



Aplicación de la biología molecular en la detección del quimerismo hematopoyético post-transplante alogénico de médula ósea.

Dra. Karina Casanueva Calero.

Especialista de 1er grado en Bioquímica Clínica

Laboratorio de Genética Molecular

HCQ “Hermanos Ameijeiras”



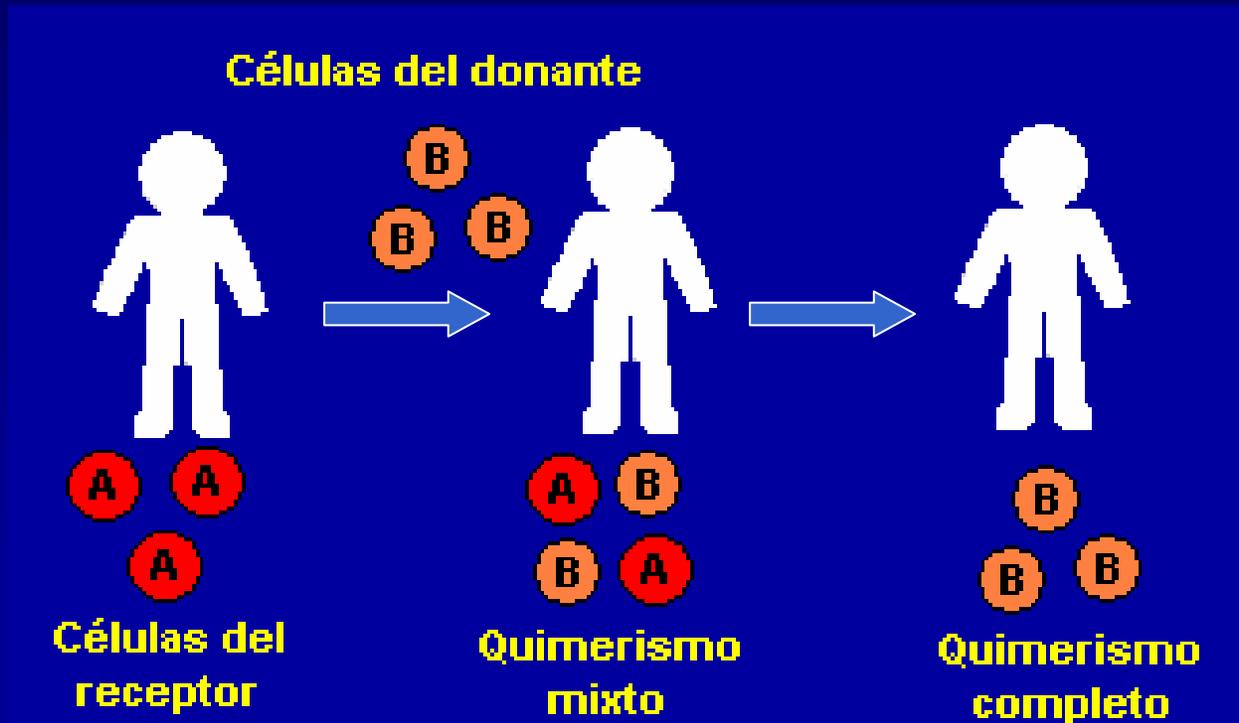
QUIMERISMO



QUIMERA DE AREZZO

CONCEPTO

En hematología, el término quimerismo se refiere a la presencia de células linfohematopoyéticas no propias del receptor que aparecen como resultado de un trasplante alogénico de células de la médula ósea. Para que este fenómeno tenga lugar, es necesaria la inmunodeficiencia en el receptor y la presencia de células hematopoyéticas del donante.



CLASIFICACIÓN DEL QUIMERISMO

Atendiendo a la presencia de células del donante:

- **Quimerismo total o completo (QC):** todas las células hematopoyéticas detectadas proceden del donante.
- **Quimerismo mixto (QM):** coexisten células hematopoyéticas del donante con células hematopoyéticas del receptor.
- **Quimerismo dividido o disociado:** células mieloides y linfoideas tienen un origen distinto entre sí (Ej. Linfocitos del donante y macrófagos del receptor).
- **Microquimerismo:** existe menos del 1% de células del donante

TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS HEMATOPEYÉTICAS

Tratamiento recomendado en pacientes con hemopatías malignas y no malignas.

