

## Microquimerismo fetal en pacientes con cirrosis biliar primaria

Albert Selva O'Callaghan<sup>a</sup>, Eva Balada Prades<sup>b</sup>, Lluís Castells Fusté<sup>c</sup>, Víctor Vargas Blasco<sup>c</sup>, Roser Solans Laque<sup>a</sup> y Miquel Vilardell Tarrés<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Medicina Interna.

<sup>b</sup>Unidad de Investigación en Autoinmunidad.

<sup>c</sup>Servicio de Hepatología. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona. España.

**FUNDAMENTO:** Se ha implicado la existencia de microquimerismo fetal (MQF) en la etiopatogenia de la CBP. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de MQF en pacientes diagnosticadas de CBP.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Se estudió la presencia de MQF en 28 mujeres, 14 con CBP y 14 controles sanos. Se extrajo ADN a partir de células de sangre periférica, y mediante reacción en cadena de polimerasa se detectó una secuencia específica de cromosoma Y, que se confirmó por análisis Southern blot.

**RESULTADOS:** Se detectó MQF en un única paciente diagnosticada de CBP (7%) y en ningún caso del grupo control.

**CONCLUSIONES:** La presencia de MQF no parece desempeñar un papel importante en la patogenia de las pacientes con CBP.

**Palabras clave:** Microquimerismo fetal. Autoinmunidad. Cirrosis biliar primaria.

Fetal microchimerism in patients with primary biliary cirrhosis

**BACKGROUND:** Fetal microchimerism (FM) has been implicated in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC). The aim of the study was to investigate the presence of FM in PBC patients.

**PATIENTS AND METHOD:** FM was studied in 28 women, 14 with PBC and 14 healthy controls. DNA was extracted from peripheral blood cells, and a PCR analysis to detect a specific Y-chromosome sequence was performed. Specificity was confirmed by Southern blot analysis.

**RESULTS:** The Y-chromosome sequence was amplified from peripheral-blood cell DNA in only one PBC patient and in none of the controls.

**CONCLUSIONS:** FM does not seem to play a major role in patients with PBC.

**Key words:** Fetal microchimerism. Autoimmunity. Primary biliary cirrhosis.

Correspondencia: Dr. A. Selva O'Callaghan. Siracusa, 12 bis, A. 08012 Barcelona.

Correo electrónico: aselva@hg.vebron.es

Recibido el 2-9-2002; aceptado para su publicación el 21-10-2002.

La etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes es poco conocida. Se argumenta que la existencia de un factor externo (virus, agentes físicos, fármacos) sobre un sustrato genético favorable provocaría la eclosión de la enfermedad autoinmune. Sin embargo, recientemente, algunos autores han intentado explicar la aparición de estas enfermedades a partir de la existencia de un fenómeno de aloinmunidad: la persistencia de microquimerismo fetal<sup>1,2</sup>. Es conocido que a partir del flujo de elementos celulares entre la madre y el feto a través de la circulación placentaria, algunas células fetales se implantan en la madre y persisten durante años. Se cree que en ocasiones estas células fetales –que pueden ser identificadas a partir del cromosoma Y cuando el feto es un varón– son capaces de desencadenar un auténtico fenómeno de aloinmunidad crónica similar al que tiene lugar en algunos pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitor homocigótico (TPH), dando lugar a la enfermedad crónica del injerto contra el huésped, la cual se caracteriza por alteraciones clínicas e inmunológicas, en ocasiones indistinguibles de enfermedades autoinmunes como la esclerodermia, el síndrome de Sjögren, la miopatía inflamatoria o la cirrosis biliar primaria (CBP).

La existencia de microquimerismo fetal en pacientes con CBP y su importancia en la patogenia de esta enfermedad autoinmune es un tema ampliamente debatido<sup>3-7</sup>. En este estudio se analiza la presencia y significado clínico del microquimerismo fetal en una serie de pacientes (mujeres) diagnosticadas de CBP.

### Pacientes y método

Se recogieron muestras de sangre de 28 mujeres con historia de al menos un descendiente varón: 14 mujeres diagnosticadas de CBP y 14 controles sanos de sexo femenino de similar edad y número de hijos. No existían antecedentes de abortos, transfusiones sanguíneas ni trasplante en ninguna de ellas. El diagnóstico de CBP se estableció ante la presencia de una biopsia hepática compatible, valores de fosfatasa alcalina 2 veces por encima de su valor normal y anticuerpos antimitocondriales positivos a título superior a 1:320.

