

Monitoreo de la recaída y/o rechazo mediante el quimerismo molecular

Carmen Álaez*

Laboratorio de Biología Molecular,
Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, SSA, México D. F., México

RESUMEN

Para hacer estudios de quimerismo molecular postrasplante es necesario distinguir las células del donador de las del receptor. Para ello se requiere identificar marcadores genéticos informativos que permitan hacer esta distinción. Los métodos de laboratorio, así como los marcadores genéticos utilizados, han evolucionado a lo largo del tiempo: los antígenos eritrocitarios fueron los primeros para confirmar el injerto. Sin embargo, debido a la vida media de los eritrocitos en circulación, el resultado no correlaciona con lo que ocurre en la médula ósea, además, las transfusiones y la hemólisis provocada por incompatibilidades ABO, también hacen los resultados poco confiables.

Palabras clave:

Quimerismo molecular, trasplante, células progenitoras

SUMMARY

Molecular chimerism studies after transplantation are necessary in order to distinguish donor cells from recipient cells. This requires the identification of informative genetic markers. Laboratory methods and the genetic markers used have evolved over time. Erythrocyte antigens were the first used to confirm the graft. However, due to the half-life of erythrocytes in the circulation, results do not correlate with what occurs in the bone marrow. Transfusions and hemolysis caused by ABO incompatibility also make the results unreliable.

Key words:

Molecular chimerism, transplant, progenitor cells

Introducción

El objetivo de los estudios de seguimiento del injerto posterior al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), es evaluar la presencia y cantidad de células del donador y del receptor ya sea en la médula ósea o en la sangre periférica del paciente que ha sido trasplantado. Los estudios de seguimiento deben ser realizados periódicamente, de tal forma que permitan modificar oportunamente la conducta terapéutica, con el fin de evitar la recaída o la pérdida del injerto. El término quimera que se usa para describir la presencia de células hematopoyéticas o linfoides alogénicas en el receptor de un trasplante, alude a la figura mitológica griega que tenía la cabeza de león caso el resultado debe ser interpretado considerando el límite de detección de la metodología utilizada, así como el tipo de muestra analizada. Se le llama, el tronco de cabra y la parte posterior de serpiente.

Se dice que un paciente tiene una quimera completa cuando todas las CPHs o linfoides son derivadas del donador alogénico. En esta quimera mixta, parcial o incompleta a la

coexistencia en el receptor de células hematopoyéticas o linfoides propias y derivadas del donador. El quimerismo dividido (split quimerismo) se refiere a la presencia de células alogénicas en una estirpe hematopoyética, pero no en otro.

Metodología para el análisis del quimerismo

Para hacer estos estudios es necesario distinguir las células del donador de las del receptor. Para ello se requiere identificar marcadores genéticos informativos que permitan hacer esta distinción. Los métodos de laboratorio, así como los marcadores genéticos usados, han evolucionado a lo largo del tiempo: Los antígenos eritrocitarios fueron los primeros en confirmar el injerto. Sin embargo, debido a la vida media de los eritrocitos en circulación, el resultado no correlaciona con lo que ocurre en la médula ósea; además, las transfusiones y la hemólisis provocada por incompatibilidades ABO, también hacen los resultados poco confiables.^{1,2}

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Carmen Álaez. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del INDRE. Tel: (55) 5341 4569, (55) 5342 7557. México D. F., México.

a) Citogenética

La citogenética convencional ha servido para evaluar el quimerismo cuando hay disparidad de sexo entre donador y receptor y los reordenamientos estructurales constitucionales se han empleado como marcadores en parejas donador-receptor sin disparidad de sexo. Sin embargo la aplicación de esta metodología al seguimiento del injerto, se limita sólo a las células que entraron en metafase, además de que es lenta y laboriosa y es difícil encontrar marcadores informativos cuando no hay disparidad de sexo. La citogenética molecular permite analizar células en metafase e interfase, es más rápida y sencilla, además permite determinar simultáneamente el genotipo, la morfología y la expresión de marcadores de superficie en células únicas con gran precisión y sensibilidad. La hibridación *in situ* con sondas que hibridan con los cromosomas X y Y se ha empleado en estudios de quimerismo en parejas con diferencia de sexo. Se han usado sondas específicas para diferentes arreglos genéticos, característicos del clon maligno, para detectar enfermedad residual mínima y predecir la recaída precozmente. Las limitaciones de esta metodología son la pérdida del cromosoma Y en pacientes mayores, o en las células tumorales, como parte de sus alteraciones cariotípicas, así como las variaciones genéticas en la región del cromosoma Y que hibrida con la sonda.^{3,4}

b) Análisis del polimorfismo de VNTRs y STRs

El análisis del polimorfismo de las regiones de DNA repetidas en tandem STRs (Short Tandem Repeats) y VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) han sido ampliamente utilizados en este tipo de estudios. El tamaño de las regiones repetidas varía de un individuo a otro, lo que genera un polimorfismo de longitud que puede ser estudiado mediante la técnica de PCR. Los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis. Actualmente el análisis de STRs marcados con fluorescencia mediante electroforesis capilar en un analizador automático de DNA, es el estándar de oro para los estudios de seguimiento del injerto.

