

## INDICADORES EVOLUTIVOS Y DE RECUPERACION MEDULAR EN TRASPLANTE DE MEDULA OSEA DESPUES DE IRRADIACION CORPORAL TOTAL

DIANA DUBNER<sup>1</sup>, MARIA DEL R. PEREZ<sup>1</sup>, MARCOS BARBOZA<sup>3</sup>, MIGUEL SORRENTINO<sup>2</sup>, ANIBAL ROBINSON<sup>2</sup>, PABLO GISONE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Radiopatología, ARN (Autoridad Regulatoria Nuclear); <sup>2</sup>Servicio de Trasplante de Médula Osea, Hospital Naval Pedro Mallo; <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** El estrés oxidativo y el índice de madurez reticulocitaria (IMR) fueron estudiados en 27 pacientes sometidos a trasplante de médula ósea (TMO). En los pacientes con evolución no favorable, los lipoperóxidos mostraron un incremento entre el día 12-14 postrasplante (mediana 1.83  $\mu$ M rango 0.78-5.82) con respecto al acondicionamiento (mediana 1.05  $\mu$ M rango 0.36-1.84  $p < 0.05$ ). Los pacientes con evolución favorable revelaron un incremento de lipoperóxidos durante el acondicionamiento ( $p < 0.05$ ) (mediana: 1.42  $\mu$ M rango: 0.31-4.50) y un descenso significativo durante la tercera semana (mediana 0.77  $\mu$ M rango 0.21-1.48) y cuarta semana postrasplante (mediana 0.60  $\mu$ M rango 0.11-1.48) con respecto a los valores de acondicionamiento ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente). La actividad antioxidante total aumentó significativamente en los pacientes que evolucionaron al óbito dentro de los 35 días postrasplante ( $n:3$ ). El IMR reveló *engraftment* en los TMO alogénicos en el día 17 (rango 11-24) vs neutrófilos: día 21 (rango 14-28  $p < 0.001$ ). El incremento de lipoperóxidos durante los días 12-14 postrasplante fue predictor de evolución no favorable. El IMR resultó el más temprano detector de *engraftment* en TMO alogénicos.

**Palabras clave:** trasplante de médula ósea, irradiación, repoblación medular, estrés oxidativo, reticulocitos

**Abstract** *Prognosis and bone marrow recovery indicators in bone marrow transplantation after total body irradiation.* Oxidative stress and reticulocyte maturity index (RMI) were studied in 27 patients who underwent bone marrow transplantation (BMT). Plasmatic lipoperoxide levels of those patients with unfavorable evolution were significantly increased on days 12-14 post-transplant (median 1.83  $\mu$ M, range 0.78-5.82) compared with preconditioning levels (median 1.05  $\mu$ M, range 0.36-1.84) ( $p < 0.05$ ). Patients with favorable evolution revealed significantly higher lipoperoxide levels during conditioning regime (median 1.42  $\mu$ M, range 0.31-4.50) ( $p < 0.05$ ). Starting from the 3<sup>rd</sup> post-transplant week a significant and continuous decrease was observed, with a median of 0.77  $\mu$ M (range 0.21-1.48  $p < 0.05$ ) for the 3<sup>rd</sup>, and a median of 0.60  $\mu$ M (range 0.11-1.48 for the 4<sup>th</sup> week ( $p < 0.01$ ). A significant increase in total antioxidant activity was observed in the three patients who died up to the 35 days post-transplant. Recovery of bone marrow function was detected by RMI after a median time of 17 days (range 11-24) post-allogeneic transplantation. The threshold established for absolute neutrophil count was achieved after a median of 21 days (range 14-28) ( $p < 0.001$ ). An increase of plasma lipoperoxides on days 12-14 post-transplant may be a predictive value of unfavourable evolution. RMI was the earlier indicator of engraftment in allogeneic BMT.

**Key words:** bone marrow transplantation, radiation, engraftment, oxidative stress, reticulocytes

El trasplante de médula ósea (TMO) es un procedimiento que ha logrado, bajo ciertas condiciones, un cambio en la historia natural de la enfermedad hematológica maligna<sup>1</sup>.

Los regímenes condicionantes para TMO generan mielotoxicidad a través de diferentes mecanismos de acción. Numerosos estudios han señalado a la producción de radicales libres como el principal mecanismo in-

directo de daño radioinducido con baja transferencia lineal de energía (TLE) en sistemas biológicos<sup>2</sup>, teniendo también un rol relevante en la acción citotóxica de los fármacos citostáticos<sup>3</sup>. El estrés oxidativo asociado al efecto mieloablativo de los regímenes antedichos, se produce como la ruptura del equilibrio entre la generación de especies reactivas y la capacidad neutralizante de los sistemas antioxidantes<sup>4</sup>.

