

ESTUDIOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

Estudio de la presencia de microquimerismo en la morfea: la aloinmunidad como posible modelo etiopatogénico*

Resumen.—Durante el embarazo se produce una transferencia de células desde el feto hacia la madre y viceversa. Algunas son células progenitoras hematopoyéticas capaces de persistir viables durante décadas, dando lugar a microquimerismos. Estos microquimerismos pueden estar implicados en la etiopatogenia de ciertas enfermedades, como la esclerosis sistémica.

Mediante *nested* PCR para amplificar secuencias de ADN del gen SRY, específico del cromosoma Y, realizamos un estudio prospectivo a fin de investigar la presencia de microquimerismos fetales en 25 muestras de sangre, piel afectada y piel sana de 10 pacientes afectas de morfea que habían tenido uno o más hijos y/ o abortos de sexo masculino o desconocido. La sensibilidad de la técnica fue del 0,01-0,004%. Se detectaron secuencias SRY en tres pacientes (dos muestras de sangre periférica, una de piel afectada y una de piel sana perilesional). Los resultados fueron negativos en las 30 muestras procedentes de 16 pacientes control, 11 de ellas potencialmente expuestas a microquimerismos masculinos durante la gestación.

Estos hallazgos sugieren que los microquimerismos fetales podrían estar implicados en la etiopatogenia de la morfea. Sin embargo, su detección en piel aparentemente sana parece indicar que no son suficientes para el desarrollo de la enfermedad.

Palabras clave: Morfea. Embarazo, Microquimera. PCR. Cromosoma Y

VICENTE GARCÍA-PATOS BRIONES*
FRANCISCO VIDAL PÉREZ**
ELISENDA FARSSAC BUSQUETS**
ANTONI CASTELLS RODELLAS*
DOMINIQUE GALLARDO SAINZ**
*Servicio de Dermatología.
**Centro de Transfusiones y Banco de Tejidos.
Hospitals Vall d'Hebron. Barcelona.

Correspondencia:

VICENTE GARCÍA-PATOS BRIONES. Servicio de Dermatología. Hospital General Vall d'Hebron. P.º Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona.

Aceptado el 1 de septiembre de 2000.

*Este trabajo fue galardonado con el Premio Academia Española de Dermatología 2000.

INTRODUCCIÓN

Quimera era un monstruo mitológico constituido por partes de distintos animales. En medicina «quimera» hace referencia a organismos que integran células formadas a partir de cigotos diferentes (1). Los alo-trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas son ejemplos de quimerismos en los que las células del donante sustituyen completa o mayoritariamente la médula ósea del receptor (2, 3).

El término microquimera fue propuesto a finales de los años setenta, a raíz de la observación experimental en ratones, de una pequeña cantidad de células fetales con marcadores cromosómicos de origen paterno que persistían en el bazo de la madre (4). Estas células convivían con las células maternas a largo

plazo sin provocar una reacción del injerto contra el huésped ni ser rechazadas. No se ha establecido un límite cuantitativo entre quimera y microquimera, pero para detectar estas pequeñas poblaciones de células inmersas en un gran número de células del huésped suelen ser necesarias técnicas de biología molecular. Si el microquimerismo es de diferente sexo que el huésped se pueden utilizar la hibridación *in situ* fluorescente con sondas que reconocen secuencias específicas del cromosoma X o del cromosoma Y y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias específicas del cromosoma Y (5-16).

Las principales fuentes de microquimerismos hematopoyéticos son los trasplantes de órganos sólidos, las transfusiones sanguíneas no irradiadas y el embarazo

(17-23). Desde las primeras semanas de gestación se produce una transferencia de células desde el feto hacia la madre (microquimerismo fetal) y en menor grado desde la madre hacia el feto (microquimerismo materno)(24-38). Dicho intercambio también tiene lugar entre hermanos gemelos (39-41). Se ha demostrado que algunas de estas células son células progenitoras hematopoyéticas capaces de proliferar y diferenciarse hacia células inmunocompetentes, detectables en sangre periférica y en los tejidos del huésped durante décadas (4, 32, 35-38).

