

Estudio de Quimerismo: Aplicación en Pacientes con Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos

Claudio Pérez N., Jorge Alfaro L., Milton Larrondo L.

Laboratorio de Terapia Celular, Banco de Sangre, HCUCh.

RESUMEN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH) es una técnica que ha cambiado el pronóstico de muchas enfermedades hematológicas malignas y no malignas. En determinados tiempos post trasplante coexisten células hematológicas de receptor y dador, por lo cual el individuo posee dos sistemas hematopoyéticos. El término Quimera se utiliza para indicar el origen dual de las células hematológicas. Este análisis es indispensable para saber si existe prendimiento o rechazo del trasplante. La determinación de Quimerismo se realiza mediante la amplificación por PCR de secuencias cortas repetidas en tandem (STRs del inglés *short tandem repeat sequence*). Este examen es fácil de realizar, reproducible, altamente sensible y específico. El resultado del quimerismo es de vital importancia a la hora de tomar decisiones clínicas, sobre todo si se utilizan técnicas no mieloablativas de acondicionamiento, infusión de linfocitos del donante, o modificaciones en los protocolos de inmunosupresión, donde existe una alta variabilidad en el prendimiento del injerto y el desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) e injerto contra tumor (ICT).

SUMMARY

Allogeneic progenitor cell transplantation (AloPCT) is a procedure that has changed the prognosis of many malignant and non-malignant hematologic diseases. For a period of time post-transplant, cellular subtypes from the donor and the host coexist, giving the patient two hematopoietic systems. The term Chimera is used to indicate the dual origin of blood cells. This analysis is important to determine whether engraftment or rejection has occurred. The determination of chimerism is based on PCR of Short Tandem Repeat sequences (STRs). The PCR technique is easy to perform, reproducible, highly sensitive and specific. Chimerism determination helps to improve the clinical approach to the patient, specifically when non-mieloablative conditioning, lymphocyte donor infusion or modification of the immunosuppressive protocols have been employed. All of these manipulations produce a high variability in engraftment, development of graft versus host disease (GVHD) and the likelihood to eliminate tumor cells through graft versus tumor (GvT) effects.

Recibido 06/04/2006 | Aceptado 23/05/2006

INTRODUCCIÓN

Quimera es la denominación de un animal mitológico, que posee cabeza de león, cuerpo de caprino y cola de serpiente. Por extensión se denomina quimera a un organismo compuesto por

varios individuos. El trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (TAPH) es utilizado como tratamiento de enfermedades hematopoyéticas malignas o enfermedades genéticas hematológicas. En un TAPH, el sistema hematopoyético del receptor es reemplazado por la hematopoyesis

del donante. Este recambio ocurre paulatinamente y en un momento dado coexisten los sistemas hematopoyéticos del dador y del receptor, por lo cual el individuo es portador de dos sistemas con estructura génica diferente. En estos casos, utilizamos el concepto de quimera para especificar la existencia de células originadas en individuos distintos. El monitoreo constante del “estado quimérico” a través de técnicas moleculares permite al médico clínico la toma de decisiones oportuna para erradicar células tumorales a través de una reacción de injerto contra tumor (ICT) o prevenir la enfermedad de injerto versus huésped (EICH), ocasionada en este tipo de trasplante.

El presente trabajo revisa algunos conceptos de trasplantes con progenitores hematopoyéticos y describe las técnicas que se emplean para determinar quimerismo en pacientes alo trasplantados.

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

El TAPH ha cambiado el pronóstico de muchas enfermedades hematológicas malignas y no malignas. Este procedimiento consiste en la administración de una dosis elevada de radioterapia y/o quimioterapia, denominado acondicionamiento mieloablativo, para erradicar la enfermedad de base, el sistema hematopoyético del receptor, y así lograr el establecimiento de una hematopoyesis originada de células troncales del donante.

El TAPH, posee sin embargo una alta toxicidad debido a las altas dosis de quimio/radioterapia. Por lo anterior se han desarrollados esquemas no

mieloablativos de baja toxicidad con menores dosis. Estos esquemas no mieloablativos disminuyen las complicaciones inmediatas y, son utilizados en pacientes con enfermedades concomitantes o edad más avanzada.

El acondicionamiento menos intenso no modifica sin embargo la evolución inmunológica del sistema hematopoyético trasplantado. El nuevo sistema puede actuar contra los tejidos del receptor, fenómeno denominado enfermedad injerto contra huésped (EICH)⁽¹⁾ y, un efecto dirigido contra la enfermedad tumoral de base denominada injerto contra tumor (ICT). En ambos casos intervienen los linfocitos T (LT) de origen donante, que son activados por células presentadoras de antígenos profesionales, entre ellas las células dendríticas (CDs). Sin esta interacción, la respuesta inmune no ocurre y, en condiciones de trasplante alogénico pueden interactuar poblaciones celulares LT y CDs que tienen origen distinto⁽²⁾, por lo tanto forman estados quiméricos mixtos cuyo conocimiento clínico es indispensable al momento de modular estos fenómenos en los pacientes.