Este estado definido como el aumento de la concentración estacionaria de especies reactivas, tiene en aquellos pacientes sometidos a irradiación de todo el cuerpo (ITC) como medio condicionante, una respuesta bifásica en la mayor parte de los casos, que se expresa como un

Recibido: 5-II-2002

Aceptado: 18-IX-2002

**Dirección postal:** Dr. Pablo A. Gisone, Laboratorio de Radiopatología, Libertador 8250, 1429 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4379-8460 e-mail: pgisone@cae.arn.gov.ar

incremento pronunciado de ERO (especies reactivas del oxígeno) y lipoperóxidos (LP) durante el condicionamiento y un incremento tardío debido a las condiciones sistémicas del enfermo durante su evolución.

Por otra parte, los parámetros hematológicos de recuperación medular permiten detectar el momento de *engraftment* del trasplante. El análisis citométrico de las poblaciones reticulocitarias de sangre periférica provee una medida objetiva de la madurez reticulocitaria a través de la correlación entre la intensidad de fluorescencia obtenida con un colorante específico y el contenido de ARN, permitiendo estimar un índice de madurez reticulocitaria (IMR) definiendo poblaciones con alta, media y baja intensidad de fluorescencia<sup>5</sup>.

La presencia de reticulocitos de alta fluorescencia podría ser considerada como una expresión temprana de la actividad eritropoyética, y ésta un indicador de la reactivación hematopoyética global<sup>6</sup>. El objeto del presente trabajo es evaluar parámetros de estrés oxidativo como potenciales indicadores evolutivos y la expresión del IMR como instrumento de detección de recuperación medular postrasplante (pt), utilizando ITC como condicionante de TMO con el propósito de contar con indicadores de rápida implementación en la práctica hematológica y en la potencial evaluación y seguimiento de personas sobreexpuestas a radiaciones ionizantes.

## Materiales y métodos

### Descripción de los pacientes y del esquema de toma de muestras

En este estudio fueron enrolados 27 pacientes. Las características clínicas de los mismos y el tipo de TMO están descritos en la Tabla 1. El régimen condicionante pretrasplante

TABLA 1.- Características clínicas de los pacientes y tipo de trasplante de médula ósea (TMO)

	Alogénico	Autólogo	Singeneico (*)
Número	22	4	1
Sexo (M / F)	13 / 9	3 / 1	1 / -
Edad (mediana)	34	30	44
rango	7 - 46	16 - 48	-
Diagnóstico			
Leucemia mieloide aguda (LMA)	5	3	-
Leucemia mieloide crónica (LMC)	14	-	-
Leucemia linfocítica aguda (LLA)	3	1	-
Linfoma no Hodgkin (LNH)	-	-	1

(\*) Un paciente recibió un trasplante singeneico a partir de donante gemelar homocigoto.

consistió en quimioterapia (comenzada en el día -9) combinada con radioterapia (realizadas entre los días -4 y -1). Todos los trasplantes incluidos en este estudio fueron grupos sanguíneos compatibles.

La quimioterapia se administró de acuerdo a los siguientes esquemas: ciclofosfamida (CFM) (120 mg/kg), CFM (120 mg/kg) + mercapto-etan-sulfonato de sodio (MESNA) (120mg/kg), CFM (60 mg/kg) + Etopósido (VP16) (30 mg/kg/día) de acuerdo a protocolos del Servicio.

La ITC fue administrada con una unidad de telecobaltoterapia y el protocolo de irradiación consistió en la administración de 12 Gy (Gray) en cuatro días, fraccionado en dos aplicaciones diarias de 1.5 Gy cada una, con una tasa de dosis de 0.04 Gy/min.

El TMO fue realizado en el día 0.

Las muestras de sangre fueron obtenidas el día anterior al inicio del protocolo de quimioterapia, diariamente durante el condicionamiento y tres veces por semana después del TMO hasta el alta del enfermo.

La inclusión de pacientes fue precedida por un consentimiento escrito e informado.