Si bien parece que los microquimerismos originados durante la gestación son relativamente frecuentes en condiciones normales, estudios recientes sugieren que pueden estar implicados en ciertas patologías, incluyendo la esclerosis sistémica (32, 35-37, 42-64), la erupción polimorfa del embarazo (65), el lupus eritematoso sistémico (56-58), la cirrosis biliar primaria (38) y la dermatomiositis infantil (66). Su capacidad para provocar una reacción de tipo «microinjerto» contra el huésped posiblemente está relacionada con factores cuantitativos (número de células quiméricas) y/o cualitativos (relación entre los antígenos HLA de estas células y las del huésped)(37, 67-69).

La morfea es una dermatosis inflamatoria crónica de etiología desconocida que afecta principalmente a mujeres de edad media. No suele acompañarse de sintomatología extracutánea, por lo que es considerada el polo opuesto a la esclerosis sistémica en el espectro de las esclerodermias. Se caracteriza por placas induradas debidas a depósitos anómalos de colágeno en la dermis y/o tejidos subyacentes. En pacientes que han recibido un alotrasplante de médula ósea es posible observar placas de morfea como expresión de una reacción del injerto contra el huésped crónica (70-75).

Nuestro objetivo fue investigar la presencia de microquimerismos fetales persistentes en mujeres afectas de morfea. Para ello diseñamos un estudio prospectivo a fin de detectar secuencias de ADN específicas del cromosoma Y (gen *SRY*) en pacientes que potencialmente habían estado expuestas a microquimerismos masculinos de origen fetal. El gen *SRY*, del que existe una sola copia en el brazo corto, es determinante del desarrollo testicular y, secundariamente, de la morfología de los genitales externos (76).

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

Cráterios de selección de pacientes

El grupo de estudio A estaba constituido por mujeres diagnosticadas clínicamente e histológicamente de morfea, con antecedentes de al menos una gestación a término de un hijo varón y/o un aborto de sexo masculino o desconocido. Se excluyeron las pacientes con antecedentes de transfusiones sanguíneas o trasplan-

tes de células progenitoras hematopoyéticas u órganos sólidos.

El grupo control B estaba constituido por mujeres afectas de dermatosis diversas, diferentes de la morfea, que potencialmente también habían estado expuestas a microquimerismos masculinos durante la gestación. Además se incluyeron controles negativos (grupo C, constituido por mujeres afectas de morfea, nulíparas o con antecedentes de abortos o embarazos a término, exclusivamente de sexo femenino, y no expuestas a otras fuentes potenciales de microquimerismos) y controles positivos (grupo D, varones).

En todos los casos se obtuvo consentimiento informado y se recogieron los siguientes datos: edad, antecedentes obstétricos, historia clínica general y de la enfermedad cutánea, datos de laboratorio, parámetros inmunológicos y características del infiltrado inflamatorio de las biopsias cutáneas de las lesiones.

Obtención y preparación de las muestras

Se realizó una extracción de 10 cc de sangre venosa periférica en EDTA y biopsias cutáneas mediante sacabocados de 4 mm de diámetro. Se tomó una muestra de la piel sana perilesional y seguidamente otras dos de la piel afecta (una para estudio histológico convencional). En las lesiones de morfea las biopsias se realizaron preferentemente en la zona de transición entre la induración central y el halo inflamatorio. El material utilizado fue desechable en todos los casos. La toma y manipulación de las muestras de sangre y piel fue realizada por personal femenino. Las muestras de piel se mantuvieron congeladas a -80°C hasta que fueron procesadas.

Extracción del ADN genómico de sangre y piel

La extracción del ADN de sangre venosa periférica se realizó, dentro de las 24 horas posteriores a la toma de la muestra, según el método de *saltin out* con pequeñas modificaciones (77). A 700 μl de sangre se le añadió un volumen equivalente de tampón de lisis de eritrocitos. Una vez centrifugado y eliminado el sobrenadante se realizó un lavado con agua destilada y desionizada. Después de agitar y centrifugar, nuevamente se desechó el sobrenadante. El *pellet* obtenido fue tratado con una solución tampón que contenía proteinasa K durante 45 minutos a 55°C , seguido de la adición de 100 μl de una solución saturada de cloruro sódico (NaCl 6 M). Después de centrifugar se recuperó el sobrenadante (450 μl), al que se le añadió 1 ml de etanol absoluto, agitando suavemente por inversión. El ADN precipitado se transfirió a otro tubo con 100 μl de agua estéril, donde fue resuspendido mediante agitación intensa.

