*, 84(suppl 1):427 (abstract)
 - **Bortin MM**, Horowitz MM, Rowlings PA, Rimm AA, Sobocinski KA, Zhang MJ, Gale RP (1993). 1993 progress report from the International Bone Marrow Transplant Registry. Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant*, 12:97-104
 - **Bortin MM**, Bach FH, van Bakkum DN, Good RA, van Rood JJ (1994). 25th Anniversary of the first successful allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*, 14:211-212
 - **Bourhis JH**, Jagiello CA, Black P, O'Reilly R, Gerritsen WR (1991). Mixed chimerism is unfavourably determining the outcome of an allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 78:886 (abstract)

-
- **Brochstein JA**, Kernan NA, Groshen S, Cirrincione C, Shank B, Emanuel D, Laver J, O'Reilly RJ (1987). Allogeneic bone marrow transplantation after hyperfractionated total-body irradiation and cyclophosphamide in children with acute leukaemia. *N Engl J Med*, 317:1618-1624

 - Bureo E, Ortega JJ, Muñoz A (1995). Bone marrow transplantation in 46 pediatric patients with non Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*, 15:353-355

 - **Burnett AK**, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone A (1999). Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood*, 93:4131-4143

 - **Butturini A**, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD (1994). Hematologic abnormalities in Fanconi Anemia: An international Fanconi Anemia registry study. *Blood*, 84:1650-1655

 - **Campana D**, Coustan-Smith E, Janossy G (1990). The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, 76:163-170

 - **Campana D**, Pui CH (1995). Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*, 85:1416-1434

 - **Carreras E**, Bertz H, Arcese W, Vernant JP, Tomas JF, Hagglund H, Bandini G, Esperou H, Russell J, de la Rubia J, Di Girolamo G, Demuynck H, Hartmann O, Clausen J, Ruutu T, Leblond V, Iriando A, Bosi A, Ben-Bassat I, Koza V, Gratwohl A, Apperley JF (1998). Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European group for blood and marrow transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. *Blood*, 92:3599-3604

 - **Casper J**, Camitta B, Truitt R, Baxter-Lowe LA, Bunin N, Lawton C, Murray K, Hunter J, Pietryga D, Garbrecht F (1995). Unrelated bone marrow transplants for children with leukaemia or myelodysplasia. *Bone Marrow Transplant*, 85:2354-2363

 - **Champlin RE**, Gale RP (1984). Early complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol*, 21:101-104

 - **Chang M**, Raimondi SC, Ravindranath Y, Carroll AJ, Camitta B, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein H (2000). Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukaemia (excluding children with Down syndrome and acute promyelocytic leukaemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821. *Leukemia*, 14:1201-1207

 - **Chessells JM**, Bailey CC, Richards S (on behalf of the Medical Research Council Working Party on Childhood Leukemia) (1992). MRC UKALL X: the UK protocol for childhood ALL:1985-1990. *Leukemia*, 6(suppl 2):157-161

 - **Childs R**, Epperson D, Bahceci E, Clave E, Barrett J (1999). Molecular remission of chronic myeloid leukaemia following a non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplant: in vivo and in vitro evidence for a graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol*, 107:396-400

 - **Choi SJ**, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, Kim SH, Park CJ, Chi HS, Kim WK (2000). Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after

allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant*, 26:327-332

- **Cimino G**, Rapanotti MC, Sprovieri T, Elia L (1998). ALL1 gene alteration in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica*, 83:350-357

- **Ciudad J**, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Garcia Marcos MA, Gonzalez M, Vazquez L, del Canizo MC, Lopez A, Van Dongen JJ, Orfao A (1999). Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool predict relapse in precursor-B-ALL. *Br J Haematol*, 104:695-705

- **Ciudad J**, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, Mateos G, Caballero MD, Hernandez J, Moro MJ, Mateos MV, Orfao A (1998). Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 16:3774-3781

- **Civin CI**, Gore SD (1993). Antigenic analysis of hematopoiesis: A Review. *Journal of Hematotherapy*, 2:137-144

- **Clavell LA**, Gelber RD, Cohen HJ, Hitchcock-Bryan S, Cassady JR, Tarbell NJ, Blattner SR, Tantravahi R, Leavitt P, Sallan SE (1986). Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med*, 315:657-663

- **Claxton D**, Deisseroth A, Talpaz M, Reading C, Kantarjian H, Trujillo J, Stass S, Gooch G, Spitzer G (1992). Polyclonal hematopoiesis in interferon-induced cytogenetic remissions of chronic myelogenous leukaemia. *Blood*, 79:997-1002

- **Coustan-Smith E**, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D (1998). Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 351:550-554

- **Creutzig U**, Ritter J, Zimmerman M (1995). High lights of BFM schedule in childhood AML. *Med Ped Oncol*, 25:271(abstract)