### Parámetros de estrés oxidativo

La determinación de lipoperóxidos plasmáticos y de la actividad antioxidante total (AAT) fue efectuada en plasma obtenido de muestras de sangre anticoagulada con EDTA y mantenida a -70 °C hasta su análisis. El contenido de productos de lipoperoxidación fue estimado como TBARS (sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico) de acuerdo a la técnica de Jentzch et al<sup>7</sup>. La misma se basa en la reactividad del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), un producto de la degradación lipoperoxidativa. El resultado fue expresado como equivalentes de (MDA) en  $\mu\text{moles/L}$ .

La determinación de la AAT fue realizada por técnica desarrollada por Miller et al<sup>8</sup> basada en la formación del radical catión ABTS<sup>+</sup> a partir de la reacción del 2,2'-azino-bis (3-ethylben-zothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) con una peroxidasa como la metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox<sup>9</sup> (derivado hidro-soluble de la vitamina E) en  $\text{mmoles/L}$ . El rango de normalidad para cada uno de estos parámetros fue determinado utilizando sangre proveniente de 15 adultos normales.

### Parámetros hematológicos

Para el estudio de reticulocitos, las muestras de sangre anticoagulada con EDTA fueron mantenidas a 4 °C, hasta su análisis dentro de las 48 h posteriores a la extracción.

Para su análisis por citometría de flujo, los reticulocitos fueron teñidos con naranja de tiazol (*Retic-COUNT*, *BD*) de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro *Facstar Plus*<sup>5</sup> (*Becton Dickinson*), registrándose la fluorescencia de un mínimo de 50 000 células rojas. El porcentaje de reticulocitos así como la intensidad media de fluorescencia fueron calculados a través del software *Lysis II*. Para la determinación del IMR, la población reticulocitaria fue dividida en regiones de baja, moderada y alta fluorescencia. El IMR fue expresado como el cociente entre el número de reticulocitos en el área de la alta fluorescencia y el número total de reticulocitos (%<sup>9</sup>).

### Criterios de engraftment

Se definió *engraftment* mieloide como un incremento postrasplante en el número absoluto de neutrófilos mayor de 500 / $\mu\text{l}$  en dos muestras consecutivas. El momento de recuperación

trompocitopenia fue definido como segundo incremento sucesivo de plaquetas sobre el valor umbral de 20000/ $\mu$ l. El *engraftment* eritroide estuvo indicado por la observación de dos incrementos consecutivos del IMR posterior al nadir del período pancitopénico.

El *engraftment* no verificado por neutrófilos hasta el día 21 postrasplante fue definido como *engraftment* tardío.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de estrés oxidativo fue realizado a través del test t para muestras apareadas y la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. Los valores hematológicos fueron analizados a través de ANOVA de una cola, seguida de corrección de Bonferroni y test del signo. Para análisis de correlación fue utilizado el coeficiente de correlación r de Pearson.

Para el cálculo de valores predictivos relacionados con lipoperóxidos, el esquema utilizado para la definición de categorías fue el siguiente:

Parámetro	Evolución favorable (EF)	Evolución no favorable (ENF)
Presente (+)	Verdadero positivo	Falso positivo
Ausente (-)	Falso negativo	Verdadero negativo

El valor predictivo positivo fue calculado como el porcentaje de verdaderos positivos entre todos los resultados positivos: verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos positivos

De la misma manera el valor predictivo negativo fue calculado como el porcentaje de verdaderos negativos entre todos los resultados negativos: verdaderos negativos/ verdaderos negativos + falsos negativos.

## Resultados

Para la categorización de los pacientes se consideraron las siguientes variables: momento del *engraftment* detectado a través de las tres series, y muerte antes de los 90 días.

Dado que se ha comunicado la importancia del número de leucocitos totales en el día 16 pt como indicador precoz de riesgo de óbito antes de los 90 días por causa de hemorragia, infección o falla del trasplante, este parámetro también fue considerado en el estudio<sup>10</sup>.

Se consideró como de ENF a aquellos pacientes que presentaron por lo menos dos de las siguientes características: *engraftment* tardío, recuento de leucocitos menor o igual a 200/ $\mu$ l en el día 16, y/o muerte antes de los 90 días pt. Ocho pacientes de 27 se encuadraron dentro de la categoría de ENF.

Los pacientes con EF alcanzaron *engraftment* por neutrófilos antes del día 21, mientras que 12 de 19 lo hicieron por plaquetas y 18 de 19 lo hicieron por IMR en el mismo día. Entre los pacientes con ENF 4 de 8 alcanzaron *engraftment* por neutrófilos al día 21, 2 de 8 por plaquetas y 4 de 8 por IMR en el mismo día. Seis de 8 pacientes con ENF fallecieron dentro de los 90 días pt y ninguno con EF. Entre los fallecidos 3 murieron antes de

los 35 días pt a causa de sepsis. Tres pacientes fallecieron entre los 35 y los 90 días. Dentro de este último grupo uno falleció a causa de neumonía en el día 43, y dos a causa de enfermedad injerto contra huésped (EICH) en los días 60 y 90 pt siendo este último una EICH crónica diagnosticada en el día 8.