Para la extracción de ADN de las biopsias cutáneas también se siguió el método de *salting out* modificado (78). Se trocó la muestra congelada a -80°C y se incubó en tampón de lisis, CDTA y proteinasa K durante toda la noche a 55°C y en agitación continua. A la mañana siguiente se realizó la extracción convencional con fenol/ cloroformo. Se precipitó el ADN con acetato sódico 3M y etanol absoluto. El *pellet* obtenido se resuspendió en 20-30 μl de agua destilada.

La comprobación de la cantidad y la calidad del ADN obtenido de sangre y piel se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y medición espectrofotométrica a 260 nm. Las muestras de ADN se mantuvieron congeladas a -20°C hasta que se realizó la PCR.

PCR para detectar secuencias específicas del cromosoma Y en muestras de ADN extraído de sangre y piel

Para determinar la existencia o no de microquimerismo persistente de células de origen masculino en las muestras se puso a punto una técnica de *nested PCR* para detectar secuencias de ADN del gen *SRY*, específico del cromosoma Y humano. Para ello fue necesario adaptar un *kit* comercializado (*MPCR Kit for Human Sex Identification*, Maxim Biotech, Inc., San Francisco, California, USA) diseñado inicialmente para la identificación del sexo en muestras de origen humano mediante PCR estándar.

En primer lugar, las muestras fueron sometidas a PCR mediante el *kit* estándar, conteniendo 6 *primers* capaces de amplificar cuatro fragmentos de ADN de diferentes pesos moleculares (Fig. 1). El proceso de amplificación se realizó a partir de 600 ng de ADN de

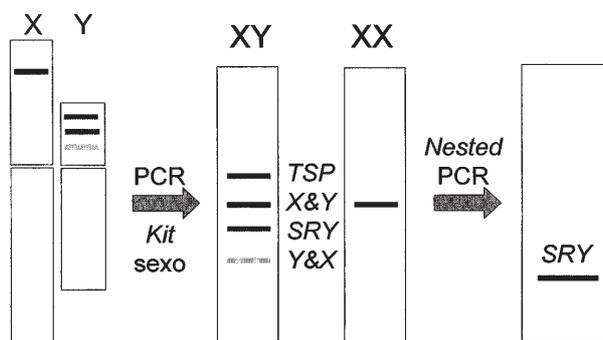


FIG. 1.—*Nested PCR* para detectar secuencias de ADN del gen *SRY*, específico del cromosoma Y. La primera amplificación se llevó a cabo con un *kit* comercializado de seis *primers* para identificar el sexo. Estos *primers* eran capaces de amplificar cuatro fragmentos de ADN de diferentes pesos moleculares [799 (TSP, proteína expresada en los testículos), 690 (región homóloga X&Y, específica del cromosoma X), 609 (región *SRY*) y 500 pares de bases (bp) (región homóloga Y&X, específica del cromosoma Y)]. El fragmento de 690 bp sirvió de control interno de la reacción. Posteriormente se realizó un segundo proceso de amplificación utilizando *primers* específicos de la región *SRY* con el objetivo de identificar microquimerismos masculinos en mujeres.

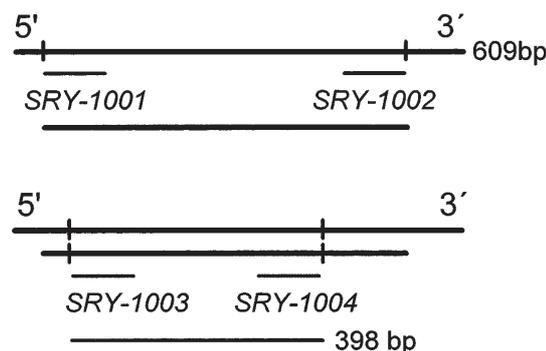


FIG. 2.—Los *primers* utilizados en la *nested PCR* amplificaban secuencias del fragmento *SRY* de 609 bp obtenido con la primera PCR. La concentración de estos *primers* estaba ajustada de tal manera que sólo apareciera un producto final de 398 bp, correspondiente a la amplificación con *SRY-1003* y *SRY-1004*.

cada muestra en un volumen total de 50 μl utilizando la enzima Platinum Taq ADN polimerasa recombinante (Life TechnologiesTM, Bethesda, USA) según la siguiente secuencia: un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 minutos, 32 ciclos secuenciales a 94°C -20 segundos, 58°C -20 segundos, 72°C -30 segundos, seguidos de un ciclo final de polimerización a 72°C durante 8 minutos.

