

Artículo Original

Evaluación De Quimerismo En Pacientes Con Injerto De Células Progenitoras Hematopoyéticas En Panamá Del 2000-2018

Evaluation of Chimerism in Patients with Graft Hematopoietic Progenitor Cells in Panama from 2000-2018

Vernaza Alejandro APMC*, Gutiérrez Yira*, Ortiz Luis*, Moscoso Juan*, Cuero César APMC**.

*Laboratorio Nacional de Trasplantes. Caja de Seguro Social, Panamá. Organización Panameña de Trasplantes. **Coordinación Nacional de la Organización Panameña de Trasplantes.

Palabras claves:

Injerto de células progenitoras hematopoyéticas Quimerismo Completo, Quimerismo, unidades de repetición en tándem y reacción de la cadena polimerasa.

Key words:

Grafting of hematopoietic progenitor cells complete chimerism, chimerism, tandem repeat units, and polymerase chain reaction.

Correspondencia a:
Licenciado Alejandro Vernaza

Correo electrónico:
al_ve_rnaza
@hotmail.com

Los autores han declarado que no existen conflictos de intereses con la publicación del presente trabajo.

Se obtuvo el consentimiento informado de todo paciente participante. Los autores declaran autogestión como fuente de financiamiento

Resumen

Introducción: El injerto de células progenitoras hematopoyéticas (ICPH) es actualmente un tratamiento para diferentes desórdenes hematológicos malignos y no malignos. El análisis del quimerismo post ICPH, y la cuantificación de cada población celular, deben ser monitoreados. El presente trabajo tiene como objetivo: el evaluar los resultados de quimerismo completo y mixto en sangre periférica del receptor pos trasplante obtenidos por método cualitativo y cuantitativo del año 2000 al 2018.

Material y método: El presente es un estudio descriptivo, observacional, transversal de dos métodos de quimerismo efectuados a receptores y donantes de ICPH alogénico.

Resultados: De los 79 pacientes estudiados por el método cualitativo: 65 (82.2%) resultaron con quimerismo completo y 14 (17.7%) con quimerismo mixto. No fue posible cuantificar por este método el % de células del donante y del receptor. **Conclusión:** El método cuantitativo es un método exacto, que determina el % de células del receptor y del donante presentes en la muestra. Con este método se evalúan un mayor número de marcadores genéticos que con el método cualitativo, y se obtienen un mayor número de loci informativos del quimerismo al compararlo con el método cualitativo.

Abstract

Introduction: Hematopoietic progenitor cell grafting (ICPH) is currently a treatment for different malignant and non-malignant hematological disorders. The analysis of post-ICPH chimerism, and the quantification of each cell population, should be monitored. The present work has as objective: to evaluate the results of complete and mixed chimerism in peripheral blood of the post-transplant recipient obtained by qualitative and quantitative method from the year 2000 to 2018.

Material and method: The present is a descriptive, observational, cross-sectional study of two methods of chimerism performed on allogeneic ICPH recipients and donors.

Results: Of the 79 patients studied by the qualitative method: 65 (82.2%) resulted with complete chimerism and 14 (17.7%) with mixed chimerism. It was not possible to quantify by this method the % of donor and recipient cells. **Conclusion:** The quantitative method is an exact method, which determines the % of recipient and donor cells present in the sample. With this method, a greater number of genetic markers are evaluated than in the qualitative method, and a greater number of information loci of chimerism are obtained than with the qualitative method.

INTRODUCCIÓN

El término quimera según La Mitología Griega se refiere a una criatura con cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de serpiente. En medicina, el término es usado para designar el fenómeno de coexistencia de diferentes poblaciones celulares derivadas de dos diferentes organismos en el cuerpo de un individuo, y que pueden ocurrir espontáneamente o producirse artificialmente [1].

El Injerto de células progenitoras hematopoyéticas (ICPH) es actualmente un tratamiento para diferentes desórdenes hematológicos malignos y no malignos, que ha sido efectivo en la reconstitución de la hematopoyesis normal. Un tratamiento exitoso resulta en injerto completo de las células del donante, en ausencia del sistema hematopoyético propio del receptor, denominado quimerismo completo [2].

El análisis del quimerismo posterior al ICPH en sangre periférica del receptor, y la cuantificación de cada población celular, es uno de los efectos más importantes que deben ser monitoreados.

Esta herramienta de diagnóstico de rutina en los centros de trasplante es una importante señal del estado del injerto, ya que una disminución de células del donante y la reaparición de la hematopoyesis del receptor afectan el éxito del tratamiento, y son indicadores de recaída de la enfermedad, rechazo del injerto, presencia de la enfermedad injerto vs huésped o presencia de enfermedad mínima residual [3, 4].