- ❖ Leucemias
- ❖ Linfoma no Hodgkin
- ❖ Anemia drepanocítica
- ❖ Aplasia medular
- ❖ Talasemia

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL QUIMERISMO

- ❖ Identificar el origen de las células hematopoyéticas.
- ❖ Conocer el éxito o fracaso del trasplante.
- ❖ Predecir la posibilidad de una recaída.
- ❖ Aplicar una terapia oportuna.

DETECCIÓN DEL QUIMERISMO

**CÉLULAS DEL
DONANTE**

≠

**CÉLULAS DEL
PACIENTE**

Marcadores informativos

Técnicas sensibles

EVALUACIÓN DEL QUIMERISMO

Métodos de estudio del quimerismo:

- ✓ Tipaje eritrocitario
- ✓ Alotipos inmunoglobulínicos
- ✓ Citogenética: cromosomas sexuales y autosómicos
- ✓ Hibridación fluorescente in situ (FISH, del inglés fluorescent *in situ* hybridization)
- ✓ Southern blott
- ✓ PCR para STR/VNTR
- ✓ PCR cuantitativo

EVALUACIÓN DEL QUIMERISMO

- *Fenotipificación de eritrocitos*
- *Alotipificación de inmunoglobulinas*
- *Citogenética*

Actualmente han sido sustituidos por otros métodos debido a limitantes que incluyen:

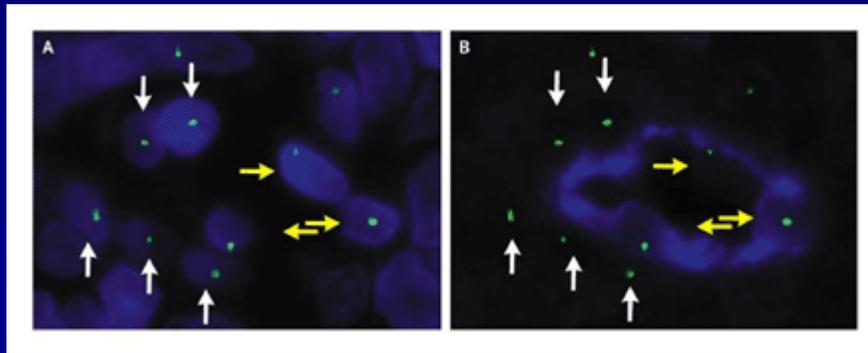
- *Pobre sensibilidad*
- *Requerimiento de donante y receptor de sexos diferentes*
- *Detección de un bajo grado de polimorfismo*

**TÉCNICAS DE BIOLOGÍA
MOLECULAR PARA LA
DETECCIÓN DEL
QUIMERISMO**

FISH (hibridación fluorescente *in situ*)

El quimerismo se puede estudiar mediante esta técnica utilizando sondas para los cromosomas X e Y, cuando existen diferencias de sexo entre el donante y el paciente.

Permite el análisis del ADN de las células que están en metafase o en interfase. Su principio se basa en la unión de una cadena sencilla de ADN (sonda) al ADN complementario de la célula a estudiar.



Principales ventajas sobre la citogenética convencional:

- Mayor sensibilidad (1%)
- Posibilidad de cuantificar las células sin necesidad de que estén en división

SOUTHERN BLOTT

Ventajas:

