



Dpto. de Fisiología Humana, Histología Humana,
Anatomía Patológica y Educación Física y del Deporte
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

Influencia de la variabilidad genética entre donante y receptor, de los alelos GSTM1 y GSTT1, en la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda en pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

ALEJANDRO CONTENITO GONZALO


2016





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alejandro Contento Gonzalo

 <http://orcid.org/0000-0002-0771-0887>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Dpto. de Fisiología Humana, Histología Humana,
Anatomía Patológica y Educación Física y del Deporte
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Dra. Martina Álvarez Pérez, Profesor Asociado del Área de Conocimiento de Anatomía Patológica

CERTIFICA: Que D. Alejandro Contento Gonzalo, ha realizado personalmente y bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Influencia de la variabilidad genética entre donante y receptor, de los alelos GSTM1 y GSTT1, en la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda en pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos".

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes expide el presente en

En Málaga, a 18 de enero de 2016

Dra. Martina Álvarez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que, de manera más o menos directa, han hecho posible la realización de esta tesis. Es inevitable que siempre quede alguien a quien no se le cite explícitamente, mis disculpas por anticipado y mi agradecimiento.

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración, el apoyo y el ánimo por parte de muchas personas a las cuales me gustaría mostrar mi agradecimiento.

Agradecer en primer lugar a Antonio Jiménez Velasco, mi consejero y el motor de todo este trabajo, muchas gracias por motivarme con el conocimiento y la ciencia. Por la confianza depositada en mí durante todo este tiempo, poniendo a mi disposición la oportunidad de trabajar en colaboración con un equipo excelente y con todos los medios necesarios a mí alcance.

A la Dra. Martina Álvarez, directora de esta tesis, por su gran profesionalidad y su apoyo constante en cada pregunta, duda y valoración global del texto. Por su imprescindible colaboración en la corrección y valoración final del texto.

A todo el departamento de Anatomía Patológica donde inicie los cursos del doctorado y tan amablemente me trataron.

A mi Jefe de servicio, Ana Isabel Heiniger Mazo, sin su confianza en mí a la hora del trabajo diario, no podría haber comenzado este trabajo.

A todo el personal del Servicio de Hematología (secretarias, enfermeras, auxiliares, de la planta y de los diferentes laboratorios).

Y por último siendo de enorme importancia para mí, a mi mujer María del Mar, mi hijo Nicolás, mis padres y hermanos, pues sin su apoyo, ánimo y paciencia, habría sido imposible la realización de esta Tesis.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS

1RC: Primera remisión completa.
2RC: Segunda remisión completa.
ADN: Acido desoxirribonucleico.
ALO: Alogénico.
BuCy: Busulfán + Ciclofosfamida.
CDs: células dendríticas.
CsA: Ciclosporina.
CTLs: Linfocito T citotóxicos.
Cy: Ciclofosfamida.
D+: Donante que expresa GSTM1 o GSTT1.
D-: Donante que no expresa GSTM1 o GSTT1.
DE: Donante no emparentado.
DnE: Donante no emparentado.
EICR: Enfermedad injerto contra receptor.
EICRag: Enfermedad injerto contra receptor aguda.
EICT: Enfermedad injerto contra tumor.
FISH: Hibridación por fluorencia in situ.
FI: Fallo implante.
G-CSF: Factor estimulante de colonias granulociticas.
GST: Glutati6n s transferasa.
ICT: Irradiaci6n corporal total.
IFN gama: Interfer6n gama.
INV: Inversi6n.
LA: Leucemia aguda.
LLA: Leucemia linfoblastica aguda.
LMA: leucemia mieloblástica aguda.
mHH: Antígeno menor de histocompatibilidad.
MTX: Metotrexato.
NR: No remisi6n.
PHP: Precursores hematopoyéticos.
R+: Receptor que expresa GSTM1 o GSTT1.
R-: Receptor que no expresa GSTM1 o GSTT1.
RCP-TI: Transcriptasa reversa.
RFLPs: Fragmentos de restricci6n de longitud variable.
SCU: Sangre de cord6n umbilical.
SG: Supervivencia global.
SHC: sistema histocompatibilidad.
SLE: Supervivencia libre de enfermedad.
SNP: Polimorfismo de nucle6tido 6nico
SSCP: Single strand conformation polymorphism
STRs: Repeticiones en tándem de secuencias cortas.

TIR: Terapia de intensidad reducida.
TPH: Trasplante de precursores hematopoyéticos.
TRM: Mortalidad relacionada con el trasplante.
VNTR: Repeticiones en tándem de número variable.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1. POLIMORFISMOS EN FAMILIA GST.....	14
I.1.1. Subclase M (mu).....	14
I.1.2. Subclase T (theta).....	16
I.1.3. Subclase P (pi).....	18
I.2. ALTERACIONES DE LAS GST Y SU RELACIÓN CLÍNICA.....	18
I.2.1 Fármacos.....	18
I.2.2. Neoplasias.....	19
I.2.3. Enfermedades hematológicas.....	20
I.2.3.1 Leucemias agudas.....	20
I.2.3.2 Enfermedad injerto contra receptor.....	22
I.2.3.3 Síndrome mielodisplásico.....	24
I.2.3.4 Trasplante hematopoyético.....	24
I.3. POLIMORFISMOS GENETICOS.....	26
I.3.1. Tipos de variación polimórficas.....	26
I.4. LEUCEMIA AGUDA Y TRASPLANTE HEMATOPOYETICOS.....	32
I.4.1. Trasplante hematopoyético.....	39
I.4.1.1 Historia.....	41
I.4.1.2 Fuente de progenitores.....	45
I.4.1.3 Enfermedad injerto contra receptor.....	46
I.4.1.3.1 Clínica.....	48
I.4.1.3.2 Factores de riesgo.....	51
I.4.1.3.3 Gradación.....	52
I.4.1.3.4 Tratamiento.....	54
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	57
III. MATERIAL Y METODOS.....	63
III.1. Tipo de estudio.....	63
III.2. Población estudiada.....	63
III.2.1. Variables estudiadas.....	63

III.3. Análisis de la muestra.....	68
III.3.1. Extracción y obtención DNA.....	68
III.3.2. Calidad de DNA.....	68
III.3.3. Análisis del ALELO NULO.....	68
III.4. Analisis estadístico.....	71
III.5. Utilización de la expresión del alelos GSTM1 como diagnostico....	72
IV. RESULTADOS.....	75
IV.1. Pacientes.....	77
IV.2. Resultados del GST con las variables.....	83
IV.2.1. Expresión del alelo GST como factor predictivo.....	103
V. DISCUSIÓN.....	105
VI. CONCLUSIONES.....	125
VII. BIBLIOGRAFIA.....	129

I- INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La glutatión S transferasa (GSTs) es una familia de enzimas que consiste en numerosas proteínas citosólicas, mitocondriales y microsomales, las cuales son capaces de generar reacciones múltiples con sustratos endógenos y xenobiótico. Catalizan la conjugación del glutatión reducido a los centros de electrofílica a través del grupo sulfhídrico en una amplia variedad de sustratos. Las toxinas se unen a las GSTs, funcionan como las proteínas de transporte, desintoxicar compuestos endógenos, tales como los lípidos peroxidados y desactivar los productos finales endógeno formados como metabolitos secundarios durante el estrés oxidativo [1].

La conjugación con glutatión puede tener lugar con un amplio grupo de sustratos, que frecuentemente tienen un grupo reactivo. Es la reacción mayoritaria de desintoxicación para especies reactivas o electrófilas. La enzima que cataliza esta reacción es la glutatión S transferasas, localizada en la fracción soluble (XBs) y en la fracción microsomal. La GSTs muestra muchas formas isoenzimáticas, además de polimorfismos genéticos y es inducible por los xenobiótico. Su actividad se relaciona con los mecanismos de resistencia a tóxicos, que se asocian con incrementos de la actividad enzimática, la cual es inducida por fármacos como pueden serlos las dioxinas, los glucocorticoides y también los antioxidantes.

En la actualidad, se han identificado en los mamíferos ocho clases distintas de glutatión S transferasas: alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta, pero en los seres humanos solo se han identificado 7 subclases de esta familia, las siguientes son: alfa (a), mu (M), pi (P), theta (T) sigma, omega y zeta (Z). Cada subclase abarca varios genes con sus isoenzimas respectivas [2].

Las enzimas de la familia GST presumiblemente han surgido de un gen único y común antepasado, su especificidad de sustrato y su diversidad se han reformado por duplicación de genes, genes de recombinación y por acumulación de mutaciones.

Las subclases P, T y M son las más estudiadas y a su vez a las que mayor relevancia clínica se les ha adjudicado [1,2].

I.1. POLIMORFISMOS EN FAMILIA GST

I.1.1. Subclase M (μ)

La subfamilia GSTM está codificada por un gen de 100 kb dividido en 1p13.3, dispuestos como 50-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-30 [Figura 1]. La supresión del gen GSTM1, GSTM1 * 0, afecta con frecuencia a ambos alelos, resultando un genotipo nulo llamado GSTM1 K / K. En un meta-análisis de 30 estudios en el que participaron más de 10.000 personas, se identificó un 53% de GSTM1 alelo nulo en la raza blanca (con un 42-62% del rango inter individual). La frecuencia del genotipo GSTM1 K / K fue similar en los asiáticos pero más baja en los afro-americanos, el 27% (16-36%).

El análisis molecular detallado de la agrupación génica GSTM reveló que el gen GSTM1 está flanqueado por dos regiones casi idénticas de 4,2 kb [Figura 1]. La delección de este gen es de 16-kb, la cual está causada por una recombinación homóloga, en las que están involucradas ambas regiones idénticas.

A pesar de las extensas regiones homólogas adyacentes la delección de este gen no afecta al resto de las estructuras, quedando intactas las regiones génicas correspondientes a las isoformas M2, M5 y M6 [3].

Estas supresiones, resultado de la virtual ausencia de actividad enzimática en individuos con delecciones (genotipo nulo), se ha asociado con el riesgo de alteración de una variedad de patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades respiratorias [4]. Diversos polimorfismos en las GST también han sido asociados con problemas oftalmológicos como cataratas y la degeneración macular senil [5-6].

También se produce en el gen GSTM1 un polimorfismo de nucleótido único (SNP) de cambio de sentido, en el nucleótido 534 G / C (172 Lisina / Asparagina) correspondiente a GST M1 *A y GST M1 *B respectivamente, lo que no parece afectar a la función de la enzima.

El análisis de las otras isoformas de la familia GST muestran una homología extensa. Por ejemplo, el exón 8 del gen GSTM2 y el exón 8 del gen GSTM1 presentan más de un 99% de similitud, teniendo 583 nucleótidos idénticos.

El GSTM3 es considerablemente más corto que las otras isoformas, orientadas en el gen en dirección 3 prima 5 prima. En el gen GSTM3, el GSTM3 * (wild type) y GSTM3 * alelos variante B, difieren entre sí por una deleción de 3 pb en el intrón 6, que resulta en la generación de una secuencia de reconocimiento para el factor de transcripción YY1 [6,7].

La isoforma GSTM4 comparte la misma identidad de aminoácidos con GSTM1 (87%), GSTM2 (83%) y GSTM3 (70%).

Varias líneas de investigación sugieren que GSTT1 y/o GSTM1 desempeñan un papel en la desactivación de las especies de oxígeno reactivo que pueden estar involucrados en los procesos celulares de la inflamación, el envejecimiento y enfermedades degenerativas [7]. Estas isoformas son especialmente importante en la desactivación de los intermediarios cancerígeno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

El alelo nulo GSTM1 aparece también asociado con un incremento modesto en el riesgo de desarrollar cáncer de vejiga pudiendo corresponder al acumulo de carcinógenos en el epitelio vesical y la imposibilidad de que esta enzima actúe [7].

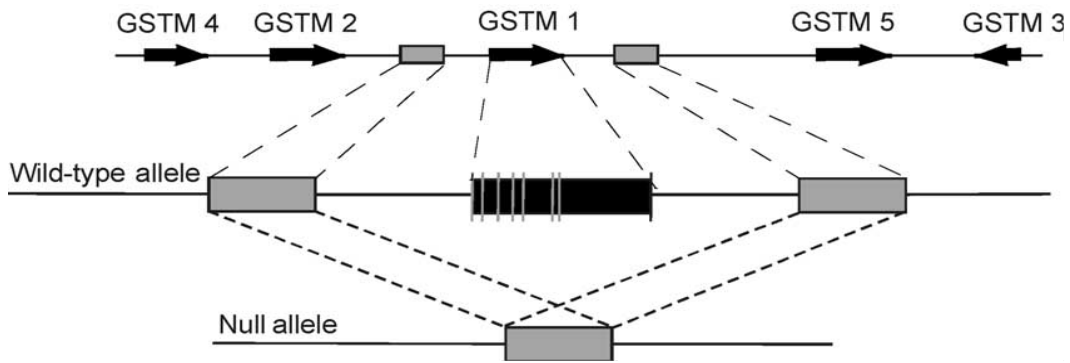


Figura. 1. El gen GSTM1 es parte del cluster de genes GST Mu-clase en 1p13.3, GSTM4 GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3 (parte superior del diagrama). El gen GSTM1 (cuadro negro) se compone de 8 exones, que varían en tamaño desde 36 hasta 112pb, mientras que los intrones varían 87 a 2641 pb. GSTM1 se incrusta en una región con amplia homología y flanqueado por dos regiones de 4,2 kb casi idénticas (gris cajas). El alelo nulo GSTM1 surge por recombinación homóloga de la izquierda y la derecha de 4,2 kb, lo que resulta en una delección de 16kb que contiene todo el gen GSTM1 (parte inferior del diagrama). El punto de supresión no puede ser localizado con precisión debido a gran cantidad de secuencias repetitivas entre ambas región [7].

I.1.2. Subclase T (theta)

Esta subfamilia consta de dos genes, GSTT1 y GSTT2, que se encuentran en 22q11.2 y separados por unos 50 kb [Figura 2].

Ambos genes tienen cinco exones con idénticas intrón / exón fronteras, pero que comparten sólo el 55% de identidad de aminoácidos.

Aproximadamente el 20% de los caucásicos son homocigotos para un alelo nulo GSTT1, GSTT1 * 0.

La delección del gen GSTT1 no incluye la del GSTT2. El análisis de una sección de 119-kb que contiene el GSTT1 y GSTT2 reveló una extensa homología.

Al igual que el GSTM1 * 0, la supresión GSTT1 * 0 probablemente se deba a una recombinación homóloga [8].

Está altamente conservada durante la evolución y juega un papel importante en la biotransformación de fase II de un número de fármacos y productos químicos industriales, por ejemplo: citostáticos, los hidrocarburos y derivados halogenados de hidrocarburos [8].

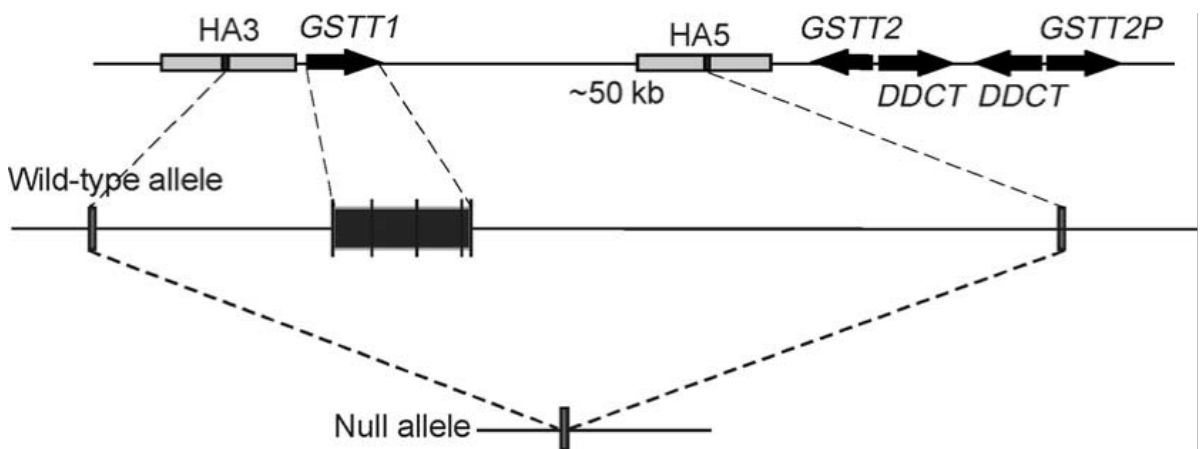


Figura. 2. El gen GSTT1 es parte del cluster de genes GST Theta-clase en 22q11.2 (parte superior del diagrama). GSTT1 y GSTT2 están separados por aproximadamente 50 kb. GSTT2 se encuentra cara a cara con un gen que codifica la D tautomerase dopachrome (DDCT). El GSTT2 y DDCT genes se han duplicado en una repetición invertida. El gen GSTT1 (cuadro negro) consta de cinco exones, que varían en tamaño desde 88 hasta 195 pb, mientras que los intrones varían desde 205 hasta 2363 pb. El gen GSTT1 se incrusta en una región con amplia homología y flanqueado por dos regiones de 18 kb, HA3 y HA5 (cuadros grises), que tienen más del 90% de homología. El alelo nulo GSTT1 surge por recombinación homóloga de la izquierda y la derecha repite 403 pb, lo que resulta en una delección de 54 kb que contiene el gen GSTT1 completo (parte inferior del diagrama) [8].

I.1.3. Subclase P (pi)

El gen GSTP1 se encuentra en el 11q13, es de 2,8 kb de longitud y contiene siete exones la cual codifica una proteína de 209 aminoácidos. GSTP1 se expresa en muchos tejidos incluyendo en el tejido mamario, donde es la GST predominante.

Varios polimorfismos de único nucleótido se han descrito en el gen GSTP1. La sustitución de estos aminoácidos se ha visto que afecta la especificidad del sustrato en la unión enzimática [9].

I.2. ALTERACIONES DE LAS GST Y SU RELACIÓN CLÍNICA

La familia de las isoenzimas GST tienen afinidades de unión relativamente baja a sustratos específicos, y por otro lado, reconocen y / o desintoxican una amplia gama de sustratos. El mecanismo por el cual GST puede modular la resistencia a los quimioterápicos sigue siendo aun una cuestión de debate. El principal mecanismo propuesto es la conjugación con el glutatión. Otros estudios proponen nuevas posibilidades, como la participación en la unión de drogas en la salida de la célula.

I.2.1. Fármacos

La presencia de algún alelo nulo en las GST también puede conferir resistencia a los agentes de quimioterapia utilizados en la actualidad para tratar el cáncer.

Sin embargo, en contraste con el papel de las GST en la carcinogénesis del medio ambiente, los genotipos GST con menor actividad de la enzima puede ser una ventaja para los individuos sometidos a tratamiento quimioterápico, porque reduce la desintoxicación y potencialmente aumentaría la eficacia de los medicamentos citotóxicos [9,10].

Medicamentos contra el cáncer que se ha demostrado que sean sustratos para GST son, por ejemplo, el Clorambucil, Melfalán, Ciclofosfamida, Esteroides, etc.

Existe evidencia también de un papel de las GST en la modulación de los efectos de drogas mediante la inactivación de los hidroperóxidos generados por diferentes fármacos como lo son la Adriamicina, Mitomicina C, Carboplatino y Cisplatino [10].

I.2.2. Neoplasias

Diversos estudios han sugerido una asociación entre el genotipo nulo GSTM1 y un mayor riesgo para desarrollar diversos cánceres relacionados con el uso del tabaco. Un metaanálisis sobre 12 trabajos de casos controles sobre el riesgo de cáncer de pulmón y el estado de portador GSTM1 clasificó el genotipo nulo GSTM1 como factor de riesgo independiente de características moderado para todos los subtipos histológicos de cáncer pulmonar [11].

En pacientes con cáncer de mama la delección del gen GSTM1 o el GSTT1 ha sido relacionada con una mayor supervivencia y menor incidencia en las recaídas de la enfermedad principalmente cuando ambos genes estaban deleccionados [12].

En los pacientes con tumores del sistema nervioso central como es el caso de los oligodendrogliomas anaplásicos se ha visto que los pacientes que poseen el genotipo GSTT1 nulo, pueden estar relacionados con una supervivencia menor en comparación con los que expresan el alelo, posiblemente esté relacionado con mayor toxicidad a los fármacos y reducción de la dosis de los mismos. En los pacientes con astrocitoma anaplásico, el B GSTP1 * / * genotipo B puede conferir una ventaja en relación a una mayor supervivencia [13].

Se ha postulado que los individuos con alelos nulos GSTM1 y GSTT1 y también aquellos con transición 105Ile/Val en GSTP1 han aumentado la susceptibilidad

para los agentes carcinógenos y de esta manera son más propensos a desarrollar cáncer de próstata.

En los últimos años ha sido ampliamente estudiado como un factor de riesgo de desarrollar cáncer de próstata, sin embargo, los resultados son inconsistentes. La principal conclusión de un metaanálisis de 22 estudios sugiere que el polimorfismo GSTM1 nulo confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer de próstata, sin embargo, no se encontró relación entre el GSTT1 y el GSTP1 con el riesgo de mayor incidencia de cáncer de próstata [14].

Al estar estas enzimas involucradas en la detoxificación celular, se han revisado diversas bibliografías y entre ellos varios metaanálisis en los cuales se ha relacionado con mayor incidencia de padecer hepatocarcinoma.

En 15 estudios fueron identificados: los cuales evaluaron mayormente la GSTM1 y la GSTT1. Los resultados globales sugieren que puede haber un pequeño riesgo de hepatocarcinoma en individuos con alelo nulo GSTT1 y posiblemente también con genotipos nulos GSTM1. Sin embargo, dado el número relativamente limitado de pacientes que se estudiaron y la heterogeneidad observada entre los estudios, no son concluyentes los mismos [15].

1.2.3. Enfermedades hematológicas

1.2.3.1 Leucemia agudas

Se trata de una proliferación neoplásica de células inmaduras, llamadas blastos, que pueden ser de diferentes estirpes (mieloide, linfoide, etc.) que proceden de un progenitor hematopoyético con capacidad de maduración alterada y que desplaza a las células normales de la médula ósea.

Los polimorfismos de la familia de las GST (GSTM1, GSTP1 y GSTT1) han sido considerados factores de riesgo para desarrollar leucemias agudas (LA) en una

serie de estudios, sin embargo los resultados globales de estos estudios son inconsistentes [16].

Para investigar una posible asociación de los polimorfismos de GST con el riesgo de leucemia aguda, se realizó una revisión sistemática y metaanálisis de 30 estudios de casos/control publicados. Para tener en cuenta la posibilidad de heterogeneidad entre los estudios, se realizó un riguroso análisis estadístico. [Tabla 1].

El Odds Ratio combinado de riesgo de leucemia aguda asociada con el genotipo nulo *GSTM1*, *GSTP1* alelo y genotipo *GSTT1* nulo fueron 1,22 (intervalo de confianza 95% (IC) 1,07-1,38), 1,07 (IC 95% 1.00-1.13) y 1.19 (IC 95% 1,00-1,41), respectivamente.

Se observó un aumento significativo del riesgo de desarrollar leucemia linfoblástica aguda (LLA) asociada con los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* nulo. No se observó evidencia de la relación entre los polimorfismos en *GSTP1* y la mayor incidencia de LA.

En varios estudios se ponen de acuerdo en el papel que los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* nulo podrían desempeñar en la patogénesis de las leucemias agudas.

La asociación significativa de estos genes nulos con el mayor riesgo de desarrollar una leucemia aguda debe ser evaluada con más detenimiento y relacionarlos con respecto a la población, el tabaquismo, los hábitos alimentarios, la etnia y la raza entre otros factores [17].

First author (year) [reference]	Country	Cases (n)	%GSTM1 ^a deficiency	Controls (n)	%GSTM1 ^b deficiency	Control source	Tumour types	Age	Odds ratio (95% CI)
Chen (1997) white [9]	USA	163	55.21	213	53.50	Population	ALL	Childhood	1.07 (0.87–1.32)
Chen (1997) black [9]	USA	34	41.18	203	27.60	Population	ALL	Childhood	1.84 (1.25–2.69)
Krajinovic (1999) [11]	Canada	174	64.94	304	51.30	Population	ALL	Childhood	1.76 (1.44–2.14)
Sasai (1999) [12]	Japan	21	47.62	43	53.50	Population	AML	Adult	0.79 (0.46–1.35)
Sasai (1999) [12]	Japan	18	61.11	43	53.50	Population	t-AML	Adult	1.37 (0.77–2.42)
Lemos (1999) [13]	Portugal	22	63.64	128	57.80	Population	ALL	Adult	1.28 (0.79–2.06)
Lemos (1999) [13]	Portugal	18	55.56	128	57.80	Population	AML	Adult	0.91 (0.55–1.51)
Saadat (2000) [16]	Iran	38	55.26	75	32.00	Population	ALL	Childhood	2.63 (1.74–3.95)
Crump (2000) [14]	USA	297	53.54	152	49.30	Hospital	AML	Adult	1.18 (0.97–1.44)
Rollinson (2000) [17]	UK	475	54.32	826	49.30	Population	AML	Adult	1.22 (1.09–1.37)
Rollinson (2000) [17]	UK	70	50.00	113	48.70	Population	ALL	Adult	1.05 (0.78–1.43)
Naoe (2000) [18]	Japan	411	55.23	150	51.30	Population	AML	Adult	1.17 (0.97–1.42)
Woo (2000) white [15]	USA	40	37.50	160	56.90	Hospital	ALL	Childhood	0.45 (0.32–0.65)
Woo (2000) black [15]	USA	7	71.43	38	36.80	Hospital	ALL	Childhood	4.29 (1.74–10.56)
Woo (2000) hispanic [15]	USA	6	66.67	44	43.20	Hospital	ALL	Childhood	2.63 (1.05–6.59)
Davies (2000) white [19]	USA	232	63.79	153	47.10	Population	AML	Childhood	1.98 (1.60–2.45)
Arruda (2001) [2]	Brazil	38	73.68	276	37.00	Hospital	AML	Adult	4.78 (3.24–7.05)
Allan (2001) [4]	UK	417	54.92	1019	48.70	Population	AML	Adult	1.28 (1.14–1.44)
Allan (2001) [4]	UK	89	55.06	1019	48.70	Population	t-AML	Adult	1.29 (1.03–1.61)
Davies (2002) white [21]	USA	616	53.73	532	53.80	Hospital	ALL	Childhood	1.00 (0.89–1.12)
Davies (2002) black [21]	USA	35	40.00	201	31.80	Hospital	ALL	Childhood	1.43 (0.98–2.08)
Haase (2002) [20]	Germany	213	50.23	239	51.00	Population	AML	Adult	0.97 (0.80–1.17)
Alves (2002) [23]	Portugal	47	68.09	102	49.00	Population	ALL	Childhood	2.22 (1.53–3.21)
Balta (2003) [24]	Turkey	139	55.40	185	54.60	Population	ALL	Childhood	1.03 (0.82–1.29)
Balta (2003) [24]	Turkey	31	61.29	185	54.60	Population	ANLL	Childhood	1.32 (0.89–1.96)
Barnette (2004) [25]	USA	94	48.94	336	54.50	Population	ALL	Childhood	0.75 (0.59–0.95)
Canalle (2004) [26]	Brazil	113	42.48	221	45.70	Population	ALL	Childhood	0.88 (0.69–1.11)
Seedhouse (2004) [27]	UK	200	50.50	177	44.10	Population	AML	Adult	1.29 (1.05–1.59)
Seedhouse (2004) [27]	UK	42	45.24	177	44.10	Population	t-AML	Adult	1.05 (0.74–1.48)
Dalo (2004) [28]	Italy	193	42.49	273	46.90	Population	AML	Adult	0.84 (0.69–1.01)

Tabla 1. Resumen de los diferentes estudios y su relación con el GSTM1 y el riesgo de leucemia aguda. LLA (leucemia linfoblástica aguda) LMA (leucemia mieloblastica aguda) t-AML (leucemia mieloblástica relacionada con el tratamiento. a frecuencia de GSTM1 deficiencia en casos. b frecuencia de GSTM1 deficiencia en controles [17].