Una vez verificada la presencia de banda/s se realizó un segundo proceso de amplificación. Cinco μl de una dilución 1/100 del producto de la reacción anterior se mezclaron con 4 *primers* específicos de la región *SRY* (*SRY-1001*: 5' GACAATGCAATCATATGCTTCTGC 3'; *SRY-1002*: 5' CTGTAGCGGTCCCCTTGTGCTGCGGTG 3'; *SRY-1003*: 5' TCA-TATGCTTCTGCTATGTT AAGCGT 3'; *SRY-1004*: 5' GCCTTCCGACGAGGTCGATACT 3') (Maxim Biotech, Inc., San Francisco, California, USA) (Fig. 2). El proceso de amplificación se realizó en un volumen total de 50 μl , según la siguiente secuencia: desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, 10 ciclos secuenciales a 94°C -60 segundos, 58°C -120 segundos, 72°C -30 segundos, 25 ciclos adicionales de 94°C -60 segundos y 55°C -150 segundos, seguidos de un ciclo final de polimerización a 72°C durante 10 minutos.

Tomando una alícuota de 10 μl , los productos de las reacciones fueron visualizados mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1%, tinción con bromuro de etidio, transiluminación con luz ultravioleta de 302 nm y registro fotográfico. Los resultados se valoraron sin conocer otros datos de los pacientes y se comprobaron en dos experimentos independientes.

Pruebas de sensibilidad de la *nested PCR* para detectar secuencias *SRY*

En primer lugar se extrajo ADN de muestras de sangre procedentes de varones. Se comprobó la cantidad

y la calidad del ADN obtenido y asumiendo que el peso del ADN nuclear humano (diploide) es aproximadamente de 6 pg (16, 79), se preparó una solución en agua bidestilada conteniendo 600 pg/ μ l, correspondientes a 1.000 copias de genoma diploide en 10 μ l. A continuación se realizaron diluciones seriadas de este ADN a fin de obtener la cantidad correspondiente a 100, 40, 10, 4, 1 y 0,1 copias. Con estas soluciones se procedió a la realización de la *nested* PCR según se ha descrito.

El segundo aspecto fue valorar la sensibilidad de la técnica para detectar secuencias *SR Y* en presencia de grandes cantidades de ADN de origen femenino. Para realizar diluciones seriadas se escogieron muestras de ADN procedentes de sangre periférica de mujeres nulíparas y sin antecedentes de transfusiones ni trasplantes en las que, después de repetir la *nested* PCR en varias ocasiones, no se detectaron secuencias *SR Y*. A 600 ng de ADN de estas muestras, equivalentes al genoma de 100.000 células, se añadieron las cantidades de ADN de origen masculino equivalentes a 1.000, 100, 40, 10, 4 y 1 copias. Seguidamente se procedió a realizar la *nested* PCR según hemos descrito. Ambas pruebas de sensibilidad se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

Criterio para definir la presencia de microquimerismo y análisis de los resultados

La detección de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y en muestras de sangre, piel afectada y/o piel sana perilesional fue considerada indicativa de la

presencia de microquimerismo. Los datos fueron analizados a fin de determinar si en sangre periférica y/o en muestras de piel de las pacientes del grupo de estudio (grupo A) se detectaba microquimerismo. Los resultados se compararon con los obtenidos en muestras de sangre y piel de las pacientes del grupo B para analizar si existían diferencias significativas.

Los parámetros evaluados fueron: 1) presencia de microquimerismo circulante y/o tisular en cada uno de los grupos; 2) presencia de microquimerismo en piel de las lesiones frente a piel sana perilesional; 3) correlación entre la presencia de microquimerismo y los antecedentes obstétricos; 4) correlación entre la presencia de microquimerismo y otras alteraciones inmunológicas, y 5) correlación entre la presencia de microquimerismo y las características del infiltrado inflamatorio de la biopsia cutánea de las lesiones. El análisis del grado de asociación entre dos variables cualitativas (tabla 2 \times 2) se llevó a cabo con la prueba exacta de Fisher. El análisis comparativo de los parámetros estudiados en dos grupos se realizó con la prueba de comparación de medias para muestras independientes «t» de Student. El nivel de significación estadística establecido fue $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Aspectos epidemiológicos, clínicos, inmunológicos e histológicos