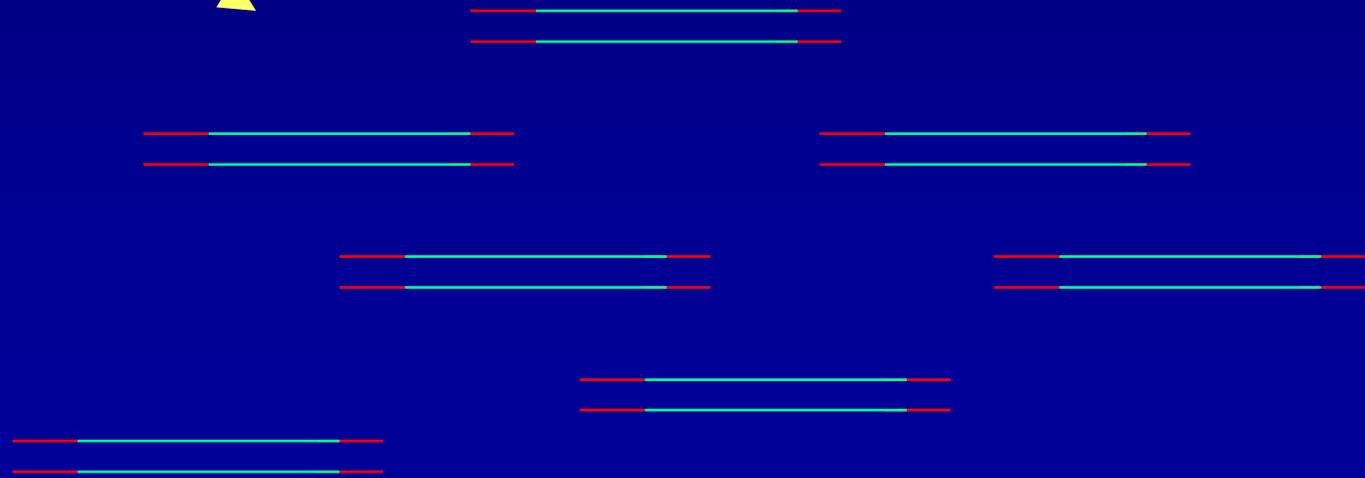
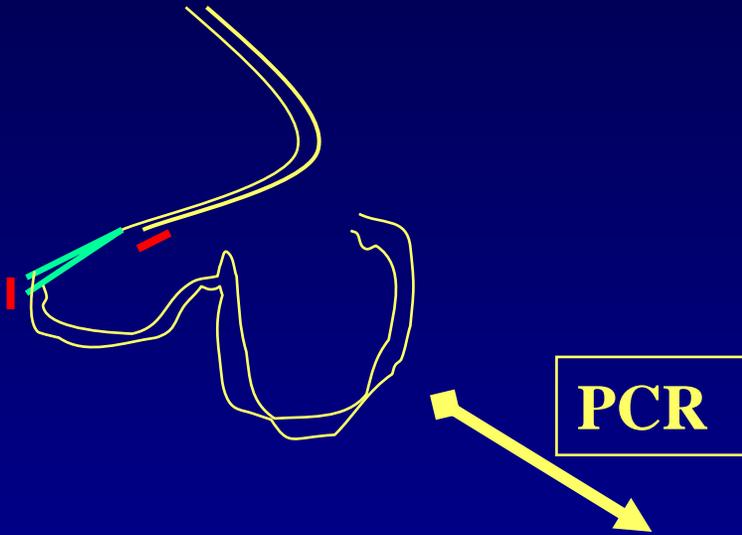
Sensibilidad: del 1 al 10%

Desventajas:

- Requiere de grandes cantidades de células (1000 000).
- Método laborioso.
- Se trabaja con radioactividad.