- **Crist W**, Shuster J, Look T, Borowitz M, Behm F, Bowman P, Frankel L, Pullen J, Krance R, Steuber P, et al (1992). Current results of studies of immunophenotype-, age-, and leukocyte-based therapy for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 6(suppl 2):162-166

- **Cross NC** (1998). Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Hematol Cell Ther*, 40:224-228

- **Cuneo A**, Bigoni R, Roberti MG, Bardi A, Balsamo R, Piva N, Castoldi G (1997). Detection of numerical aberrations in hematologic neoplasias by fluorescence in situ hybridization. *Haematologica*, 82:85-90

- **Dewald GW**, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RO, Zinsmeister AR, Jalal SM, Spurbeck JL, Silver RT (1998). Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double bcr/abl fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 91:3357-3365

- **Diez-Martin JL**, Llamas P, Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Polo N, de la Fuente MS, Buno I (1998). Conventional cytogenetics and FISH evaluation of chimerism after sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) and donor leukocyte infusion (DLI). *Haematologica*, 83:408-415

- **Dini G**, Boni L, Abela O, Uderzo C, Polchi P, Locatelli F, Di Bartolomeo P, Arcese W, Iori AP, Rossetti F (1994). Allogeneic bone marrow transplantation in children with acute myelogenous

leukemia in first remission. Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP) and the Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Bone Marrow Transplant*, 13:771-776

- **Dinndorf P**, Bunin N (1995). Bone marrow transplantation for children with acute myelogenous leukaemia. *J Pediatr Hemat/Oncol*, 17:211-224

- **Diverio D**, Pandolfi PP, Rossi V, Biondi A, Pelicci PG, Lo Coco F (1994). Monitoring of treatment outcome in acute promyelocytic leukemia by RT-PCR. *Leukemia*, 8:1105-1107

- **Diverio D**, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, Saglio G, Martinelli G, Petti MC, Santoro A, Pelicci PG, Mandelli F, Biondi A, Lo Coco FL (1998). Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. *GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. Blood*, 92:784-789

- **Dopfer R**, Henze G, Bender-Gotze C, Ebell W, Ehninger G, Friedrich W, Gadner H, Klingebiel T, Peters C, Riehm H, Suttorp M, Schmid H, Schmitz N, Siegert W, Stollmann-Gibbels B, Hartmann R, Niethammer D (1991). Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to the BFM-and CoALL-protocols: Results of the German cooperative study. *Blood*, 78:2780-2784

- **El-Rifai W**, Ruutu T, Vettenranta K, Elonen E, Saarinen UM, Volin L, Knuutila S (1997). Follow-up of residual disease using metaphase-FISH in patients with acute lymphoblastic leukaemia in remission. *Leukemia*, 11:633-638

- **Engel H**, Goodacre A, Keyhani A, Jiang S, Van NT, Kimmel M, Sanchez-Williams G, Andreeff M (1997). Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes: a follow-up of patients in clinical remission. *Br J Haematol*, 99:64-75

- **Engelhard D** (1998). Bacterial and fungal infections in children undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 21(Suppl 2):S78-S80

- **Evans PA**, Short MA, Jack AS, Norfolk DR, Child JA, Shiach CR, Davies F, Tobal K, Liu Yin JA, Morgan GJ (1997). Detection and quantification of the CBFβ/MYH11 transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 11:364-369

- **Farahat N**, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Pinkerton CR, Treleaven JG, Matutes E, Powles RL, Catovsky D (1998). Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol*, 101:158-164

- **Feig SA**, Lampkin B, Nesbit ME, Woods WG, Versteeg CM, Buckley JD, Kim T, Hammond GD (1993). Outcome of BMT during first complete remission of AML: a comparison of two sequential studies by the Childrens Cancer Group. *Bone Marrow Transplant*, 12:65-71

- **Ferrant A**, Doyen C, Delannoy A, Straetmans N, Martiat P, Mineur P, Bosly A, Van den Berghe H, Michaux JL (1995). Karyotype in acute myeloblastic leukemia: prognostic significance in a prospective study assessing bone marrow transplantation in first remission. *Bone Marrow Transplant*, 15:685-690