Otros parámetros diferenciales entre grupo EF y ENF se presentan en Tabla 2.

En todos los pacientes los niveles de TBARS se mantuvieron superiores al de referencia en una población adulta de sujetos sanos (0.34  $\pm$  0.14  $\mu$ M) durante todo el período de seguimiento.

Entre los días 12 y 14 se constataron los valores más altos de TBARS, que no resultaron significativos en el análisis del conjunto, esto es, de ambos grupos, comparados con los valores de acondicionamiento (Fig. 1). Sin embargo, analizando el grupo de los pacientes con ENF se constató que superaban el cuartil del 25% por arriba de la mediana de los valores totales. Este grupo presentó un incremento significativo en los valores de TBARS ( $p < 0.05$ ) entre los días 12-14 pt con una mediana de 1.83  $\mu$ M (rango 0.78- 5.82) respecto del valor de acondicionamiento: 1.05  $\mu$ M (rango 0.36-1.84) (Fig. 2).

En el grupo de pacientes con EF el comportamiento de los TBARS durante el acondicionamiento evidenció un incremento significativo en relación a los valores de acondicionamiento: 1.42  $\mu$ M (rango 0.31-4.5) vs 1.17  $\mu$ M (rango 0.36-1.84) ( $p < 0.05$ ), seguido de un descenso significativo durante la tercera semana pt: 0.77  $\mu$ M (rango 0.21-1.48) y cuarta semana pt: 0.60  $\mu$ M (rango 0.11-1.48) con respecto a los valores de acondicionamiento ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) (Fig. 2).

TABLA 2.— Parámetros clínicos y evolutivos de los grupos de pacientes con evolución favorable (EF) y con evolución no favorable (ENF)

	EF	ENF
Muerte dentro de los 90 días postrasplante	0	6
Días de internación	23.2 $\pm$ 4.7	35.6 $\pm$ 6.8
Días de antibióticos recibidos	7.4 $\pm$ 5.5	20.5 $\pm$ 12.4*
Intercurrencias:		
Enfermedad injerto contra huésped ( EICH )	0	2
Sepsis	0	3
Neuropatías	0	1
Recuento de leucocitos $\geq$ 200/ $\mu$ L al día 16 postrasplante	2 / 19	5 / 8

\* $p < 0.05$  respecto de EF (test de Student para dos muestras independientes).

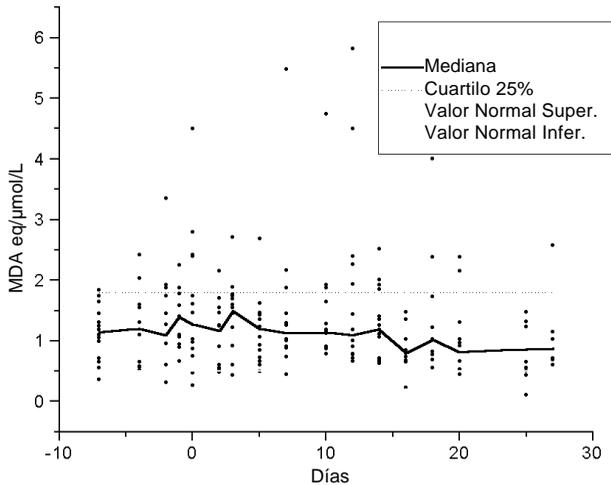


Fig. 1.- Comportamiento temporal de la concentración de lipoperoxidos (LP) plasmáticos evaluados como sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se indica la mediana, el valor correspondiente al cuartilo 25% y el rango de valor normal (valor normal ± DS).