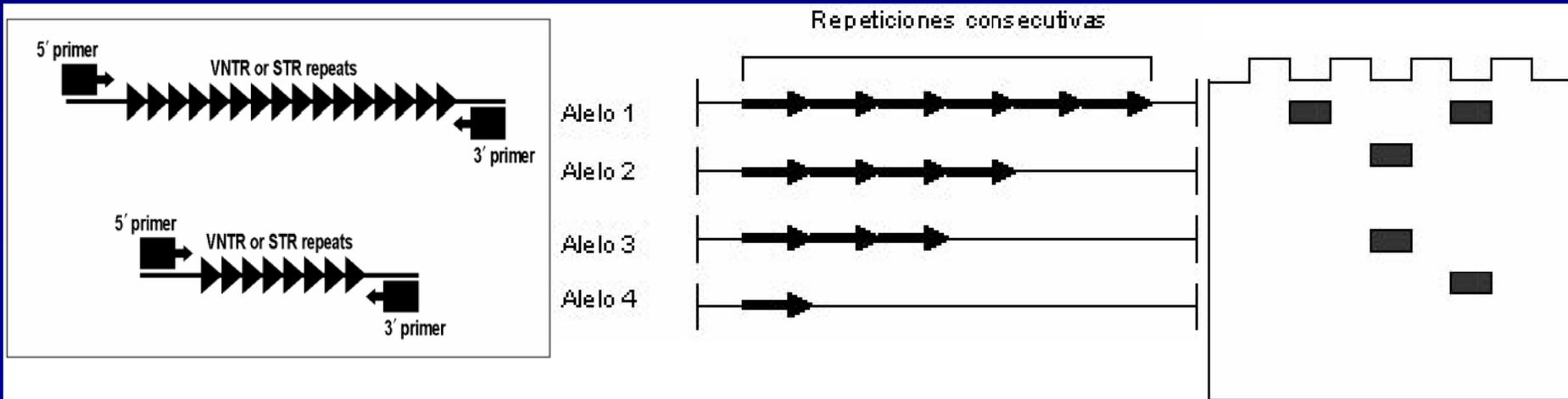
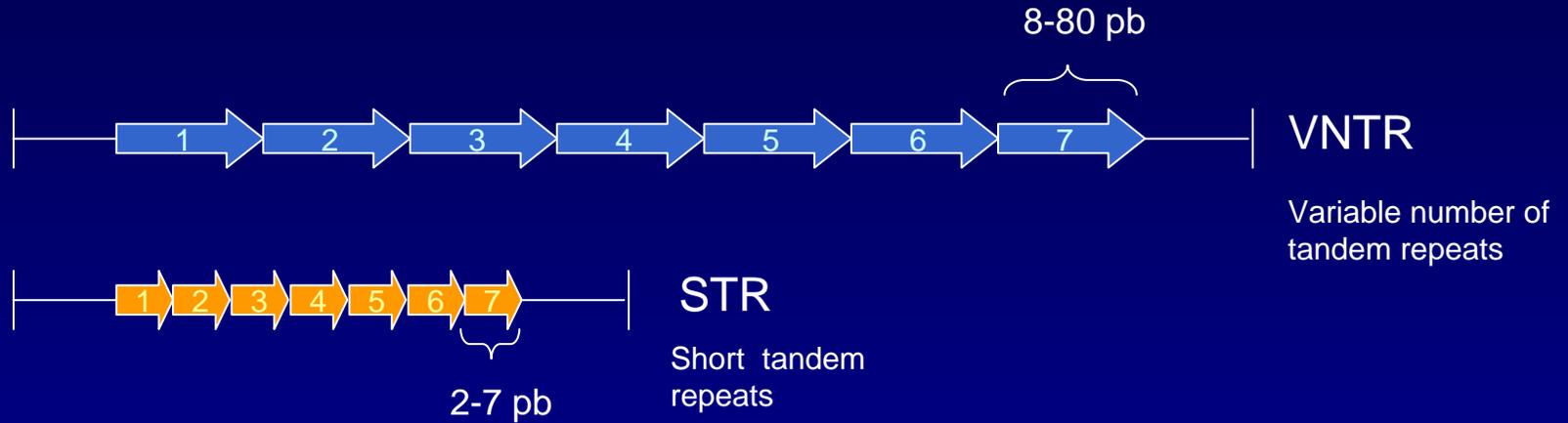
TÉCNICA DE PCR

Reproducción (amplificación) en ciclos consecutivos de un fragmento del ADN cuya longitud está definida por la ubicación de los cebadores (*primers*) utilizados