ESTADOS DE QUIMERISMO

Durante el curso del trasplante se pueden generar por tanto diversos grados de reconstitución hematológica (tabla I). Si el sistema hematopoyético es originado en células del donante tendremos un estado quimérico completo, existiendo también estados quiméricos mixtos, en que sólo una parte de la hematopoyesis es del donante, teniendo además un componente del receptor.

Tabla 1. Definiciones de estados quiméricos

Quimerismo completo (QC)	Hematopoyesis 100 % donante.
Quimera mixta (QM)	Hematopoyesis mixta donante/ receptor.
Quimera restringida a línea celular (QRlc)	Una línea celular de origen donante y otras líneas originadas en el receptor. Ej. QRlc de LT
Microquimerismo	Menos de 1% de células del huésped es detectada. Requiere de técnicas de alta sensibilidad.
Falla de injerto (FI)	Eliminación o no prendimiento del sistema hematopoyético del donante.
Recuperación autóloga (RA)	Hematopoyesis de receptor, después de haberse establecido una quimera.

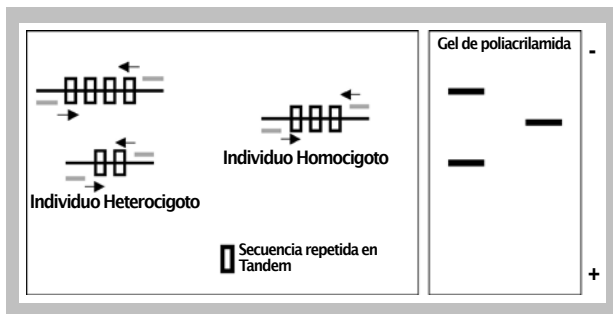


Fig. 1 Alelo STR presente en el genoma. Alelo puede presentar variantes en la población que se diferencian en el número de copias o elementos repetidos. Los individuos pueden ser homocigotos o heterocigotos para un determinado alelo. La amplificación por PCR genera fragmentos de diferente tamaño, los cuales son visualizados en un gel de poliacrilamida.

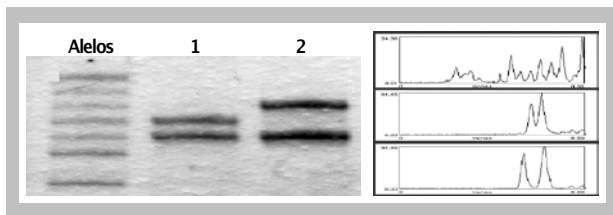


Fig. 2 Foto e histograma de gel de poliacrilamida que muestra la amplificación del alelo LPL en individuos diferentes. El gel muestra un estándar con los alelos presentes en la población y dos individuos (1, 2). Ambos individuos son heterocigotos, presentan un alelo común y otro diferente.

En aquellos casos en que se ha logrado establecer un estado quimérico completo, el seguimiento posee una utilidad adicional, pues es posible observar en la evolución del paciente una pérdida del estado quimérico debido a la aparición de células tumorales originadas en el receptor.

DETERMINACIÓN DE QUIMERISMO MEDIANTE STR

Existen varios métodos que han sido utilizados para determinar el origen receptor/ dador de una población celular: cromosomas sexuales mediante FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), tipificación de grupo sanguíneo ABO o estudios de ADN mediante la determinación de polimorfismo génico por reacción en cadena de polimerasa (PCR). Dentro de estos últimos se encuentra la deter-

minación de quimerismo de secuencias cortas repetidas en tandem (STRs del inglés *short tandem repeat sequence*). Las técnicas de grupos sanguíneos requieren diferencia de grupo ABO, y las citogenéticas se basan en la disparidad de sexo, por lo que su uso es limitado. Los STRs no presentan ninguna de estas restricciones para su aplicación, requiere menos muestra y, es mucho más discriminativa.

El STRs consiste en secuencias de 3 a 7 pares de base que se repiten en tandem, es decir ...TATT...TATT... TATT... en este caso existen tres tandem. Como el gen posee las mismas secuencias en sus extremos, si se amplifica el ADN de un paciente en esta región, será posible encontrar 1 ó 2 bandas, dependiendo de si es homo o heterocigoto para el gen (Figura 1). Estos alelos son heredados de forma mendeliana y cada hijo recibe una copia de su progenitor. Determinando el tamaño del segmento amplificado, se pueden identificar fácilmente en un gel de poliacrilamida, el alelo al que corresponde (Figura 2). Las secuencias repetidas tandem son altamente polimórficos en la población. Es decir existe alta variabilidad entre los individuos, por lo cual, es muy raro encontrar a individuos no gemelos con idéntico patrón genómico de secuencias. En la tabla 2 se detalla el nombre del gen, su localización y la secuencia repetida, para los genes en nuestro panel.