La recaída es la mayor causa de mortalidad en estos pacientes; de allí la importancia de diagnosticar en forma temprana y con exactitud el patrón celular del quimerismo en la sangre periférica del receptor, para predecir falla del injerto, persistencia de la enfermedad, decidir terminar la inmunosupresión o suministrar infusión de linfocitos del donante, y además, promover ayuda para la intervención médica, aún en ausencia de evidencia morfológica, citogenética o clínica [5, 6, 7].

Hay diferentes grados de quimerismo: el completo (QC), cuando el paciente no muestra evidencia de células del receptor en ningún tiempo después del trasplante; el quimerismo mixto (QM), donde el paciente muestra células del receptor y del donante en sangre periférica en diferentes proporciones y el microquimerismo, en el cual se detectan 1% o menos de células del receptor.

En Panamá hemos utilizado dos métodos para la evaluación del quimerismo, uno cualitativo de nueve marcadores del 2000 al 2016 y otro cuantitativo de 24 marcadores del 2016 al presente, ambos basados en la utilización de las diferencias entre receptor y donante de alelos de marcadores genéticos polimórficos de unidades de repetición en tándem, tanto en ICPH con donante idéntico y haploidéntico [8, 9,10]. (Ver tabla No. 1)

Tabla 1. Marcadores genéticos de unidades de repetición en tándem utilizados en el método de quimerismo cualitativo y cuantitativo

Loci	Cualitativo	
	Localización Cromosómica	Número de alelos
CSF1PO	5q33.3	9
TPOX	2p25.1	8
THOI	11p15.5	7
F13A01	6p24.3	14
FESFPS	15q.25	8
VWA	12p12	8
D16S539	16q24	9
D7S820	7q11.21	9
D13S317	13q22	9
Loci	Cuantitativo	
	Localización Cromosómica	Número de alelos
D3S1358	3p21.3	12
vWA	12P13.31	14
D16S539	16q24.1	9
CSF1PO	5q33.3-34	10
TPOX	2p23-2per	2
Y Indel	Yq11.221	2
Amelogenina	X:p22.1-Y:p11.2	2
D8S1179	8q24.13	15
D21S11	21q11.2-q21	24
D18S51	18q21.3	23
DY391	Yq11.21	7
D2S441	2p14	11
D19S433	19q12	20
THOI	11p15.5	10
FGA	4q28	32
D22S1045	22q12.3	12
D5S818	5q21-31	12
D13S317	13q22-31	12
D7S820	7q11.21-22	10
SE33	6q14	34
D10S1248	10q26.3	12
D1S1656	1q42.2	16
D12S391	12p13.2	15
D2S1338	2q35	18

La medición cuantitativa del quimerismo introducida en 2016, es de gran ayuda en el injerto de células tronco sin mieloablación y permite un análisis rápido y exacto del perfil genético y porcentaje de células presentes, lo cual ha sido efectuado por el Laboratorio Nacional de Tras-

plante para pacientes del Complejo Hospitalario Metropolitano, el Instituto Oncológico, el Hospital del Niño, el Hospital de Especialidades Pediátricas y el Hospital Rafael Hernández [11, 12, 13].

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Evaluar los resultados de quimerismo completo y mixto en sangre periférica del receptor posterior al ICPH obtenidos por método cualitativo y cuantitativo del año 2000 al 2018 en Panamá.
2. Definir un Protocolo Nacional del período de tiempo post -ICPH, en el cual deben efectuarse los análisis de quimerismo, para un mejor seguimiento del efecto del injerto medido por proporción de poblaciones celulares del receptor y el donante.
3. Definir un nuevo modelo de análisis de quimerismo basado en sub-poblaciones celulares para establecer capacidad de respuesta inmune en el receptor.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente es un estudio descriptivo, observacional, transversal de dos métodos de quimerismo efectuados a receptores y donantes de ICPH alogénico desde el año 2000 al 2018 en el Laboratorio Nacional de Trasplante.

Se incluye un total de 124 pacientes con ICPH alogénicas, efectuados del 2000 al 2018, de los cuales 79 fueron estudiados utilizando el método de quimerismo cualitativo y 45 por el método cuantitativo.

La sangre periférica del receptor y el donante fueron extraídas antes del ICPH y la del receptor en diferentes períodos posterior al trasplante por solicitud de análisis de quimerismo. Se utilizaron células mononucleares y granulocitos obtenidas por centrifugación de la sangre periférica con EDTA.