1.2.3.2. Enfermedad injerto contra receptor

La enfermedad de injerto contra receptor agudo y crónica es una de las complicaciones con mayor morbi mortalidad en el periodo post-TPH. En este proceso los linfocitos T del donante reconocen alo antígenos que activan la presentación de antígenos, con la consecuente activación de la cascada inflamatoria produciendo un daño tisular que puede llegar a ser irreversible.

Se ha investigado en recientes publicaciones si los polimorfismos de las GST interfieren con el metabolismo de los fármacos utilizados en el tratamiento de

acondicionamiento quimioterápico previo a la infusión de precursores hematopoyéticos y de la profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped aguda (EICRag) [18].

El Busulfán y los metabolitos de la Ciclofosfamida se conjugan con el glutatión y son catabolizado por algunas de las enzimas de la familia glutatión citosólico S-transferasas. Existen algunos polimorfismos de únicos nucleótidos (SNP) en la región promotora de la glutatión S-transferasa gen A1, los que se han observado con mayor relevancia clínica son: *GSTA1* * A, -567T, -69C y -52G; *GSTA1* * B, -567g, 69T-y -52A.

Se evaluaron los resultados clínicos de 61 pacientes con neoplasias hematológicas, sometidos a Trasplante de Precursores hematopoyético (TPH) alogénico, acondicionado con Busulfán / Ciclofosfamida, se relaciono la incidencia de EICH agudo grado II-IV, con los distintos polimorfismos de la glutatión S-transferasa genotipos A1.

Concluyendo en este estudio que el diplotipo *GSTA1* * A / * A es un factor de protección independiente para el desarrollo de EICR agudo, en especial para localización cutánea y probablemente hepática también [19].

Siendo estos estudios relevantes para la posible identificación de genotipos antes de un trasplante alogénico y poder permitir modificar algunos regímenes de acondicionamiento o las profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped aguda.

1.2.3.3. Síndromes mielodisplásicos

Es un grupo heterogéneo de enfermedades clónales de las células hematopoyéticas pluripotentes caracterizado por la presencia de alteraciones morfológicas de las células de las diferentes líneas hematopoyéticas, citopenias y una frecuente evolución a leucemia aguda.

En un meta análisis realizado por Dahabreh et al. [20] analizaron más de 1400 pacientes, en dichas observaciones llegan a la conclusión que el alelo nulo GSTT1 está relacionado con una mayor incidencia de síndrome mielodisplásico, no obstante continúan sin hallar esta relación con el alelo nulo GSTM1, dichos hallazgos están fundamentados en la susceptibilidad de las líneas celulares hematopoyéticas a mayor toxicidad por diversos fármacos (agentes alquilantes) y metales pesados.

1.2.3.4. Trasplante hematopoyético

La mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) es un obstáculo importante para el éxito de los TPH alogénicos, una amplia variedad de fármacos se utilizan en el TPH alogénico, por esta razón los polimorfismo en diversas enzimas metabólicas podrían afectar el metabolismo de los fármacos y potencialmente influir en la MRT.

En el estudio de Terakura et al. [21]. No se encontró asociación significativa entre el alelo nulo GSTT1 y las diversas variantes analizadas relacionadas con el TPH. Sin embargo, un genotipo GSTM1-positivo en los receptores se asoció significativamente con un mayor TRM y una menor supervivencia global [Figura 3]. Estos resultados sugieren que un genotipo GSTM1 nulo en los receptores protege contra TRM después realizarse TPH alogénico, no obstante estos resultados necesitan más estudios prospectivos y multicéntricos para su validación [114].

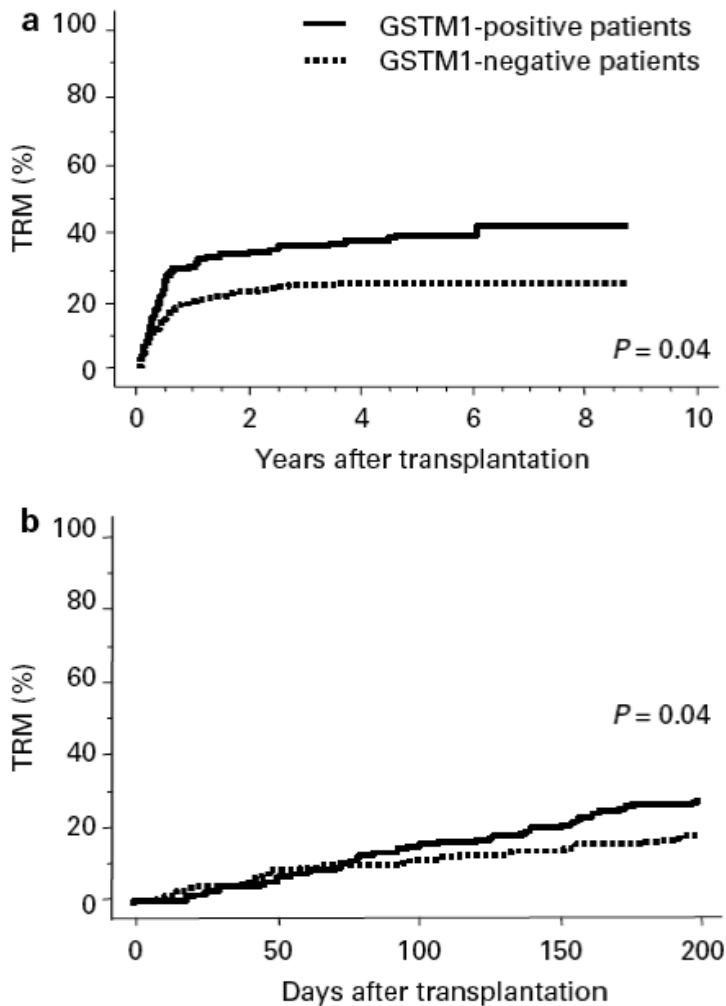


Figura 3. Impacto de la delección homocigota de GSTM1 en TRM después del trasplante de médula ósea de donantes no relacionados. (a) TRM en los pacientes GSTM1-positivos con una enfermedad hematológica fue de 42,9% (n = 166) y que en los pacientes GSTM1-negativos fue de 29,3% (n = 201). (b) TRM dentro de los 200 días después del trasplante en los pacientes GSTM1-positivos con una enfermedad hematológica fue del 28,8% (n = 166) y que en los pacientes GSTM1-negativos fue de 18,7% (n = 201). [21]

I.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Como su nombre indica, las secuencias polimórficas, también conocidas como secuencias anónimas, loci anónimos, loci polimórficos, marcadores anónimos o marcadores polimórficos, son secuencias de ADN que normalmente no codifican para un producto génico, se distribuyen de forma aleatoria a lo largo del genoma y presentan como característica singular el hecho de ser polimórficas. Este último hecho es de suma importancia pues confiere a este tipo de secuencias la característica primordial del análisis genético, la variabilidad.

El primer polimorfismo descrito en la especie humana fue el descubrimiento del grupo sanguíneo ABO por Landsteiner en 1900, y durante los 55 años siguientes todos los polimorfismos descritos se refirieron a diferentes antígenos de superficie de los glóbulos rojos. Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante a mediados de los setenta supuso la apertura de una nueva vía para la identificación de marcadores genéticos polimórficos mediante el análisis directo de las propias moléculas de ADN. Así nace una nueva generación de polimorfismos: los polimorfismos del ADN [22].

I.3.1. Tipos de variación polimórficas

Los polimorfismos de ADN se pueden ordenar según dos criterios básicos: su propia naturaleza y el sistema de detección. De este modo se podrían distinguir los siguientes tipos de polimorfismos [22,23] :

-Tipo 1

Fragmentos de restricción de longitud variable (RFLPs). La causa del polimorfismo radica normalmente en la pérdida de una o más dianas de restricción debido a mutaciones puntuales (transiciones o transversiones), y se detectan mediante electroforesis en geles de agarosa.

Polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción

El tipo más tempranamente estudiado de variante de ADN fue el que puede detectarse cuando una enzima de restricción encuentra una mutación puntual en su secuencia de reconocimiento habitual, por lo que no puede fijarse. En ese caso, alguno de los fragmentos de ADN obtenidos mediante estas enzimas serán de una longitud diferente. Por ello se conocen estos polimorfismos como polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción.

El análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) fue una de las primeras técnicas que se usó ampliamente para detectar variaciones a nivel de la secuencia del ADN. Esta tecnología se basa en el principio de que es posible comparar patrones de bandas generados a partir de moléculas de ADN de diferentes individuos que han sido sometidas a digestión con enzimas de restricción. Las diversas mutaciones que afectan a las moléculas de ADN de muchas maneras producen fragmentos de longitud variable. Estas diferencias de longitud de los fragmentos pueden observarse una vez realizadas la electroforesis, la hibridación y la visualización.

Mediante enzimas de restricción puede analizarse cualquier región del genoma, codificante o no. Sin embargo, sólo pueden detectarse cambios dentro de unas secuencias determinadas, de modo que no todas las mutaciones existentes serán reveladas mediante esta técnica. Las enzimas de restricción se han utilizado para

estudiar numerosas variantes de polimorfismos, desde secuencias de ADN repetitivas hasta ADN mitocondrial o mutaciones puntuales. Sin embargo, los resultados obtenidos a menudo no son comparables a los obtenidos por otros métodos, por lo que pueden considerarse un tipo de polimorfismo diferenciado. Los RFLP son polimorfismos que presentan normalmente un número bajo de alelos y por lo tanto su utilización en el diagnóstico indirecto es limitada [23].

-Tipo II

Repeticiones en tándem de secuencias cortas (STRs). En este caso el polimorfismo consiste en la existencia de un número variable de repeticiones en tándem de una secuencia básica que oscila entre un solo nucleótido y una kilobase. Se detectan también mediante electroforesis en el mismo tipo de geles, salvo los micro satélites que, como se verá más adelante, suelen necesitar geles de poliacrilamida.

Polimorfismos de repetición. Secuencias cortas repetidas en tándem

En todos los genomas, y muy especialmente en el humano, existen secuencias cortas que se repiten en tándem y están sometidas a una alta tasa de variabilidad. La longitud de estas unidades básicas de repetición oscila entre 1 nucleótido y 2 kilobases. Este tipo de secuencias ha sido bautizado con diferentes nombres, pero parece bastante aceptada la separación en dos categorías según el tamaño de la unidad repetida y el sistema de detección. Cuando la unidad básica es de unas pocas bases (entre una y seis) se suelen denominar microsatélites o polimorfismos de longitud de secuencia simple, Si la unidad de repetición es mayor (normalmente entre 10 y 15 pares de bases), se habla de minisatélites o repeticiones en tándem de número variable (VNTR) Este tipo de polimorfismos se ven favorecidos por la ocurrencia de "crossing over" desiguales y otros mecanismos moleculares (como el "slippage" durante la replicación) que

contribuyen a su extensión. El resultado son regiones hipervariables y polimorfismos multialélicos, pero hay que tener cuidado a la hora de interpretar sus patrones de segregación porque pueden sufrir modificaciones con una frecuencia superior a la de las mutaciones puntuales, apareciendo en los hijos variantes alélicas que no existían en los padres [24].

De las dos categorías consideradas, los minisatélites son lógicamente menos polimórficos y, curiosamente, tienden a estar agrupados en las regiones terminales de los cromosomas humanos. Pueden distinguirse fácilmente mediante Southern blot e hibridación, pero los más pequeños necesitan ser amplificados mediante PCR [25]. Fue precisamente el desarrollo de esta técnica (PCR), que permitía amplificar segmentos cortos de ADN con gran rapidez y eficacia, lo que hizo posible el descubrimiento de los microsatélites.

En 1990 Weber realizó un exhaustivo estudio sobre el tipo y distribución de los microsatélites $(dC-dA)_n$ $(dG-dT)_n$ en el genoma humano.

El resultado fue el hallazgo de tres tipos de microsatélites:

- a. Secuencias de repetición perfecta. Consisten en repeticiones en tándem sin interrupciones ni otro tipo de secuencias repetidas adyacentes.
- b. Secuencias de repetición imperfectas. Consiste en dos o más series de repeticiones interrumpidas por bases nucleotídicas que no se repiten.
- c. Secuencias de repetición compuestas. Pueden ser también perfectas o imperfectas según el status de las series.

Como se ha mencionado, la detección de los microsatélites es algo más sofisticada que la de minisatélites. Al tratarse de secuencias muy cortas pueden clonarse y secuenciarse con relativa facilidad a partir de ADN genómico total o de regiones cromosómicas específicas. El procedimiento más utilizado es la

elaboración de genotecas en vectores de secuenciación, cortando el ADN genómico con endonucleasas de restricción de corte frecuente.

La singularidad más especial de este tipo de polimorfismos está en que cada loci puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones), sin embargo presentan el inconveniente que no están distribuidos por todo el genoma y por lo tanto solo pueden ser utilizados en el diagnóstico de un número muy reducido de enfermedades. Los VNTR-minisatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial. Cuando se habla de huellas dactilares del ADN se está hablando de este tipo de polimorfismo.

Los VNTR-microsatélites son por excelencia los polimorfismos anónimos utilizados en el diagnóstico genético. Corresponden a la repetición en tándem de secuencias de entre 2 y 5 nucleótidos. Los microsatélites presentan dos características que los hacen ideales para su uso. En primer lugar, están distribuidos de forma casi homogénea por todo el genoma y en segundo lugar, presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada (presentan una alta heterocigosidad). Su detección se realiza normalmente mediante la técnica de PCR [26].

-Tipo III

Polimorfismos debidos a mutaciones puntuales que no afectan a la longitud de los fragmentos de restricción ni alteran la secuencia de ninguna diana conocida. En estos casos existen métodos indirectos para comprobar la naturaleza polimórfica de un fragmento de ADN y lógicamente está el recurso de poder secuenciarlo directamente.

Polimorfismos debidos a mutaciones puntuales

Cuando el origen de los polimorfismos está en la ocurrencia de mutaciones puntuales como las transiciones y transversiones, y estas mutaciones no afectan a ninguna diana de restricción conocida, los fragmentos de ADN variantes pasarían inadvertidos con los sistemas de detección anteriores. Sin embargo, existen métodos adicionales de carácter indirecto (SSCP, etc.) o directo (secuenciación), que hacen posible también su detección.

Entre los métodos indirectos, uno de los más empleados es el que aprovecha los cambios en la movilidad electroforética que presentan dos cadenas sencillas de ADN cuando se diferencian en una única sustitución de bases. Esta diferente movilidad electroforética se puede poner de manifiesto en geles neutros de poliacrilamida y se basa al parecer en sutiles diferencias conformacionales; por ello se habla de "single strand conformation polymorphism" (SSCP).

En cuanto al procedimiento directo, es decir la secuenciación, parece cada día más asequible desde la incorporación de los sistemas automatizados, y por la posibilidad de secuenciar directamente los productos amplificados mediante PCR [27].

I.4. LEUCEMIA AGUDA Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICOS

Las leucemias agudas son una proliferación de células inmaduras, blastos, de estirpe linfoide o mieloide, que proceden de un progenitor hematopoyético lesionado con capacidad de maduración alterada y que debido a su crecimiento excesivo desplaza a células normales de la médula ósea. Ello se traduce en síntomas y signos de enfermedad y en alteraciones del hemograma.

Sin embargo, en la actualidad, la clasificación exclusivamente morfológica descrita inicialmente por la FAB, tiende a ser reemplazada por una clasificación de neoplasias hematológicas propuesta por la Organización Mundial de la Salud, que las divide según la línea celular afectada, en: neoplasias mieloides, neoplasias linfoides, enfermedades de células mastoides y neoplasias histiocíticas. Dentro de cada categoría, las diferentes enfermedades se definen de acuerdo a una combinación de hallazgos morfológicos, de inmunofenotipo, características genéticas y síndromes clínicos específicos.

En adultos su incidencia se estima en 4-5 casos / 100.000 habitantes al año, la leucemia mieloide aguda (LMA) representa el 40% de los casos. En la edad pediátrica la incidencia es de 40 nuevos casos / 1.000.000 habitantes al año, de ellos un 75% son leucemias linfoblásticas [28].

La clasificación de un determinado tipo de leucemia, nos permite dar tratamientos específicos, con mejores resultados. El objetivo principal del tratamiento antineoplásico es erradicar la clona leucémica y restablecer la hematopoyesis normal en la médula ósea, lo cual cada vez es más posible de lograr, siempre que se apliquen tratamientos adecuados a los diferentes grupos pronósticos.

El avance tecnológico en la última década se ha reflejado tanto en el desarrollo de técnicas específicas para la identificación de las leucemias, como en el uso de nuevos agentes farmacológicos y biológicos, lo cual en conjunto, resulta en mejores formas de tratamiento para las leucemias agudas, en donde ya no es suficiente el hecho de integrar remisión, sino cada vez lograr sobrevidas más prolongadas e incluso, mayor porcentaje de curaciones.

Los adelantos en el tratamiento de la LMA han dado lugar a tasas de remisión completa sustancialmente mejores. El tratamiento deberá ser lo suficientemente intensivo como para lograr una remisión completa, ya que la remisión parcial no ofrece beneficios sustanciales de supervivencia [28,29].

Aproximadamente, de 60 a 70% de los adultos con LMA se puede esperar que logren un estado de remisión completa después del tratamiento apropiado de inducción.

Se puede esperar que más de 25% de los adultos con LMA (cerca de 45% de los que logran remisión completa) sobrevivan 3 años o más y es posible que se curen. Las tasas de remisión de LMA en adultos están inversamente relacionadas con la edad, con una tasa esperada de remisión de más de 65% para los pacientes menores de 60 años de edad. Existen datos que indican que una vez que se logra, la duración de la remisión puede ser más corta entre los pacientes de edad más avanzada.

Parece que la mayor morbilidad y mortalidad durante la inducción está directamente relacionada con la edad. Otros factores pronósticos adversos son la infiltración del sistema nervioso central, infección sistémica al momento del diagnóstico, recuento elevado de leucocitos ($>100.000/mm^3$), LMA inducida por tratamiento y antecedentes de síndrome mielodisplásico o un trastorno hematológico previo [29].

Su etiología es desconocida, no obstante existen múltiples factores externos e internos que predisponen a su desarrollo.

Una vez sospechada esta enfermedad se utiliza las siguientes pruebas complementarias en su diagnóstico:

Mielograma

Es de utilidad para asignar una variedad en concreto de leucemia aguda (LA), presenta un significado clínico importante la presencia de signos morfológicos displásicos, el cual se observa en un 15 % de los pacientes.

Citoquímica

Es utilizada para ayudar a tipificar el linaje de la LA, se basa fundamentalmente en las tinciones de la mieloperoxidasa, negro sudan y esterasas.

Citometría de flujo

La caracterización inmunofenotípica se lleva a cabo mediante una amplia batería de anticuerpos monoclonales; algunos de estos reaccionan con antígenos bien definidos, específicos para una determinada línea celular e incluso para un estadio madurativo concreto, otros son menos restrictivos pero cuando se emplean como parte de una serie, también prestan una valiosa contribución diagnóstica y pronóstica al delimitar nuevas variantes y reconocer leucemias con marcadores linfoides y mieloides. Esta técnica bien empleada, permite identificar la estirpe de la LA correctamente en un 98-99% de los casos.

Citogenética

El análisis citogenético proporciona una de las pruebas más sólidas disponibles para el pronóstico, prediciendo así resultados tanto de la inducción a remisión como el tratamiento post remisión, según se ve en el estudio del Southwest Oncology Group (SWOG) y el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (E-3489) [30].

Las anomalías citogenéticas que indican un pronóstico bueno son la t(8;21), inv(16) o t(16;16) y t(15;17) [Figura 3]. Las características citogenéticas normales presagian una LMA de riesgo regular. Los pacientes con LMA que se caracteriza por supresiones de los grupos grandes o monosomías de cromosomas 5 o 7; por translocaciones o inversiones de cromosoma 3, t(6;9), t(9;22); o por anomalías de cromosoma 11q23 tienen pronósticos particularmente precarios con quimioterapia.

Estos subgrupos citogenéticos predicen el resultado clínico en pacientes de edad avanzada con LMA al igual en pacientes jóvenes. Los genes de fusión formados en t (8;21) e inv (16) pueden ser detectados por reacción en cadena de polimerasa relacionada con la transcriptasa inversa (RCP-TI) o hibridación por fluorescencia in situ (FISH) la cual indicará la presencia de estas alteraciones genéticas en algunos pacientes en quienes la citogenética estándar era técnicamente inadecuada [31].

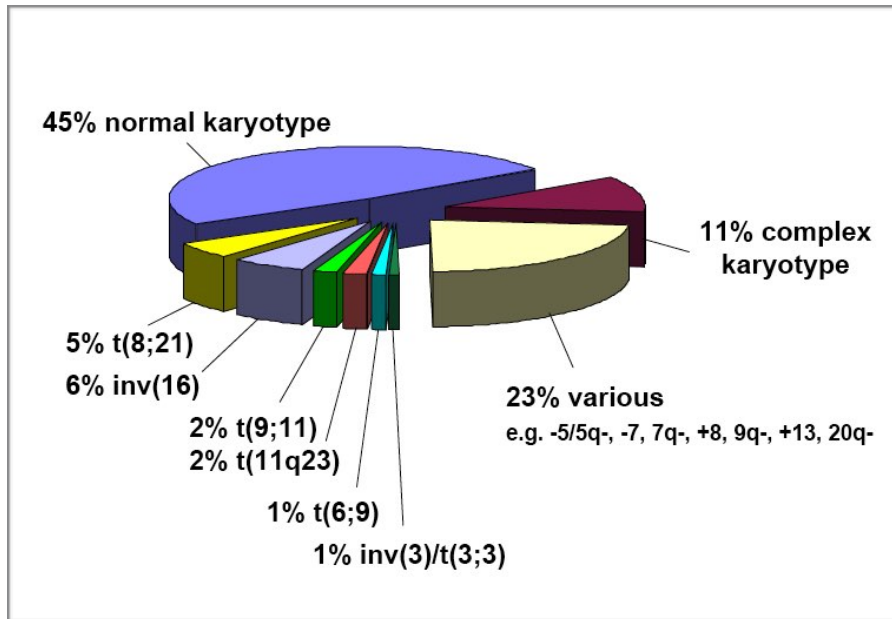


Figura 3. Análisis de los diferentes cariotipos de las leucemias agudas mieloblástica. [30]

La gran mayoría de las alteraciones típicas de las LA son reordenamiento equilibrados o balanceados y de varios de ellos se conoce su equivalente molecular o gen de fusión.

Biología molecular

Es uno de los campos en que más se ha avanzado en él diagnóstico, pronóstico y como dianas terapéuticas. Actualmente existen clasificaciones basadas en la expresión de determinados genes, por las cuales se toman algoritmos terapéuticos [Tabla 2 y figura 4] [31].