Las frecuencias alélicas para cada uno de los alelos están estudiadas y se encuentran definidas para la población hispanoamericana⁽³⁾, a manera de ejemplo se muestra en la tabla 3, las frecuencias para los alelos del gen F13B del cromosoma Iq31-Iq32.1.

Por su alto polimorfismo, si estudiamos 9 alelos, la probabilidad de encontrar un individuo idéntico es de 1 en 10⁹, con una exclusión mayor a 0.99, lo que sirve para los propósitos de detectar con precisión el origen (donante, receptor) de la población celular en el paciente después del trasplante. Justamente, para el seguimiento de un trasplante alogénico

se busca que los alelos de los STRs amplificados permitan diferenciar entre el genoma del receptor y del dador. El alelo se denomina informativo si permite esta discriminación. En el caso de hermanos HLA compatibles suele existir una alta similitud entre los genes estudiados, por lo cual es necesario amplificar varios de ellos hasta dar con los que sean útiles a nuestros propósitos. En la figura 3, se esquematizan las posibles situaciones encontradas al amplificar un alelo STR y si éste es informativo de la condición de trasplante.

También es posible realizar una estimación de la magnitud del quimerismo alcanzado, calculando

el porcentaje de células residuales, mediante la medición de la intensidad de las bandas amplificadas con el programa computacional Scion Image (www.scioncorp.com).

ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES CELULARES

Después de un trasplante con acondicionamiento no mieloablativo, la recuperación de las distintas series hematológicas no es sincrónica y, posee una alta variabilidad entre los individuos y entre los esquemas terapéuticos utilizados. En el día 14 post trasplante entre el 50-100% de los linfocitos circulantes son originados en células del donante, versus el 30 % de las células de estirpe mieloide. En el día + 30 cerca del 100 % de los linfocitos son del dador, pero la serie mieloide continua presentando quimera mixta. El significado de esta determinación es pronóstica, ya que un aumento del quimerismo en el compartimiento T se relaciona con EICH y una disminución a niveles menores a 20 % de LT se asocia a pérdida del injerto⁽⁶⁾.

Conocer el estado quimérico en LT es de alta relevancia al momento de tomar decisiones clínicas,

Tabla 2. Alelos STRs utilizados para el seguimiento del trasplante alógeno

Locus STR	Cromosoma	Secuencia repetida
Amelogenina	Xp22.1-22,3 Y	*****
CSF1PO	8q33.3-34	AGAT
D16S539	16q24-qter	AGAT
D7S820	7q11.21-22	AGAT
D13S317	13q22-q31	AGAT
F13A01	6p24.3-p25.1	AAAG
F13B	1q31-q32.1	AAAT
FesFPS	15q25-qter	AAAT
HPRTB	Xq26	AGAT
LPL	8p22	AAAT
TH01	11p15.5	AATG
TPOX	2p25.1-pter	AATG
VWa	12p12-pter	AGAT

Tabla 3. Frecuencia alélica de los alelos del gen F13B

ALELO F13B	FRECUENCIA
6	0.051
7	0.016
8	0.129
9	0.362
10	0.435
11	0.005
12	0.000
Todos	1.000

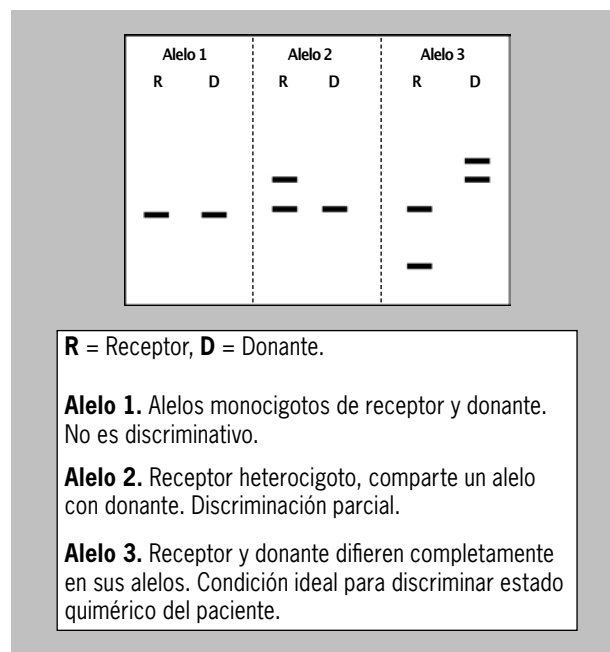


Fig. 3 Posibles diferencias entre los alelos en un estudio de STRs.