En el grupo A se incluyeron 10 mujeres afectas de morfea (tabla I). La edad media a la que se inició el

TABLA I: DATOS CLÍNICOS, OBSTÉTRICOS E INMUNOLÓGICOS DE LAS PACIENTES DEL GRUPO A (MORFEA)

Paciente/ edad, a	Patología dermatológica	Tiempo de evolución	Abortos (sexo/edad)*	Embarazos a término		Alteraciones asociadas
				Varones (edad)**	Mujeres (edad)**	
1/60	Morfea generalizada.	7 a	1 (F/28)	1 (26)	2 (30, 21)	ANA 1/60, moteado; antimúsculo liso 1/80; eosinofilia 680/mm ³ .
2/49	Morfea en placas.	16 m	1 (D/26)	2 (24, 22)	0	ANA 1/80, moteado; antipared gástrica 1/640.
3/55	Morfea en placas.	11 m	1 (D/23)	1 (20)	1 (23) (C)	SI.
4/45	Morfea en placas.	2 a	0	2 (20, 16)	0	SI.
5/58	Morfea en placas.	2 a	0	3 (31, 28, 21)	1 (19)	SI.
6/62	Morfea en placas. LEA cutaneogenital.	5 a	2 (D/27, 32)	5 (38, 34, 33, 32, 22)	0	Síndrome de Sjögren, ANA 1/80, moteado.
7/73	Morfea «en coup de sabre».	15 a	0	1 (36)	2 (38, 31)	Anti-ADN bicatenario (ELISA) 495 UI/ml (VN < 300), trombocitosis 530.000/mm ³ ; eosinofilia 700/mm ³ .
8/43	Morfea en placas.	12 m	1 (D/24)	1 (17)	1 (14)	SI.
9/74	Morfea en placas.	9 m	2 (D/32, 33) (L)	0	0	SI.
10/47	Morfea en placas.	4 a	0	2 (18, 16)	0	SI.

LEA: liquen escleroatrófico. a: años. m: meses. M: sexo masculino. F: sexo femenino. D: sexo desconocido. L: legrado. C: cesárea. ANA: anticuerpos antinucleares. VN: valor normal. SI: sin interés. En las pacientes 2, 4-6 y 8-10 existían signos inflamatorios (*lilac ring*) en la periferia de las lesiones.* Edad de la paciente, en años, cuando tuvo el/los aborto/s. Los abortos se produjeron entre la semana 12 y 20 de gestación. ** Edad de los hijos, en años, en el momento del estudio (incluyendo aquellos que habían fallecido).

TABLA II: DATOS CLÍNICOS, OBSTÉTRICOS E INMUNOLÓGICOS DE LAS PACIENTES DEL GRUPO B

Paciente/ edad, a	Patología dermatológica	Tiempo de evolución	Abortos (sexo/edad de la paciente) ¹	Embarazos a término		Alteraciones asociadas
				Varones (edad) ²	Mujeres (edad) ²	
11/61 ³	LEA cutáneo.	6 a	0	0	0	Diabetes mellitus tipo II, ANA 1/80, moteado.
12/55	LEA cutáneo.	8 m	0	1 (16) (C)	0	ANA 1/80 moteado, diabetes mellitus tipo II.
13/71	LEA cutáneo y anogenital.	20 a	0	2 (45, 42)	1 (42)	Vulvectomía por displasia (50 a), xeroftalmía, ANA 1/80, moteado
14/56	LEA anogenital.	8 a	0	1 (24) (C)	3 (27, 22, 21)	Hipotiroidismo.
15/82	LEA cutáneo. Atrofodermia Pasini-Pierini.	15 a	1 (D/39)	0	0	SI.
16/55	Sarcoidosis cutánea papular.	3 a	0	1 (28)	0	Vitiligo, anemia perniciosa, sarcoidosis sistémica.
17/63	Eccema de contacto alérgico.	10 d	0	1 (35)	1 (39)	Diabetes mellitus tipo II.
18/56	Urticaria crónica.	20 a	1 (F/27)	2 (27, 18)	1 (25)	SI.
19/49	Verrugas vulgares.	6 m	0	2 (23, 13)	2 (20, 18)	SI.
20/49	Infección por herpes simple intraoral.	7 a	1 (D/26)	1 (25) (PP)	2 (21, 15)	Hipotiroidismo (anticuerpos antimicrosomales 1/640).
21/50 ⁴	Eccema atópico-like.	15 d	0	4 (26, 24, 23, 20)	0	Cirrosis enólica, trasplante hepático.