En el método cualitativo la extracción de ADN genómico fue efectuada utilizando el método "Promega Wizard Genomic DNA Purificación kit" para aislar la banda de ADN y en el método cuantitativo se utilizó "QIAamp DNA Blood kit (Qiagen), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. La cantidad y pureza fue obtenida ajustando la concentración a 25 ng/ul. de ADN.

En el método cualitativo la amplificación para diferenciar los alelos específicos del polimorfismo de los nueve marcadores basado en las unidades de repetición en tándem, se efectuó utilizando amplificación en Termociclador Perkin Elmer 9600, siendo los pares de base de longitud menor de 400 y separando los productos alélicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizada y tinción con plata de las bandas alélicas presentes (Silver Stain Detection, Promega Corporation).

Tabla 2. Resultados de quimerismo completo y mixto según método

	Quimerismo Completo		Quimerismo Mixto		Total	
	N	%	N	%	N	%
Método Cualitativo	65	82.2	14	17.7	79	63.7
Método Cuantitativo	37	82.2	8	17.7	45	36.3
Total	102	82.2	22	17.7	124	100

La definición de alelos se logra construyendo la escalera alélica. (Ver tabla No. 2)

En el método cuantitativo, los alelos de los marcadores de identificación humana, definidos por las STR, se identifican mediante fluorescencia del producto alélico de la reacción PCR y electroforesis capilar. Se utilizaron los reactivos comerciales "Global Filer" de Applied Biosystems "Thermo Fisher Scientific" , que contienen los loci recomendados por el CODIS Core Loci Working Group" que comprende un total de 24 loci altamente discriminatorios: (Ver tabla No.2). Los productos amplificados por PCR se determinan en el equipo Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

El ADN del receptor y el donante fueron estudiados después del trasplante utilizando para el cálculo del quimerismo los alelos informativos que presentan diferencias alélicas entre el donante y el receptor por ser homo o heterocigóticos pero sin tener alelos comunes, por ser heterocigóticos y uno de los alelos es idéntico al patrón homocigótico del otro individuo.

Cuando todos los alelos son compartidos, entre el receptor y el donante, el marcador genético es no informativo.

El porcentaje total del quimerismo es establecido calculando el valor promedio de todos los marcadores informativos y se calcula la desviación estándar de cada locus informativo respecto a la media para controlar la fuente de variación que puede indicar problemas metodológicos.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 124 pacientes con ICPH alogénicas, de los cuales 79 (63.7%) fueron utilizando el método de quimerismo cualitativo y 45 (36.3%) por el método cuantitativo. En ninguno de los pacientes estudiados se utilizaron ambos métodos de quimerismo. (Ver tabla No. 2)

De los 79 pacientes estudiados por el método cualitativo: 65 (82.2%) resultaron con quimerismo completo y 14 (17.7%) con quimerismo mixto. No fue posible cuantificar por este método el % de células del donante y del receptor y la expresión quimerismo mixto se refiere a presen-

Tabla 3. Periodo de tiempo en el cual se efectuaron los análisis de quimerismo post-Icph en ambos métodos

Tiempo	n	%
1 mes	30	24.2
2 meses	18	14.5
3 meses	25	20.2
4 meses	10	8.1
5 meses	8	6.4
6 meses	11	8.8
8 meses	4	3.2
10 meses	1	0.8
12 meses	6	6.4
14 meses	2	1.6
16 meses	2	1.6
22 meses	1	0.8
24 meses	4	3.2
+144 meses	2	1.6
Total:	124	

cía o ausencia de alelos de marcadores del donante y del receptor en su sangre periférica.

De los 45 pacientes estudiados por el método cuantitativo 37 (82.2%) resultaron con quimerismo completo y 8 (17.7%) con quimerismo mixto.

De estos últimos la media aritmética del resultado de porcentaje de células del donante en sangre periférica del receptor fue de 6.6%, 36.2%, 39.7%, 71.7%, 75.3%, 77.8%, 94.5% y 96.6%. En los receptores con quimerismo completo el porcentaje de células del donante fue de 100%.