A continuación se detallan las diferentes etapas seguidas para efectuar el estudio de microquimerismo. Todas las técnicas descritas se realizaron por personal de sexo femenino con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación por células del sexo masculino:

– Extracción de ADN a partir de células de sangre periférica. Un total de 40 ml de sangre venosa periférica preservada en ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) fueron extraídos de pacientes y de controles. Se utilizó una solución de ACK (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mmol KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mmol sal disódica de EDTA, pH 7,2) para eliminar los eritrocitos. La sangre fue incubada con ACK en una relación de 1:2 (5 ml de sangre con 10 ml de ACK) durante 15 min; después de centrifugar durante 5 min a 3.000 rpm, el sedimento fue resuspendido en 1 ml de ACK y centrifugado durante 2 min a 3.000 rpm; una vez más, el sedimento fue resuspendido en 1 ml de ACK y centrifugado como anteriormente. Por último, se efectuó un lavado con 1 ml de solución salina de tampón fosfato (PBS) durante 2 min; a 6.000 rpm. El sedimento se guardó en diferentes aliquotas a -20 °C.

El ADN se extrajo con el equipo QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), tras redissolver el sedimento celular en 10 ml de PBS. Para conseguir la máxima concentración, 1 ml del eluido final que contenía el ADN se volvió a cargar en la columna, se incubó y se centrifugó siguiendo las instrucciones del proveedor.

– Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar una secuencia específica del cromosoma Y. Se llevó a cabo una PCR anidada para detectar una secuencia específica de copia única del cromosoma Y. GeneCraft (Heidelberg, Alemania) suministró todos los reactivos excepto los cebadores, que fueron suministrados por Cruachem Ltd (Glasgow, Reino Unido). Se tomaron medidas estrictas para prevenir contaminaciones, incluyéndose cada vez un control positivo (ADN de varón) y un control negativo (agua). Se efectuaron distintas diluciones mezclando ADN femenino y masculino y pudimos determinar que una sola célula de un individuo varón podía detectarse entre 5 × 10<sup>5</sup> células femeninas. Así pues, las PCR se desarrollaron con 3 mg de ADN total (una cantidad mayor parecía inhibir la reacción, es decir, el ADN masculino no era detectado) (fig. 1). Aparte del ADN, cada reacción contenía 200 μM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, uno por tampón de Taq polimerasa, 0,3 unidades de Taq polimerasa, y 18,75 pmol de los cebadores P1 y P2 (P1: 5' CTAGACCGCAGAGGCCTCAT 3'; P2: 5' TAGTACCCACGCCTGCTCCGG 3'). Se llevaron a cabo reacciones de 25 μl en un termociclador Whatman Biometra Tgradient (Goettingen, Alemania) bajo las siguientes condiciones: desnaturación a 94 °C durante 5 min; veinte ciclos de amplificación que consistían en 1 min a 94 °C, 1 min a 64,4 °C y 2 min a 72 °C, y 7 min adicionales a 68 °C. Para la segunda PCR cada tubo de reacción contenía 1 μl de la primera PCR y se emplearon condiciones similares, siendo los cebadores utilizados el P3 y el P4 (P3: 5' CATCCAGAGCGCTCCCTGGCTT 3'; P4: 5' CTTTCCA-CACGCCACATTGTC 3'), la temperatura de anillamiento de 64 °C, y el número de ciclos de 25. Es importante destacar que se emplearon más de cinco aliquotas por paciente. Se cargaron 10 μl en un gel

de agarosa al 2% y el producto de amplificación (esto es, una banda de 298 pb) fue visualizado tras teñir con SIBR Green (Sigma, Madrid, España).

— Confirmación específica del producto de PCR. Se efectuó un estudio de Southern blot mediante transferencia por capilaridad en una membrana de nailon cargada (Hybond<sup>Y</sup>-N+) (Amsterdam Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se empleó una sonda específica biotinilada en su extremo 5' (5' CAGCTCGGCCCTGATGTGACTCTT 3') (Crucachem) para hibridar con el producto de PCR transferido a la membrana. Los equipos North2South<sup>Y</sup> Chemiluminescent Nucleic Acid Hybridization and Detection Kit de Pierce (Rockford, IL, EE.UU.) se utilizaron siguiendo las instrucciones de los proveedores y la quimioluminiscencia se detectó tras la exposición en un film CL-X Posure<sup>Y</sup> (Pierce).

## Resultados

Las 14 mujeres diagnosticadas de CBP tenían una edad media de 54,1 años, con límites de 31 y 70 años. La edad media de los 14 controles sanos de sexo femenino fue de 48,7 años, con límites entre 32 y 65 años. No existían diferencias significativas entre el número de hijos varones entre ambos grupos. No hubo antecedentes de abortos, transfusiones sanguíneas ni trasplante en ninguna de las 28 mujeres.