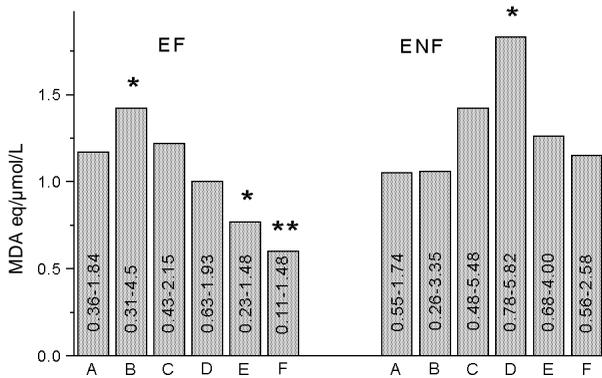


Fig. 2.- Comportamiento temporal de la concentración de LP plasmáticos evaluados como TBARS en pacientes con evolución favorable (EF) y con evolución no favorable (ENF). El valor graficado corresponde a la mediana y el valor dentro de las columnas corresponde al rango en el período indicado. A: precondicionamiento, B: condicionamiento, C: primera semana pt, D: segunda semana pt, E: tercera semana pt, F: cuarta semana pt.

\* p<0.05 respecto del valor precondicionamiento  
 \*\* p<0.01 respecto del valor precondicionamiento.

La predictibilidad positiva y negativa del parámetro Incremento de TBARS para ENF durante la segunda semana pt fue de 86% y 73% respectivamente. La predictibilidad positiva y negativa para No incremento de TBARS para EF fue 82% y 80% respectivamente.

Aunque no se hallaron diferencias significativas en AAT en ambos grupos, los pacientes con EF presentaron valores discretamente inferiores a los considerados como normales: (1.46 ± 0.16 μM) y evidenciaron una

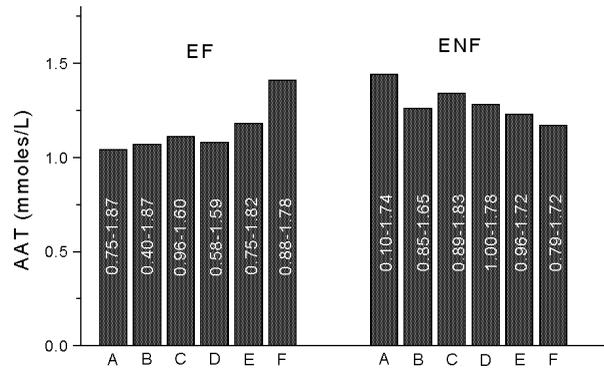


Fig. 3.- Comportamiento temporal de la actividad antioxidante total (AAT) plasmática en pacientes con evolución favorable (EF) y con evolución no favorable (ENF). El valor graficado corresponde a la mediana y el valor dentro de las columnas corresponde al rango en el período indicado. A: precondicionamiento, B: condicionamiento, C: primera semana pt, D: segunda semana pt, E: tercera semana pt, F: cuarta semana pt.

TABLA 3.- Actividad antioxidante total (AAT) en pacientes que evolucionaron hacia el óbito

Paciente	AAT (mmoles / L )			
	Precond (#) (*)	Cond (##) (*)	1° Semana (*)	2° Semana (*)
A	1.46	1.53	1.83	1.78
B	0.57	0.66	1.46	
C	1.31	1.48	1.95	1.84

(\*) Valor máximo alcanzado durante el período indicado  
 (#) Precondicionamiento  
 (##) Condicionamiento

tendencia a normalizar los mismos después de la recuperación medular. Este comportamiento no fue observado en pacientes con ENF (Fig. 3).

Considerando individualmente los 3 pacientes que fallecieron antes de los 35 días, se pudo constatar un incremento relevante de AAT con respecto al valor precondicionamiento en etapas finales de la evolución (Tabla 3). El ácido úrico representa entre el 35-65% de la AAT<sup>11</sup>, contribuyendo también la bilirrubina, pero en menor proporción. En este sentido nuestros resultados permitieron constatar que el aumento de la AAT se correlacionó con un aumento simultáneo de la uricemia (Fig. 4).

En todos los pacientes, el IMR descendió más rápidamente que el número total de reticulocitos, y en algunos pacientes alcanzó un nadir de cero después del condicionamiento. Después del período aplásico el au-