-
- **Ferrant A**, Labopin M, Frassoni F, Prentice HG, Cahn JY, Blaise D, Reiffers J, Visani G, Sanz MA, Boogaerts MA, Lowenberg B, Gorin NC (1997). Karyotype in acute myeloblastic leukemia: prognostic significance for bone marrow transplantation in first remission: a European Group for Blood and Marrow Transplantation study. Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*, 90:2931-2938
 - **Fisher RI**, Gaynor ER, Dahlberg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA Jr, Miller TP (1993). Comparison of standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimen for advanced non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med*, 328:1002-1006
 - **Ford CE**, Hamerton JL, Garnes DWH, Loutit JF (1956). Cytological identification of radiation chimaeras. *Nature*, 177:452-454
 - **Forés R**, Díez-martín JL, Briz M, Regidor C, Sanjuán I, Cabrera R, Fernández MN (1996). Donor leukocyte infusions for treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 17:439-441
 - **Frassoni F**, Strada P, Sessarego M, Miceli S, Corvò R, Scarpati D, Vitale V, Piaggio G, Raffo MR, Sogno G, Figari O, Bacigalupo A, M Clavio, Gualandi F, Soldá A, Marmont A, Realy G (1990). Mixed chimerism after allogeneic marrow transplantation for leukaemia: correlation with dose of total body irradiation and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*, 5:235-240
 - **Freireich EJ**, Cork A, Stass SA, McCredie KB, Keating MJ, Estey EH, Kantarjian HM, Trujillo JM (1992). Cytogenetics for detection of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*, 6:500-506
 - **Gadner H**, Haas OA (1992). Experience in pediatric myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, 6:655-772
 - **Gale RP**, Armitage JO, Dicke KA (1991). Autotransplants: Now and in the future. *Bone Marrow Transplant*, 7:153-157
 - **Gale RP**, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JA, Bortin MM (1994). Identical-twin bone marrow transplants for leukaemia. *Ann Intern Med*, 120:646-652
 - **Gale RP**, Horowitz MM, Weiner RS, Ash RC, Atkinson K, Babu R, Dicke KA, Klein JP, Lowenberg B, Reiffers J, Rimm AA, Rowlings PA, Sandberg AA, Sobocinski KA, Veum-Stone J, Bortin MM (1995). Impact of cytogenetic abnormalities on outcome of bone marrow transplants in acute myelogenous leukaemia in first remission. *Bone Marrow Transplant*, 16: 203-208
 - **García J**, Tugues D, Miralles A (1993). Clinical and biological aspects of umbilical cord blood for progenitors cells transplant in human. ISH-94 meeting. Cancún, Septiembre1993, pp239(abstract)
 - **Gatti RA**, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA (1968). Immunological reconstitution of linked lymphopenic immunologic deficiency. *Lancet*, 2:1366-1369
 - **Giralt SA**, Champlin RE (1994). Leukaemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 84:3603-3612
 - **Giralt SA**, Hester J, Huh Y (1994). CD8 + lymphocytes are not essential for graft vs leukaemia in chronic myelogenous leukaemia. *Exp Hematol*, 22:697(abstract)

- **Gluckman E**, Devergie A, Bourdeau-Esperou H, Thierry D, Traineau R, Auerbach A, Broxmeyer HE (1990). Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol*, 32:423-425

- **Gluckman E**, Auerbach AD, Horowitz M (1995). BM transplantation for Fanconi anemia. *Blood*, 86:2856-2862

- **Goldman JM**, Szydlo R, Horowitz MM, Gale RP, Ash RC, Atkinson K, Dicke KA, Gluckman E, Herzig RH, Marmont A, Masaoka T, McGlave PB, Messner H, O'Reilly RJ, Reiffers J, Rimm AA, Speck B, Veum-Stone JA, Wingard JR, Zwaan FE, Bortin MM (1993). For the advisory committee of the IBMTR. Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukaemia in chronic phase. *Blood*, 82:2235-2238

- **Greaves M** (1997). Silence of the leukemic clone. *N Engl J Med*, 336:317-323

- **Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique** (1997). Forty-four cases of childhood myelodysplasia with cytogenetics, documented by the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Leukemia*, 11:1478-1485

- **Guglielmelli T**, Giugliano E, Scaravaglio P, Audisio E, D'Ardia S, Marmont F, Saglio G, Rege-Cambrin G (1999). Detection of residual leukaemic cells in PBSC from patients with AML and trisomy 8 predicts early relapse after autologous transplantation. *Haematologica* 84(EHA-4 abstract book):63 (abstract)

- **Guilhot F**, Chastang C, Guerci A et al for the French CML study Group (1995). Interferon alpha eb (IFN) and cytarabine (Ara-C) increase survival and cytogenetic response in chronic myelogenous leukaemia (CML). *Blood*, 88 (Suppl 1):141 (abstract)

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

- **Hann IM** (1992). Myelodysplastic syndrome. *Arch Dis Child*, 67:962-966

- **Hart JS**, Trujillo JM, Freireich EJ, George SL, Frei E (1971). Cytogenetic studies and their clinical correlates in adults with acute leukemia. *Ann Intern Med*, 75:353-360

- **Hathaway WE**, Githens JH, Blackburn WR, Fulginiti V, Kempe CH (1965). Aplastic anemia, hystiocytosis and erythrodermia in immunologically deficient children: probable human runt disease. *N Engl J Med*, 273:953-958