De los 124 pacientes estudiados por quimerismo, a 30 pacientes (24.2%) se les efectuó quimerismo al mes posterior al ICPH, 18 pacientes (14.5 %) al 2º. Mes; 25 al tercer Mes (16.25%); 10 al cuarto mes (0.8%); 8 al quinto mes. (6.4%); once al 6to mes (8.8%); cuatro al octavo mes (3.2%); uno al décimo mes (0.8%); seis al mes doce (4.8%); dos (a los catorce meses (1.61%)y dos a los dieciséis meses (1.61%) , uno a los 22 meses (0.8%); cuatro a los veintidós meses (3.2%); dos a los 24 meses (1.61%); y dos a los 144 meses (1.61%). (Ver tabla No. 3)

En el método cualitativo que estudia 9 marcadores genéticos, el número total de loci estudiados en los 14 pacientes con quimerismo mixto fue de 126, de los cuales los loci informativos fueron 36 (28.57%) y los no informativos fueron 90 (71.4%).

En el método cuantitativo que estudia 25 marcadores genéticos, el número total de loci genético estudiados en los 8 pacientes con quimerismo mixto es de 200 y los loci informativos fueron 93 (46.5%) y los no informativos fueron 107 (53.5%). (Ver tabla No. 4)

Tabla 4. Marcadores genéticos informativos y no informativos en pacientes con Icph analizados por quimerismo mixto según método.

Método	Total de pacientes con Quimerismo Mixto	Loci estudiado por paciente	Total Loci estudiados	Total Loci Informativo	Total Loci no informativo
Método Cualitativo	14	9	126	36 (28.5%)	90 (71.4%)
Método Cuantitativo	8	25	200	93 (46.5%)	107 (53.5%)

DISCUSIÓN

El análisis del quimerismo molecular múltiple permite resultados reproducibles. Con este análisis es posible estudiar varias muestras en tiempos diferentes para obtener un estudio longitudinal de seguimiento que produzca un informe comprensivo del análisis del estado del injerto.

Queda demostrado que el quimerismo no es un estado estable, sino un proceso dinámico que aumenta o disminuye la proporción de células con el tiempo. La presencia de quimerismo mixto en el receptor en la etapa temprana del trasplante alogénico puede ser asociada con la evolución del trasplante y esperar que en el futuro desarrolle quimerismo completo.

El método cualitativo a diferencia del método cuantitativo ofrece medición del nivel de quimerismo basado en presencia o ausencia de bandas de ADN amplificado teñidas con nitrato de plata y que define los alelos del polimorfismo comparando con la escalera alélica de referencia; pero la cuantificación es subjetiva y no permite definir el porcentaje exacto de células del donante o del receptor en quimerismo mixto.

Este método excluye la posibilidad de cuantificar el microquimerismo, que determina hasta un 5% de células del donante o del receptor en sangre periférica.

El método cuantitativo es un método exacto, que determina el % de células del receptor y del donante presente en la muestra, utilizando la fluorescencia del producto alélico de la reacción de la cadena polimerasa y la electroforesis capilar, registrando el alto de los picos que aparecen con registro del electroferograma. Con este método se evalúan un mayor número de marcadores genéticos que en el método cualitativo, y se obtienen un mayor número de loci informativos del quimerismo que con el método cualitativo.

La incorporación de este nuevo método cuantitativo nos permitirá en el futuro evaluar el porcentaje con exactitud

de las sub-poblaciones celulares que se encuentran en pequeñas proporciones en la sangre periférica, lo que facilita conocer si existe reconstitución inmune en función de las principales poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune.

El efecto más importante del monitoreo posterior al trasplante, es predecir eventos contrarios al éxito del ICPH como EMR, predecir la recaída inminente de la enfermedad original, rechazo del injerto y ElvsH, a fin de iniciar tratamiento relevante.

En este contexto, el análisis del quimerismo es el método de elección para conocer el monitoreo exitoso posterior al trasplante. El análisis cuantitativo temprano de la cinética del quimerismo permite diferenciar las etapas progresivas del injerto, diferenciando ausencia o retardo del injerto.

La presencia de Quimerismo Completo o Mixto es un fenómeno que indica la evolución de la enfermedad posterior al ICPH y es dependiente de una serie de factores como la enfermedad hematológica de base, la intensidad del régimen de acondicionamiento, el uso de depleción de células-T, el número de células tronco infundidas, la sensibilidad de la técnica utilizada y el tiempo en el cual se realiza el ensayo. Hemos seleccionado la técnica cuantitativa de determinación de quimerismo con extremo cuidado, a fin de obtener exactitud del estado de quimerismo.

El método cuantitativo permite probar la sensibilidad y linealidad en el análisis, al efectuar ensayos repitiendo las muestras pre-injerto del receptor y el donante con cada nueva muestra de quimerismo posterior para registrar las áreas de los picos. Adicionalmente, el coeficiente de variación entre muestras repetidas fue menor de 10%, utilizando la misma concentración de ADN.