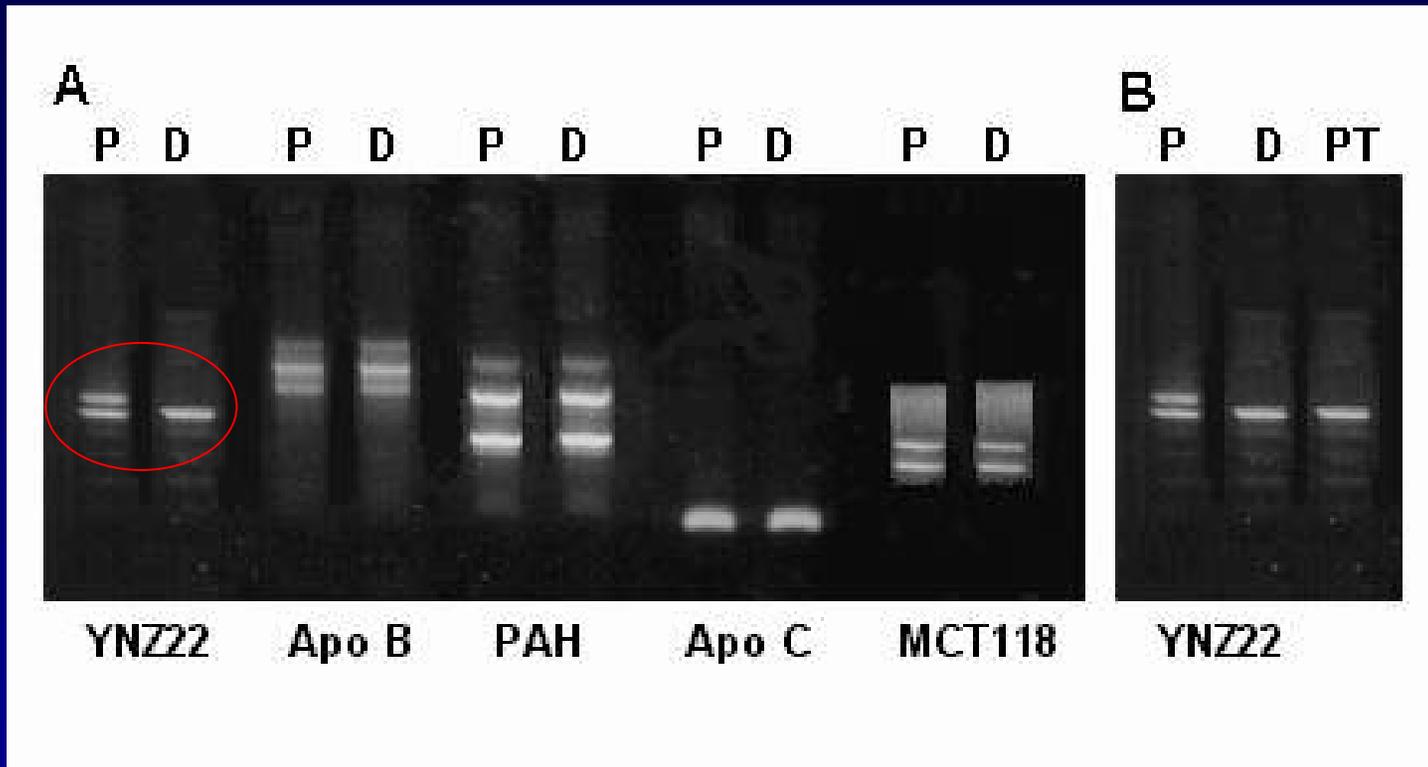


STR/VNTR

Una repetición en tandem es una secuencia corta de ADN que se repite consecutivamente cabeza con cola en un locus cromosómico específico



PATRÓN DE BANDAS REPRESENTATIVO



- A** Paciente y donante antes del transplante. Aparece un solo marcador útil, YNZ22.
- B** Estudio post-transplante. Se observa quimera total o completa.