Únicamente se observó ADN específico del cromosoma Y en las células de sangre periférica de una paciente con CBP (IC del 95, 0,18-33,87%), mientras que no se detectó en ninguna de las 14 mujeres del grupo control (IC del 95%, 0,00-23,16). El estudio mediante la técnica de Southern blot confirmó que el producto amplificado era específico del cromosoma Y. Así pues, la incidencia de microquimerismo fetal en este grupo de pacientes con CBP fue del 7%.

## Discusión

Es bien conocido que algunas de las manifestaciones de la enfermedad crónica del injerto contra huésped (EICHc) son similares a las que presentan pacientes con enfermedades autoinmunes, especialmente la esclerodermia, el síndrome de Sjögren y la CBP. Recientemente se ha planteado la hipótesis de que la persistencia de células fetales en la circulación materna (microquimerismo fetal) podría dar lugar a una reacción injerto contra huésped que acabara desencadenando una enfermedad autoinmune<sup>2,8,9</sup>. Los resultados publicados hasta ahora son confusos y contradictorios. Si bien inicialmente en algunas enfermedades, como la esclerodermia, parecía existir una asociación evidente con la presencia de microquimerismo fetal<sup>1</sup>, esto no ha sido posteriormente confirmado por otros autores<sup>10</sup>. En los pacientes con CBP los resultados son también contradictorios. Esta enfermedad, como otras afecciones autoinmunes, es más frecuente en las mujeres y su incidencia aumenta en los

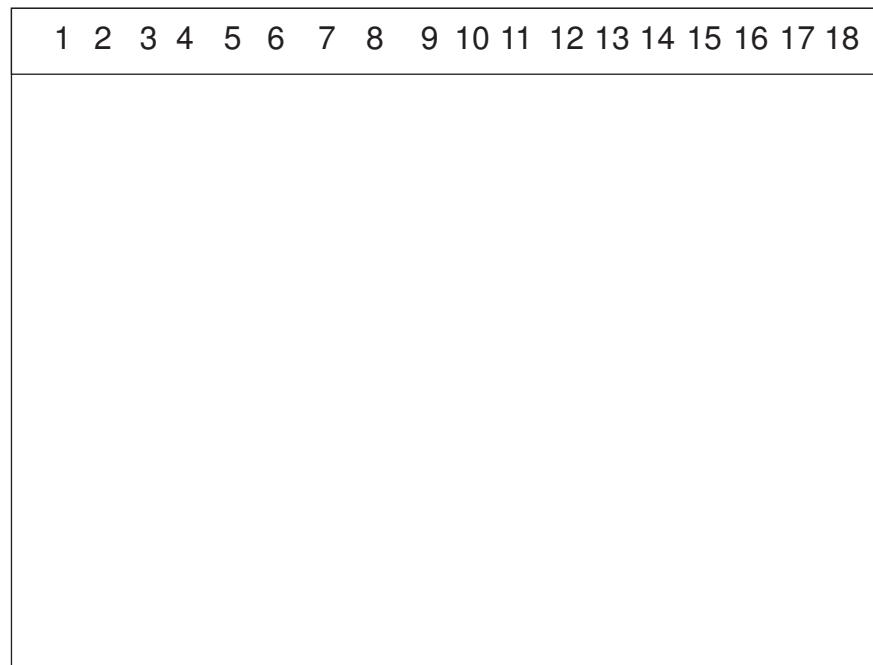


Fig. 1. Sensibilidad de la PCR; 6 pg (aproximadamente una célula masculina) se detectaron entre 500.000 células femeninas; 1,5 µg (carries 1 al 6) o 4,5 mg (carries 11 al 15) de ADN femenino se mezclaron con distintas cantidades de ADN masculino. Carries 1 al 6: sin ADN masculino, 6 ng, 600 pg, 60 pg, 6 pg, 0,6 pg (se obtuvieron resultados similares cuando se usaron 3 mg de ADN femenino); carries 11 al 15: sin ADN masculino, 6 ng, 600 pg, 60 pg, 6 pg, 0,6 pg; carries 7 al 17: PCR efectuada con 6 pg de ADN masculino; carries 8 al 18: PCR efectuada con 0,6 pg de ADN masculino; carries 9 al 16: control negativo (agua); carry 10 vacío.