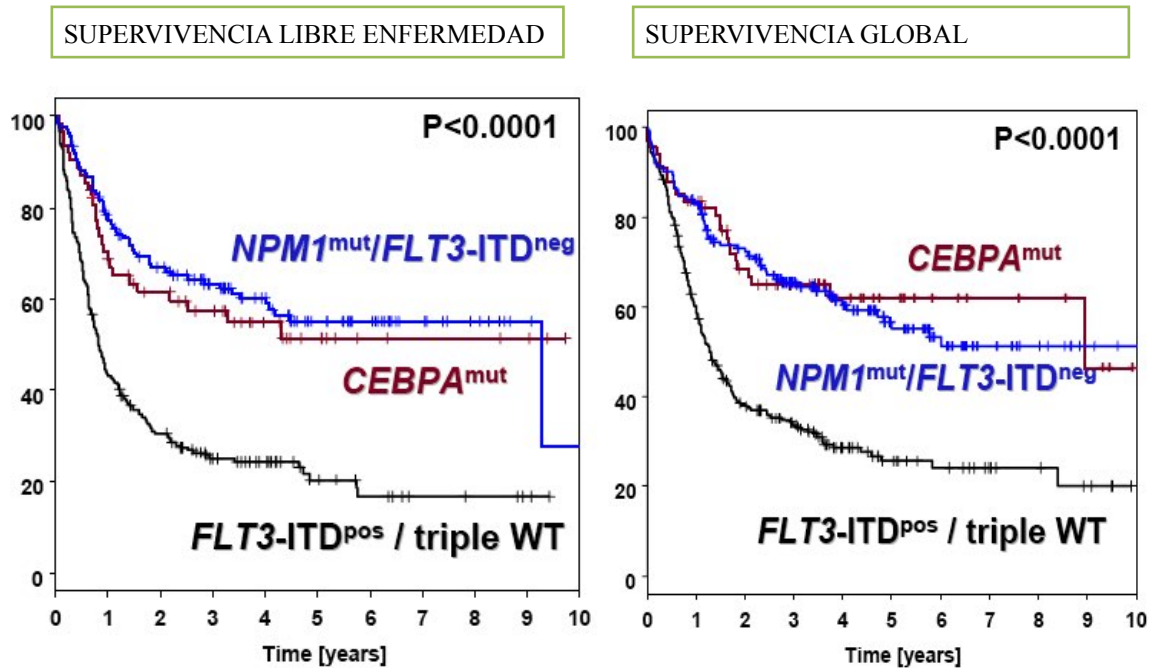


Figura 4. Análisis de SLE y la SG según alteraciones moleculares [31].

Anatomía patológica

La pieza analizada es el cilindro óseo, habitualmente de la cresta iliaca. En muchos centros de referencia, utilizan el estudio de medula ósea como factor pronóstico de gran relevancia, teniendo en cuenta la celularidad, el grado de afección y la estructura trabecular.

Riesgo	Citogenética	Molecular
Favorable	inv(16) o t(16;16)	Normal citogenética:
	t(8;21)	Aislado bialelico <i>CEBPA</i> mutación
	t(15;17)	<i>NPM1</i> mutación sin <i>FLT3</i> ITD
Intermedio	Normal citogenética	<i>KIT</i> mutación inv(16) o t(16;16) t(8;21)
	Aislado +8	
	t(9;11)	
Pobre	Complejo (≥ 3 anormalidades clonales)	Normal citogenética con: <i>FLT3</i> ITD
	Monosomía cariotipo	
	-5/-5q o -7/-7q	
	11q23 reordenamiento otro que t(9;11)	
	inv(3) o t(3;3)	
	t(6;9)	
	t(9;22)	

Tabla 2. Hallazgos citogenéticos y moleculares usados en la estratificación de riesgos de la LMA [29-30-32].

Dentro de los aspectos importantes a tomar en cuenta, cuando se planea el tratamiento de un paciente con leucemia aguda se encuentran [32]:

- 1) clasificación biológica de la leucemia en base a inmunofenotipo, citogenética y alteraciones genéticas moleculares
- 2) definición de grupos de riesgo en base a factores de impacto pronóstico conocidos
- 3) evaluación de enfermedad mínima residual para la redefinición de remisión completa y selección de tratamientos de acuerdo a ésta
- 4) uso de nuevas drogas y esquemas con dosis altas de quimioterapia
- 5) inmunoterapia
- 6) tratamientos dirigidos a blancos moleculares
- 7) avances en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

1.4.1. Trasplante de precursores hematopoyético

El trasplante de precursores hematopoyéticos es un procedimiento médico altamente especializado y complejo. Dentro del trasplante hematopoyético hablamos de dos modalidades: trasplante autólogo y trasplante alogénico.

En el trasplante autólogo las células progenitoras infundidas son las del propio enfermo; este procedimiento permite la administración de altas dosis de quimioterapia evitando la aplasia prolongada.

La otra modalidad es el Trasplante alogénico, en el que las células progenitoras infundidas son las de un donante emparentado o no emparentado.

En los últimos años el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (TPH) ha sido el arma terapéutica más efectiva para la curación de las leucemias

agudas, su eficacia se basa principalmente en el régimen de acondicionamiento y la respuesta inmunológica del donante.

Durante las últimas décadas el TPH ha evolucionado desde un procedimiento experimental hasta convertirse en el tratamiento estándar de muchas enfermedades neoplásicas como las leucemias agudas, síndromes mielodisplásicos, linfomas, mieloma múltiple y otras hereditarias, inmunes o genéticas como talasemia, anemia aplásica, enzimopatías etc. También es el tratamiento de elección de enfermedades no malignas, congénitas y adquiridas del Sistema Hematopoyético.

El primer trasplante alogénico lo realizó E. Donnall Thomas en 1957. Desde entonces, este procedimiento se ha incrementado exponencialmente, incorporando nuevas indicaciones ya aceptadas o en investigación, que incluyen enfermedades no neoplásicas congénitas y adquiridas como las inmunodeficiencias, anemias, enfermedades metabólicas y autoinmunes, siendo la indicación más frecuente las neoplásicas hematológicas.

Los primeros trasplantes alogénicos se comenzaron a realizar a partir de médula ósea de hermanos gemelos, validando su uso y con resultados favorables, posteriormente el conocimiento más profundo del Sistema HLA permitió crear los registros de donantes, en la actualidad existen más de 22 millones de donantes no emparentados en los registros. Esto ha permitido que más de la mitad de los trasplantes en pacientes que no tienen un donante familiar HLA idéntico se realicen a partir de un Donante No Emparentado, hoy en día con el uso de los factores estimulantes de colonias granulocíticas, la sangre periférica está utilizándose con mayor frecuencia.

Elianne Gluckman en 1989 publicó la realización del primer trasplante con sangre de cordón umbilical, fue en una niña con diagnóstico de Anemia de Fanconi. Actualmente existen en los bancos de cordones una gran cantidad de unidades

congeladas, lo cual garantiza que prácticamente todos los pacientes podrían tener opción de utilizar este recurso de precursores hematopoyéticos.

Aquellos pacientes que requieren un trasplante de precursores hematopoyéticos de realización urgente, la modalidad del cordón umbilical (SCU) o la del trasplante haploidéntico, pueden permitir que un gran número de pacientes cuya opción terapéutica mejor es el trasplante alogénico sean finalmente trasplantados dada la rápida disponibilidad [32].

I.4.1.1. Historia del Trasplante Hematopoyético

Al final de la II guerra mundial tras las bombas atómicas, se estudiaron los daños sufridos por la población que habían sobrevivido a la radiación, llegándose a la conclusión de que el Sistema hematopoyético, era el más sensible a la radiación y que la muerte debida a bajas dosis de radiación era debida principalmente al fallo medular secundario.

Investigaciones de TPH en ratones sugieren la posibilidad de realizar trasplantes de médula ósea, si el bazo era protegido con una lámina de plomo, posteriormente Lorenz et al. [31] demostraron cómo dicha protección podía hacerse también con la infusión de células procedentes de la MO.

En los años siguientes se desarrolla una intensa actividad investigadora en torno a este fenómeno de protección radiológica y al trasplante alogénico de tejidos. Los hallazgos en roedores posibilitan las experiencias piloto del grupo de

E.D.Thomas [32] sobre modelos caninos, que bien se pueden considerar el antecedente inmediato del trasplante de medula ósea (TMO) en humanos.

Experimentos posteriores demostraron cómo el efecto protector de la infusión de células de la medula ósea era debido a la transferencia de células vivas y de la producción de inmunotolerancia entre donante y receptor [33].

Tras los experimentos en animales se sacaron las conclusiones que la eficacia de la medula ósea en repoblar la hematopoyesis es similar independientemente de la vía de infusión utilizada, es un órgano inmunológicamente competente que produce un síndrome inmunológico, conocido actualmente como EICR.

También en estos experimentos se observó que la severidad de la reacción inmune está mediada genéticamente y que la histocompatibilidad está regida por un sistema mayor y varios menores. La utilización de metotrexato es capaz de prevenir y disminuir la intensidad de la reacción inmune de la EICR y el uso de Ciclofosfamida es capaz por sí sola de producir una inmunosupresión necesaria para permitir el injerto hematopoyético. En estos primeros experimentos se comenzó a conocer la importancia del timo, los linfocitos T y B, empezando los primeros pasos en el conocimiento de la biología del TPH [33].

La investigación en perros en el Fred Hutchinson Cancer Research Center, ha contribuido en gran medida al desarrollo del TPH. Se estableció las dosis de ICT necesarias para permitir el injerto y se comenzó a utilizar la ICT fraccionada, que fue mejor tolerada. Se estableció la eficacia de la Ciclofosfamida a altas dosis, similar a la de la ICT para permitir el injerto. Se comenzaron a realizar los primeros trasplantes autólogo de sangre periférica que lograron implantar con éxito. la depleción ex vivo de linfocitos y la asociación de timoglobulina a la ICT evitaban el fallo de implante. Fue documentada la importancia del tipaje HLA en el éxito del trasplante, teniendo mayor supervivencia aquellos perros que reciben un TPH idéntico. Se observó en perros que la utilización de dosis subletales de ICT asociada a ciclofosfamida y ciclosporina producían menor toxicidad y permitían un implante correcto, por lo cual a raíz de estos experimentos comenzó la era del TPH alogénico de intensidad reducida [33,34].

En 1957, Thomas et al. publican el resultado de las primeras experiencias de TPH alogénico en humanos, en las que tan sólo se consiguió un injerto temporal en uno de los pacientes. Al poco tiempo Mathé et al. publican su experiencia con la utilización de infusiones de medula ósea para tratar a un grupo de supervivientes de un accidente nuclear. Sin embargo, un análisis posterior de esta serie permite

afirmar que los injertos conseguidos se debieron probablemente a una reconstitución hematopoyéticas autóloga. En 1970 tras revisar los casos publicados hasta la fecha, concluyeron que ese tratamiento no era eficaz, por lo cual el trasplante fue abandonado por la mayoría de los investigadores.

Comienza a finales de los años 60, cuando se inicia también el desarrollo del sistema HLA; en 1968 el equipo de Minneapolis realiza un trasplante en un paciente con Inmunodeficiencia y el equipo de Seattle realizó un trasplante en un paciente afecto de leucemia. Estos primeros trasplantes pusieron en evidencia que la aplasia medular podía curarse sólo con ciclofosfamida (Cy) y que pacientes con leucemia avanzada podían curarse con Cy + ICT.

Los primeros trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogos realizados con células obtenidas de sangre periférica se llevan a cabo en el Hammersmith Hospital de Londres y en el Johns Hopkins Hospital de Baltimore. Sin embargo, la fecha en que esta técnica termina de asentarse definitivamente en la práctica clínica hay que situarla entre 1985 y 1986. En esos años, grupos de seis instituciones de distintas partes del mundo publican experiencias de TPH utilizando células de sangre periférica [32,33].

El régimen de acondicionamiento pretrasplante pretendía administrar un tratamiento mieloablativo con poder antileucémico e inmunosupresor, para permitir el injerto de las células del donante. No han sido muchos los avances en relación a los esquemas de acondicionamiento, todavía se utilizan los esquemas iniciales propuestos por Donald Thomas, como son los esquemas con ICT + altas dosis de ciclofosfamida, o busulfán más ciclofosfamida.

La edad media de los pacientes con enfermedades hematológicas candidatas a TPH es superior a los 60 años, lo cual marca que esta estrategia no está accesible a la mayoría de los enfermos con hemopatías malignas, por esta razón el empleo de regímenes no mieloablativos o de Intensidad reducida se utilizan con frecuencia, ya que mantienen el efecto injerto contra tumor [33,35].

Eventos relevantes en la historia del TPH

1977: se reportan los primeros 100 trasplantes alogénicos y los primeros autólogos.

1978: primeros autólogos para el tratamiento de linfomas. Se crea el EBMT (European Bone Marrow Transplant Group). Se realiza el primer trasplante con sangre periférica.

1980: se publican los primeros datos de CSA en la profilaxis de EICR.

1986: se crea en EEUU el NMDP (National Marrow Donor Program).

1988: se crea en Europa el BMDW (Bone Marrow Donor Worldwide).

1989: primer trasplante alogénico de sangre periférica y primer trasplante de cordón umbilical.

1990: primera infusión de linfocitos para tratar recaídas de leucemias. D. Thomas recibe el Premio Nobel de Medicina.

1990: se crea en España el Grupo GELTAMO (Grupo Español de Linfomas/Trasplante de Médula).

1994: se crea en España el Grupo GETH (Grupo español de Trasplante) y se crea en Estados Unidos de América el CIBMTR (Center International Bone Marrow Transplant Registry) (NMDP+IBMTR)

I.4.1.2. Fuente de progenitores

Medula ósea

- No contraindicación por edad.
- Precisa anestesia.
- Precisa autotransfusión del donante.
- El número de precursores hematopoyéticos es más limitado.
- Recuperación de neutrófilos y plaquetas mas lenta.
- Efectos secundarios como fatiga, dolor en zona de punción y complicaciones como hematomas locales.

Sangre Periférica

- No precisa anestesia.
- Se consiguen más precursores hematopoyéticos.
- Posible efecto adverso de los G-CSF.
- Recuperación de neutrófilos y plaquetas más rápida.
- Presenta mayor incidencia de EICR crónico.
- En el momento actual se utiliza en más del 95% de los autoTPH y el 65% de los aloTPH son de sangre periférica.

Sangre de cordón umbilical

- Facilidad de obtención.
- Inocuo para la madre y niño.
- Rápida disponibilidad.
- Menor reactividad inmunológica en el receptor del TPH.
- Reducido riesgo de transmisión viral.

- Mayor probabilidad de encontrar para minorías étnicas
- Número limitado de células madres.
- Mayor riesgo de fallo de implante.
- Retraso en la recuperación hemoperiférica.
- No transferencia de Linfocitos T y B con memoria.
- Riesgo de transmisión de enfermedades genéticas no reconocibles al nacimiento.

I.4.1.3. Enfermedad injerto contra receptor

La enfermedad de injerto contra receptor agudo es una de las complicaciones con mayor morbi-mortalidad en el periodo post-TPH. En este proceso los linfocitos T del donante reconocen alo-antígenos que activan la presentación de antígenos, con la consecuente activación de la cascada inflamatoria produciendo un daño tisular que puede llegar a ser mortal.

Hay que tener en cuenta que este proceso se desarrolla de forma caótica en intensidad, severidad y mantenimiento, no presenta una relación lineal temporos espacial, por lo cual se hace dificultoso anteceder a la aparición del mismo.

Fisiopatología

Para el desarrollo de la EICR se requiere que las células inmunocompetentes del injerto reconozcan proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad no expresadas en el donante, siendo también importantes las discrepancias a nivel de los antígenos menores de histocompatibilidad [34,36].

La patogénesis es muy compleja, de manera que se pone en juego el sistema inmunológico del receptor y del donante, podemos dividirla en tres fases [34]:

Fase 1

Enfermedad de base, tipo de acondicionamiento recibido, profilaxis de EICH, descontaminación intestinal realizada, daño orgánico, infusión de precursores hematopoyéticos y tormenta de citoquinas.

El daño tisular inducido fundamentalmente por el régimen de acondicionamiento previo al trasplante u otros procesos inflamatorios intercurrentes como por ejemplo infecciones, dan lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias que son responsables de la activación de las células dendríticas (CDs) del huésped, necesarias para el inicio de las respuestas inmunes primaria y secundaria.

Fase 2

Activación de los linfocitos T, aloreactividad de linfocitos T del donante, diferenciación, activación y migración.

-La presentación de antígenos a las CDs una vez activadas actúan como presentadoras de antígenos del huésped a los linfocitos T del donante provocando su activación, proliferación y diferenciación.

-Citoquinas y quimioquinas. La activación de los linfocitos T resulta en la transcripción de genes de citoquinas y/o de sus receptores. Los linfocitos T CD4 del donante productores de interleuquina 2 (IL-2) amplifican la respuesta aloinmune. Otras citoquinas, como la interleuquina 15 (IL-15) o IL-6 desempeñan un papel clave en el proceso de activación y expansión de los linfocitos T. El Interferón-gamma (IFN-g) facilita la presentación de antígenos aumentando la expresión de moléculas de adhesión y de moléculas HLA y es además un mediador en el proceso de daño tisular. Las quimioquinas inflamatorias expresadas por los tejidos dañados son las responsables de la migración de las células inmunes a los órganos linfoides secundarios y a los tejidos diana. Los linfocitos T CCR5+, que producen citoquinas Th1, se asocian al desarrollo de EICR [35].

Fase 3

Fase efectora celular e inflamatoria.

-Los efectores celulares principales de la EICR aguda son los linfocitos T citotóxicos y las células NK.

-Las citoquinas inflamatorias TNF-a e IL-1 inducen daño tisular directamente mediante la inducción de apoptosis y necrosis. El TNF-a activa las CDs y aumenta la presentación de aloantígenos. Induce la producción de quimoquinas inflamatorias que son las que reclutan linfocitos T, neutrófilos y monocitos a los órganos afectados [37].

I.4.1.3.1. Clínica de la EICR aguda

Las características clínicas están marcadas por el efecto citotóxicos de los linfocitos del donante contra las células del receptor, las más frecuentes son las células epiteliales de la piel, células de los conductos biliares y de las criptas en la mucosa intestinal.

Se ha denominado históricamente al EICR aguda al evento que ocurría en los primeros 100 días postrasplante. No obstante utilizando los criterios establecidos por el NIH [tabla 3] es la sintomatología y no el momento de aparición la que determina el diagnóstico diferencial entre EICR aguda o crónica, incluso es posible la coexistencia de signos y o síntomas atribuibles tanto a EICR aguda como crónica [38].

Piel

Las manifestaciones cutáneas suelen ser eritema maculopapuloso que habitualmente es pruriginoso y/o doloroso, puede ser localizado en palmas, plantas, orejas, mejillas, cuello, cara interna de muslos, tronco y flancos, no obstante las formas generalizadas suelen ocurrir. En sus formas avanzadas puede manifestarse con descamación cutánea, formación de bullas y necrosis epidérmica. La afectación cutánea se clasifica en 4 grados, según la severidad [tabla 4]. El diagnóstico diferencial de la EICRa cutánea incluye los efectos de la quimioterapia ó radioterapia, alergia a fármacos e infecciones virales

Hepático

La alteración del perfil enzimático hepático suele asociarse a manifestaciones cutáneas y/o intestinales. Estas alteraciones de la bilirrubina y fosfatasa alcalina se asocia al aumento de las transaminasas, cuando esto sucede tenemos que realizar el diagnóstico diferencial con enfermedad veno oclusiva hepática, infecciones, toxicidad por fármacos, etc. La biopsia es de utilidad cuando no existes otro órgano afecto por esta complicación post TPH, cuando se realiza los hallazgos son característicos y patognomónicos [tabla 5].

Digestivo

Es la manifestación clínica que suele ser la más severa y en algunos casos la de menor tasa de respuesta al tratamiento inmunosupresor.

Las manifestaciones clínicas son anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal de tipo cólico y en casos graves hemorragia. Los diagnósticos diferenciales suelen ser: toxicidad gastrointestinal inducida por el régimen de acondicionamiento, infecciones víricas o bacterianas, por lo que es necesario realizar estudios microbiológicos seriados y la biopsia es necesaria para el

establecer el diagnóstico definitivo de EICRa digestivo, dado que los hallazgos anatomopatológicos [39].

Los pacientes que solo presentan síntomas de EICR de localización alta como son: anorexia, dispepsia, náuseas y vómitos, sin diarrea, presentan una mayor tasa de respuesta al uso de esteroides y menor severidad de los síntomas, estos datos clínicos son utilizados a la hora de plantear el uso de tratamientos más intensos. [38,39].

Otros órganos

Afecta también al tejido linfoide y de esta manera una disminución de los centros germinales y anomalías en las poblaciones linfoides, analíticamente se manifiesta como inversión del cociente CD4/CD8. Estos daños producidos por la reactividad linfoide aumentan el riesgo de desarrollar infecciones severas en el periodo postrasplante.

También se han observado síntomas oftalmológicos como fotofobia, conjuntivitis hemorrágica y formación de pseudomembranas, estas manifestaciones se han asociado a peor supervivencia [36,39].

I.4.1.3.2. Factores de riesgo para el desarrollo de EICR agudo

Factores que predisponen a mayor riesgo de EICR agudo

- Tipo de acondicionamiento, si es mieloablativo o de intensidad reducida.
- Diferencias en el HLA o la utilización de un Donante no emparentado.
- Elegir donantes como mujeres con embarazos previos.
- Edad, mayores de 45 años en los donantes.
- Donante mujer - receptor varón.
- Tipo de PHP, mayor en sangre periférica que medula ósea.
- Cantidad de linfocitos T infundidos.
- Mayor celularidad de CD34.
- Tipo de profilaxis de la EICR utilizada.
- No alcanzar los niveles deseados del inmunosupresor, mayor evidencia con la ciclosporina.
- No utilizar descontaminación intestinal.

I.4.1.3.3. Graduación del EICR

La enfermedad injerto contra receptor aguda fue clasificada de 0 a 4 según los criterios de Glucksberg et al [41]. La enfermedad injerto contra huésped crónica fue clasificada como limitada o extensa según criterios de Shulman et al [38]. La graduación se realiza teniendo en cuenta el grado de afectación hepática, digestiva y cutánea, estos datos son obtenidos del laboratorio, anatomía patológica y signos clínicos [40].

Categoría	Momento aparición	de Síntomas de EICHa	Síntomas característicos de EICHa	Síntomas característicos de EICHc
EICHa				
Clásica	< 100 días postrasplante	Sí	No	No
Persistente, recurrente o tardía	> 100 días postrasplante	Sí	No	No
EICHc				
Clásica	Sin límite temporal	No	Sí	Sí
Mixto ó compuesto	Sin límite temporal	Sí	Sí	Sí

Tabla 3. Clasificaciones EICR, según momento aparición y síntomas [40].

Organo	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Piel	Rash eritrodermia <25% SC	Rash	Rash 25-50% SC	Rash >50% SC con bullas
Higado	Bilirrubina Bilirrubina 2-3mg/dL	Bilirrubina 3,1-6mg/dL	Bilirrubina 6,1/15mg/dL	>15mg/dL
Intestino	Diarrea >500mL/día >2000mL/día	Diarrea >1000mL/día	Diarrea	Diarrea >1500mL/día o dolor abdominal severo con o sin parálisis

Tabla 4. Gradación según afectación por órgano y severidad [40].

Grado total	Piel	Hígado	Intestino	ECOG
I Leve	1-2	0	0	0
II Moderado	1-3	1	1	0-1
III Severo multiorgánico	2-3	2-4	2-3	2-3
IV Peligro de muerte	2-4	2-4	2-4	3-4

Tabla 5. Gradación clínica [40].

I.4.1.3.4. Tratamiento y profilaxis

Valorando las distintas fases de la fisiopatogenia de la EICR y teniendo en cuenta el conocimiento de los mecanismos implicados en su desarrollo existen diseños de nuevas aproximaciones que están demostrando una eficacia importante tanto desde el punto de vista profiláctico como también terapéutico.

Se han diseñado estrategias en relación a la prevención, que son las que actúan sobre las fases I y II de la patogénesis y otras que han sido encaminadas al tratamiento del EICR, estas intentan manipular las fases II y III [40,41].

Pautas estándar de profilaxis

La estrategia farmacológica primaria para prevenir la EICR aguda es la utilización de los inhibidores de la calcineurina, enzima fundamental para la activación de los linfocitos T. El Tacrólimus y la Ciclosporina A son similares en cuanto a la eficacia clínica, el mecanismo de acción y los efectos tóxicos incluyendo la hipomagnesimia, la hiperpotasemia, la hipertensión y la nefrotoxicidad [41].

Se han comparado otras estrategias como son la combinación de Tacrólimus/ Metotrexate la cual permitió reducir el riesgo de EICR en trasplante de donante no emparentado, estos estudios sugieren que la combinación de un inhibidor de calcineurina (CsA o Tacrólimus) más Metotrexate, representa el tratamiento de elección en la actualidad [42].

Nuevas estrategias de profilaxis

La Ciclofosfamida postrasplante es capaz de generar un efecto citotóxico selectivo sobre los linfocitos T que se encuentran en fase de división celular, sin alterar la viabilidad del resto de poblaciones linfoides. Esto permite realizar trasplantes haploidénticos con depleción in vivo linfoide T con una incidencia de

EICR similar al resto de las modalidades de trasplante utilizadas [46]. También existen datos de sus optimistas resultados cuando se utiliza en donantes HLA idénticos, no obstante son resultados que necesitan su análisis a largo plazo [43].

Estrategias de tratamiento de la EICR

El tratamiento de elección de la EICR continúa siendo los esteroides, en relación a la dosis existe un estudio donde demuestran que las dosis estándar de 2mg/kg/día de 6 metilprednisolona serían similares en eficacia a dosis más bajas [44].

Además del sistémico, el tratamiento tópico constituye una herramienta clave para el control de la sintomatología sin tener que recurrir al incremento de tratamiento inmunosupresor; en este sentido, la Beclometasoma dipropionato ha mostrado su eficacia en estudios prospectivos randomizados en combinación con dosis bajas de 6 metilprednisolona, aumentando la tasa de respuestas e incluso la supervivencia a un año en pacientes con EICR agudo digestivo e incluso permite obtener un elevado porcentaje de respuestas en ausencia de tratamiento sistémico con esteroides [45].

Varios ensayos clínicos han tratado de validar algún tratamiento para utilizar en aquellos pacientes que son refractarios a los esteroides, también ha sido fallido el intento de valorar respuestas tanto en EICR agudo como crónico en asociar un segundo fármaco inmunosupresor a los esteroides dentro de la primera línea de tratamiento [46], no existe un tratamiento que pueda considerarse estándar, habiéndose empleado Mofetil Micofenolato (MMF), Sirólimus, Alemtuzumab, ATG, Pentostatina, etc.