Al utilizar regresión lineal la variación es del 10% del valor actual del pico, comparando la misma muestra en diferentes corridas. Al incorporar este método, lograremos determinar el estado de la respuesta inmune de las células del donante, al permitarnos evaluar en el futuro la concentración de sub-poblaciones celulares como la CD3 (célula-T), CD19 (célula-B), CD33 (célula mieloide), CD66b (Célula granulocítica), DC56 (células NK y CD34 (célula progenitora del donante), presentes en la sangre periférica del receptor.

El uso de un método altamente sensible excluye recaída con certeza y permite predecir tempranamente la recaída con exactitud y especificidad en un período de más de un mes antes del diagnóstico clínico.

La determinación de quimerismo en intervalo de tiempo de 15, 30, 60, 90, 180 y 360 días posterior al ICPH específico permite introducir un protocolo nacional, para definir y conocer los efectos progresivos del ICPH en el receptor y nos permite predecir eventos.

CONCLUSIÓN

El método cuantitativo es un método exacto, que determina el % de células del receptor y del donante presente en la muestra. Con este método se evalúan un mayor número de marcadores genéticos que con el método cualitativo, y se obtienen un mayor número de loci informativos del quimerismo que con el método cualitativo.

La incorporación de este nuevo método cuantitativo nos permitirá en el futuro evaluar el porcentaje con exactitud de las sub-poblaciones celulares que se encuentran en pequeñas proporciones en la sangre periférica, lo que facilita conocer si existe reconstitución inmune en función de las principales poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune.

El método cuantitativo permite probar la sensibilidad y linealidad en el análisis, al efectuar ensayos repitiendo las muestras pre-injerto del receptor y el donante con cada nueva muestra de quimerismo posterior para registrar las áreas de los picos. Nos permitirá evaluar en el futuro la concentración de sub-poblaciones celulares.

La determinación de quimerismo en intervalo de tiempo de 15, 30, 60, 90, 180 y 360 días posterior al ICPH específico nos permite introducir un protocolo nacional, para definir y conocer los efectos progresivos del ICPH en el receptor.

REFERENCIAS

- [1] Khan F, Agarwal A, and Agrawal D. Significance of chimerism hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplantation* (2004):34, 1-12.
- [2] Frankfurt U, Zitzner R, Tambur A. Real time qPCR for chimerism assessment in allogeneic hematopoietic stem cell transplants from unrelated adult and double umbilical cord blood. *Human Immunology* 2015;76:155-160
- [3] Clemente I, Goncalo C, Faria, M et. al. Relevance for Chimerism analysis after allogeneic stem cell Transplantation. *Transplantation Proceeding* (2017): 49,890-892.
- [4] Tang X, Alatrash G, Ning J, Jakher H, Stafford P, Zope M., et al. Increasing chimerism after allogeneic stem cell transplantation is associated with longer survival times. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(8) 1139-44.
- [5] Sellman L, Rabe K, et al. Diagnostic value of highly-sensitive chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. <https://doi.org/10.1038/s41409-018-0176-7>.
- [6] Kroger N, Bacher U, Brader P, Bottcher S, Borowitz MJ, Dreger P et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention and Treatment of Relapse

- after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant: J Am soc Blood Marrow Transplant*. 2010; 16:1187-211.
- [7] Kroger N, Bacher U, Brader P, Bottcher S, Borowitz MJ, Dreger P et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following allogeneic Stem Cell Transplantation. Part II: chronic leukemia's, myeloproliferative neoplasms and lymphoid malignancies.. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010; 16:1325-46.
- [8.] Kliman D, et al. Ultra-Sensitive Droplet Digital PCR for the Assessment of Microchimerism in Cellular Therapies. *Biol. Blood Marrow Transplant* (2018); 24; 1069-1078.
- [9] Technical Manual. Gene prints STR Systems (Silver Stain Detection). Promega Corporation.
- [10] Global Filer PCR Amplification User Guide. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific.
- [11.] Wang D., Goopinath S., Lagacé R., Norona W., Hennessey L., Short M., Mulero J. Development validation of the Global Filer Express PCR Amplification Kite: a 6-dye multiplex assay for the direct amplification of reference samples. *Forensic Science International. Genetics*. 19(2015)148-155.
- [12] Thiede C, Florek M, et al. Rapid quantification for mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeats markers and fluorescent detection. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1055-1060.
- [13] Thiede C. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiple PCR amplification of short tandem repeats markers and fluorescent detection. *Leukemia* (2001) 15: 302-306.