- **Herrera C**, Martín C, García-Castellano JM, Román J, Álvarez MA, Flores R, García MJ, de la Torre MJ, Sánchez J, Martínez F, Gómez P, Torres A (1995). Prevention of GVHD by selective CD4+ T-cell depletion plus adjustment of the CD8+ cell content in donor bone marrow. *Blood*, 86(Suppl 1):571 (abstract)

- **Hill RS**, Petersen FB, Storb R, Appelbaum FR, Doney K, Dahlberg S, Ramberg R, Thomas ED (1986). Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*, 67:811-816

-
- **Hochhaus A** Lin F, Reiter A, Skladny H, Mason PJ, van Rhee F, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC (1996). Quantification of residual disease in CML patients on interferon- α therapy by competitive PCR. *Blood*, 87:1549-1555
 - **Hoyle C**, Gray R, Goldman J (1994). Autografting for patients with CML in chronic phase: an update. *Br J Haematol*, 86:76-81
 - **Huss R**, Deeg HJ, Gooley T, Bryant E, Leisenring W, Clift R, Buckner CD, Martin P, Storb R, Appelbaum FR (1996). Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 18:767-776
 - **Imrie KR**, Dube I, Prince HM, Girouard C, Crump M, Keating A (1998). New clonal karyotypic abnormalities acquired following autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia do not appear to confer an adverse prognosis. *Bone Marrow Transplant*, 21:395-399
 - **Iriondo A**, García-Conde J, Domingo A (1994). Bone marrow transplantation in Hodgkin's disease: When should it be considered?. *Hematol Reviews*, 8:313-321
 - **Irving JA**, Lennard A, Storey N, Conn J, Dunn J, Oliver K, Proctor SJ, Dickinson AM (1999). Analysis of CD34 populations in mobilised peripheral blood stem cell harvests and in bone marrow by fluorescent in situ hybridisation for the bcr/abl gene fusion in patients with chronic granulocytic leukaemia. *Leukemia*, 13:944-949
 - **ISCN 1991**. Mitelman F (ed). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger: Basel.
 - **ISCN 1995**. Mitelman F (ed). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger: Basel.
 - **Jacqy C**, Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermynen C, Cornu G, Martiat P (1997). A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol*, 98:140-146
 - **Jurlander J**, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR, Hoffmann L, Ball ED, Frei-Lahr DA, Christiansen NP, Block AM, Knuutila S, Herzig GP, Bloomfield CD (1996). Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood*, 88:2183-2191
 - **Kasprzy A**, Secker-Walker LM (1997). Increased sensitivity of minimal residual disease detection by interphase FISH in acute lymphoblastic leukaemia with hyperdiploidy. *Leukemia*, 11:429-435
 - **Khwaja A**, Goldstone AH, Linch DC (1995). Delayed neutrophil recovery after BEAM chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for lymphoma is not associated with increased mortality from infection. *Bone Marrow Transplant*, 15:313-315
 - **Klingebiel T**, Schlegel PG (1998). GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant*, 21(Suppl 2):S45-S49
 - **Kloke O**, Niederle N, Qiu JY, Wandl U, Moritz T, Nagel-Hiemke M, Häwig I, Opalka B, Seeber S, Becher R (1993). Impact of interferon alpha-induced cytogenetic improvement on survival in chronic myelogenous leukaemia. *Br J haematol*, 83:399-403

- **Kolb HJ**, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W (1990). Donor leukocyte infusions for chronic myelogenous leukaemia in marrow transplant patients. *Blood*, 76:2462-2465
- **Kolb HJ**, Mittermuller J, Hertenstein H, Schumm M, Holler E, de Witte T, Gunther W, Ljungman P, Goldman JM (1993). Adoptive immunotherapy in human and canine chimeras. The role of interferon alfa. *Semin Hematol*, 30(Suppl 3):37-39
- **Kolb HJ**, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H for the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia (1995). Graft-vs-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, 86:2041-2050
- **Kurzrock R**, Gutterman J U, Talpaz M (1988). The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New Engl J Med*, 319:990-998

- **Kusec R**, Laczika K, Knobl P, Friedl J, Greinix H, Kahls P, Linkesch W, Schwarzinger I, Mitterbauer G, Purtscher B, et al (1994). AML1/ETO transcripts can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia*, 8:735-739
- **Ladenstein R**, Hartman O, Pinkerton CR (1993). The role of megatherapy with autologous bone marrow rescue in solid tumors in childhood. *Annals of Oncology*, 4(Suppl 1):545-558
- **Lavabre-Bertrand T**, Janossy G, Ivory K, Peters R, Secker-Walker L, Porwit-MacDonald A (1994). Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry: CD10 expression. *Cytometry*, 18:209-217
- **Lawler SD**, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR (1984). Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol*, 56:431- 443
- **Lawler M**, Humphires P, McCann S (1991). Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood*, 77:2504-2514
- **Lie SO** (1995). Treatment of acute myeloid leukemia in children. *Baillière's Clin Paediatrics*, 3:757-777
- **Lion T** (1996). Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia: Methodological approaches and clinical aspects. *Leukemia*, 10:896-906
- **Ljungman P** (1998). Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 21(Suppl 2):S72-S74
- **Locatelli F**, Niemeyer C, Angelucci E, Bender-Gotze C, Burdach S, Ebell W, Friedrich W, Hasle H, Hermann J, Jacobsen N, Klingebiel T, Kremens B, Mann G, Pession A, Peters C, Schmid HJ, Stary J, Suttorp M, Uderzo C, van't Veer-Korthof ET, Vossen J, Zecca M, Zimmermann M (1997). Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for chronic myelomonocytic leukaemia