Nuevas estrategias de tratamiento: terapia celular

Las estrategias más interesantes desde el punto de vista de la fisiopatología de la EICR, son las terapias celulares, como son el uso de células mesenquimales o linfocitos T reguladores (CD4+/CD25+). También la fotoaféresis extracorpórea ofrece buenos resultados, su mecanismo de acción reside en alterar la proporción de subpoblaciones linfocitarias, mejoraría las manifestaciones cutáneas eritematosas y esclerodermiformes además de las extracutáneas propias de la EICR crónica [47,48].

En relación con el uso de células mesenquimales, se ha fracasado en el intento de emplearlas en la estrategia de profilaxis [47], ya que no se vio menor incidencia de EICR cuando se empleaba desde el día 0 del TPH. En relación al tratamiento, diversos estudios han descrito la eficacia con una tasa de respuestas variable en función de la línea de tratamiento en que se han utilizado, la severidad de la EICH y el órgano afecto [48].

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

II.1. Hipótesis

La familia de enzimas glutatión S-transferasas (GSTM1 y GSTT1) está involucrada en el metabolismo de carcinógenos ambientales y drogas quimioterápicas. Su capacidad inmunógena y relación con el rechazo agudo ha sido demostrada en el trasplante de órganos sólidos [3,5,7,8].

Atendiendo a los resultados obtenidos en diferentes publicaciones relacionadas con los trasplante de órganos sólidos, se ha propuesto la posibilidad del reconocimiento alogénico de las proteínas GSTM1 y GSTT1 por el receptor cuando se somete a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos [1,7,15].

Son numerosos los intentos realizados para obtener algún método diagnóstico que pueda prevenir la aparición de la enfermedad injerto contra receptor aguda y de esta manera, poder adelantarse a los síntomas clínicos de la misma [103,104]. Además, tras esta complicación cuando la respuesta inflamatoria se encuentra ya establecida, son pocos los pacientes que responden a tratamientos de segunda línea [101,102].

Tras todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo se ha planteado el estudio de la variabilidad genética, ausencia frente a presencia del alelo GSTM1 o GSTT1 entre donante y receptor, y su posible relación con la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda en pacientes con leucemia aguda sometidos a trasplante alogénico mieloablativo.

II.2. Objetivos

Se plantean como objetivos los siguientes:

Principales

1. Analizar la incidencia de los alelos GSTM1 y GSTT1 en aquellos pacientes sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos y en sus respectivos donantes.
2. Relacionar la presencia/ausencia de los alelos GSTM1 y GSTT1 entre donante y receptor con la enfermedad injerto contra receptor aguda e intentar determinar su valor como posible factor predictivo.
3. Comparar los diferentes tipos de profilaxis utilizados para la enfermedad injerto contra receptor aguda en los pacientes sometidos al trasplante hematopoyético y relacionarla con la expresión de los alelos GSTM1 y GSTT1.

Secundarios

1. Analizar y relacionar en esta serie de pacientes aquellas variables que tienen asociación ya conocida con la enfermedad injerto contra receptor aguda.
2. Evaluar en la serie estudiada si la expresión de los alelos GSTM1 y GSTT1 está relacionada con la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor crónica, toxicidad hepática relacionada con el trasplante, recaída de la enfermedad de base, mortalidad y supervivencia global.
3. Valorar la respuesta al tratamiento inmunosupresor de la enfermedad injerto contra receptor aguda, analizando los resultados en las diferentes líneas de tratamiento utilizadas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III. MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III.1. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes con leucemia aguda, sometidos a TPH alogénico.

III.2. POBLACIÓN ESTUDIADA

Se han estudiado en total 92 pacientes diagnosticados entre 1999 y 2009 en el Hospital Regional Universitario de Málaga, incluyendo en la serie también pacientes del Hospital Materno Infantil de Málaga, en total 59 pacientes pertenecieron al hospital de adultos y 33 al pediátrico. El criterio de inclusión fue que los pacientes tuvieran diagnóstico de hemopatías malignas y se sometieran a trasplante hematopoyético alogénicos.

III.2.1. Variables estudiadas

Variables relacionadas con el paciente y la enfermedad de base

- Hospital de procedencia: Se considero el hospital donde se realizo el TPH, Hospital Carlos haya / Hospital Materno Infantil (variable cualitativa nominal policotómica).
- Edad: valorada en años, (variable cuantitativa continúa).
- Sexo: femenino o masculino, (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Enfermedad de base: se lo considero al diagnóstico previo al TPH, Leucemia mieloblástica aguda (LMA), Leucemia linfoblastica aguda (LLA), LMA secundaria, (variable cualitativa nominal dicotómica).

- Respuesta al tratamiento: se valoró la respuesta previa al TPH, 1ª remisión completa (1RC), 2ª remisión completa (RC2), no remisión (NR), (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Positividad para el alelo GSTM1 y GSTT1 en donante y receptor, (variable cualitativa nominal policotómica).

Variables relacionadas con el tratamiento previo al trasplante

- Tipo de acondicionamiento utilizado: diferentes tipos de acondicionamiento quimioterápicos y asociados a irradiación corporal total (ICT), (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Esquema de acondicionamiento con ICT versus (vs) a aquellos que solo utilizaron quimioterapia, se los asocio en ICT vs. ICT + quimioterapia, (variable cualitativa nominal dicotómica).

Variables relacionadas con el TPH

- Tipo TPH: el tipo de donante utilizado se lo valoro en Donante emparentado (DE) versus donante no emparentado (DnE) (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Identidad del HLA: se valoró la identidad del HLA del donante ,idéntico en el HLA vs no idéntico, (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Tipo de progenitor: tipo de precursor utilizado en el TPH, médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y sangre cordón umbilical (SCU) (variable cualitativa nominal dicotómica).
- EICR agudo: se valoró la aparición de síntomas de EICR, presencia vs ausencia del mismo (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Grado EICR: grados clínicos de la EICRag. valorado en I, II, III y IV, (variable cualitativa ordinal policotómica).

- Grado EICR: grados clínicos agrupados en leves 0-I vs. severos II-IV (cualitativa nominal dicotómica).
- Localización EICR agudo: se valoró la localización clínica ,intestinal, cutánea, hepática, mixta (variable cualitativa nominal policotómica).
- EICR crónico: se valoró la presencia vs ausencia del mismo (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Grado EICR crónica: se valoró los grados clínicos del EICR crónico en Leve, moderado o severo (variable cualitativa nominal policotómica).
- Tratamiento utilizado en la enfermedad injerto contra receptor aguda, se enumeran los diferentes tipos utilizados (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Toxicidad hepática: valorado en grado clínicos según afectación de enzimas hepáticas, I, II, III o IV (variable cualitativa ordinal policotómica).
- Mortalidad relacionada con el TPH: la mortalidad que sucedió en el momento del TPH, presencia vs ausencia (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Causas de muerte: análisis de las diferentes causas de muerte en la serie de pacientes (variable cualitativa nominal dicotómica).

Variables evento: respuesta, recaída y muerte

- Recaída: recaída de su enfermedad de base post trasplante, sí vs. no (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Respuesta al tratamiento del EICR: respuesta favorable al tratamiento comenzado, si vs. No (variable cualitativa nominal dicotómica).
- Evento muerte: presencia vs ausencia de la misma, sí vs. no (variable cualitativa nominal dicotómica).

Variables tiempo

- SG: cuantitativa continua. Se define como SG al tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa o fecha de último control.

III.3. Métodos de estudio

III.3.1. Extracción y obtención de DNA

El ADN genómico fue extraído en los 92 pacientes y donantes de sangre periférica total, unos 30 días antes del trasplante de precursores hematopoyéticos, utilizando procedimientos convencionales (kit de aislamiento de ADN Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), y se almacenó a -80 C° hasta que se han realizado las determinaciones mediante la técnica de PCR.

III.3.2. Calidad de DNA

Utilizamos para medir la concentración y pureza del ADN el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000. Aceptando como indicador la relación de absorbancias a las longitud de onda entre 260nm y 280nm para el ADN. Con un rango de detección de 2ng/μL (dsDNA).

III.3.3. Análisis del ALELO NULO/Amplificación de PCR en tiempo real

Esta detección se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la amplificación de los cebadores siguientes: *GSTT1* cebador 5´-TTC CTT ACTO AAC GGT CAC ATC TC -3»; *GSTT1* Primer inversa 5´-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3»; *GSTM1* cebador 5´- GAA CTC AAC GAA AAG CTA AAG C -3», y *GSTM1* Primer inversa 5´- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G -3».

Cada reacción de 25 µl PCR contenía 2,5 µl de 10X tampón de reacción con MgCl₂ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 10 pmol de cada cebador, 100 pmol / µl cada uno de desoxinucleósidos trifosfato (deoxyATP, el trifosfato de desoxiguanosina, el trifosfato de desoxicitidina, y el trifosfato de timidina, Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA) en Tris - HCl, 1 unidad de Taq ADN polimerasa HotStar (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), y 100 ng de DNA genómico de plantilla a temperatura de templado de 58 °C durante 40 ciclos.

En los alelos nulos, todos los cebadores y sondas hibridan dentro del gen correspondiente.

Se determinaron estos alelos nulos antes que el paciente haya sido sometido al trasplante de precursores hematopoyéticos, luego del trasplante se han determinado cada 2-3 meses coincidiendo con la determinación de los alelos nulos de las técnicas de quimerismo.

LightCycler: Condiciones de ejecución

Se utilizó para realizar la PCR en tiempo real el tecnología LightCycler.

Se establecieron condiciones similares para todas las carreras: 100 ng de ADN genómico se añadió a 20 µl de volumen de reacción que contiene 0,4 mmol / l cada cebador, 0,2 mmol / l. anclar y sonda de sensor y 2 µl de sondas de ADN Fast Star LightCycler Maestro de hibridación (Roche Molecular Biochemicals) que incluían tampón, Taq ADN polimerasa y MgCl₂. La concentración final Mg²⁺ en la mezcla de reacción se ajustó a 3,5 mmol / l en todos los casos, a excepción de SRY, que era 4,5 mmol / l. beta globina, que se utiliza como un gen de referencia, se amplificó en la misma ejecución y siguiendo el mismo procedimiento descrito para cada marcador. Los cebadores y sondas para la amplificación beta globina fueron proporcionados en un kit comercial (ADN kit de control LightCycler, Roche). Los condiciones del programa solicitado QRT-PCR fueron probados previamente.

Cuantificación de la muestra

Con el fin de reducir la variación entre los diferentes ensayos y muestras, se utilizó un procedimiento basado en la cuantificación relativa de los genes diana vs su control en relación con los cálculos de referencia gene.³¹, se llevaron a cabo automáticamente por el software LightCycler (RelQuant, versión 1.0, Roche).

La Eficiencia de cada gen se calcularon a partir de las laderas del punto de cruce (C_p) vs parcelas de concentración de ADN, según el E^{1/4}10 fórmula ($-1 /$ pendiente).

III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de la serie. Los resultados se expresaron como porcentajes en las variables categóricas y como medianas (extremos) para las variables continuas.

En el análisis univariante se determinó el grado de relación existente entre dos variables cualitativas realizamos tablas de contingencia, utilizando el test de Chi cuadrado, corregido con el test de Fisher en los casos en que el tamaño de la muestra es reducido y se observan pocos eventos. El nivel de significación estadística para apoyar la dependencia de las variables fue de 0.05. Describimos el tiempo hasta el evento desarrollando las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan Meier y para comparaciones las pruebas de log rank obteniendo la función de probabilidad de supervivencia.

Para el análisis multivariante, las variables con un valor de $P < 0.10$ fueron incluidas en los análisis usando el método de riesgo proporcional de Cox para eventos temporales (observaciones incompletas, Cox DR. 1972) o el método de Fine and Gray para la incidencia acumulativa (Fine JP, Gray RJ. 1999), se utilizó para la MRT, EICR aguda y crónica, la recaída, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. El análisis estadístico se realizó usando el SPSSv17.

III.5. UTILIZACIÓN DE LA EXPRESION DEL ALELO COMO FACTOR PREDICTIVO

El análisis de su validez puede obtenerse calculando los siguientes valores:

Sensibilidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Especificidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. Se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Valor predictivo positivo

Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Valor predictivo negativo

Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV. RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV.1. PACIENTES

En la serie de pacientes estudiada un 43% de los receptores del TPH (40 pacientes) fueron mujeres, siendo el restante 57% hombres (52 pacientes). La edad media de nuestra serie fue de 38 años (rango 3 años - 63 años). Al no existir diferencia por grupos de edades en la expresión de los alelos GSTT1 y GSTM1 y de no existir diferencias en la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda, los análisis de los resultados en relación con la edad fueron globales. El seguimiento de la serie fue mínimo de 180 días.

El diagnóstico de los pacientes fue de leucemia aguda en el 100% de los casos, en 35 pacientes correspondió a leucemia mieloblástica aguda (LMA), en 47 pacientes a leucemia linfoblástica aguda (LLA) y 10 pacientes fueron LMA secundarias en un 100% de los pacientes a síndromes mielodisplásicos [Figura 5].

Todos los pacientes estudiados fueron sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyético (aloTPH).

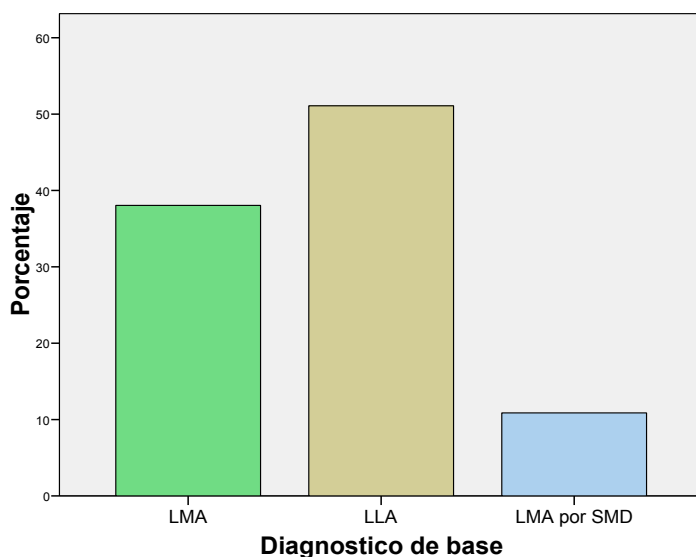


Figura 5. Diagnósticos de los pacientes sometidos a TPH.

En el momento de someterse al trasplante alogénico un 45% de los pacientes se encontraban en primera remisión completa (1RC) de la enfermedad y el 37% (34 pacientes) que ingresó para realizar el TPH encontrándose en segunda remisión completa (2RC o más), esto último indica que un tercio de la serie precisó de más ciclos de quimioterapia tras la primera recaída de su enfermedad de base. No obstante siendo el TPH también un tratamiento en pacientes refractarios, hubo un 18% (17 pacientes) que ingresaron sin remisión de su enfermedad (NR) [Figura 6].

SITUACION PREVIA AL ALO TPH

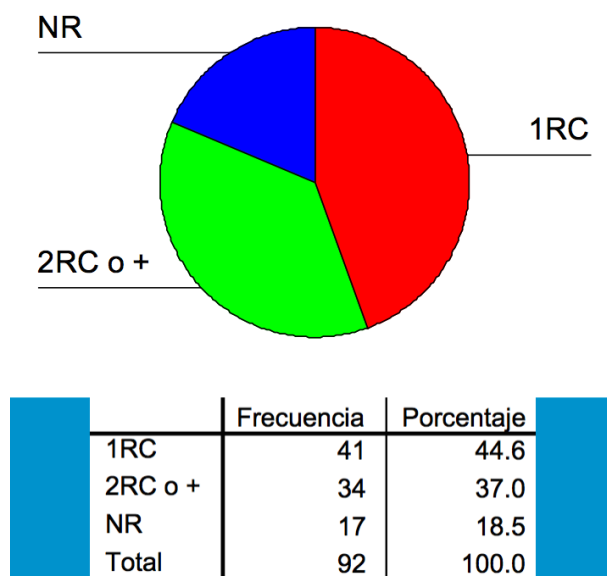


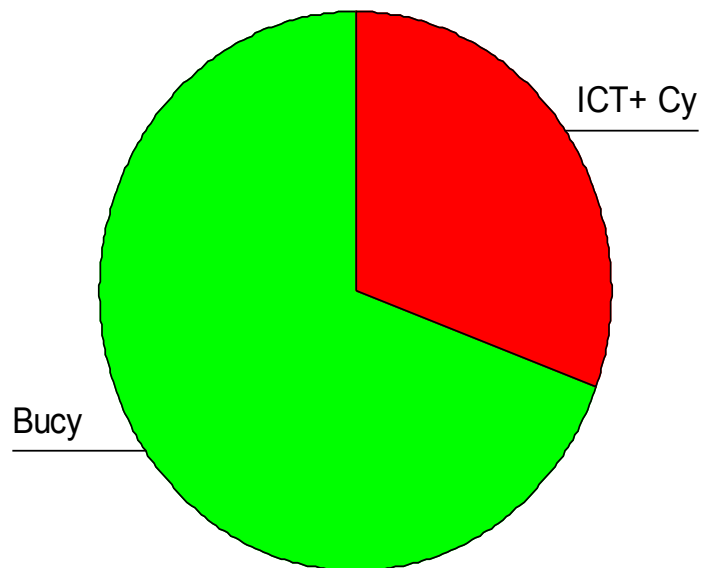
Figura 6. Situación previa al TPH.

En relación con el acondicionamiento previo a la infusión de precursores hematopoyéticos utilizado en la serie estudiada, en el 100% de los casos fue de tipo mieloablativo. Se utilizó en 64 pacientes (68%) el esquema BuCy, el cual consiste de Busulfán a dosis de 4 mg/Kg/ los días -7 a -4 del TPH, asociado a Ciclofosfamida 50 mgr/Kg. los días -3 y -2 del TPH [Figura 7].

Se administró en 28 pacientes (31%) irradiación corporal total (ICT) a dosis de 12 Gy, repartido en 6 sesiones en total, de 2 Gy por sesión. Se asoció a la ICT a Ciclofosfamida a dosis de 60 mg/kg los días -6 y -5 del TPH.

En aquellos receptores en el cual su donantes era no emparentado o presentaba alguna disparidad en el HLA se asoció al esquema de acondicionamiento Timoglobulina (2,5 mg/kg/día) los días -5,-4,-3 del TPH.

Regimen de acondicionamiento



	Frecuencia	Porcentaje
ICT+ Cy	28	30.4
BuCy	64	69.6
Total	92	100.0

Figura 7. Regímenes de acondicionamiento empleados.

En un 70%, 64 pacientes, el donante fue emparentado (DE), siendo el 30% restante donantes no emparentados. En relación al HLA, sólo en el 13% (12 pacientes) de de los receptores existió disparidad con su donante, la disparidad fue de 9/10 en todos los casos [tabla 6].

Como fuente de progenitores hematopoyéticos se utilizó médula ósea en 41 pacientes (44%), sangre periférica en 43 (46%) y cordón umbilical en 8 (10%).

Disparidad del HLA

	Frecuencia	Porcentaje
idéntico	80	87.0
no idéntico	12	13.0
Total	92	100.0

Tipo de progenitores

	Frecuencia	Porcentaje
SP	43	46.7
MO	41	44.6
SC	8	8.7
Total	92	100.0

Tipo de donante

	Frecuencia	Porcentaje
DE	64	69.6
DnE	28	30.4
Total	92	100.0

Tabla 6. Disparidad HLA, tipo progenitores y tipo de donante.

La profilaxis de la enfermedad injerto contra receptor aguda en los pacientes sometidos a trasplantes de donante emparentado se realizó con:

- Ciclosporina a dosis de 1.5 mg/Kg./12 h iv desde día +1, asociado a Metotrexate intravenoso en pauta corta, a 10 mg/m² iv los días +1, +3 y +6 post TPH.

En los receptores de donante no emparentado se utilizaron combinaciones de:

- Tacrólimus a dosis de 0.02 mg/Kg/día intravenoso en infusión continúa desde el día -3 del TPH.

- Sirólimus a dosis de 8 mg vía oral comenzando el día -3 del TPH, continuando con 2 mg/día vía oral.

- ATG a dosis de 2,5 mg/kg/día los días -5,-4,-3 del TPH.

De los 92 pacientes estudiados en la serie un 37 %, 40 pacientes, desarrollaron enfermedad de injerto contra receptor aguda (EICRag.) grado II-IV

En relación con el sitio donde fueron las manifestaciones clínicas, observamos que del 37% total de incidencia de EICRag. la localización fue en un 12% cutánea, 3% hepática, 6 % intestinal y en un 13% combinado cutáneo con digestivo [Tabla 7].

LOCALIZACION EICR

	Frecuencia	Porcentaje
CUTANEO	14	12.0
HEPATICO	3	3.0
INTESTINAL	5	6.0
Piel + intest	12	13.0
Total	34	37.0

Tabla 7. Localización enfermedad injerto contra receptor.

IV.2. RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES GST CON LAS VARIABLES ESTUDIADAS

En la serie estudiada observamos que el 75% de los receptores del TPH mostró expresión del alelo del gen GSTT1 (GSTT1+) y el 55% lo fue para el alelo de GSTM1 (GSTM1+), mientras que el 75% de los donantes de precursores hematopoyéticos expreso el alelo GSTT1+ y el 53% fue GSTM1+ [Figura 8].

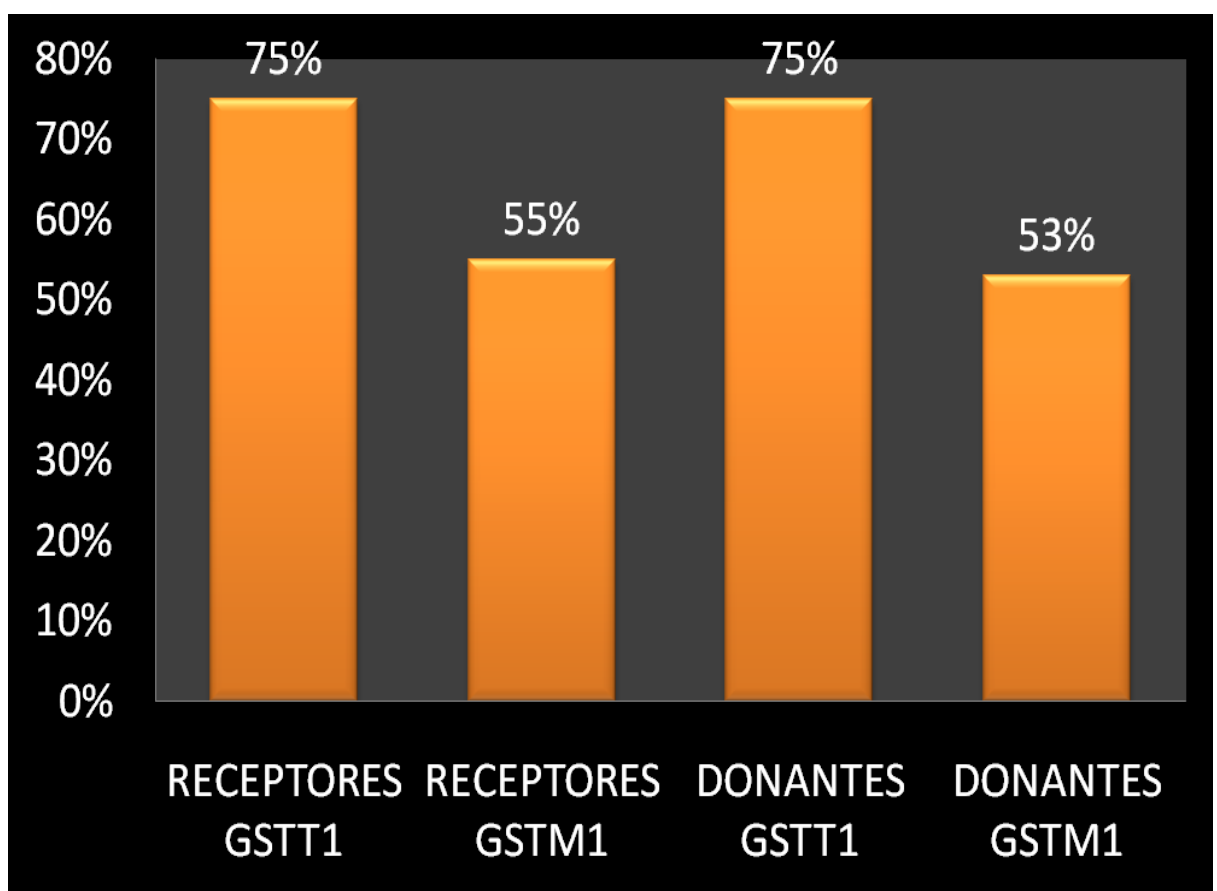


Figura 8. Distribución en la expresión de los diferentes alelos.

Analizamos en los receptores y en los donantes las diferentes combinaciones de la expresión de los alelos GSTM1 y GSTT1, estos fueron los resultados [Figura 9 y tabla 8].

En relación con la expresión de los alelos GSTT1 encontramos que:

- El subgrupo en donde tanto donante como receptor expresaban el alelo fue de un 64 %.
- El subgrupo de donante positivo (D+) y receptor negativo (R-) fue de un 11 %.
- El subgrupo de donante negativo (D-) y receptor positivo (R+) también ha sido de un 11 %.
- El subgrupo de donante negativo (D-) y receptor negativo (R-) ha sido de un 14 %.

En relación con la expresión del alelo GSTM1 el análisis de los subgrupos fue el siguiente:

- Un 20.7 % en el subgrupo que tanto donante como receptor expresaban el alelo GSTM1.
- El subgrupo de donante positivo (D+) y receptor negativo (R-) fue de un 22.8 %.
- En el subgrupo de donante negativo (D-) y receptor positivo (R+) los resultados fueron de un 23.9 %.
- El subgrupo de donante negativo (D-) y receptor negativo (R-) ha sido de un 32.6 %.