años posteriores al embarazo. Histológicamente, se caracteriza por la lesión del conductillo biliar mediada por linfocitos, lesión similar a la que aparece en los pacientes con EICHc tras un TPH. Asimismo, muchos de estos pacientes presentan alteraciones cutáneas parecidas a la esclerodermia y un síndrome seco similar al que aparece en los pacientes con síndrome de Sjögren primario. Todo ello sugiere que los mecanismos patogénicos podrían ser comunes en estas enfermedades. Sin embargo, los estudios existentes hasta ahora no son concluyentes. Rubbia-Brandt et al<sup>3</sup>, en un estudio de 10 mujeres con CBP, mediante técnicas de hibridación *in situ* (FISH) no encontraron cromosoma Y en el tejido hepático de ninguna de las pacientes estudiadas, aunque hay que tener en cuenta que solamente 5 de ellas presentaban descendencia de sexo masculino. Por el contrario, Fanning et al<sup>4</sup> sí que detectaron la presencia de células masculinas en la biopsia hepática de 8 de 19 pacientes de sexo femenino diagnosticadas de CBP, pero no en los 18 casos estudiados a partir de células mononucleares de sangre periférica, aunque sí en uno de los 18 controles. Otros estudios al respecto hallaron una mayor prevalencia del fenómeno del microquimerismo (22-70%), sin diferencias entre controles y pacientes

tes con CBP<sup>5-7</sup>. Nuestros resultados coinciden, pues, con los hasta ahora publicados, ya que en sólo una de las pacientes con CBP se detectó la presencia de células masculinas.

las masculinas. Aunque existen importantes diferencias en los porcentajes de pacientes que presentan microquimerismo fetal, no se confirma una mayor prevalencia en las pacientes con CBP, al menos estadísticamente significativa en la detección del mismo a partir de células mononucleares de sangre periférica o tejido hepático. Sin embargo, el tamaño de la muestra utilizado en estos estudios, incluido el nuestro, podría ser demasiado pequeño para permitir alcanzar diferencias significativas. El estudio del microquimerismo fetal a partir de la detección de células del sexo masculino obliga a una selección estricta de los pacientes incluidos en el estudio, que han de ser de sexo femenino, tener hijos varones y no presentar antecedentes de abortos, transfusiones o trasplantes que pudieran explicar una fuente alternativa de microquimerismo. Ello hace que las muestras estudiadas sean reducidas. Las características genéticas de las poblaciones estudiadas, la facilidad de contaminación a partir del personal de laboratorio de sexo masculino debido a la extraordinaria sensibilidad de la técnica (PCR) y el empleo de técnicas cualitativas o cuanti-

tativas (número de células masculinas encontradas por millón) contribuye a explicar estas diferencias. Cabe precisar que en este estudio se ha utilizado una técnica semicuantitativa que permite detectar la presencia de una célula masculina entre  $5 \times 10^5$  células del sexo femenino, sensibilidad similar a la obtenida en otros estudios.

A la luz de los resultados obtenidos en pacientes con CBP, el microquimerismo fetal parece un hecho fisiológico sin mayor repercusión clínica, aunque no puede descartarse un determinado papel en la patogenia de las enfermedades autoinmunes. Será importante en el futuro homogeneizar las técnicas y realizar estudios de microquimerismo no sólo fetal sino materno, tal como ya se ha puesto

de manifiesto en estudios sobre miositis juveniles, con el fin de determinar el verdadero significado del microquimerismo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1186-91.
2. Nelson JL. Pregnancy and microchimerism in autoimmune disease: Protector or insurgent? *Arthritis Rheum* 2002;46:291-7.
3. Rubbia-Brandt L, Philippeaux MM, Chavez S, Mentha G, Borish B, Hadengue A. FISH for Y chromosome in women with primary biliary cirrhosis: lack of evidence for leukocyte microchimerism. *Hepatology* 1999;30:821-2.
4. Fanning PA, Jonsson JR, Clouston AD, Edwards-Smith C, Balderson GA, McDonald GA, et al. Detection of male DNA in liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 690-5.
5. Tanaka A, Lindor K, Gish R, Batts K, Shiratori Y, Omata M, et al. Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999;30:833-8.
6. Corpechot C, Barbu V, Chazouillères O, Poupon R. Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 22:696-700.
7. Invernizzi P, DeAndrea C, Sircchia SM, Battezza PM, Zuin M, Rosella F, et al. Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2000;122:418-22.
8. Mijares-Boeckh-Behrens T, Selva-O'Callaghan A, Balada-Prades E, Solans-Laqué R, Bosch-Gil JA, Vilardell-Tarrés M. Fetal microchimerism in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001;60: 897-8.
9. Selva-O'Callaghan A, Balada-Prades E, Mijares-Boeckh-Behrens T, Solans-Laqué R, Vilardell-Tarrés M. Fetal microchimerism and inflammatory myopathies. *Lancet* 2001;357:887.
10. Selva-O'Callaghan A, Mijares-Boeckh-Behrens T, Balada-Prades E, Solans-Laqué R, Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, et al. Lack of evidence of fetal microchimerism in female Spanish patients with systemic sclerosis [en prensa]. *Lupus* 2002.