Tabla 4. Recomendaciones para el estudio de quimerismo en TPH

1. La técnica de análisis debe ser sensible e informativa. A la fecha, los estudios STR/VNTR han sido los más reproducibles.
2. Los estudios más útiles son los de sangre periférica. En el contexto de un trasplante no mieloablatoivo debe considerarse estudios línea específicos.
3. El análisis en trasplantes con acondicionamiento mieloablatoivo, con profilaxis de EICH convencional, es estudio es más opcional, siendo los controles 30, 60, 180, 360 días razonable.
4. En condiciones de condicionamiento no mieloablatoivo, depleción T, nuevos regimenes de profilaxis de EICH, anemia aplástica, debe realizarse estudios 30, 60, 180 y 360 días debido a que las intervenciones dependen del estado quimérico del paciente.
5. En condiciones no mieloablatoivas, el patrón de Quimerismo es predictivo de EICH y de pérdida del injerto. En caso de intervención terapéutica (infusión de linfocitos del donante), el estado de Quimerismo debe realizarse cada 2 – 4 semanas.
6. En paciente con EICH, con quimeras completas, el estudio debe realizarse más infrecuentemente (cada 3 – 6 meses).

VNTR = variable number tandem repeat.

ya sea para modificar la terapia inmunosupresora con ciclosporina A o, para lograr una mayor actividad ICT mediante la infusión de linfocitos del donante. Por ejemplo: si existe una pérdida del estado quimérico es necesario disminuir la dosis de ciclosporina A, debido a que existe bajo riesgo de EICH y alto riesgo de pérdida del implante o, si hay recaída del paciente de su enfermedad tumoral, puede ser necesario infundir linfocitos del donante para reponer el estado de quimera completa y generar un ICT más potente.

Para obtener la información de quimerismo restringido a línea celular se hace necesario separar la población de LT.

La purificación de LT se realiza por columnas de inmuno afinidad, es decir: se incuban las células con un anticuerpo monoclonal anti CD3 conjugado con esferas magnéticas, y luego, la suspensión celular se pasa a través de la columna sostenida en un magneto, quedando retenida la población linfocitaria. Por último, se lava la columna con *buffer* y luego se eluyen las células sacando la columna del magneto. Con este procedimiento podemos obtener sobre el 95% de

pureza cuando realizamos la medición por citometría de flujo.

RECOMENDACIONES DE DETERMINACIÓN DE QUIMERISMO EN EL CONTEXTO DE UN TRASPLANTE

Debido a la alta variabilidad en las técnicas y los tiempos de determinación de quimerismo, un grupo de expertos⁽⁶⁾, ha emitido algunas recomendaciones al momento de solicitar el estudio (tabla 4). En estas recomendaciones se establece la técnica de STRs como estándar y se sugiere controlar a los 30, 60, 180, 360 días en caso de trasplantes no complicados y, aumentar la frecuencia cada 2-4 semanas en caso de someter al paciente a infusión de linfocitos del dador o modificaciones de la terapia inmunosupresora como maniobra terapéutica (provocar un injerto contra tumor, o revertir una pérdida del injerto). En resumen, el TAPH requiere para su seguimiento la determinación de estudio de quimerismo. Actualmente la técnica recomendada es el estudio molecular de STRs, debido a que es fácil de realizar, sensible y específica, lo que permite su aplicación en el ámbito clínico.

REFERENCIAS

1. Ferrara J and Deeg J. Graft-versus-host-disease. NEJM 1991; 324: 667-71.
2. Giver CR, Li JM, Hossain MS, Lonial S, Waller EK. Reconstructing immunity after allogeneic transplantation. Immunol Res 2004;29: 269-82.
3. GenePrint® STR Systems (Silver Stain Detection) Technical manual, Promega Corporation, USA.
4. Auffermann-Gretzinger S, Lossos IS, Vayntrub TA, Leong W, Grumet FC, Blume KG, Stockerl-Goldstein KE, Levy R, Shizuru JA. Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. Blood 2002 Feb 15;99: 1442-8.
5. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Heimfeld S, Oparin D, Zellmer E, Radich JP, Grumet FC, Blume KG, Chauncey TR, Little MT. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. Blood 2004;104: 2254-62.
6. Antin J, Childs R, Filipovich A, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T and Weisdorf D. Establishment of complete and mixed chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendations from a workshop at the 2001 tandem Meetings. Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7: 473-85.
7. Barret J, Childs R. Non-myeloablative stem cell transplants. Br J Haematology 2000, 111: 6-17.

CONTACTO

Dr. Jorge Alfaro Lucero
Laboratorio de Terapia Celular, Banco de Sangre
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999. Independencia, Santiago
E-mail: jalfaro@redclinicauchile.cl