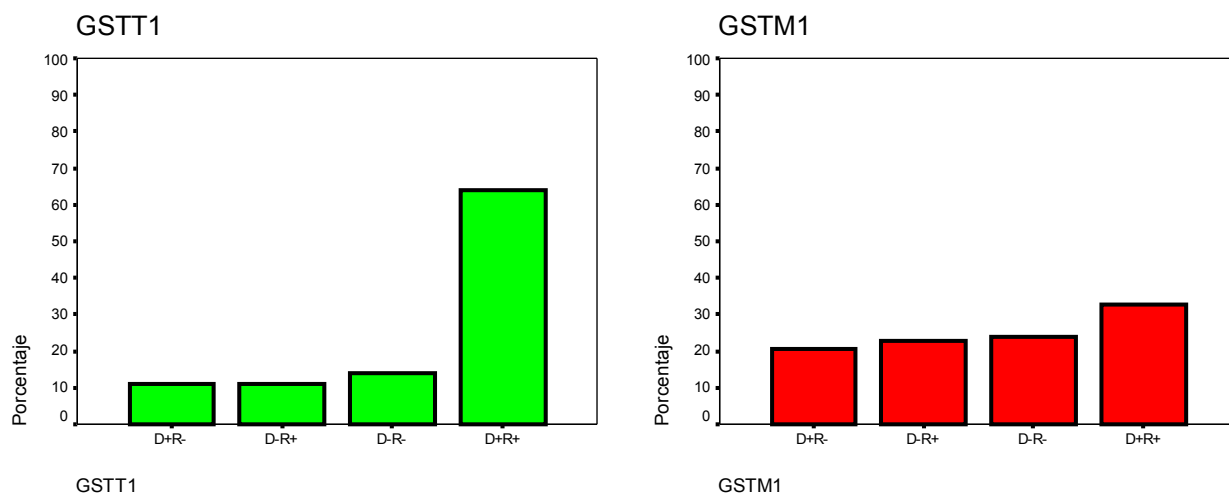


Figura 9. Expresión de los diferentes alelos en los diferentes subgrupos.

GSTT1				GSTM1			
		Frecuencia	Porcentaje			Frecuencia	Porcentaje
Válidos	D+R-	10	11.0	D+R-	19	20.7	
	D-R+	10	11.0	D-R+	21	22.8	
	D-R-	13	14.0	D-R-	22	23.9	
	D+R+	59	64.0	D+R+	30	32.6	
	Total	92	100.0	Total	92	100.0	

D+ (donante positivo) D- (donante negativo)

R+ (receptor positivo) R- (receptor negativo)

Tabla 8. Frecuencias y porcentajes expresión GSTT1 y GSTM1.

En relación al análisis del alelo GSTM1 y GSTT1, realizamos una división de subgrupos entre la expresión o no del alelo en los receptores y donantes, fue realizada para relacionar los datos y las variable del TPH con los diferentes subgrupos de expresión del alelo.

A la hora de subdividir los grupos del alelo GSTM1 y analizar los resultados, observamos que:

- En un 55,4% el alelo era positivo en receptores, siendo un 46,6% negativo
- Bajo la hipótesis del presente trabajo, sobre el reconocimiento alogénico del alelo del receptor de aquellos donantes que no lo expresaban, también analizamos el subgrupo donde el receptor expresa el alelo (R+) y el donante no lo presenta (D-), y analizamos este subgrupo frente al resto de los grupos [Figura 11].
- De la misma manera analizamos el subgrupo con expresión opuesta, receptor positivo y donante negativo que fueron del 22,8% frente al resto de los subgrupos. [Figura 12].

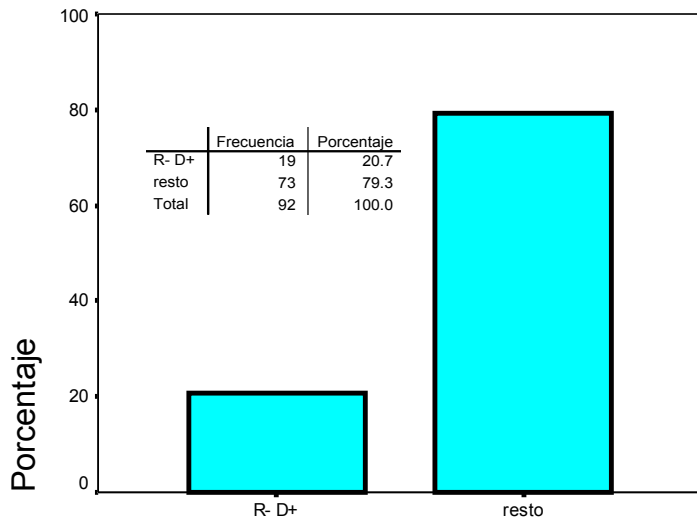
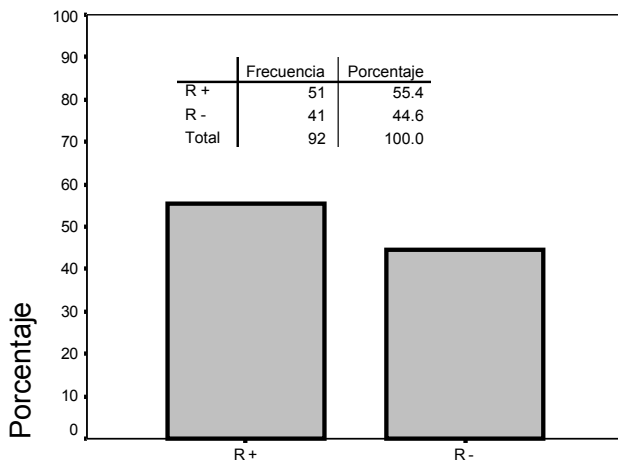
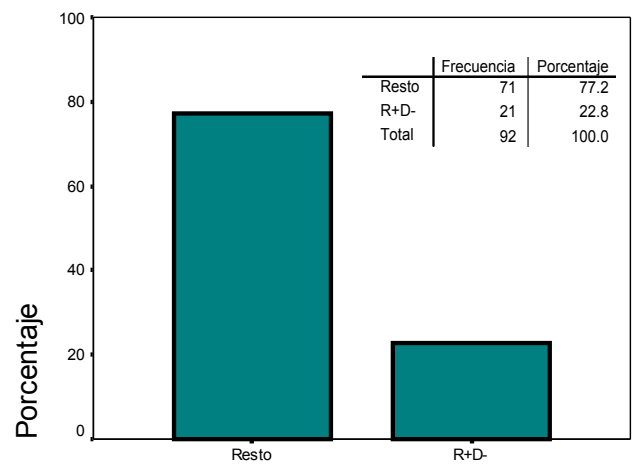


Figura 11. Comparación de porcentajes de R-/D+ vs el resto combinaciones.

R- / D+ GSTM1 vs resto combinaciones



Receptor + / Receptor -



R+ / D- GSTM1 vs resto combinaciones

Figura 12. Comparación R+ vs R (izquierda). Comparación de porcentajes de R+/D- vs el resto combinaciones (derecha)

Cuando realizamos el análisis de la expresión del alelo GSTT1 en los 4 subgrupos de donantes y receptores, encontramos que en el grupo D+/R- de 10 pacientes en total, 7 (70%) de ellos no desarrollaron EICRag. En el grupo D-/R+, de 10 pacientes 5 (50%) de ellos no presentaron EICRag. Grado II-IV. En el grupo D-/R- de 13 pacientes, 9 pacientes (69%) no desarrollaron EICRag. y en el grupo D+/R+ de 59 pacientes, 37 de ellos (62%) no presentaron EICRag. De este análisis observamos que no hubo diferencias en la incidencia de EICRag. Este análisis no tuvo asociación estadísticamente significativa, estos datos presentaron una de $p=0.6796$ [Figura 20].

No observamos relación estadística entre la variabilidad genética entre donante y receptor en la expresión del alelo GSTT1 y la mayor incidencia de EICRag. [Figura 20]. Tampoco relacionamos de forma significativa el resto de las variables del estudio con el alelo GSTT1.

Cuando relacionamos las variables del estudio con el EICRag., en el análisis univariante observamos los siguientes resultados reflejados en la tabla 9 según el análisis de la expresión del alelo GSTM1 en los 4 subgrupos de donantes y receptores:

- Encontramos que en el grupo D+/R- de 19 pacientes en total, 15 (79%) de ellos no desarrollaron EICRag.
- En el grupo D-/R+, de 21 pacientes 8 (38%) de ellos no presentaron EICRag. Grado II-IV.
- En el grupo D-/R- de 22 pacientes, 19 pacientes (86%) no desarrollaron EICRag.
- En el grupo D+/R+ de 30 pacientes, 16 de ellos (53%) no presentaron EICRag.

De este análisis observamos que en los grupos en donde el receptor no expresaba el alelo, tenían una menor incidencia de EICRag. y en el subgrupo donde el R-/D- la incidencia es aún más baja. Este análisis tuvo una de $p= 0.0096$ [Figura 14].

Tras el análisis anterior decidimos comparar a los receptores que expresaban el alelo GSTM1 (R+) frente a los que no lo expresaban (R-), observamos una menor incidencia de EICRag. en los pacientes que no expresaban el alelo GSTM1, de 41 pacientes en total que no lo expresaban, 34 de ellos (82%) no desarrollaron EICRag., mientras que de 51 pacientes que expresaban el alelo GSTM1, 24 de ellos (46%), no presentaron EICRag., este análisis tuvo un $p= 0.0013$ [Figura 15].

Bajo la hipótesis de nuestro trabajo del posible reconocimiento alo-inmune de las células del donantes sobre la expresión del alelo en el receptor y tras los resultados anteriormente mencionados comparamos el subgrupo de pacientes R+ / D- frente al resto de los grupos, de 21 pacientes en el grupo R+/D-, 13 pacientes (62%) presentaron EICRag., en el resto de los grupos, de 71 pacientes en total, 21 de ellos (29%) desarrollaron EICRag., de esta manera encontramos mayor incidencia de EICRag. en el grupo de receptor positivo/ donante negativo, frente al resto de subgrupos con una $p= 0.0149$ [Figura 16].

Al observar los resultados del subgrupo R+/ D- frente al resto, decidimos comparar el subgrupo opuesto, R- / D+ frente al resto de subgrupos, de 19 pacientes en total en el grupo R- / D+, 15 de ellos (79%) no presentaron EICRag. En el resto de grupos hubo un total de 73 pacientes, donde 43 de ellos (58%) no desarrollaron EICRag., se observó una $p=0,17$ [Figura 17].

La incidencia de la EICRag. grado II-IV en los receptores que expresaban el alelo GSTM1 fue del 80% frente al 20% de incidencia de EICRag. en aquellos receptores GSTM1 negativo [Figura 13].

De esta manera observamos que un 59% los pacientes que no desarrollaron EICRag. no expresaban el alelo GSTM1, mientras un 41% de los pacientes lo expresaban.

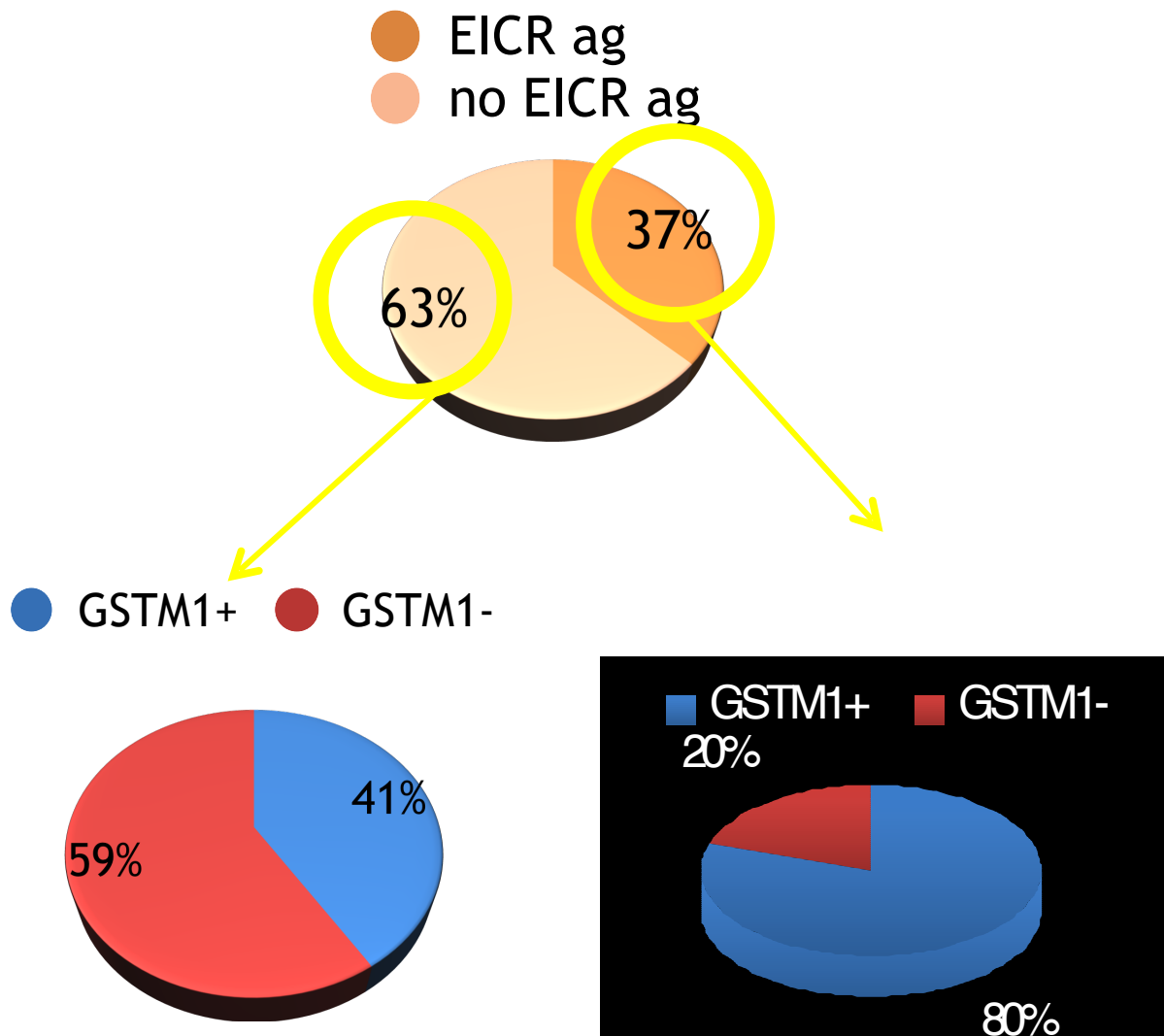


Figura 13. Incidencia de EICR aguda según expresión del gen GSTM1.

VARIABLES	P
DIAGNOSTICO	NS
SITUACION PRE-ALO	NS
TIPO PROGENITORES	NS
RECEPTOR GSTT1	NS
ACONDICIONAMIENTO ICT	0,024
TIPO DE DONANTE	0,014
RECEPTOR GSTM1+ vs GSTM1-	0,0013
R+ /D- GSTM1 vs. RESTO	0,0149
R- /D+ GSTM1 vs. RESTO	NS
PROFILAXIS EICR	NS
MUERTE	NS
RECAIDA	NS
GSTT1	NS
Subgrupos GSTM1	0.0096

Tabla 9. Análisis univariante de las variables relacionadas con la enfermedad injerto contra receptor aguda.

De los 29 pacientes que se acondicionaron con ICT + Ciclofosfamida, 15 pacientes (51%) no desarrollaron EICRag. grado II-IV y 14 pacientes si la presentaron, por otra parte y comparando estos resultados, de los 63 pacientes que se acondicionaron con Busulfán + Ciclofosfamida, 43 pacientes (69%) no presentaron EICRag. grado II-IV mientras 20 pacientes si la desarrollaron, se observa menor incidencia en aquel grupo que no se utilizó ICT, estos resultados tuvieron una $p=0.024$ [Figura 18].

Al analizar el tipo de donante utilizado, cuando comparamos donante emparentado frente a no emparentado, observamos que de los 64 pacientes que recibieron TPH de donante emparentado, 45 de ellos (71%) no desarrollaron EICRag. grado II-IV mientras 19 pacientes si la presentaron. En el análisis en los datos de los 28 pacientes que fueron de donantes no emparentados, observamos que 13 pacientes (46%) no presentaron EICRag. grado II-IV frente a 15 pacientes que si la desarrollaron. El grupo donde se utilizó donante emparentado ha presentado menor incidencia de EICRag. Estos datos tuvieron una significación estadística de $p=0.014$ [Figura 18].

No observamos mayor incidencia de enfermedad injerto contra receptor aguda en relación con otras variables conocidas como lo son el tipo de precursor hematopoyético utilizado, la disparidad HLA entre donante y receptor, la enfermedad de base y la situación de su enfermedad previa al trasplante [Tabla 9].

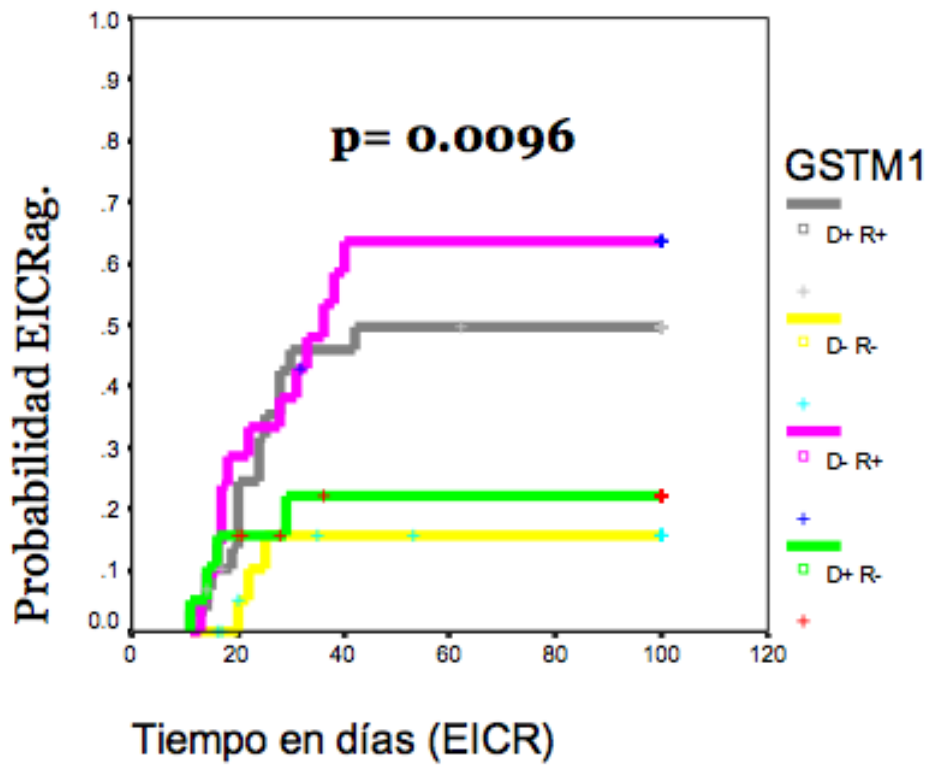


Figura 14. Análisis de los 4 grupos de la familia GSTM1 con la probabilidad de EICR. ($p= 0.0096$).

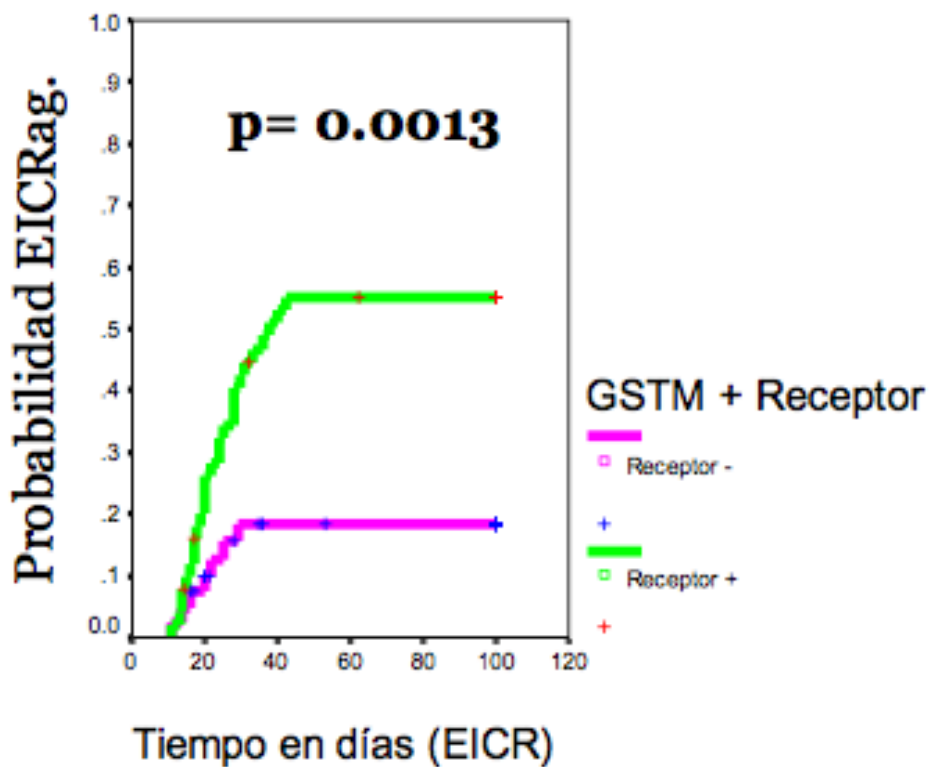


Figura 15. Receptores GSTM1 positivos frente a los negativo con la probabilidad de EICR ($p= 0.0013$).

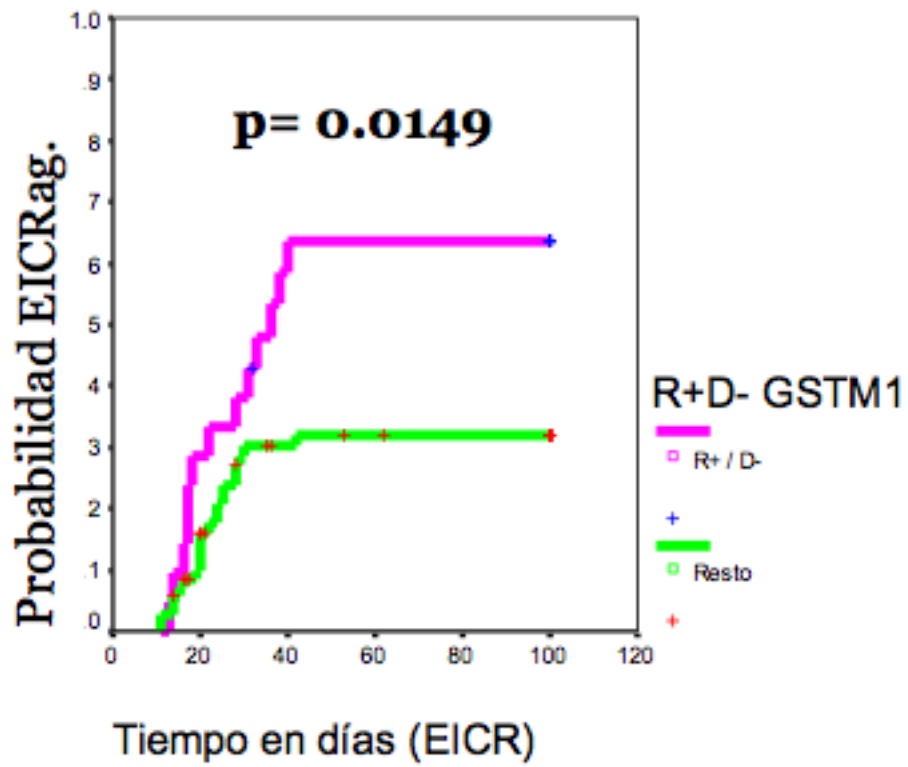


Figura 16. Receptor positivo/ Donante negativo, frente al resto de grupos con la probabilidad de EICR (p= 0.0149).

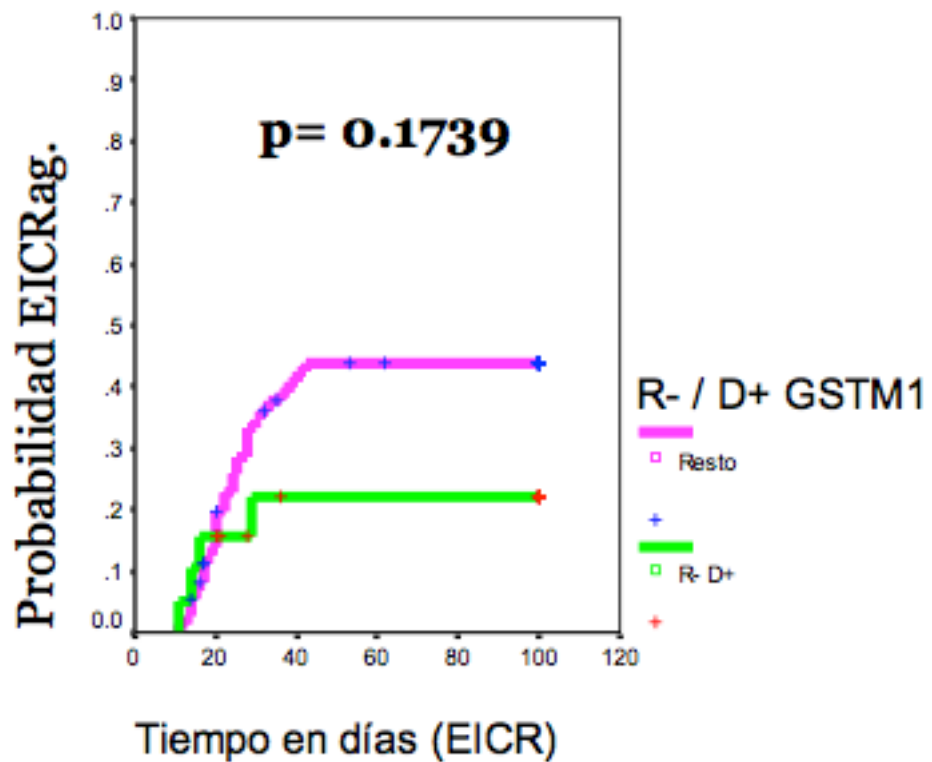


Figura 17. Receptor negativo/ Donante positivo, frente al resto de grupos con la probabilidad de EICR (p= 0.17).