(CMML) in childhood: a report from the European Working Group on myelodysplastic syndrome in childhood (EWOG-MDS). *J Clin Oncol*, 15: 566-573

- **Löwenberg B** Downing JR, Burnett A (1999). Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341:1051-1062

- **Luna-Fineman S** Shannon KM, Atwater SK, Davis J, Masterson M, Ortega JJ, Sanders J, Steinherz P, Weinberg V, Lange BJ (1999). Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. *Blood*, 93:459-66

- **Mackinnon S** (1995). Adoptive immunotherapy using escalating doses of donor leukocytes for relapsed CML following allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*, 15 (Suppl 2):S4 (abstract)

- **Marmont AM**, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA, Herzig RH, Hong R, Masooka T, Rimm AA, Ringden O, Speck b, Weiner RS, Bortin MM (1991). T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukaemia. *Blood*, 78:2120-2130

- **Martinez-Climent JA** (1997). Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia*, 11:1999-2021

- **Matsuzaki N**, Saji F, Okada T, Sawai K, Kameda T, Tanaka T, Negoro S, Tanizawa O (1989). Demonstration of functional immaturity of signal transduction pathways in human T cells. *Cell Immunol*, 124:252-263

- **Matthes-Martin SW**, Aberle SW, Peters C (1998). CMV-viraemia during allogeneic bone marrow transplantation in paediatric patients: association with survival and graft-versus- host disease. *Bone Marrow Transplant*, 21(Suppl 2):S53-S56

- **Meloni G** Diverio D, Vignetti M, Avvisati G, Capria S, Petti MC, Mandelli F, Lo Coco F (1997). Autologous bone marrow transplantation for acute promyelocytic leukemia in second remission: prognostic relevance of pretransplant minimal residual disease assessment by reverse-transcription polymerase chain reaction of the PML/RAR alpha fusion gene. *Blood*, 90:1321-1325

- **Meyskens FL Jr**, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Balcerzak SP, Samlowski W, Hynes H (1995). Effects of vitamin A on survival in patients with chronic myelogenous leukaemia: a SWOG randomised trial. *Leukemia Research*, 19:605-612

- **Michel G**, Leverger G, Leblanc T, Nelken B, Baruchel A, Landman-Parker J, Thuret I, Bergeron C, Bordigoni P, Esperou-Bourdeau H, Perel Y, Vannier JP, Schaison G (1996). Allogeneic bone marrow transplantation vs aggressive post-remission chemotherapy for children with acute myeloid leukaemia on first complete remission. A prospective study from the French Society of Pediatric Hematology and Immunology (SHIP). *Bone Marrow Transplant*, 17:191-196

- **Mitelman F**, Heim S (1995). Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. Second Edition. A J Wiley & sons, INC. New York

- **Negrin RS** (1998). Minimal residual disease. *Curr Opin Hematol*, 5:488-493

- **Nemunaitis J** Singer JW, Buckner CD, Durnam D, Epstein C, Hill R, Storb R, Thomas ED, Appelbaum FR (1990). Use of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in graft failure after bone marrow transplant. *Blood*, 76:245-253

