

Búsqueda de un marcador de rechazo cardiaco mediante análisis de expresión génica de linfocitos con *microarrays* en pacientes con trasplante cardiaco

Sr. Editor:

El diagnóstico del rechazo del injerto es uno de los aspectos fundamentales de la atención de los pacientes con tras-

plante cardiaco (TC). La biopsia endomiocárdica (BEM) tiene importantes limitaciones, ya que se trata de una prueba invasiva, con variabilidad en la interpretación y sensibilidad limitada¹⁻³. Por tanto, es de gran interés disponer de un método diagnóstico no invasivo que facilite el seguimiento de los pacientes con TC.

Los patrones de expresión génica de los linfocitos de sangre periférica pueden constituir una herramienta de alta sensibilidad y especificidad que permita identificar a los pacientes que presentan rechazo y, así, evitar las molestias de la BEM. Presentamos los resultados preliminares de un estudio cuyo objetivo ha sido la búsqueda de un grupo de genes candidatos que puedan usarse en un test de expresión molecular en sangre periférica capaz de detectar de forma no invasiva el rechazo cardiaco.

Los experimentos de análisis de la expresión génica se realizaron a partir de 6 muestras de sangre periférica procedentes de pacientes con TC, extraídas el mismo día de la BEM. El diagnóstico de rechazo se realizó según la clasificación de la International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)⁴. Tres de las muestras correspondían a pacientes con rechazo (grado $\geq 2R$ ISHLT) y 3 a pacientes sin rechazo (grado $0R$ ISHLT). Las muestras de sangre se recogieron en tubos que contenían una solución para la estabilización del ARN (PAXgene Blood RNA Tubes, Qiagen) y se guardaron a -80°C hasta su análisis.

El análisis genético se realizó con *microarrays* Affymetrix (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array). Mediante el algoritmo de comparación de Genespring se han encontrado diferencias en la expresión de 262 genes. El *cluster* jerárquico bidimensional permite comprobar la existencia de patrones de expresión diferenciales y consis-

TABLA 1. Listado de 23 genes en los que se ha hallado una modificación significativa de la expresión génica

Systematic	P-value	Fold change	Gene title	UniGene ID
202483_s_at	0,0362	0,72	RAN binding protein 1	24763
222435_s_at	0,0329	0,38	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	163776
204115_at	0,0329	1,83	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	83381
204081_at	0,0327	2,27	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	524116
213095_x_at	0,0316	0,56	allograft inflammatory factor 1	76364
200087_s_at	0,0315	0,43	coated vesicle membrane protein /// coated vesicle membrane protein	75914
209201_x_at	0,0312	0,62	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	421986
217877_s_at	0,0308	0,62	hypothetical protein SP192	238432
200614_at	0,0303	0,56	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	491351
224644_at	0,0302	0,47	Homo sapiens, clone IMAGE:5278517, mRNA	517821
201453_x_at	0,0264	0,63	Ras homolog enriched in brain	283521
228959_at	0,026	0,64	CDNA clone IMAGE:5262734, partial cds	296031
207305_s_at	0,0259	0,55	KIAA1012	202001
212429_s_at	0,0256	0,53	general transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta 110kDa	75782
1557905_s_at	0,0254	0,58	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	502328
200729_s_at	0,0232	0,37	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	393201
200009_at	0,023	0,45	GDP dissociation inhibitor 2 /// GDP dissociation inhibitor 2	299055
225225_at	0,023	0,46	Homo sapiens, clone IMAGE:5274897, mRNA	351680
200607_s_at	0,0229	0,58	RAD21 homolog (S. pombe)	81848
227621_at	0,0226	0,36	Wilms tumor 1 associated protein	446091
202603_at	0,0202	0,35	A disintegrin and metalloproteinase domain 10	172028
217825_s_at	0,0123	0,56	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	163776
239205_s_at	0,00254	1,69	complement component (3b/4b) receptor 1	334019

La primera columna, Systematic, hace referencia al número de identificación de la sonda en el chip affimetrix U133plus. P-value es el valor de significación del cambio de expresión observado. Fold change indica el grado de cambio en la expresión (el valor 1 representaría que no hay cambio, valores menores de 1 indican represión y superiores a 1, sobreexpresión del gen). Gene title es el nombre del gen. UniGene ID es el identificador de ese gen en la base de datos del GenBan.

tentes en las muestras con rechazo comparadas con las muestras control. De estos 262 genes, en la tabla 1 se muestran los que podrían ser utilizados como genes candidatos.

Se comprobó que había cinco rutas metabólicas en las que al menos estaban implicados dos genes con nivel de expresión modificada. Estas rutas metabólicas son: apoptosis (4 genes), ruta de las MAP-quinasas (5 genes), ruta de señalización de las células B (2 genes), linaje de células hematoepoyéticas (2 genes), ruta de señalización de receptores de células T (2 genes).

Los resultados obtenidos son consistentes con la hipótesis de la estimulación del sistema inmunológico implicada en el rechazo de los órganos trasplantados. Es interesante destacar que Horwitz et al⁵ utilizaron una metodología similar y encontraron que *CFLAR*, un gen implicado en la vía apoptótica, estaba alterado en pacientes con rechazo del órgano trasplantado. Algo similar ocurre con los resultados obtenidos por Deng et al⁶, quienes han encontrado alteraciones en la expresión de genes, relacionados con la ruta de las MAP-quinasas, apoptosis y receptores de células T.

En conclusión, en este estudio exploratorio en pacientes con TC hemos observado diferencias en la expresión génica entre los que presentaban rechazo y los que no lo presentaban. De las 5 vías identificadas en las que hay genes con expresión alterada, la ruta apoptótica y la de las MAP-quinasas parecen tener un mayor número de genes implicados. El escaso número de muestras estudiadas limita la interpretación de los resultados. Sin embargo, consideramos que los resultados de este trabajo preliminar justifican las expectativas depositadas en esta prometedora estrategia, que puede contribuir a desarrollar un test molecular para el control del tratamiento inmunodepresor en pacientes con trasplante.

Manuel Hermida-Prieto^a,
María G. Crespo-Leiro^b, María J. Paniagua^b
y Alfonso Castro-Beiras^{a,b}

^aServicio de Cardiología. Instituto Ciencias Salud.
A Coruña. España.

^bServicio de Cardiología. Complejo Hospitalario
Universitario Juan Canalejo. A Coruña. España.

Este estudio ha sido financiado con una Beca de la Sección de Insuficiencia Cardíaca de la Sociedad Española de Cardiología, 2003 (título del trabajo: «Análisis de expresión génica en células mononucleares circulantes mediante Real-time RT-PCR en pacientes con trasplante cardíaco. Estudio de su posible relación con el rechazo cardíaco») y por la Red Nacional de Investigación Cardiovascular, RECAVA C03/01.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hertz MI, Boucek MM, Deng MC, Edwards LB, Keck BM, Kirklin JK, et al. Scientific Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2005 annual reports. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:939-44.
2. Pophal SG, Sigfusson G, Booth KL, Bacanu SA, Webber SA, Etedgui JA, et al. Complications of endomyocardial biopsy in children. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:2105-10.
3. Marboe CC, Billingham M, Eisen H, Deng MC, Baron H, Mehra M, et al. Nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) cause significant variability in diagnosis of ISHLT Grade 2 and 3A rejection in cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24 Suppl 7:219-26.

4. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1710-20.
5. Horwitz PA, Tsai EJ, Putt ME, Gilmore JM, Lepore JJ, Parmacek MS, et al. Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. *Circulation.* 2004;110:3815-21.
6. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant.* 2006;6:150-60.