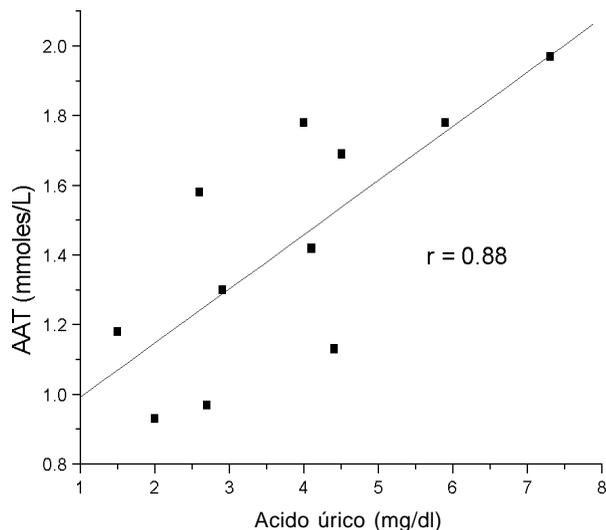


Fig. 4.- Correlación entre AAT y concentración de ácido úrico

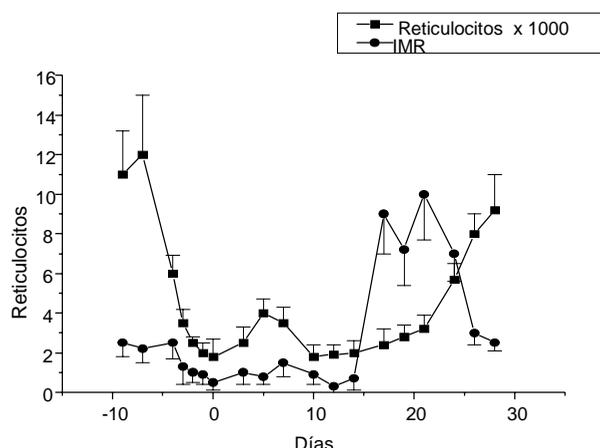


Fig. 5.- Comportamiento temporal de reticulocitos totales y de índice de madurez reticulocitaria (IMR)

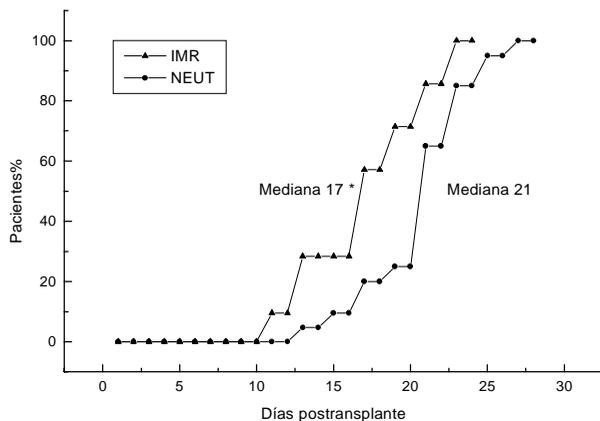


Fig. 6.- Recuperación de neutrófilos e IMR a valor de engraftment en TMO alogénico.

mento en el IMR precedió al incremento de reticulocitos totales por varios días (Fig. 5).

Analizando el comportamiento de neutrófilos e IMR en los TMO alogénicos, el *engraftment* fue detectado en el día 17 (rango 11-24) por IMR, y en el día 21 por neutrófilos ( $p < 0.001$ ) (Fig. 6). Las plaquetas, en estos pacientes revelaron *engraftment* sobre día 25 (rango 19-31) pt.

En pacientes sometidos a TMO autólogo (n:3) el *engraftment* fue detectado por IMR y neutrófilos coincidentemente sobre el día 12 pt (rango 10-21).

**Discusión**

La optimización de indicadores biológicos distintos a los métodos clínicos y hematológicos convencionales capaces de predecir *engraftment* temprano y curso evolutivo de pacientes sometidos a TMO, podría ser beneficioso en términos de toma de decisiones.

Un desbalance oxidativo debido a la enfermedad de base así como a los esquemas de administración de fármacos antes del TMO podrían justificar los niveles elevados de LP observados en nuestros pacientes, en relación a una población normal.

Ha sido comunicado que un incremento de los LP durante el condicionamiento es verificable en pacientes que reciben ITC adicional y no en aquellos sometidos sólo a quimioterapia mieloablativa, esto es, que el condicionamiento radiante podría ser capaz de generar mayor estrés oxidativo<sup>12</sup>. Por otra parte, este comportamiento ha sido relacionado por algunos autores con la eficacia de la técnica de mieloablación<sup>13</sup>.

Aunque no fue el propósito de esta comunicación el intentar establecer relaciones causales entre la eficacia de la técnica mieloablativa y el aumento de los LP durante el condicionamiento, en nuestro estudio aquellos pacientes que presentaron elevación significativa de los mismos durante el condicionamiento presentaron también EF. Sin querer sugerir que la eficacia del trasplante en términos de *engraftment* y evolución, pudiese descansar sólo en la mieloablación y con independencia de otros factores, este hallazgo podría señalar la importancia del balance prooxidante-antioxidante durante el condicionamiento.