Los estuches comerciales con reacciones multiplex permiten la amplificación simultánea de hasta 15 diferentes loci a partir de 1 ng de DNA, lo que representa una enorme ventaja en cuanto a tiempo y a la cantidad de células que se requieren. Esto es de gran importancia, pues los pacientes trasplantados tienen muy pocas células en el período inmediato post-trasplante. La amplificación simultánea de las muestras del donador, del paciente antes del trasplante y del paciente después del trasplante, permite la identificación de marcadores informativos en el donador. La cantidad relativa de cada uno de las poblaciones celulares puede calcularse empleando para ello el área o la altura de los picos informativos. El estudio se hace con DNA extraído de sangre periférica o médula ósea, aunque los resultados pueden diferir en el caso de una recaída cuando las células tumorales infiltran la médula ósea pero aún no se encuentran en la circulación. La separación de subpoblaciones celulares permite aumentar la sensibilidad del ensayo y obtener información adicional sobre el comportamiento del injerto en diferentes estirpes hematopoyéticas.

Aplicaciones del análisis de los polimorfismos de STRs en pacientes trasplantados

Los estudios de seguimiento son de especial importancia en pacientes trasplantados con fallas en la hematopoyesis, en pacientes candidatos a infusión de leucocitos del donador (DLI) o candidatos a un segundo trasplante con el mismo donador. En trasplantados con fallas en la hematopoyesis, la presencia de células del receptor no indica necesariamente que el rechazo es la causa del mal funcionamiento de la médula, éste puede deberse a infección viral, toxicidad o un defecto en los estromas de la médula. Por otro lado, la no detección de células autólogas no elimina completamente la posibilidad de rechazo o recaída como causantes del mal funcionamiento de la médula. En estos casos el seguimiento en el tiempo es más informativo. En pacientes que requieren una DLI debido a una recaída, la detección de células del donador asegura que el rechazo no ha ocurrido. Se ha demostrado que el riesgo de aplasia transitoria o irreversible después de la DLI, es mayor en pacientes que tienen un pequeño número de células del donador en médula o periferia, en comparación con aquellos que presentan mayor cantidad de estas células. En candidatos a un segundo trasplante con el mismo donante, la persistencia de células del donador indica tolerancia a las células del donador por lo que el riesgo de rechazo del segundo trasplante es bajo y el régimen de condicionamiento estará encaminado solamente a la eliminación de las células malignas.

El estudio de quimerismo permite en ciertos casos predecir la recaída después del trasplante. Se ha observado que el aumento de células autólogas en un individuo trasplantado indica un alto riesgo de recaída, sin embargo un quimerismo mixto estable en el tiempo no indica riesgo de recaída. El estudio de poblaciones celulares aisladas con expresión aberrante de marcadores de superficie permite una detección más temprana de la recaída. La determinación de quimerismo de forma seriada, permite predecir la recaída de la enfermedad en pacientes con LMC. En pacientes con leucemias agudas que son de más rápida evolución, la detección del quimerismo debe hacerse en intervalos cortos de tiempo y con alta sensibilidad para predecir la recaída oportunamente. En la LMC, la persistencia de células T autólogas después del trasplante, cuando se ha usado médula ósea depletada de T, se ha asociado con aumento del riesgo de recaída, pero en pacientes con LMC que recibieron médula sin depleción de células T, la persistencia de células autólogas durante los primeros 3 meses post-trasplante, no se asocia con recaída.

El estudio del quimerismo en pacientes trasplantados con regímenes de condicionamiento de intensidad reducida, es de vital importancia para el manejo clínico de la inmunosupresión post-trasplante. Es evidente que el establecimiento del injerto completo en células T precede al desarrollo del injerto completo en línea mieloide, al desarrollo de la EICH y al efecto de injerto contra tumor. Bajos niveles de injerto en células T en estos pacientes, se asocian con aumento en el riesgo de rechazo y con la ausencia de efecto antitumoral, mientras que altos niveles de injerto en células T se asocian con mayor riesgo de EICH. Los estudios de estos marcadores genéticos, determinan si la recaída hematológica se ha originado de las células del donador o de las células del receptor.

Utilidad de los STRs en ciertos casos pretrasplante

Estos marcadores son también útiles en ciertas situaciones pretrasplante. Por ejemplo, para establecer la identidad en el caso de gemelos donde la identidad genética indicaría no riesgo de rechazo o EICH. En este caso, el régimen de condicionamiento estará dirigido solamente a la eliminación de las células malignas. En niños con inmunodeficiencias severas combinadas, candidatos a trasplante, puede establecerse la posible presencia de células T circulantes de origen materno. La presencia de éstas indica la necesidad de inmunosupresión para evitar rechazo.

Los estudios de quimerismo alcanzan su máxima utilidad y valor predictivo cuando se realizan secuencialmente y en su interpretación se consideran: el diagnóstico previo, el estadio de la enfermedad, el régimen de condicionamiento y la fuente de células hematopoyéticas empleadas. Además, los resultados deben obtenerse en forma rápida, manteniendo una estrecha comunicación con el médico tratante.⁵

Referencias

1. **Baron F, Sandmaier BM.** Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006;20:1690-1700.
2. **Huisman C, de Weger RA, de Vries L, Tilanus MGJ, Verdonck LF.** Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:285-291.
3. **Jolkowska J, Pieczonka A, Strabel T, Boruckowski D, Wachowiak J, Bader P, et al.** Hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation: a comparison of quantitative analysis by automated DNA sizing and fluorescent in situ hybridization. *BMC Blood Disorders* 2005;5:1-6
4. **Krisst D, Stein J, Yaniv I, Klein T.** Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:255-268.
5. **Jurado M, Deeg HJ, Storer B, Anasetti C, Anderson JE, Bryant E, et al.** Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome after conditioning with busulfan and fractionated total body irradiation is associated with low relapse rate but considerable nonrelapse mortality. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(3):161-169.