- **Niemeyer CM**, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, Haas O, Harbott J, Hasle H, Kerndrup G, Locatelli F, Mann G, Stollmann-Gibbels B, van't Veer-Korthof ET, van Wering E, Zimmermann M (1997). Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood*, 89:3534-3543
- **Nylund SJ**, Ruutu T, Saarinen U, Larramendy ML, Knuutila S (1994). Detection of minimal residual disease using fluorescence DNA in situ hybridization: A follow-up study in leukemia and lymphoma patients. *Leukemia*, 8:587-594
- **Oakhill A**, Pamphilon DH, Potter MN, Steward CG, Goodman S, Green A, Goulden P, Goulden NJ, Hale G, Waldmann H, Cornish JM (1996). Unrelated donor bone marrow transplantation by children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. *Br J Haematol*, 94:574-578
- **Oberkircher AR**, Strout MP, Herzig GP, Fritz PD, Caligiuri MA (1995). Description of an efficient and highly informative method for the evaluation of hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 16:695-702
- **Ortega M**, Escudero T, Caballín MR, Olivé T, Ortega JJ, Coll MD (1999). Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants. *Bone Marrow Transplant*, 24:81-87
- **Ortega M**, Caballín MR, Ortega JJ, Olive T, Coll MD (2000). Follow-up by cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analysis of allogeneic bone marrow transplantation in two children with Fanconi's anaemia in transformation. *Br J Haematol* 111:329-333
- **Ortega JA**, Nesbit ME, Sather HN, Robison LL, D'Angio GJ, Hammond GD (1987). Long-term evaluation of a CNS prophylaxis trial-treatment comparisons and outcome after CNS relapse in childhood ALL: a report from the CCSG. *J Clin Oncol*, 5:1646-1654
- **Ortega JJ** (1994). Protocolos PETHEMA en leucemias agudas linfoblásticas. *Sangre*, 39:445-447
- **Ortega JJ** (1995). Trasplante de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Aplicaciones clínicas y resultados. *Rev Esp Trasp*, 4:202-209
- **Ortega JJ**, Olive T, Diaz de Heredia C, Coll MT, Bastida P, Massuet L (1996). Allogeneic and autologous bone marrow transplantation in AML in first remission. The Spanish experience. *Bone Marrow Transplant*, 19(Suppl 1):S53-S58
- **Ortega JJ**, Olive T (1998). Haematopoietic progenitor cell transplant in acute leukaemias in children: indications, results and controversies. *Bone Marrow Transplant*, 21(Suppl 2):S11-S16
- **Palka G**, Stuppia L, Di Bartolomeo, P, Morizio E, Peila R, Guanciali Franchi P, Calabrese G (1996). FISH detection of mixed chimerism in 33 patients submitted to bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 17:231-236
- **Parsons SK**, Castellino SM, Lehmann LE, Eickhoff CE, Tarbell NJ, Sallan SE, Weinstein HJ, Billett AL (1996). Relapsed acute lymphoblastic leukaemia . Similar outcomes for autologous and allogeneic marrow transplantation in selected children. *Bone Marrow Transplant*, 17:763-768
- **Pati A**, Godder K, Lamb L, Gee A, Henslee-Downey P (1994). Donor leukocyte infusions (DLI) to treat relapsed acute myeloid leukaemia following partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Blood*, 84(Suppl 1):1341 (abstract)

- **Pongers-Willemsse MJ**, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ (1999). Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 13:110-118
- **Porta F**, Friedrich W (1998). Bone Marrow Transplantation in congenital immunodeficiency diseases. *Bone Marrow Transplant*, 21(Suppl 2):S21-S23
- **Powles RL**, Morgenstern GR, Kay HE, McElwain TJ, Clink HM, Dady PJ, Barrett A, Jameson B, Depledge MH, Watson JG, Sloane J, Leigh M, Lumley H, Hedley D, Lawler SD, Filshie J, Robinson B (1983). Mismatched family donors for bone marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. *Lancet*, 1:612-615
- **Pui CH**, Crist W (1994). Biology and treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *J Pediatr*, 124:491-503
- **Pui CH** (1996). Acute leukemia in children. *Current Opinion in Hematology*, 3:249-258
- **Pui CH**, Raimondi SC, Srivastava DK, Tong X, Behm FG, Razzouk B, Rubnitz JE, Sandlund JT, Evans WE, Ribero R (2000). Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 14:684-687
- **Rabbitts TH** (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372:143-149
- **Radich JP**, Sanders JE, Buckner CD, Martin PJ, Petersen FB, Bensinger W, McDonald GB, Mori M, Schoch G, Hansen JA (1993). Second allogeneic marrow transplantation for patients with recurrent leukaemia after initial transplant with total body irradiation-containing regimens. *J Clin Oncol*, 11:304-313
- **Radich JP**, Gehly G, Gooley T, Bryant E, Clift RA, Collins S, Edmands S, Kirk J, Lee A, Kessler P, Schoch G, Buckner CD, Sullivan KM, Appelbaum FR, Thomas ED (1995). Polymerase chain reaction of BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. Results and implications in 346 patients. *Blood*, 85:2632-2638
- **Radich JP**, Gehly G, Lee A, Avery R, Bryant E, Edmands S, Gooley T, Kessler P, Kirk J, Ladne P, Thomas ED, Appelbaum FR (1997). Detection of the BCR-ABL transcripts in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after marrow transplantation. *Blood*, 89:2602-2609
- **Raimondi SC** (1998). Recent advances in cytogenetics in childhood acute myeloid leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*, 5:3-24
- **Raimondi SC**, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein HJ, Carroll AJ (1999). Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood*, 94: 3703-3716
- **Ramirez M**, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, Vicario JL, Madero L (1996). Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 18:1161-1165