El aumento del Fe libre a expensas de la citólisis constituye un mecanismo que favorecería la producción de especies reactivas a través de la reacción de Fenton, en el período pt. En pacientes sometidos a TMO la saturación de la capacidad de unión entre Fe y proteínas, añadido a su alta producción a expensas de la muerte celular de la línea eritroide, generan una alta concentración de Fe libre, particularmente en el día 0 y durante la segunda semana pt<sup>14</sup>. Del mismo modo, la afectación de los sistemas antioxidantes individuales es manifiesta en pacientes sometidos a TMO<sup>15</sup>.

Aunque el número de pacientes de nuestra serie es demasiado pequeño para obtener conclusiones definitivas, postulamos que el comportamiento de los LP durante la segunda semana pt podría servir como indicador evolutivo de ENF y señalaría un deterioro progresivo de los pacientes a partir de interurrencias, que impediría el retorno a valores de precondicionamiento de TBARS, tal como se constata en pacientes con EF. Del mismo modo, el no aumento de LP en el mismo período tiene una razonable predictibilidad para la EF.

En relación a la AAT, los pacientes con EF presentaron una tendencia a incrementar su actividad en el curso del seguimiento evolutivo. Entre los pacientes con ENF, sólo en aquellos que evolucionaron al óbito dentro de los 35 días pt se constató un incremento significativo de AAT coincidiendo con el aumento de bilirrubina y ácido úrico.

Coincidentemente con otros autores, nuestros valores de AAT precondicionamiento no presentaron diferencias significativas con los valores normales de una población de sujetos sanos. La no comprobación del descenso de AAT pt, tal como fue comunicado por otros autores<sup>12</sup> podría deberse a la utilización de técnicas de capacidad antioxidante total distintas, o al hecho de que en nuestro trabajo no se midieron componentes antioxidantes individuales, excepto los antedichos.

La AAT incluye ascorbato, tioles proteicos, bilirrubina, urato y alfa-tocoferol. Dado que el sistema antioxidante es un complejo de interacciones y sinergismos, se ha postulado que la medición de valores totales como los utilizados en este trabajo no puede sustituir a la determinación de un perfil completo de los sistemas individuales<sup>16</sup>.

En relación a los parámetros de repoblación medular, puede decirse que antes de los análisis automatizados, la accesibilidad del recuento de neutrófilos se imponía sobre el recuento de la población reticulocitaria para el seguimiento del *engraftment*, dado que este último procedimiento resultaba engorroso e impreciso<sup>17</sup>.

Considerando que la restauración de la actividad hematopoyética comienza por la línea eritroide<sup>18</sup>, el análisis de precursores reticulocitarios podría dar cuenta de la actividad hematopoyética total de la MO<sup>19</sup>.

El análisis por citometría de flujo de subpoblaciones reticulocitarias fue desarrollado en los años 80 con el fin de monitorear la actividad eritropoyética en diversas patologías, a través de la utilización de colorantes fluorescentes que se combinan con el RNA ribosomal<sup>20</sup>. La utilización de naranja de tiazol permitió superar ciertas limitaciones inherentes a otros colorantes fluorescentes y obtener una señal estable entre 30 y 90 min post-marcaje<sup>21</sup>. Otra ventaja de esta técnica es que permite minimizar el error asociado a las transfusiones de sangre entera o glóbulos rojos sedimentados sobre el conteo del número total de reticulocitos<sup>22</sup>.

Nuestros resultados confirman que el corrimiento hacia la región de alta fluorescencia a partir de los reticulocitos de alto contenido de ARN y verificado a través del IMR, antecede de modo significativo al método convencional del recuento manual o automatizado de reticulocitos, neutrófilos y plaquetas en sangre periférica en pacientes con TMO alogénico<sup>23, 24</sup>.

Es importante destacar que nuestro estudio no pudo comprobar en los trasplantes autólogos, tal como ha sido comunicado por otros autores<sup>25</sup>, una ventaja del IMR en relación a neutrófilos. Esta discordancia podría estar en relación al escaso número de pacientes autólogos reclutados.

Otro aspecto relevante de estos resultados, es la confirmación de la segunda semana como la de mayor valor predictivo de ENF de acuerdo a los LP, y en coincidencia con otros predictores tempranos como el recuento leucocitario.

En conclusión, el seguimiento de los LP durante la evolución postrasplante de pacientes sometidos a TMO puede constituir un útil aliado como predictor evolutivo temprano. Del mismo modo, el IMR se presenta como un método cuantitativo y de fácil implementación para la detección temprana de *engraftment*.