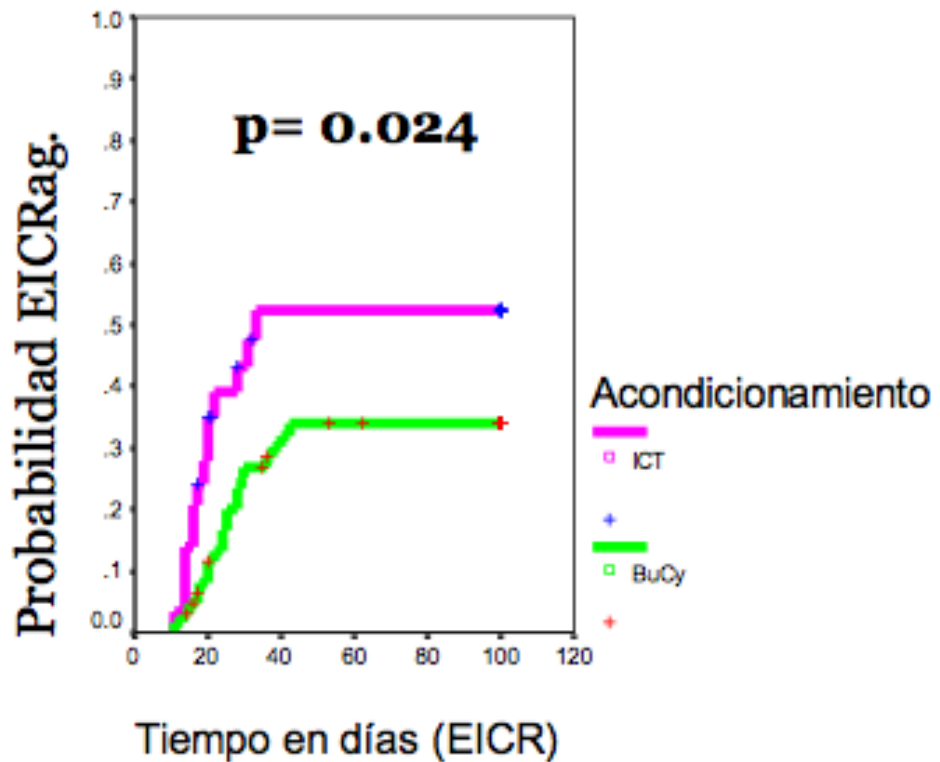
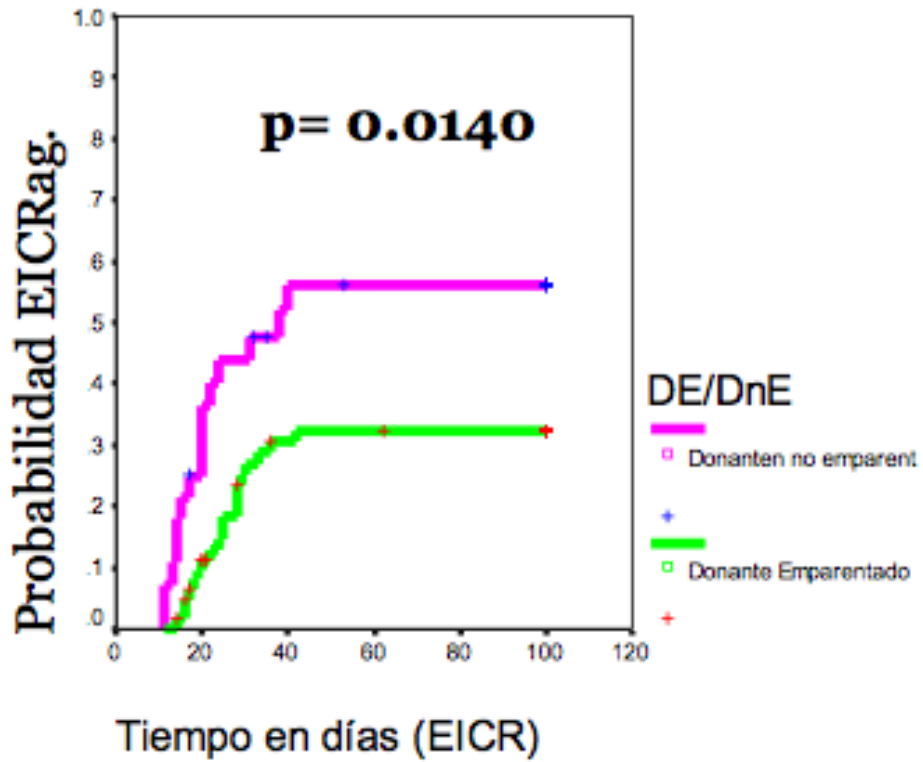


Figura 18. DE Vs DnE con la probabilidad de EICR. ($p= 0.014$). Tipos de acondicionamientos y la probabilidad de EICR. ($p= 0.024$).

Analizamos el efecto que tuvo la enfermedad injerto contra receptor aguda grado II-IV con la mortalidad y la recaída, no observando asociación estadística significativa en ambas, $p= 0,7$ y $p=0,3$ respectivamente [Figura 19 y 20].

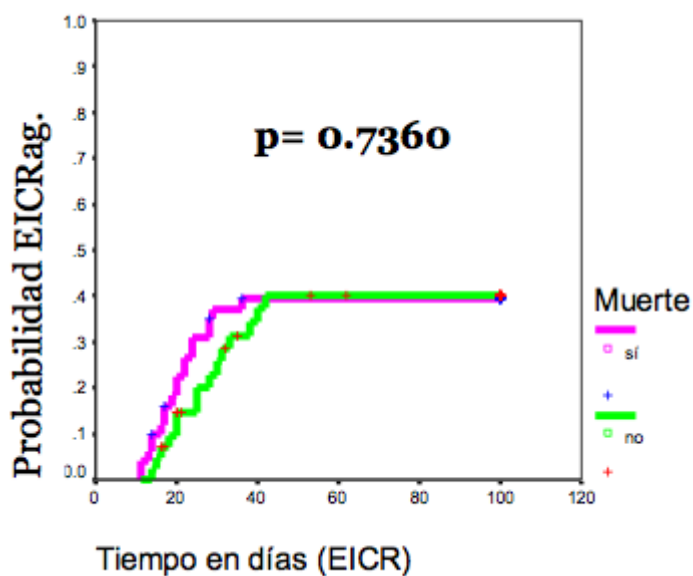


Figura 19. La mortalidad con la probabilidad de EICR.

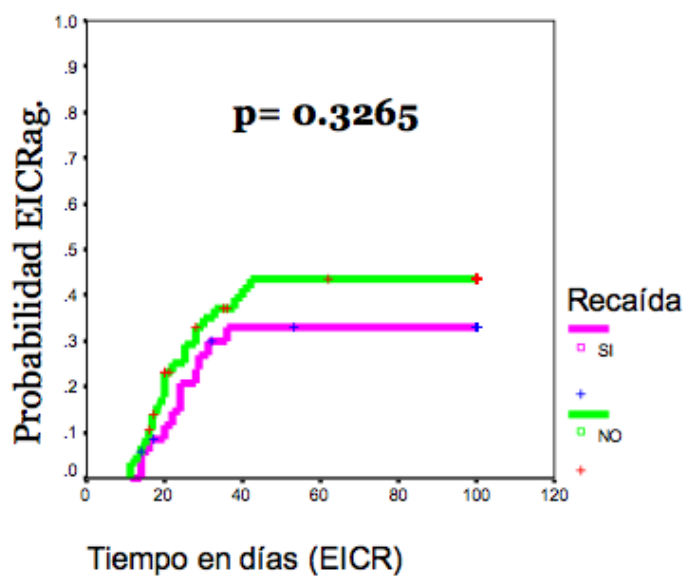


Figura 20. La recaída y su relación con la probabilidad de EICR.

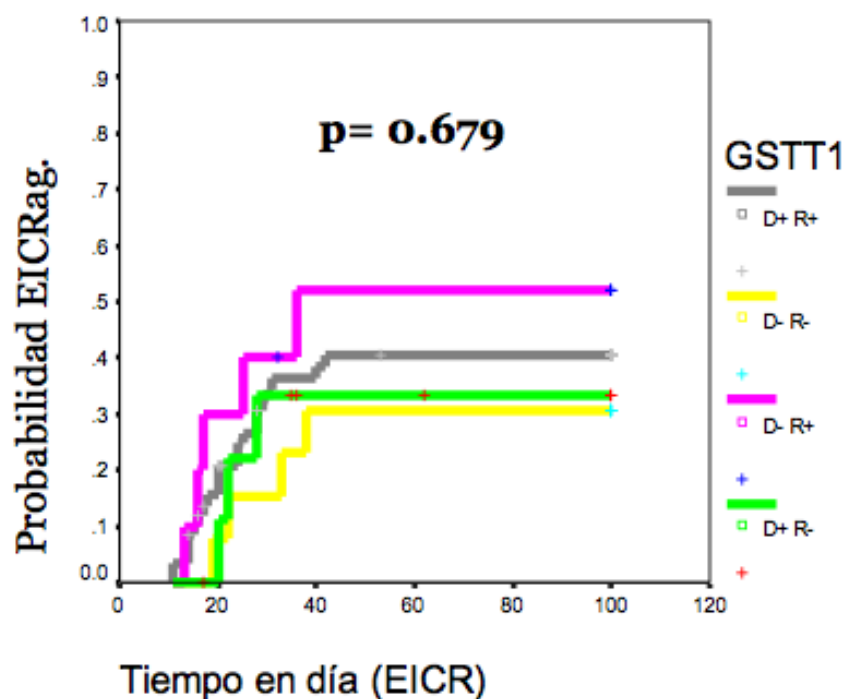


Figura 20. GSTT1 y la probabilidad de EICR.

La profilaxis del EICR se realizó en 76 pacientes con Metotrexate y Ciclosporina, 50 pacientes (65%) no desarrollaron EICR de este subgrupo. En 4 pacientes se utilizó Tacrólimus y Sirólimus, 1 pacientes (25%) de este grupo no desarrollo EICR. En 9 pacientes se utilizó Ciclosporina y Micofenolato, 6 pacientes (66%) no desarrollo EICR. En 3 pacientes se utilizó Tacrólimus y Metotrexate ,1 pacientes (33%) no desarrollo EICR. Estos datos debido al numero reducido de casos por grupo, no tuvo diferencia significativa.

El EICRag. grado II-IV, se trató de forma estándar en todos los pacientes con esteroides a 1 mg/kg de peso cada 12 horas. La respuesta al mismo se valoró a los 3 días y a los 7 días, dependiendo de los signos y síntomas clínicos sumado a los hallazgos de laboratorio se catalogó de respuesta parcial, completa, no respuesta o progresión, en base a estos criterios se decidió comenzar una segunda línea donde se utilizaron diferentes fármacos como el Micofenolato de Mofetil, Tacrólimus, ATG o Sirólimus.

No se encontraron diferencias en relación a la expresión o no de los alelos GSTM1 y GSTT1 cuando valoramos la respuesta al tratamiento de primera línea del EICR agudo. En aquellos pacientes que necesitaron de segundas líneas de tratamiento tampoco observamos diferencias en la respuesta en aquellos que expresaban o no los alelos GSTM1 y GSTT1.

La toxicidad hepática relacionada con el trasplante fue del 13%, 12 pacientes, no observamos mayor toxicidad hepática relacionada con el tratamiento inmunosupresor y quimioterápico en aquellos pacientes que no expresaban el alelo tanto de GSTM1 como de GSTT1.

La incidencia en nuestra serie de la enfermedad injerto contra receptor crónica fue del 25%, siendo en un 15% de manifestación extensa. No observando tampoco en estos pacientes relación con la expresión de los alelos GSTM1 y GSTT1 [Tabla 10].

Toxicidad hepatica		
	Frecuencia	Porcentaje
no	80	87.0
si	12	13.0
Total	92	100.0

EICR CRONICO		
	Frecuencia	Porcentaje
LIMITADO	10	10.9
EXTENSO	15	16.3

Tabla 10. Frecuencia y porcentaje de EICR crónica y toxicidad hepática.

En el análisis multivariante, sólo dos variables se relacionaron de manera significativa con la probabilidad de desarrollar EICRag. grado II-IV [Tabla 11]:

- La utilización para el TPH de un Donante no emparentado ($p= 0.011$).
- La expresión del alelo GSTM1 en el receptor del TPH ($p= 0.018$).

VARIABLE	P
TIPO DE DONANTE	0,011
Polimorfismo GSTM1	0,018

Tabla 11. Resultado del análisis multivariante.

La mediana de seguimiento de la serie fue de 674 días, con un mínimo de 30 y un máximo de 3735 días.

No encontramos diferencias significativas en la supervivencia global de los pacientes en función de la variabilidad genética en la expresión de GSTM1 o GSTT1 entre donante y receptor [Figura 23].

La mortalidad de la serie en estudio ha sido del 53%, 49 pacientes de 92 incluidos, en 28 pacientes la causa fue recaída de su enfermedad de base, en 13 pacientes de causas infecciosas, en 2 pacientes como consecuencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda grado IV y en 6 pacientes de diferentes causas como cardiopatías isquémicas y fallo multiorgánico de causa desconocida [Figura 21].

	Frecuencia	Porcentaje
Infecciosa	13	14.1
Recaída	28	30.4
EICH	2	2.2
Otras	6	6.5
Total	49	53.3

Causas muerte

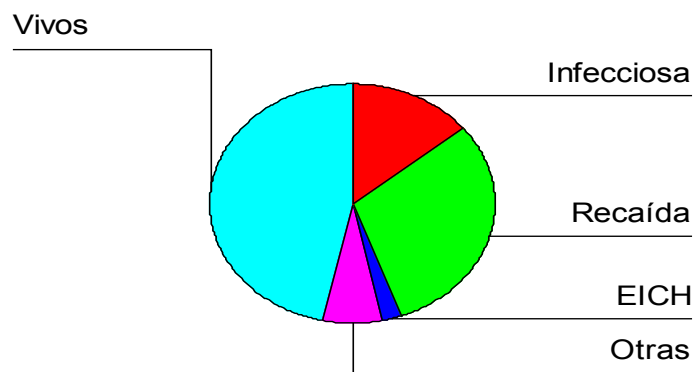


Figura 21. Frecuencia y causas de muerte.

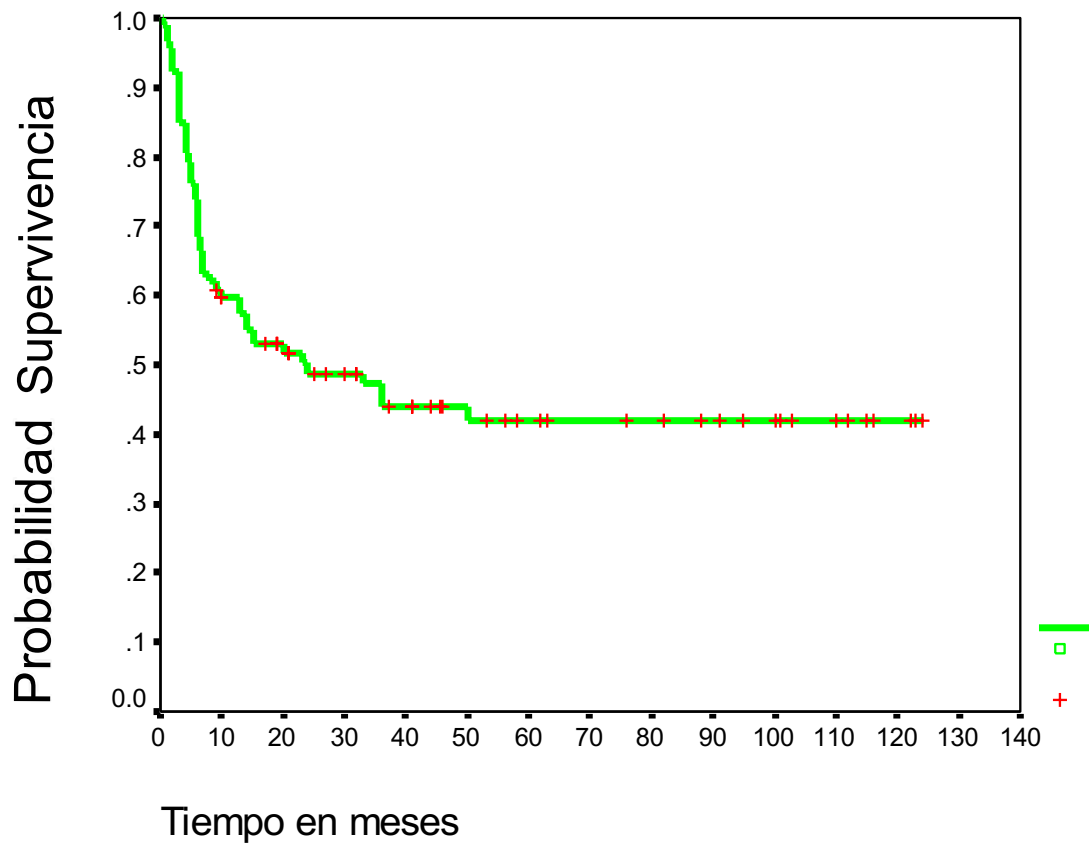


Figura 22. Supervivencia global de nuestra serie.

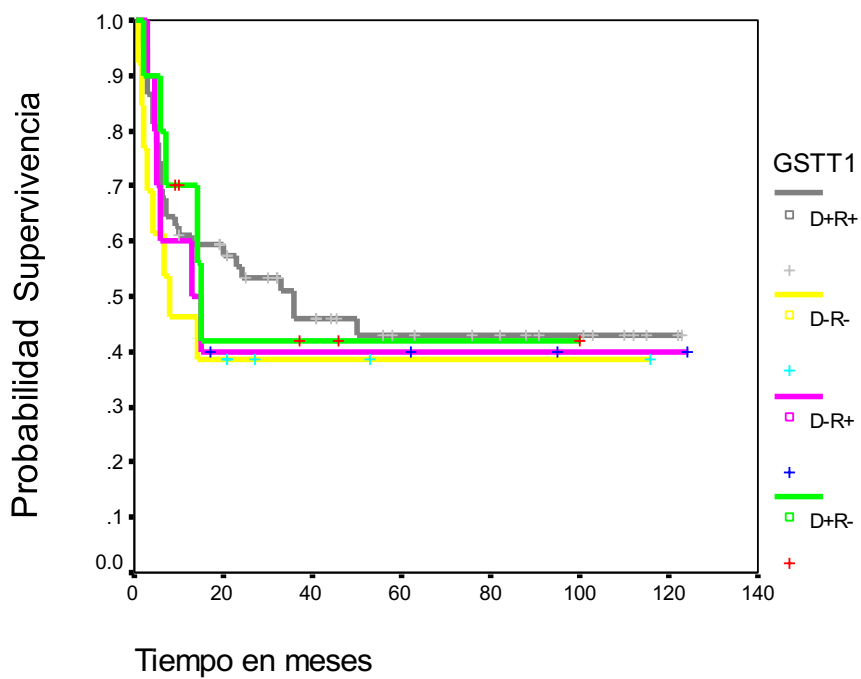
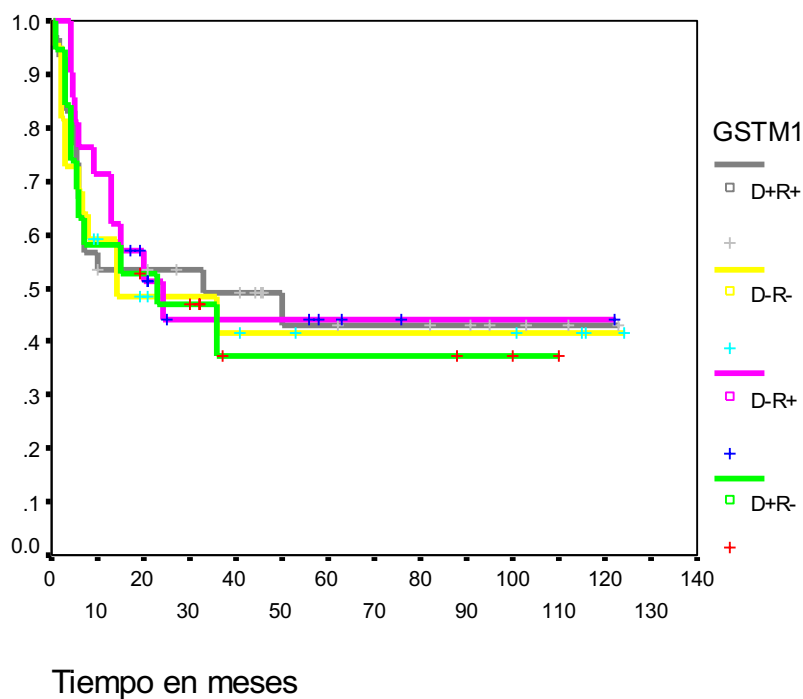


Figura 23. Supervivencia global, según los diferentes subgrupos de GSTM1 y GSTT1.

IV.2.1. Utilización de la expresión del alelo GSTM1 como factor predictivo de EICR

Analizamos la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo negativo y el valor predictivo positivo en la expresión o no del alelo GSTM1 en el receptor sometido a TPH alogénico.

Sensibilidad y especificidad de la expresión del alelo GSTM1

		EICR agudo		Total
		no	si	
R +	Recuento	24	27	51
	% de R+ R- todos	47.1%	52.9%	100.0%
	% de EICRag.	41.4%	79.4%	55.4%
R -	Recuento	34	7	41
	% de R+ R- todos	82.9%	17.1%	100.0%
	% de EICRag.	58.6%	20.6%	44.6%
Total	Recuento	58	34	92
	% de R+ R- todos	63.0%	37.0%	100.0%
	% de EICRag.	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 12. Sensibilidad y especificidad de la expresión del alelo GSTM1.

La valoración de la expresión del alelo GSTM1 en el receptor tiene una sensibilidad del 79% (IC 95%: 0,66-0,93) lo que traduce que de 34 pacientes que desarrollaron EICRag. Grado II-IV , 27 pacientes expresaban el alelo GSTM1. Un especificidad del 59% (IC 95%: 0,45-0,71) esto explica que de 58 pacientes que no desarrollaron EICRag. 34 pacientes no expresaban el alelo GSTM1. Este método diagnóstico tiene un valor predictivo positivo de 53% (IC 95%: 0,39-0,67) y un valor predictivo negativo del 83% (IC 95%: 0,71-0,94), este último valor nos podría ser útil para a identificar a aquellos pacientes que van a tener alta probabilidad de no desarrollar EICRag. [tabla 12].



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

V. DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

GSTM1

Es una enzima encargada de la detoxificación sobre todo de fármacos como los quimioterápicos, estrés oxidativo, etc. Existen 4 isoformas reconocidas (A1-M1-P1-T1) los niveles de expresión dependen de la presencia o no de diversos polimorfismos. Las isoformas M1 y T1 están ausentes aproximadamente en el 50% de la población [17,20].

En relación con el trasplante hepático existe diversa bibliografía de la familia de las enzimas GST, en algunos estudios se ha relacionado y documentado la inmunogenicidad de estas proteínas. En el trasplante hepático, se ha visto su asociación con el rechazo de órgano agudo [49], no obstante en posteriores revisiones bibliográficas, que han sido contradictorias, no se ha observado mayor incidencia de rechazo agudo de órgano en aquellos receptores que no expresaban el alelo GSTM1. Dado los contradictorios resultados de las revisiones, el análisis no permite obtener conclusiones que podamos asociarlas al TPH allogénico [50].

Se ha estudiado también la expresión de este alelo en el trasplante renal, Singh R et al [105] observaron menor tiempo medio hasta el primer episodio de rechazo de injerto agudo en aquellos receptores que no expresaban GSTM1 en comparación con aquellos que los expresaban ($p=0,002$). Los niveles de ciclosporina tanto en los momentos inmediatos post trasplante como a los tres meses del mismo en los pacientes sin expresión del alelo fue superior en comparación con los positivos, ($p=0,007$ y $p=0,027$). Los pacientes con el genotipo GSTM1 positivo presentaron mayor riesgo de rechazo y retrasaron el funcionamiento del aloinjerto, estos resultados apoyan la teoría de la importancia de esta enzima en el metabolismo de los fármacos y que la variabilidad en su expresión podría ser un factor influyente en la evolución de estos pacientes [106].

En relación con el trasplante de precursores hematopoyéticos, las enzimas de la familia GST son de gran importancia para la desintoxicación y el metabolismo de diferentes inmunosupresores como son la Ciclosporina, Tacrólimus y Sirólimus, por consiguiente la ausencia de expresión de este alelo podría afectar los resultados de los TPH alogénicos debido a la importancia en el metabolismo de este fármaco [51,52,54]. En nuestra serie no obstante no encontramos diferencias en relación a la expresión del alelo GSTM1 y las diferentes combinaciones de profilaxis del EICRag. Dado que la cantidad de pacientes estudiada no es muy grande y hubo una gran proporción de pacientes en el subgrupo que realizo profilaxis con Ciclosporina + Metotrexato, este análisis no es concluyente. No tuvimos como objetivo del estudio relacionar los niveles de Ciclosporina con la expresión de los alelos GSTM1 y la incidencia de EICRag. tal como realizan en los artículos [54,106] de TPH alogénico y trasplante renal.

En nuestra serie encontramos mayor incidencia de EICRag grado II-IV en aquellos receptores que expresaban el alelo GSTM1 cuando los comparamos con los receptores alelo GSTM1 negativo ($p= 0.0013$). También se observó una menor tasa de EICRag cuando comparamos el grupo de Donante negativo / receptor negativo frente al resto de los grupos de expresión ($p=0.0096$). Bajo una de las hipótesis que se pensó este trabajo también comparamos el grupo donde los pacientes expresan el alelo y los donantes no, frente al resto de subgrupos, observando también una potencia significativa ($p=0.0149$).