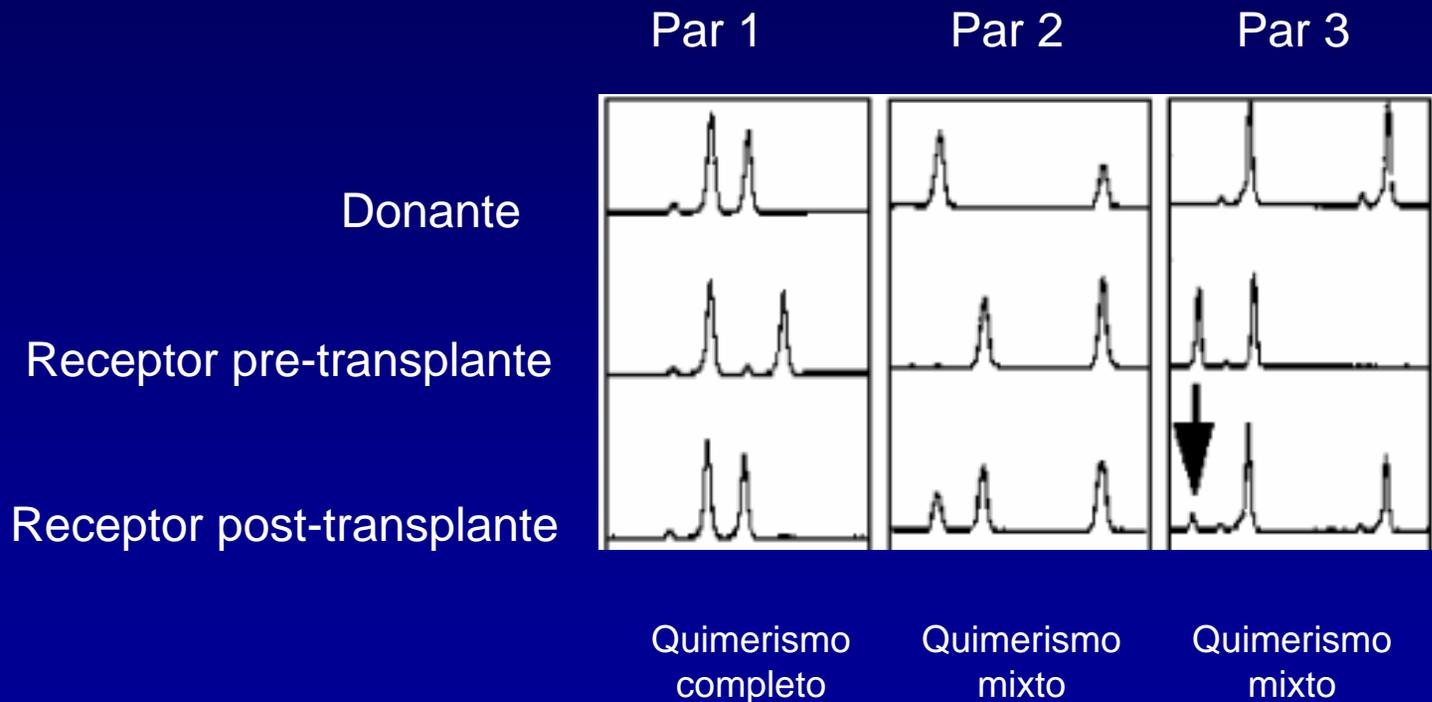


VENTAJAS DEL ESTUDIO POR *PCR* DE LOS *STR/VNTR*

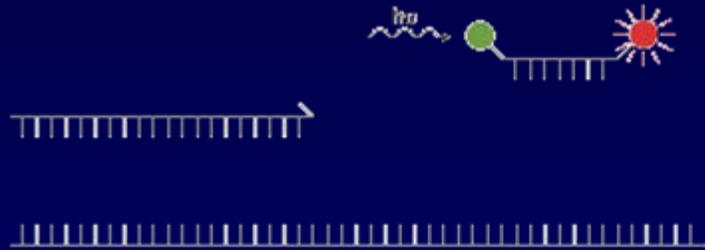
- Rápida y sencilla
- Pequeñas cantidades de ADN
- Específica para la patología
- Altamente informativa
- No usa radioisótopos ni enzimas de restricción
- El donante y el paciente pueden ser del mismo sexo

PCR CUANTITATIVO

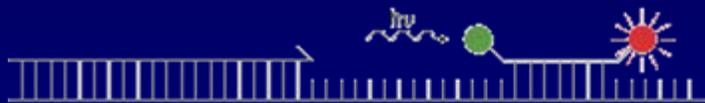
Análisis mediante secuenciador de ADN de los productos de PCR que emplea cebadores marcados con fluoróforos.