- **Rapanotti MC**, Arcese W, Buffolino S, Iori AP, Mengarelli A, De Cuija MR, Cardillo A, Cimino G (1997). Sequential molecular monitoring of chimerism in chronic myeloid leukemia patients receiving donor lymphocyte transfusion for relapse after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 19:703-707
- **Ravindranath Y**, Yeager AM, Chang MN, Steuber CP, Krischer J, Graham-Pole J, Carroll A, Inoue S, Camitta B, Weinstein HJ (1996). Autologous bone marrow transplantation versus intensive consolidation chemotherapy in childhood acute myeloid leukaemia. *N Engl J Med*, 334:1428-1434
- **Ringden O**, Remberger M, Aschan J, Lungman P, Lonnqvist B, Markling L (1994). Long-term follow-up of a randomized trial comparing T cell depletion with a combination of methotrexate and cyclosporine in adult leukemic marrow transplant recipients. *Transplantation* 58:887-891
- **Risdon G**, Gaddy J, Broxmeyer HE (1994). Allogeneic responses of human cord blood. *Blood Cells*, 20:566-570
- **Ritter J**, Creutzig U, Reiter A, Riehm H, Schellong G (1990). Childhood leukaemia cooperative Berlin-Frankfurt-Münster trials in the Federal Republic of Germany. *J Cancer Res Clin Oncol*, 116:100-103
- **Roberts I** (1994). Bone marrow transplantation in children: current results and controversies. *Bone Marrow Transplant*, 14:197-199
- **Rodriguez MA**, Cabanillas FC, Velasquez W, Hagemester FB, McLaughlin P, Swan F, Romaguera JE (1995). Results of a salvage treatment program for relapsing lymphoma: MINE consolidated with ESHAP. *J Clin Oncol*, 13:1734-1741
- **Roman J**, Serrano J, Jimenez A, Castillejo JA, Reina ML, Gonzalez MG, Rodriguez MC, Garcia I, Sanchez J, Maldonado J, Torres A (2000). Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*, 85:173-180
- **Ross CW**, Stoolman LM, Schnitzer B, Schlegelmilch JA, Hanson CA (1990). Immunophenotypic aberrancy in adult acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol*, 94:590-596
- **Rowley JD** (1983). Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature*, 301:290-291
- **Sanders JE**, Thomas ED, Buckner CD, Doney K (1987). Marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. *Blood*, 70:324-326
- **Schaison G**, Sommelet D, Bancillon A, Perel Y, Leblanc T, Bergeron C, Lejars O, Baruchel A, Lepage E, Leverger G (1992). Treatment of acute lymphoblastic leukaemia French protocol Fralle 83-87. *Leukemia*, 6(Suppl 2):148-152
- **Seale JR**, Varma S, Swirsky DM, Pandolfi PP, Goldman JM, Cross NC (1996). Quantification of PML-RAR α transcripts in APL: explanation for the lack of sensitivity RT-PCR for the detection of minimal residual disease and induction of the leukemia-specific m-RNA by alpha interferon. *Br J Haematol*, 95:95-101
- **Serrano J**, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera C, Gonzalez MG, Reina L, Rodriguez MC, Alvarez MA, Maldonado J, Torres A (2000). Molecular análisis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210^{BCR-ABL} and p190^{BCR-ABL} after

allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190^{BCR-ABL} detection precede cytogenetic relapse. *Blood*, 95:2659-2665

- **Sinclair PB**, Green AR, Grace C, Nacheva EP (1997). Improved sensitivity of BCR-ABL detection: a triple-probe three-color fluorescence in situ hybridization system. *Blood*, 90:1395-1402

- **Sing JW**, Nemunaitis J (1994). Use of recombinant growth factors in bone marrow transplantation. In Forman, Blume and Thomas. Eds. "Bone Marrow Transplantation". Oxford Blackwell.

- **Slavin S**, Weiss L, Ackerstein A, Vourka-Karussis U, Morecki S, Or R, Nagler A, Kapelushnik J, Delukina M, Drakos P, et al (1993). Prevention and treatment of relapse by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 12(Suppl 3):S54-S56

- **Smith A** Robson LG, Sharma P, Shaw PJ (1999). Application of interphase FISH on direct bone marrow smears for evidence of chimerism in pediatric sex mismatched bone marrow transplantation. *Pathology*, 31:25-28

- **Soiffer RJ**, Fairclough D, Robertson M, Alyea E, Anderson K, Freedman A, Bartlett-Pandite L, Fisher D, Schlossman RL, Stone R, Murray C, Freeman A, Marcus K, Mauch P, Nadler L, Ritz J (1997). CD6-depleted bone marrow transplantation for acute leukaemia in first complete remission. *Blood*, 86:3039-3047

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

- **Stelzer GT**, Shults KE, Wormsley SB, Loken MR (1992). Detection of occult lymphoma cells in bone marrow aspirates by multi-dimension flow cytometry. *Prog Clin Biol Res*, 377:629-635