Tras todas estas comparaciones realizadas y los resultados obtenidos también concluimos que los receptores que no expresan el alelo GSTM1 tienen una incidencia menor de EICRag. independiente del resto de las combinaciones de los subgrupos.

No hay suficiente bibliografía en relación a la falta de expresión del alelo GSTM1 y el trasplante de precursores hematopoyético como para contrastar nuestros resultados, un trabajo reciente de Martínez-Bravo MJ et al [100] estudia 125 donantes y receptores donde analizan la diferencia entre ambos en relación al alelo GSTM1, en sus resultados no encontraron diferencias significativas en la incidencia de EICRag. grado II-IV ni con otras variables estudiadas.

Terakura et al. también estudio en su trabajo a 367 donantes y receptores, no encontrando asociación significativa entre la expresión de los alelos GSTT1 y GSTM1 con una mayor incidencia de EICR aguda, EICR crónica y recaída de la enfermedad de base. Sin embargo en los pacientes GSTM1 positivo se asoció significativamente con una mayor mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y una menor supervivencia global (SG) ($p=0,04$). Exactamente no se sabe cuál es el mecanismo por el cual no expresar este alelo protegería al receptor, la ausencia de estas enzimas protegería al receptor de la producción de mediadores inflamatorios y produciría un mayor metabolismo de los inmunosupresores [21].

SCORE DE RIESGO SEGÚN SÍNTOMAS CLÍNICOS Y/O POR BIOMARCADORES

En relación a los polimorfismos (PL) genéticos podemos decir que son los responsable de la variabilidad entre individuos de la misma especie, existen 10 millones de polimorfismos en todo el genoma (intrones, exones, promotores, etc.). Pueden encontrarse en regiones codificante, polimorfismos génicos, o en regiones no codificante, polimorfismo genético, donde se producen en su mayoría. La función biológica depende de la localización del polimorfismo, por ejemplo solo un 4% de PL afectan región codificante y solo el 25% afectan a la función de la proteína. Existe un profundo interés de los PL no HLA, ya que en el terreno del TPH, la EICRag. sigue siendo la complicación con mayor morbi-mortalidad en la actualidad. El diagnóstico y la severidad clínica de la EICRag. se basa en criterios estrictamente clínicos. Actualmente no hay ninguna prueba de laboratorio validada para el diagnóstico del EICRag. [102,103,104].

Muchos esfuerzos se han dedicado a la identificación de posibles biomarcadores de sangre periférica no invasivos para ayudar a mejorar el diagnóstico o tratamiento de la EICRag. evitando biopsias de tejido invasivos. Los primeros intentos para identificar biomarcadores se centraron en las citoquinas

inflamatorias, especialmente IL-2 o TNF- α , sin embargo, ambos de estos y otros no eran específicas del EICRag.

Los esfuerzos más recientes se han centrado en las citoquinas y otras moléculas de la superficie celular que funcionan en el tráfico de leucocitos y la activación de los mismo, se han realizado con la esperanza de que estos también puedan servir como dianas para nuevos enfoques terapéuticos. Los objetivos finales de la identificación de un biomarcador específico son para perfeccionar el diagnóstico, guiar la terapia y desarrollar enfoques adaptados al riesgo con el fin de tratar mejor a los pacientes y mejorar los resultados después de TPH alogénico. Estos enfoques incluyen el tratamiento diferenciado para los pacientes que desarrollan EICRag. con un perfil de biomarcadores de alto riesgo, así como terapia preventiva en pacientes después del TPH antes del desarrollo de los síntomas [105].

Síntomas clínicos

Mac Millan ML et al [110,111] estudiaron los síntomas clínicos y el estadiaje del EICRag. en 1723 pacientes al inicio del tratamiento con esteroides sistémicos. De esta manera analizaron y clasificaron a los pacientes de alto riesgo y de riesgo estándar. Valoraron las respuesta a esteroides de estos grupos, vieron que los 269 pacientes con alto riesgo de EICR presentaban menor tasa de respuesta que el resto de los 1454 pacientes con riesgo estándar ($P < 0,001$). Los pacientes con alto riesgo eran menos propensos a responder en el día 28 y tenían un mayor riesgo de mortalidad y de mortalidad relacionada con el trasplante que los pacientes con riesgo estándar. De esta manera concluyeron que Los pacientes de alto riesgo son candidatos para estudios de investigación de nuevos tratamiento mas intensos y del mismo modo, los pacientes con riesgo estándar son candidatos para estudios de investigación de posibles terapias menos agresivas.

La posibilidad de adelantarse a los síntomas y prevenir la respuesta inflamatoria severa no es posible con este tipo de scores, ya que una vez establecida la sintomatología y sumado a esto la refractariedad a los esteroides, las

posibilidades de responder a tratamiento de segundas líneas es cada vez mas baja. En nuestra serie no observamos diferencia en la respuesta a los tratamiento inmunosupresores en relación con la expresión de los alelos GSTM1 y GSTT1, no obstante lo interesante de estos artículos es poder prevenir la aparición de los síntomas del EICRag. y abordarlo en estos pacientes con terapias anticipadas.

Por estas cuestiones mencionadas existen publicaciones donde intentan unir a los síntomas clínicos los marcadores analíticos y/o polimorfismo genéticos.

Biomarcadores y polimorfismos genéticos

La liberación de citoquinas es un factor decisivo en el desarrollo de la EICR. En la actualidad se sabe que una vez producido el fenómeno de alo reconocimiento, la reacción que da lugar a la EICRag. está mediada por la secreción de citoquinas, tanto pro como antiinflamatorias, como IL-1, IL-2, IL-6 ,IL10 ,TNF α , factor decrecimiento tisular (TGFB) o IFN γ . En este sentido, se han descrito determinados polimorfismos en los genes que codifican estas citoquinas en el donante y/o en el receptor que pueden dar lugar a un aumento o descenso en la secreción de las mismas, influyendo en el desarrollo de la EICR [74].

Para que los biomarcadores o polimorfismos genéticos sean buenos candidatos para predecir la sintomatología, debieran de cumplir las siguientes condiciones; que sean fáciles de realizar, tienen que ser técnicas reproducibles por el resto de centros hospitalarios, de bajo coste económico, con adecuada sensibilidad y especificidad, alto valor predictivo y que se correlaciones con la severidad de los síntomas y la posible respuesta al tratamiento. Todas estas condiciones tienen sentido si lo que pretendemos es utilizar biomarcadores que se adelanten a los síntomas y la severidad clínica del EICRag.

Y-B Chen et al [105] utilizaron el receptor soluble de la interleuquina 2 como predictor del riesgo de desarrollar EICRag., demostraron en el estudio, igual que la en esta de pequeña cohorte [112], que sus niveles altos tienen relación con la severidad de los síntomas del EICRag., con una media de 5-7 días antes de la aparición de los síntomas clínicos. La identificación de la importancia de la IL-2 en

la fisiopatología y el desarrollo del EICRag. contribuyó a la logística y el desarrollo para la terapia dirigida en forma de anticuerpos monoclonales específicos tales como son el Daclizumab. No existe evidencia de ensayos clínicos donde se observe que los niveles en sangre de esta citoquinas tengan relación con la respuesta al tratamiento con este anticuerpo monoclonal específico.

En 1990, Holler et al. [79] observó que el aumento en la monitorización de los niveles séricos de TNF-a precedía al inicio de los síntomas del EICRag. [113]. con estos resultados este grupo propone dividir en grupos de alto y bajo riesgo de padecerlo según los niveles séricos de TNF-a , de esta manera poder intervenir aumentando o manteniendo niveles de inmunosupresores mas elevados o en su defecto utilizar dosis bajas de Timoglobulina para atenuar los síntomas en aquellos pacientes con niveles elevados [107], no aportan datos clínicos de respuesta ni relación entre los niveles y las posibles medidas terapéuticas.

Paczesny S et al. [102] realizó un estudio de 35 biomarcadores en las muestras de 21 pacientes que desarrollaron EICRag. sometidos a aloTPH de intensidad mieloablative, fuente de progenitores similar, edad en rangos similares, en este estudio se utilizó un modelo de regresión logística donde determinaron que una combinación lineal de los valores para el receptor de la IL2 (IL-2Ra), receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y IL-8 producía el mejor modelo para predecir los síntomas clínicos del EICRag. Los niveles de IL-2Ra y TNFR1 contribuyeron principalmente a la exactitud del modelo (P 0,001 y P 0,003, respectivamente). El HGF fue el único marcador que predijo mejor el grado de EICRag. (p 0,003) y ambos HGF y IL-2Ra se asociaron con especificidad de órganos (p 0,03 y 0,04 respectivamente).

Levine JE et al [109] diseñaron un estudio con objetivo de definir estratos de riesgo clínicamente significativo para los pacientes con EICRag. de reciente diagnóstico utilizando biomarcadores plasmáticos. Recogieron prospectivamente plasma de 492 pacientes con EICRag. y utilizaron las concentraciones de tres biomarcadores recientemente validados como son el TNFR1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral), ST2 y REG3 α , de esta manera crearon un algoritmo que calcula la probabilidad de mortalidad no relacionada con el trasplante (MNRT) después de 6 meses de la aparición clínica del EICR.

La incidencia acumulada de MNRT aumento al mismo tiempo que aumentaba el score de riesgo para el EICRag. La tasa de respuesta de los tratamientos de primera línea fue más baja en aquellos con scores más altos, estos datos necesitan de confirmación por otros grupos y en ensayos multicentrico [109].

Encontramos numerosas publicaciones en relación con los niveles de las citoquinas que intervienen en el proceso de desarrollo de la EICRag., está documentada la evidencia de que niveles elevados de las citoquinas inflamatorias se relacionan con mayor probabilidad de desarrollo de EICRag., no obstante no hay datos en donde la respuesta al tratamiento tenga relación dichos niveles.

Utilización de la determinación al alelo GSTM1 como método diagnóstico

El diagnóstico temprano del EICRag. podría ayudar a la toma de decisión en medidas terapéuticas en pacientes sometidos a TPH alogénico mieloablativo, no obstante es más interesante la idea de poder predecir aquellos pacientes que lo desarrollaran y de esta manera poder adelantarse en la toma de decisiones.

En general las pruebas de cribado deben ser de alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos. Una prueba muy sensible será especialmente adecuada en aquellos casos en los que el no diagnosticar la enfermedad puede resultar fatal para los enfermos. Por otra parte, la especificidad se refiere a la probabilidad de que un sujeto sano sea clasificado adecuadamente. En general, las pruebas confirmatorias del diagnóstico deben ser de alta especificidad, para evitar falsos positivos. No obstante tienen la ventaja adicional de que son propiedades intrínsecas a la prueba diagnóstica, y definen su validez independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica.

La seguridad de una prueba diagnóstica son los valores predictivos de la misma, los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica. Sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la

enfermedad. Cuando un paciente se le realiza alguna prueba se plantea si ante un resultado positivo o negativo en la prueba cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo o sano. Por medio de los valores predictivos completaremos esta información

El concepto de valores predictivos, a pesar de ser de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico, presenta la limitación de que dependen en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad a diagnosticar en la población objeto de estudio. Cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, un resultado negativo permitirá descartar la enfermedad con mayor seguridad, siendo así el valor predictivo negativo mayor. Por el contrario, un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico, resultando en un bajo valor predictivo positivo.

La utilidad de la expresión del alelo GSTM1 en el receptor como diagnóstico de EICRag. tiene una sensibilidad del 79%, con esto significa que de 34 pacientes que desarrollaron EICRag. 27 pacientes expresaban el alelo GSTM1. La especificidad que obtuvimos fue baja, en torno al 59%, lo que traduce que de 58 pacientes que no desarrollaron EICRag. 34 pacientes no expresaban el alelo GSTM1. El valor predictivo positivo fue de 53% y un valor predictivo negativo del 83%, este último valor nos podría ser útil para identificar a aquellos pacientes que van a tener alta probabilidad de no desarrollar EICRag. Dada la adecuada sensibilidad de la prueba y el correcto valor predictivo negativo de la misma, la ausencia de expresión del alelo GSTM1 podría utilizarse para valorar y estratificar el riesgo de EICRag. De esta manera sugerimos que podría utilizarse en conjunto con scores de síntomas clínicos, hallazgos analíticos y el uso de otros biomarcadores como los mencionados anteriormente para adelantarse a la aparición de los síntomas clínicos del EICRag. Este subgrupo de pacientes debería ser considerado candidato a alternativas de tratamientos capaces de atenuar o prevenir la respuesta inmune del EICRag. una vez que esta se ha desarrollado [62,101].

Muchos grupos de trabajo han reportado estudios donde analizan solo una citoquinas y su asociación con el EICR, MRT, SG y SLE. La mayoría de esos estudios son ensayos de un solo centro o estudios retrospectivos en pequeñas

poblaciones. Todavía no sabemos que citoquinas son necesarias y las que podrían servir de biomarcadores específicos del EICRag.

Por lo tanto, se considera que las mediciones de una sola citoquinas son pruebas insuficientes como biomarcadores del EICRag., sobre todo debido a la falta de sensibilidad y especificidad adecuadas. Se requieren futuras investigaciones y estudios prospectivos multicéntricos para establecer cuál es el mejor uso de estos biomarcadores para la EICRag.

GSTT1 Y SU VALOR EN EL TRASPLANTE

En el año 2001 comenzaron a observar en las publicaciones donde se asociaba el gen de la theta glutatión S-transferasa 1 gen (GSTT1) con la aparición de la hepatitis inmune de Novo después del trasplante hepático, este gen que tiene dos variantes alélicas, GSTT1 (*) A (wild type) y GSTT1 (*) 0 (delección), ha sido catalogado y surgido como un antígeno de histocompatibilidad no HLA con interesantes resultados [51,52,94,100]. Una combinación donde el receptor no expresa el alelo GSTT1 con aquellos donantes que expresan el alelo GSTT1, mostró con alta frecuencia la aparición de hepatitis autoinmunes grave, con la posterior producción de IgG anticuerpos anti-GSTT1 [51].

En relación con el trasplante renal, la falta de coincidencia entre donante y receptor en la expresión del alelo GSTT1, también se asoció con la producción de anticuerpos anti-GSTT1 y episodios de rechazo agudo, se ha observado en la biopsia del injerto estos anticuerpos relacionados con el depósito del complemento C4 [51,52,94].

Estos grupos de trabajo que han estudiado las respuestas inmune en los trasplante de órganos sólidos, como son los de riñón e hígado, argumentan que los antígenos distintos del sistema HLA tales como pueden ser la expresión de la proteína GSTT1 en el periodo post trasplante inmediato, pueden ser dianas para las respuestas

aloimmune, de esta manera siendo esta disparidad responsable de la activación del sistema inmune [51].

Martínez-Bravo MJ et al [95] estudiaron la respuesta inmune específica contra GSTT1 en el TPH alogénico con la determinación de la producción de anticuerpos y valoraron su influencia en el desarrollo de la enfermedad injerto contra receptor de localización hepática, se analizaron las muestras de donante y receptor para detectar la presencia de anticuerpos anti-GSTT1 mediante la prueba de ELISA. El desarrollo de EICR hepática, en particular su forma aguda, estaba altamente asociado con disparidad entre donante y receptor en relación al GSTT1 y con la presencia de anticuerpos anti-GSTT1 post-trasplante. En este trabajo concluyen que la disparidad en la expresión del GSTT1 entre donante y receptor podría ser considerado como un nuevo antígeno menor no HLA en relación con la EICR hepática. El mismo grupo de trabajo también estudio la disparidad ausencia/expresión de este gen entre donante y receptor, observando también mayor incidencia de EICRag. Grado II-IV, crónica y de localización hepática en aquellos donde entre donante y receptor existía disparidad en la expresión del alelo. La incidencia del EICRag. que observaron fue del 20% frente al 47,4% en el grupo con disparidad. También fue altamente significativa la mayor incidencia en el desarrollo de EICR hepática grados III-IV (3,8% versus 36,8%) [100].

Cuando realizamos el análisis de la expresión del alelo GSTT1 en nuestra serie, los subdividimos en 4 subgrupos en relación con la expresión o no del alelo GSTT1 entre donante y receptor. Analizamos la incidencia de EICRag. en estos diferentes grupos y encontramos que en el grupo D+/R- de 10 pacientes en total, 3 (30%) de ellos desarrollaron EICRag. En el grupo D-/R+, de 10 pacientes 5 (50%) de ellos presentaron EICRag. Grado II-IV. En el grupo D-/R- de 13 pacientes, 4 pacientes (31%) desarrollaron EICRag. y en el grupo D+/R+ de 59 pacientes, 22 de ellos (38%) presentaron EICRag. De esta manera observamos que la incidencia de EICRag. ha sido similar en todos estos subgrupos. Cuando analizamos la incidencia de EICR por órgano, tampoco se observo diferencia en la manifestación hepática del EICR.

La incidencia en nuestra serie de la enfermedad injerto contra receptor crónica fue del 25%, siendo en un 15% de manifestación extensa. No observando tampoco en estos pacientes relación con la expresión de los alelos GSTT1.

Estos resultados son discordantes de los obtenidos por el grupo de Martínez-Bravo MJ et al, no obstante en la serie nuestra no valoramos la producción de anticuerpos anti-GSTT1 y de esta manera no podemos realizar similares conclusiones ya que no lo planteamos como objetivo del estudio.

La participación de la expresión del alelo GSTT1 en inmunológica, el alo-reconocimiento es incuestionable, aunque todavía hay muchos aspectos que quedan por explorar y confirmar, como son el valor de los anticuerpos anti-GSTT1 para poder utilizar esta determinación de forma anticipada, también el confirmar estos resultados y de forma integral con la expresión del alelo [52,94].

El descubrimiento de los últimos años en relación con la producción de anticuerpos anti-GSTT1 en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, confirma el papel del alelo GSTT1 como antígeno de histocompatibilidad no HLA en este contexto.

APLICACIÓN CLÍNICA

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es el tratamiento de elección para la curación de algunas enfermedades hematológicas. Entre un 25-50% de los pacientes que reciben un trasplante alogénico a partir de un donante familiar HLA idéntico desarrollan enfermedad injerto contra receptor aguda [53,54]. A pesar de todos estos avances en el tratamiento y la prevención del EICR, aún no somos capaces de predecir que pacientes desarrollaran esta complicación y en que gradación ocurrirá, teniendo tasas tan altas de morbi mortalidad y el gran costo económico que representa para el sistema sanitario.

El uso de Timoglobulina de conejo (ATG) en la profilaxis de la EICR se ha evaluado en numerosos estudios prospectivos aleatorizados y multicentrico, observando que la conclusión más común en todos ellos es que permite reducir de manera significativa el riesgo de EICR aguda y aún más la crónica y, sabemos que esto se traduce en un impacto favorable en la calidad de vida postrasplante, no obstante no se ha visto que incremente la supervivencia a largo, por estas razones su uso se limita a aquellos pacientes que sus donantes son no emparentados o presentan cierto grado de disparidad en el HLA [53,101]. Bacigalupo et al [107] randomizaron 170 pacientes en dos grupos, uno recibió ATG en el día + 7 y el otro grupo no recibió este tratamiento, estratificaron a los pacientes según presentaban mayor riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y de acuerdo a factores de riesgo ya conocidos la posibilidad de desarrollar EICR, los resultados ofrecen una notable disminución en la MRT de 19% vs 42% y con una disminución de la EICR aguda en aquellos pacientes que fueron estratificados de alto riesgo de padecerla (p: 0.006). Estos trabajos que encontramos en la literatura nos marcan la tendencia a estratificar a los pacientes según riesgo de desarrollar EICR y poder adelantarnos a los síntomas clínicos, en la serie en estudio un 30% de los pacientes fueron no idénticos con sus donantes, esto llevo a que en 10 pacientes tuvimos que utilizar ATG como parte del esquema de acondicionamiento, no observamos diferencia en la incidencia de la EICR en este subgrupo, tampoco la hubo cuando analizamos los TPH idénticos vs. los no idénticos.

Es posible plantear estrategias de profilaxis que incluyan la depleción inespecífica de linfocitos T, a su vez si podemos eliminar solo los linfocitos que están activados o en procesos de mitosis podríamos ser más efectivos, ya que son los responsables de la enfermedad injerto contra receptor en fases tempranas del periodo postrasplante inmediato. Existen múltiples fármacos que podrían ser útiles a la hora de plantear este tipo de estrategias de profilaxis, donde la inactivación de los linfocitos se realice antes que la cascada inflamatoria este establecida.

Fármacos como lo son el Bortezomib, que es un inhibidor de proteosomas, es capaz de provocar un efecto proapoptótico selectivo frente a linfocitos aloreactivos, de esta manera preservando la viabilidad de los linfocitos inactivos

y podría de esta manera conservar la respuesta injerto contra tumor, se ha visto en un ensayo fase II una baja incidencia de EICR grado II-IV en torno al 12 %, algo menor que en las series habituales con pautas estándar de profilaxis tipo Metotrexato + CsA o Tacrólimus + Metotrexato [54].

También existen agentes desmetilantes como son la 5 - azacitidina, que actúan modificando el patrón de metilación de algunos genes promotores, estos pueden estar implicados en el proceso de activación linfocitaria, se realizan modificaciones a nivel epigenético, estas son capaces de bloquear la activación de los linfocitos, disminuyendo el riesgo de EICR en el periodo post TPH [55].

Estos procesos de activación y proliferación linfoide dependen de la activación de diversas vías de señalización intracelular. Los anclaje a la membrana de las diferentes enzimas involucradas en este proceso se realiza mediante la unión de moléculas hidrófobas a las proteínas, al que se le unen grupos farnesilo o geranil - geranilo, se ha visto que los inhibidores de este proceso podrían disminuir el riesgo de EICR, estos fármacos como lo son el Vorinostat, se pueden utilizar en combinación con otros inmunosupresores como el Tacrólimus con unos resultados alentadores, se ha visto una menor incidencia del EICRag. grado II-IV en pacientes sometidos a aloTPH de donante emparentado con acondicionamiento de intensidad reducida [56].

En el 2004 se publicaron los primeros resultados del uso de células mesenquimales (MSC) para el tratamiento del EICRag. refractaria a esteroides, tras los primeros buenos resultados se comenzaron a realizar ensayos clínicos fase I-II donde mostraban que era un tratamiento eficaz y seguro para los pacientes [66]. En el estudio fase II con el mayor número de pacientes publicado hasta el momento, recibieron 1 o 2 dosis de MSC, las tasas de respuestas completas obtenidas fueron superiores al 70%, con respuestas completas en torno al 50%, observando mayor supervivencia global en aquellos pacientes que la alcanzaron [67].

El papel de las MSC en la prevención del desarrollo de EICRag. hemos de indicar que existe poca información y con resultados contradictorios [66,108]. En humanos existe un estudio aleatorizado en el que se administraban 1×10^6 células/Kg en el momento del injerto ($>1 \times 10^9$ leucocitos/L) los pacientes tratados presentaban una tasa menor de EICRag. II-IV (5% vs. 39%), no se han observado diferencias en

cuanto a la tasa de EICR y sí en cuanto a la mejoría del injerto hematopoyético en otros estudios realizados [65,67].

En la serie en estudio la profilaxis del EICR se realizó en 76 pacientes con Metotrexato y Ciclosporina, 26 pacientes (35%) desarrollaron EICRag. En 4 pacientes se utilizó Tacrólimus y Sirólimus, 3 pacientes (75%) también desarrollo EICRag. En 9 pacientes se utilizó Ciclosporina y Micofenolato, 3 pacientes (33%) desarrollo EICR. En 3 pacientes se utilizó Tacrólimus y Metotrexato ,2 pacientes (66%) padecieron EICRag. En este trabajo cuando valoramos la respuesta al tratamiento de primera línea del EICRag. no se encontraron diferencias en relación a la expresión o no de los alelos GSTM1 y GSTT1. En aquellos pacientes que necesitaron de segundas líneas de tratamiento tampoco observamos diferencias en la respuesta según la expresión de los alelos.

En relación con las diferentes profilaxis y la incidencia del EICRag. no es posible sacar conclusiones dado el corto numero de pacientes y la diversidad de profilaxis utilizadas, no obstante se observa que no hay diferencias en los diferentes subgrupos. Tanto en las profilaxis utilizadas como en los tratamiento de primera y segunda líneas, no hubo diferencias en la incidencia del EICRag. cuando lo analizamos con las expresiones de los alelos GSTT1 y GSTM1. Con todas las herramientas terapéuticas que poseemos en la actualidad y viendo que la incidencia del EICRag. y del crónico no han disminuido en gran proporción en los últimos años, se deja entrever que el eje de la cuestión es la respuesta inmune y el momento en que se desencadena la misma, de esta manera pensamos que con la utilización de scores pronósticos del EICR podríamos adelantarnos en el uso de fármacos con mecanismos de acción antes mencionados o tal vez poder ser más intenso en las profilaxis utilizadas.

LA UTILIZACIÓN DE ICT Y LA INCIDENCIA DE EICR

Hemos visto que en los últimos 30 años la radioterapia ha sido la piedra angular en la mayoría de los esquemas de acondicionamiento utilizados, en general se utiliza asociada a quimioterapia, la radioterapia combina buena capacidad inmunosupresora y actividad anti-neoplásica en casi la totalidad de las neoplasias hematológicas, con la ventaja adicional de alcanzar sitios como son el sistema nervioso central y los testículos, también posee la ventaja de no presentar resistencia cruzada con los agentes farmacológicos normalmente utilizados en los esquemas de tratamiento previos al TPH [68].

La irradiación corporal total presenta una eficacia y toxicidad que está condicionada por variables como son la dosis total, la dosis fraccionada y el ratio de exposición [68,69]. La dosis total de RT administrada es fundamental y en general a mayores dosis se obtiene mayor eficacia pero también presentan mayor toxicidad relacionada con el procedimiento, sobre todo de tipo gastrointestinal y pulmonar, esta última principalmente limita el uso de dosis superiores a 12-13 Gy. Se ha comprobado que el uso de dosis cercanas a 16 Gy, si bien presenta menor recidiva, no se asocia a mejor supervivencia debido a una mayor mortalidad tóxica [68,69]. Es importante también el número de fracciones de radioterapia utilizadas, donde se ha demostrado que el uso de esquemas fraccionados ofrecen un mejor perfil de seguridad. Mayormente se utiliza radioterapia hiper fraccionada (más de una dosis al día) y los esquemas más utilizados son 1.2 Gy tres veces al día, 2 Gy dos veces al día o 3 Gy cuatro veces al día [69,70].