Serán necesarios estudios adicionales con mayor número de pacientes para dilucidar la utilidad de la técnica de IMR en TMO autólogos en relación a las técnicas convencionales.

Dado que la experiencia internacional es desalentadora en cuanto a la utilización de TMO en la aplasia medular radioinducida a partir de accidentes radiológicos, ambas técnicas podrían ser utilizadas en radiopatología como predictores evolutivos y de repoblación medular asociadas a terapias adyuvantes y sustitutivas.

**Agradecimientos:** Expresamos nuestro agradecimiento a la Dra. Mónica Saracco por sus valiosos consejos en la puesta a punto de la técnica de IMR.

## Bibliografía

1. Milone JH, Bordone J, Etchegoyen O, Napal J, Prates MV, Morales VH. Trasplante de médula ósea en leucemia mieloide crónica. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 50: 1-10.
2. Elmroth K, Nygren J, Erkell LJ, Hultborn R. Radiation induce double-strand breaks in mammalian DNA : influence of temperature and DMSO. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 1501-8.
3. Jonas CJ, Puckett AB, Jones DP, et al. Plasma antioxidant status after high - dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Amr J Clin Nutr*. 2000; 72: 181-9.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross C. Free radicals antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-617.
5. Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ, Phillips GI. Criteria for marrow engraftment: comparison of

- reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 91-2.
6. Kanold J, Bezou MJ, Coulet M, et al. Evaluation of erythropoietic/hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favorably with traditional blood cell counting. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 313-8.
  7. Jentzch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251-6.
  8. Miller NJ, Rice-Evans CA. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report* 1996; 2: 161-71.
  9. Davis BH, Bigelow NC. Automated reticulocyte analysis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1994; 8: 617-29.
  10. Mehta J, Powles R, Singhal S, et al. Early identification at risk of death due to infections, hemorrhage, or graft failure after allogeneic bone marrow transplantation on the basis of the leukocyte counts. *Bone Marrow Transplant* 1997; 349-55.
  11. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to the totals radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19.
  12. Clemens MR, Ladner C, Schmidt H, et al. Decreased essential antioxidants and increased lipid hydroperoxides following high-dose radiochemotherapy. *Free Rad Res Commun* 1989; 7: 227-32.
  13. Durken M, Agbenu J, Finckh B, et al. Deteriorating free radical-trapping capacity and antioxidant status in plasma during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 757-62.
  14. Durken M, Nielsen P, Knobel S, et al. Nontransferrin-bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22 :1159-63.
  15. Durken M, Herring C, Finck B, et al. Impaired plasma antioxidative defense and increased nontransferrin-bound iron during high-dose chemotherapy and radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 887-94.
  16. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestrol I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 456-62.
  17. Thomas ED, Storb R, Fefer A, et al. Aplastic anemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1972; 1: 284-9.
  18. Torres A, Sanchez J, Lakomsky, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2001; 86: 24-9.
  19. Rowan RM, Cavill I, Corberand JX. The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. *Clin Lab Haem* 1996; 18: 3-8.
  20. Tanke HJ, Rothbarth PH, Jaak MJ, Vossen J, Ger Koper JM, Ploem JS. Flow cytometry of reticulocytes applied to clinical hematology. *Blood* 1983; 61: 1091-7.
  21. Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 1986; 7: 508-17.
  22. Lazarus H M, Chahine A, Lacerna K, et al. Kinetics of erythropoiesis after bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 574-83.
  23. Davis B, Bigelow N. Clinical flow cytometric reticulocyte analysis. *Pathobiology* 1990; 58: 99-106.
  24. D'Onofrio G, Tichelli A, Foures C, Theodorsen L. Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. *Clin Lab Haem* 1996; 18: 45-53.
  25. George P, Wyre RM, Bruty SJ, Sweetenham JW, Duncombe AS. Automated immature reticulocyte counts are early markers of engraftment following autologous PBSC transplantation in patients with lymphoma. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 219-23.

-----

*There is in all of us a psychological tendency to resist new ideas which come from without just as there is a psychological resistance to really radical innovations in behavior or dress.*

Hay en cada uno de nosotros una tendencia psicológica a resistir ideas nuevas que surgen de afuera de la misma manera que hay una resistencia psicológica frente a innovaciones radicales en comportamiento o vestimenta.

W.I.B. Beveridge

*The art of scientific investigation*, New York: WW Norton, 1951