- **Sullivan KM** (1994). Graft-versus-host disease. In Forman, Blume and Thomas. Eds. "Bone Marrow Transplantation". Blackwell Scientific Publications: Oxford, pp. 339-362

- **Sykes M**, Preffer F, McAfee S, Saidman SL, Weymouth D, Andrews DM, Colby C, Sackstein R, Sachs DH, Spitzer TR (1999). Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *Lancet*, 353:1755-1759

- **Talpaz M**, Kantarjian H, Liang J, Calvert L, Hamer J, Tibbits P, Durett A, Claxton D, Giralt S, Khouri I, et al (1995). Percentage of Philadelphia chromosome (Ph)-negative and Ph-positive cells found after autologous transplantation for chronic myelogenous leukemia depends on percentage of diploid cells induced by conventional-dose chemotherapy before collection of autologous cells. *Blood*, 85:3257-3263

- **Tiedemann K**, Ekert H, Downie P, Smibert E, Tauro GP, Tucker DP, Rigutto G, Smith PJ (1996). intensive induction-consolidation therapy followed by autologous BMT in 1st CR for childhood AML. An RCH update. *Blood*, 88(Suppl 1):126 (abstract)

- **Tkachuk D**, Westbrook C, Andreef M (1990). Detection of BCR-ABL fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science*, 250:559-563

- **Tobal K**, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA (2000). Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood*, 95:815-819
- **Torres A**, Cubells J, Muñoz A (1995). Resultados del protocolo de estudio y tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica SHOP 89 en 259 pacientes. *Sangre*, 40(Sup 4):52 (abstract)
- **Torres A**, Martinez F, Gomez P, Fornes G, Rojas R, Herrera C, Gomez JL, Manzanares R, Garcia JM, Andres P (1989). Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. *Bone Marrow Transplant*, 4:609-612
- **Uderzo C**, Grazia Zurlo M, Adamoli L, Zanescio L, Arico M, Calculli G, Comelli A, Cordero di Montezemolo L, Di Tullio MT, Guazzelli C (1990). Treatment of isolated testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: an Italian multicenter study. *Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica. J Clin Oncol*, 8:672-677
- **Uderzo C**, Valsecchi MG, Balduzzi A, Dini G, Miniero R, Locatelli F, Rondelli R, Pession A, Arcese W, Bacigalupo A, Polchi P, Andolina M, Messina C, Conter V, Arico M, Galimberti S, Maserà G (1997). Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy in high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first remission. *Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP) and the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). Br J Haematol*, 96:387-394
- **van Dongen JJ**, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Maserà G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettlinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR (1998). Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*, 352:1731-1738
- **van Leeuwen JE**, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJ, Khan PM, Vossen JM (1994). Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood*, 83:3059-3067
- **van Rhee F**, Lin F, Cullis JO, Spencer A, Cross NC, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett J, Goldman JM (1994). Relapse of chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplant: The case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood*, 83:3377-3383
- **van Wering ER**, Beishuizen A, Roeffen ET, van der Linden-Schrevel BE, Verhoeven MA, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ (1995). Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 9:1523-1533
- **Verdonck LF**, Dekker AW, de Gast GC, van Kempen ML, Lokhorst HM, Nieuwenhuis HK (1994). Allogeneic bone marrow transplantation with a fixed low number of T cells in the marrow graft. *Blood*, 83:3090-3096
- **Webb DKH**, Wheatley K, Stevens RF (1997). Outcome for children with relapsed AML following initial therapy in the UKMRC trial AML10. *Br J Haematol*, 97(Suppl 1):11 (abstract)
- **Wessman M**, Popp S, Ruutu T, Volin L, Cremer T, Knuutila S (1993). Detection of residual host cells after bone marrow transplantation using non-isotopic "in situ" hybridization and karyotype analysis. *Bone Marrow Transplant*, 11:279-284

- **Wheatley K**, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, Rees JK, Stevens RF, Walker H (1999). A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. *Br J Haematol*, 107:69-79

- **White DM**, Crolla JA, Ross FM (1995). Detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia using fluorescence in-situ hybridization. *Br J Haematol*, 91:1019-1024

- **Yaniv I**, Ash S, Stark B, Stein J, Gavriel H, Cohen IJ, Zaizov R (1997). Childhood acute myeloid leukaemia. Consolidation with high dose melphalan and autologous stem cell transplantation. A single centre experience. *Bone Marrow Transplant*, 19(Suppl 1):101(abstract)

- **Yunis JJ** (1982). Comparative analysis of high-resolution chromosome techniques for leukemic bone marrows. *Cancer Genet Cytogenet*, 7:43-50

- **Zhao L**, Chang KS, Estey EH, Hayes K, Deisseroth AB, Liang JC (1995). Detection of residual leukemic cells in patients with acute promyelocytic leukemia by the fluorescence in situ hybridization method: potential for predicting relapse. *Blood*, 85:495-499