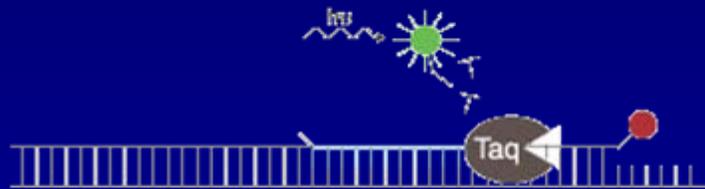
PCR EN TIEMPO REAL



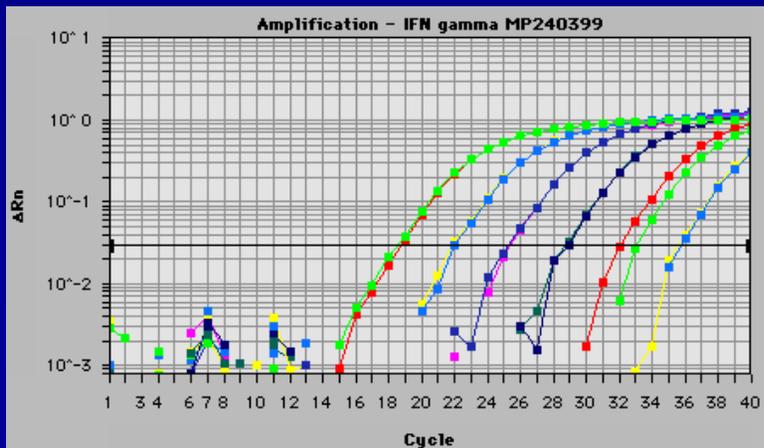
DENATURALIZACIÓN



HIBRIDACIÓN

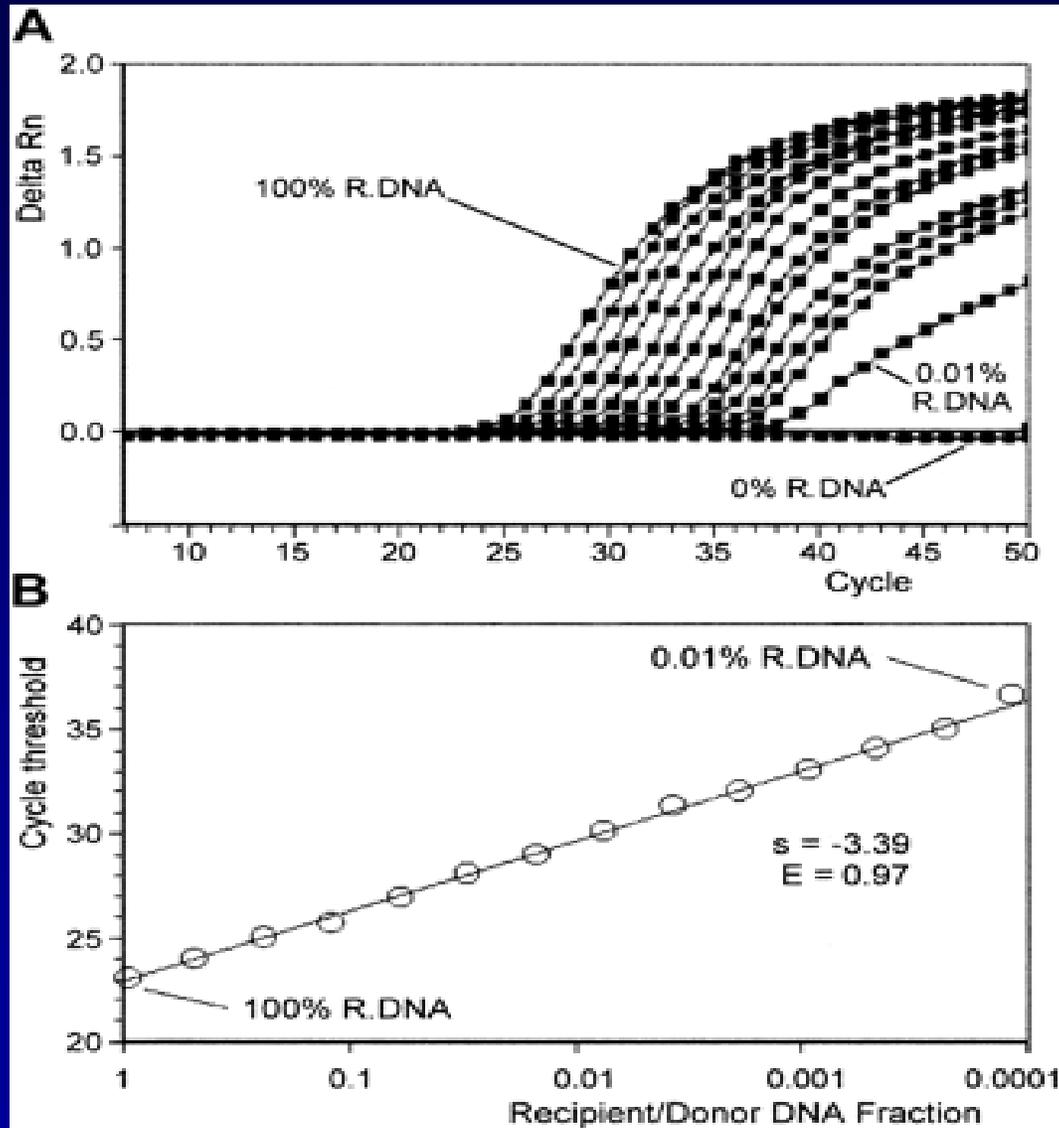


EXTENSIÓN

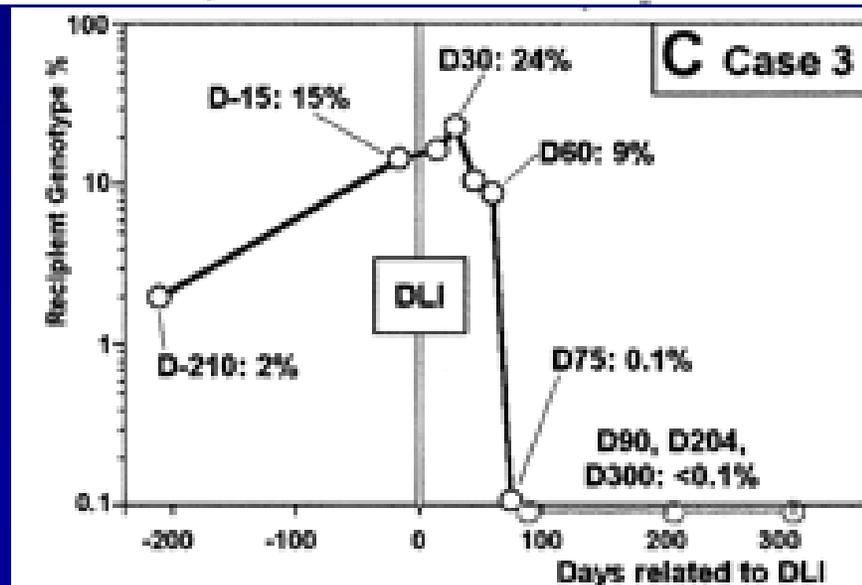
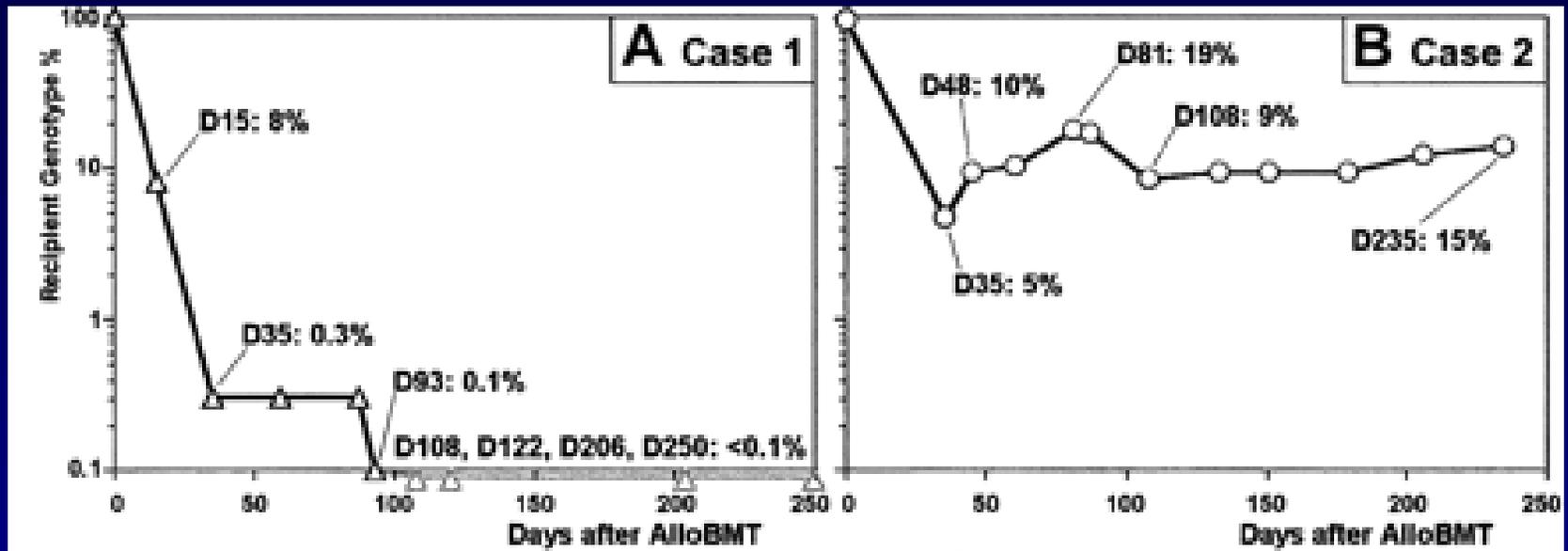


ANÁLISIS DEL QUIMERISMO POR PCR tr

ETAPA PRE-TRANSPLANTE



ANÁLISIS DEL QUIMERISMO POR PCR tr ETAPA POST-TRANSPLANTE



VENTAJAS DEL *PCR* EN TIEMPO REAL

- Mayor especificidad, sensibilidad y reproducibilidad que los métodos tradicionales
- Elimina el procesamiento del producto Post-PCR
- Utiliza las mismas condiciones de amplificación para cualquier sistema genético a evaluar, permitiendo analizar más de un marcador y por tanto más de un par donante-receptor en la misma corrida
- Elimina los errores resultantes de la competencia de alelos diferentes por un mismo par de oligonucleótidos



**¡MUCHAS
GRACIAS!**