En la literatura se recogen datos de que la ICT es un factor de riesgo para el desarrollo de la mucositis post acondicionamiento y de la inflamación intestinal después del TPH, ambas tienen un papel importante en la patogenia y en la aceleración de la EICRag., estos sucesos tienen estrecha relación con la dosis total, no obstante con menores dosis también se asoció con mayor incidencia de EICRag. [70]. El impacto de la intensidad del acondicionamiento en la incidencia de EICRag. sigue siendo un tema de debate, Nakasone H et al [59] analizaron 6848 receptores adultos que recibieron TPH alogénico, en donde observaron que independiente de la intensidad del acondicionamiento, en aquellos que se había

utilizado ICT presentaban mayor incidencia de EICRag. grado II-IV, en este artículo sugieren también considerar la utilización de ICT dentro de una estrategia adaptada a los riesgos para la prevención de EICRag [72,73].

La fisiopatología del EICRag se considera generalmente que es el ataque de los linfocitos del donante, que son estimulados por dañar al tejido del huésped en adición al medio ambiente exterior, este daño tisular es debido al acondicionamiento del TPH que es uno de los primeros pasos en la activación de las células inflamatorias y de esta manera comienza la cascada de inflamatoria [71], en relación con el uso de ICT en nuestra serie observamos que de 28 pacientes que se acondicionaron con ICT + Ciclofosfamida, 15 de ellos no desarrollaron EICR aguda y 13 pacientes si la presentaron en grado II-IV. En el grupo que solo utilizo quimioterapia, observamos que de 64 pacientes, 45 no desarrollaron clínica de EICR aguda. De esta manera obtuvimos un valor estadísticamente significativo con una $p= 0.024$ para el subgrupo de pacientes que solo utilizo quimioterapia. Estos resultados son similares a los obtenidos por Nakasone et al donde la utilización de ICT es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de EICRag.

Jagasia M et al [86] también sugiere en una serie de 5650 pacientes que los acondicionamientos que incluyen ICT, que son de tipo mieloablativo y la fuente de progenitores sea de sangre periférica, tiene mayor riesgo de desarrollar EICRag. Seleccionaron subgrupos de acuerdo a estas tres variables y observaron que los que utilizaban medula ósea, acondicionamientos de intensidad reducida y no utilizan ICT, tienen menor tasa de EICRag., también abogan por que debiera de ser considerado el régimen de acondicionamiento como parte de la estrategia de prevención del EICR para los pacientes sometidos a TPH alogénico. Sin embargo, el impacto actual del régimen de acondicionamiento de intensidad reducida parece ser controversial en relación a la incidencia de EICRag., ya que al disminuir la intensidad del régimen se observa disminución del EICRag. a cambio de mayor tasa de incidencia del EICRag. de inicio tardío y de EICR crónica [87]. Corvò R et al [60] en un análisis retrospectivo mostró que la ICT puede influir en la aparición de EICR crónica y afectar el pronóstico de los pacientes con LLA que reciben TPH alogénico, a pesar de su buena tolerancia cuando se administra de forma fraccionada. Resumiendo, observamos que se asoció el uso de ICT con

mayor riesgo de EICRag [58,63,72] por contra no existe en la literatura datos que sugieran mayor incidencia de EICRag. con el uso de los diferentes regímenes que utilizan solo quimioterapia. No obstante se ha seguido apoyando la teoría del imperante rol del acondicionamiento en la patogenia de esta complicación derivada del TPH alógeno [72,87].

El régimen de acondicionamiento hoy en día no es valorado como factor relacionado con la EICRag. a la hora de decidir que acondicionamiento se utiliza, no obstante su apreciación como factor pronóstico debe de ser encuadrada dentro de un contexto general, en esta valoración tenemos que tener en cuenta que existen numerosas publicaciones donde se observa que no ofrece mayor beneficio en SG y SLE el uso de ICT comparado con el uso solo de quimioterapia [69,70,71].

LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO

Nuestro estudio presenta limitaciones como son el análisis retrospectivo de los pacientes y el escaso tamaño muestral. Estas dos limitaciones están estrechamente relacionada con la expresión de los alelos de la familia GST y con las tasas de incidencia de EICR agudo grado II-IV.

La posibilidad del sesgo de selección por el escaso tamaño muestral y el análisis retrospectivo de los datos debe de considerado, pero debemos destacar que las características de los pacientes estaban bien estructuradas.

Para concluir, debemos resaltar que este estudio aporta la primera evidencia de la asociación de la enfermedad injerto contra huésped con expresión o falta de la misma del alelo GSTM1.

PERSPECTIVAS A FUTURO

La comprobación de este resultado por otros grupos de trabajo es fundamental a la hora de poder plantear scores pronóstico de la EICR aguda y necesaria para avalar los resultados obtenidos en la serie en estudio.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

EN RELACIÓN CON LOS OBJETIVOS PRINCIPALES

1^a)- Los pacientes sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos que presentan expresión del alelo GSTM1, tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedad injerto contra receptor aguda grado II-IV independientemente de otros factores de riesgo conocidos, de manera tal que los donantes sin expresión del alelo GSTM1 reconocerían esta proteína expresada en los pacientes y generarían una reacción alo-inmune en el receptor. Asimismo, observamos que los pacientes que no expresan el alelo GSTM1 tienen una menor incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda.

2^a)- La expresión del alelo GSTM1 representa un factor de riesgo de aparición de la enfermedad injerto contra receptor aguda con una sensibilidad adecuada. También destaca el elevado valor predictivo negativo, el cual nos puede ser útil para identificar a aquellos pacientes que van a tener alta probabilidad de no desarrollar enfermedad injerto contra receptor aguda cuando no lo expresen.

3^a)- No observamos relación entre la expresión del alelo GSTT1 en los pacientes y en los donantes con la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda.

4^a)- Independientemente del tipo de profilaxis y/o fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad injerto contra receptor, la expresión de los alelos GSTM1 y GSTT1 no modificó las respuestas obtenidas.

EN RELACIÓN CON LOS OBJETIVOS SECUNDARIOS

5ª)- Los pacientes que se acondicionaron con irradiación corporal total + Ciclofosfamida tuvieron mayor predisposición de desarrollar enfermedad injerto contra receptor aguda, también se ha observado, que aquellos que recibieron TPH de donante emparentado han presentado menor incidencia de la misma.

6ª)- La toxicidad hepática, la mortalidad, la recaída y la enfermedad injerto contra receptor crónica no fueron diferentes según la presencia/ausencia de los alelos GSTM1 y GSTT1.

VII. BIBLIOGRAFIA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- 1- Whalen R, Boyer TD. Human glutathione S-transferases. *Semin. Liver Dis.* 1998;18(4): 345-58.
- 2- Tocher DR, Leaver MJ, Hodgson PA. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res.* 1998 Jul-Aug;37(2-3):73-117.
- 3- Abu - Amero KK, Al - Boudari OM, Mohamed GH, Dzimiri N. T null and M null genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. *Med Genet.* 2006 Apr 19;7:38.
- 4- Strange RC , Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001 Oct 1;482(1-2):21-6.
- 5- Rong-feng Liao, Min-jie Ye, Cai-yuan Liu, Dong-qing Ye . An Updated Meta-Analysis: Risk Conferred by Glutathione S-Transferases (*GSTM1* and *GSTT1*) Polymorphisms to Age-Related Cataract. *J Ophthalmol.* 2015; 2015: 103950.
- 6- Bolt HM , Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab.* 2006 Aug;7(6):613-28.
- 7- Fritz F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Letters* 221 (2005) 123-129.
- 8- Li XM, Yu XW, Yuan Y, Pu MZ, Zhang HX, Wang KJ, Han XD. Glutathione S-transferase P1, gene-gene interaction, and lung cancer susceptibility in the Chinese population: An updated meta-analysis and review. *J Cancer Res Ther.* 2015 Jul-Sep;11(3): 565-70. doi: 10.4103/0973-1482.163788.
- 9- Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S. Glutathione S-transferases genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies. *J Biol Chem.* 2009 Jan 2;284(1):436-45.
- 10- Wang J, Wang T , Yin GY , Yang L· Wang ZG, Bu XB· Glutathione S transferase polymorphisms influence chemotherapy response and treatment outcome in breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015 Sep 22;14(3):11126-32.
- 11- Engstrom PF, Clapper M, Schnoll RA, Orleans CT. Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III E. *Cancer Prevention: Prevention of Tobacco-Related Cancers.* Cancer Medicine. 5th edition. Hamilton.
- 12- Ambrosone CB, Sweney C, Coles BF. Polymorphisms in glutathione S-transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:7130-5.

- 13- Kilburn L, Okcu MF, Wang T, Cao Y, Renfro - Spelman A, Aldape KD, Gilbert MR, Bondy M. Glutathione S-transferase polymorphisms are associated with survival in anaplastic glioma patients. *Cancer*. 2010 May 1;116(9):2242-9. doi: 10.1002/cncr . 25006.
- 14- Mo Z, Gao Y, Cao Y, Gao F, Jian L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate*. 2009 May 1;69(6):662-88. Review.
- 15- White DL, Li D, Nurgalieva Z, El-Serag HB. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008 Feb 15;167(4):377-89.
- 16- Ye Z and Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. May 2005; 41 (7) :980-9.
- 17- Das P, Shaik AP, Bammidi VK. Meta-analysis study of glutathione-S-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009 Aug;50(8):1345-51.
- 18- Kim a,b,c , Bhumsuk Keam a , Kyung -Hun Lee a , Jin Hee Kim d , So Yeon Oh a, Eun Kyung Ra t al. Glutathione S-transferase A1 polymorphisms and acute graft-vs.-host disease in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Inho. - *Clin Transplant*. 2007 Mar-Apr;21(2):207-13.
- 19- Rocha V, Porcher R, Fernandes JF, Filion A, Bittencourt H, Silva W Jr et al. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. - *Leukemia*. 2009 Mar;23(3):545-56.
- 20- Dahabreh IJ, Giannouli S, Gota V, Voulgarelis M. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and myelodysplastic syndrome risk: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2010 Apr 1;126(7):1716-23. Review.
- 21- S Terakura, M Murata, T Nishida, N Emi, Y Akatsuka, Y Morishima, Y Koderu and T Naoe. Increased risk for treatment-related mortality after bone marrow transplantation in GSTM1-positive recipients. *Bone Marrow Transplantation* (2006) 37, 381-386.
- 22- Armour J. A L., Croisier M. and Jeffreys A J. (1992) Human minisatellite alleles detectable only after PCR amplification. *Genomics* 12: 116-124.
- 23- . Barbujani G, Magagni A, Minch E, Cavalli-Sforza LL. An apportionment of human DNA diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4516-9.

- 24- Craig J., Fowler S., Burgoyne L. A, Scaott A C. and Handing H. V. J. Repetitive deoxyribonucleotic acid (DNA) and human genome variation: A coneise review relevant to forensic biology. *Forensic Sei* 33: 1111-1126.
- 26- Weber. L. Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*. (1990) 7: 524-530.
- 27- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770.
- 28- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al.: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98 (6): 1752-9, 2011.
- 29- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, et al.: Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 19 (8): 1345-9, 2015.
- 30- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al.: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96 (13): 4075-83, 2000.
- 31- Mrózek K, Prior TW, Edwards C, et al.: Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 19 (9): 2482-92, 2001.
- 32- Kantarjian HM, Hoelzer D, Larson RA. Advances in the treatment of adult acute lymphocytic leukemia. Part I. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14(6):1205.
- 33- Thomas DE and Storb R. The development of scientific foundation of hematopoietic stem cell transplantation based on animal and human studies. Thomas ED, Blume KG and Forman SJ. *Hematopoietic Cell Transplantation*. 1998. Blackwell Publishing. Pags 1-8.
- 34- Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-vs.-host disease. En Thomas' *Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR editores. Blackwell Publishing, USA, pp 353, 2004.
- 35- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301, 2002.
- 36- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 285: 412, 1999.

- 37- Weiss A, Littman D. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263, 1994.
- 38- Jagasia N, Greinix H, Arora M et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood and Marrow Transplant* 2015; 21: 389.
- 39- McMillan M, Robin M, Harris A et al. A refined risk score for aGVHD that predicts response to initial therapy, survival and TRM. *Biol Blood and Marrow Transplant* 2015; 21: 761.
- 40- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplantation* 1995;15:825-828.
- 41- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE et al. Clinical manifestation of graft versus host disease in human recipient of marrow HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
- 42- Nash R, Antin J, Karanes C et al. Phase 3 study comparing MTX and tacrolimus with MTX and cyclosporine for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 96: 2062, 2000.
- 43- Theurich S, Fischmann H, Chakupurakai G et al. ATG for postransplant GVHD prophylaxis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 88: 178.
- 44- Theurich S, Fischmann H, Shimabukuro A et al. Polyclonal ATG for the prophylaxis of GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 12: 9.
- 45- Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, et al. A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4557-63.
- 46- Castilla C, Pérez-Simón JA, Sánchez-Guijo F, et al. Oral beclomethasone dipropionate for the treatment of gastrointestinal acute graft-versus-host disease (GVHD). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Sep;12(9):936-41.
- 47- Das-Gupta E, Dignan F, Shaw B et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of adults and children with aGVHD: UK consensus statements and review of published literature. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49: 1251.
- 48- Sánchez-Guijo F, Caballero-Velázquez T, López-Villar O, et al. Sequential third-party MSC therapy for refractory acute graft-versus-host disease *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Jun 18.

- 49- Kamei H, Masuda S, Nakamura T, Fujimoto Y, Oike F, Ogura Y, Takada Y, Hamajima N. Impact of glutathione S-transferase T1 gene polymorphisms on acute cellular rejection in living donor liver transplantation. *Transpl Immunol*. 2013 Jan;28(1):14-7. doi: 10.1016/j.trim.2012.11.002.
- 50- Azarpira N, Nikeghbalian S, Geramizadeh B, Darai M. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms with acute rejection in Iranian liver transplant recipients. *Mol Biol Rep*. 2010 Jan;37(1):21-5. doi: 10.1007/s11033-009-9487-5.
- 51- Akgul SU, Oguz FS, Çalışkan Y, Kekik C, Gürkan H, Türkmen A, Nane I, Aydin F. *Transplant Proc*. The effect of glutathione S-transferase polymorphisms and anti-GSTT1 antibodies on allograft functions in recipients of renal transplant. 2012 Jul-Aug;44(6): 1679-84.
- 52- Aguilera I, Sousa JM, Núñez-Roldán A. Clinical relevance of GSTT1 mismatch in solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol*. 2013 Nov;74(11): 1470-3.
- 53- Graziani F et al. Treatment of acute graft versus host disease with low dose-alternative day anti-thymocyte globulin. *Haematologica* 2002;87:873-8.
- 54- Koreth J, Kim HT, Lange PB, Bindra B, Reynolds CG, Chammas MJ et al. A Bortezomib-Based Regimen Offers Promising Survival and Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Myeloablative HLA-Mismatched and Unrelated Donor Transplantation: A Phase II Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Nov;21(11):1907-13.
- 55- Sánchez-Abarca LI, Gutierrez- Cosio S, Santamaría C et al. Immunomodulatory effect of 5- azacytidine : potential role in the transplantation setting. *Blood*, Jan 7;115(1): 107-21.
- 56- Choi SW, Braun T, Chang L et al. Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 87-95.
- 57- Hechinger AK, Maas K, Dürr C, et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and farnesylation protects against graft-versus-host disease via effects on CD4 effector T cells *Haematologica*. 2013 Jan;98(1):31-40.
- 58- Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft versus host disease: rationale for the use of cytokines shileds in allogeneic bone marrow transplantation. *Blod* 95: 2754, 2000.

- 59- Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T et al. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Apr;50(4):559-65.
- 60- Corvò R, Paoli G, Barra S, Bacigalupo A, Van Lint MT, Franzone P et al. Total body irradiation correlates with chronic graft versus host disease and affects prognosis of patients with acute lymphoblastic leukemia receiving an HLA identical allogeneic bone marrow transplant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Feb 1;43(3):497-503.
- 61- Mullighan CG, Petersdorf EW. Genomic polymorphism and allogeneic hematopoietic transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006 Jan;12(1 Suppl 1):19-27.
- 62- Kim D, Won HH, Su S, Cheng L, Xu W, Hamad N et al. Risk stratification of organ-specific GVHD can be improved by single-nucleotide polymorphism-based risk models. *Bone Marrow Transplant.* 2014 May;49(5):649-56. doi: 10.1038/bmt.2014.20.
- 63- Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T et al. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Apr;50(4):559-65. doi: 10.1038/bmt.2014.293.
- 64- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-1586.
- 65- Sanchez-Guijo FM, Lopez-Villar O, Lopez - Anglada L, Villaron EM, Muntion S, Díez-Campelo M, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for refractory cytopenias after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion.* 2012;52:1086-1091.
- 66- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-1441.
- 67- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper -Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-317.
- 68- Damina J Green & Oliver W Press. Radioimmunotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Thomas Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Chapter 24.* Fourth edition. Ed: Appelbaum F, Forman S, Negrin R, Blume K.
- 69- Wong, J. Y. C., Forman, S., Somlo, G., et al. Dose escalation of total marrow irradiation with concurrent chemotherapy in patients with advanced acute leukemia undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013; 85: 148-56.

- 70- Cantoni N, Gerull S, Heim D, et al. Order of application and liver toxicity in patients given BU and CY containing conditioning regimens for allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011 ; 46, 344-9.
- 71- Shi - Xia X, Xian- Hua T, Hai- Qin X, et al: Total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulphan with cyclophosphamide as conditioning regimen for patients with leukemia undergoing allo- geneic stem cell transplantation: A meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 50-60.
- 72- Bredeson C, Le Rademacher J, Kato K, et al. Prospective cohort study comparing intravenous busulfan to total body irradiation in hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2013; 122: 3871-8.
- 73- Nagler A, Rocha V, Labopin M, et al. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in Remission: Comparison of Intravenous Busulfan Plus Cyclophosphamide (Cy) Versus Total-Body Irradiation Plus Cy As Conditioning Regimen--A Report From the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol,* 2013; 31: 3549-3556.
- 74- Kristiansen OP, Nolsoe RL, Holst H et al. The intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism in type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2000;52:107-111.
- 75-. Low JH, Williams FA, Yang X et al. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2004;10:173-181.
76. Sun J, Williams J, Yan HC et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J.Biol.Chem.* 1996;271:18561-18570.
77. Kosmoliaptsis V, Goodman RS, Dafforn TR, Bradley JA, Taylor CJ. Structural implications of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 polymorphisms. *Transplantation* 2008;86:484-485.
78. Goodman RS, Kirton CM, Oostingh GJ et al. PECAM-1 polymorphism affects monocyte adhesion to endothelial cells. *Transplantation* 2008;85:471-477.
- 79- Holler E et al. Prognosis significance of NOD2/CARD15 in HLA identical HSCT effect on long term outcome in 2 independent cohort may modulate by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood,* 2006. May 15;107(10):4189-93.
- 80- Mayor NP et al. SNPs in the NORD2/CARD15 gene are associated with and increase risk of relapse and death for patients with AL after HSCT with unrelated donor. *Clinical Oncology,* 2007.Sep 20;25(27):4262-9.

- 81- CG Mullingham. Genomic polymorphism and allogenic hematopoietic transplantation. *Haematologica*. 2009 Oct;94(10):1338-40.
- 82- Dickinson AM, Charron D et al. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Current opinion in immunology*. 2005.Oct;17(5):517-25.
- 83- Mullighan C, Bardy P et al. New direction in the genomics of allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *ASMBT* 2007. Feb;13(2):127-44.
- 84- Dickinson AM, Middleton P et al. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *BJH* 2004. Dec;127(5):479-90.
- 85- Perez A, Roman J, Jimenez A. CTLA-4 PL and clinical outcome after allogenic SCT from HLA identical sibilings donor. *Blood* 2007. Jul 1;110(1):461-7. Epub 2007 Mar 23.
- 86- Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296-307.
- 87- Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Martino R, Brunet S, Urbano A, Caballero MD et al. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br J Haematol*. 2005 Aug;130(3):394-403.
- 88- Keen LJ, DeFor TE, Bidwell JL, Davies SM, Bradley BA, Hows JM. Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation. *Blood* 2004 May 1;103(9):3599-602.
- 89- Madrigal A. Immunogenetic factors in donors and patients affect the outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood cell Mol. Dis*, 2008.Dec;127(5):479-90.
- 90- Mac Millan M . High producer IL 2 genotype increase risk for acute GVHD after unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation*, 2003.Dec 27;76(12):1758-62.
- 91- Lin MT et al. Relation of an IL 10 promoter PL to GVHD and survival after SCT. *NEJM*, 2003.Dec 27;76(12):1758-62.
- 92- Kögler G, Middleton PG, Wilke M, Rocha V, Esendam B, Enczmann J et al . Recipient cytokine genotypes for TNF-alpha and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GVHD in unrelated cord blood transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation*. 2002 Oct 27;74(8):1167-75.
- 93- Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1594-600.

94- Elhasid R, Krivoy N, Rowe JM, Sprecher E, Efrati E. Glutathione S-transferase T1-null seems to be associated with graft failure in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Dec;45(12):1728-31. doi: 10.1038/bmt.2010.61. Epub 2010 Mar 29.

95- Martínez-Bravo MJ, Tallón I, Espigado I, Perez-Simón JA, Pérez-Romero P, Gracia-Ahufinger I et al. Influence of glutathione S-transferase T1 donor/recipient mismatch and anti-GSTT1 antibodies in hepatic graft-versus-host-disease *Immunology letter* 2011 Dec 30;141(1):140-4. doi: 10.1016/j.imlet.2011.09.005.

96- Hahn T, Zhelnova E, Sucheston L, Demidova I, Savchenko V, Battiwalla M et al. A deletion polymorphism in glutathione-S-transferase mu (GSTM1) and/or theta (GSTT1) is associated with an increased risk of toxicity after autologous blood and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jun;16(6):801-8.

97- Murphy N, Diviney M, Szer J, Bardy P, Grigg A, Hoyt R, et al. Donor methylenetetrahydrofolate reductase genotype is associated with graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplant patients treated with methotrexate. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Apr;37(8):773-9.

98- Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Greinix H, Dickinson AM et al.

The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2008 Aug;35(4-5):381-4.

99- Holler E, Hahn J, Andreesen R, Rogler G, Brenmoehl J, Greinix H et al. NOD2/CARD15 polymorphisms in allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors: T depletion matters. *J Clin Oncol.* 2008 Jan 10;26(2):338-9; author reply 339.

100- Martínez-Bravo MJ, Calderón-Cabrera C, Márquez-Malaver FJ, Rodríguez N, Guijarro M, Espigado I et al. Mismatch on glutathione S-transferase T1 increases the risk of graft versus-host disease and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Sep;20(9):1356-62.

101- Kim HJ, Min WS, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Min CK et al. Successful prevention of acute graft-versus-host disease using low-dose antithymocyte globulin after mismatched, unrelated, hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Jun;15(6):704-17.

102- Paczesny S, Levine JE, Braun TM, Ferrara JL. Plasma biomarkers in graft-versus-host disease: a new era? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Jan;15(1 Suppl):33-8.

103- Toubai T, Tanaka J, Paczesny S, Shono Y, Reddy P, Imamura M. Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic

hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012 May;7(3): 229-39.

104- Fiema B, Harris AC, Gomez A, Pongtornpipat P, Lamiman K, Vander Lugt MT et al. High throughput sequential ELISA for validation of biomarkers of acute graft-versus-host disease. *J Vis Exp.* 2012 Oct 31;(68).

105- Chen YB, Cutler CS. Biomarkers for acute GVHD: can we predict the unpredictable?. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Jun;48(6):755-60.

106- Singh R, Manchanda PK, Kesarwani P, Srivastava A, Mittal RD. Influence of genetic polymorphisms in GSTM1, GSTM3, GSTT1 and GSTP1 on allograft outcome in renal transplant recipients. *Clin Transplant.* 2009 Aug-Sep;23(4):490-8.

107- Bacigalupo A, Lamparelli T, Milone G, Sormani MP, Ciceri F, Peccatori J et al. Pre-emptive treatment of acute GVHD: a randomized multicenter trial of rabbit anti-thymocyte globulin, given on day+7 after alternative donor transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Feb;45(2):385-91.

108- Mielcarek M, Storb R, Georges GE, Golubev L, Nikitine A, Hwang B et al. Mesenchymal stromal cells fail to prevent acute graft-versus-host disease and graft rejection after dog leukocyte antigen-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Feb;17(2):214-25.

109- Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H et al. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicenter study. *Lancet Haematol.* 2015 Jan 1;2(1):e21-e29.

110- MacMillan ML, Robin M, Harris AC, DeFor TE, Martin PJ, Alousi A et al. A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Apr;21(4): 761-7.

111- MacMillan ML, DeFor TE, Weisdorf DJ. What predicts high risk acute graft-versus-host disease (GVHD) at onset?: identification of those at highest risk by a novel acute GVHD risk score. *Br J Haematol.* 2012 Jun;157(6):732-41.

112- Miyamoto T, Akashi K, Hayashi S, Gondo H, Murakawa M, Tanimoto K et al. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 185-190.

113- Holler E, Kolb HJ, Moller A, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 1011-1016.

114- Ansari M, Huez-Diaz P, Rezgui MA, Markt S, Duval M, Bittencourt H et al. Influence of glutathione S-transferase gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics and outcome of hematopoietic stem-cell transplantation in thalassemia pediatric patients. Bone Marrow Transplant. 2015 Dec 21. doi: 10.1038/bmt.2015.321.