LEA: liquen escleroatrófico, diagnosticado clínica e histológicamente. a: años. m: meses. d: días. F: sexo femenino. D: sexo desconocido. C: cesárea. PP: placenta previa. SI: sin interés. ANA: anticuerpos antinucleares. ¹Edad de la paciente, en años, cuando tuvo el/los aborto/s. Los abortos se produjeron entre la semana 14 y 17 de gestación. ²Edad de los hijos, en años, en el momento del estudio. ³Paciente con hermano gemelo varón. ⁴Paciente que había recibido múltiples transfusiones sanguíneas y un trasplante hepático procedente de un donante varón hacía 5 meses.

proceso fue 52,6 años (rango: 42-73 años) y el tiempo medio de evolución de las lesiones cutáneas fue 3,9 años (rango: 9 meses-15 años). En todos los casos la enfermedad había comenzado después de uno o más embarazos. El tiempo medio transcurrido desde la última gestación de un feto varón o de sexo desconocido hasta el debut de la morfea fue 19,7 años (rango: 12-40 años). Las exploraciones complementarias incluidas en el protocolo fueron normales o negativas, con excepción de las expuestas en la tabla I. Histológicamente, el infiltrado inflamatorio estaba ausente en la biopsia de la paciente 4 y era leve (pacientes 1, 2, 3, 6, 7, 9 y 10), moderado (paciente 5) o intenso (paciente 8) en el resto, con predominio linfocitario.

En el grupo control B se incluyeron 11 pacientes cuyos datos clínicos, obstétricos e inmunológicos se resumen en la [tabla II](#). En un caso (paciente 11) la única fuente potencial de microquimerismo masculino fue su hermano gemelo.

Como controles negativos (grupo C) se incluyeron cinco pacientes afectas de morfea, cuya edad media era 44,2 años (rango: 12-76 años). Dos no habían estado embarazadas y otras tres solamente habían tenido hijas. El número medio de embarazos a término fue 1,2. Ninguna refería antecedentes de abor-

tos. Estaban afectas de morfea generalizada (paciente 22), en placas múltiples (pacientes 23 y 24), lineal (paciente 25) o en placa única (paciente 26). La edad media a la que se inició el proceso dermatológico fue 41 años y el tiempo medio de evolución del mismo fue 3,2 años. Histológicamente se observó un infiltrado linfocitario leve o moderado (pacientes 22 y 25). Como controles positivos (grupo D) se incluyeron dos varones afectos de morfea en placas múltiples, un varón afecto de enfermedad del injerto contra el huésped crónica liquenoide y esclerodermiforme secundaria a un trasplante de médula ósea procedente de su hermana (paciente 29) y una mujer que había recibido un trasplante de médula ósea de su hermano 5 años antes y sufría una enfermedad del injerto contra el huésped crónica esclerodermiforme (paciente 30).

Sensibilidad y especificidad de la PCR convencional y de la *nested* PCR para detectar secuencias SRY

Con la primera amplificación utilizando el *kit* comercializado, en todos los casos se detectó una banda correspondiente a la región homóloga X&Y específica del cromosoma X. En las 10 muestras de ADN extraído de sangre y piel de los pacientes 27-30

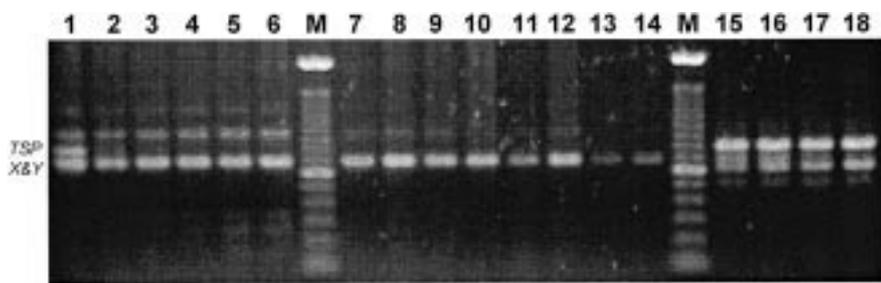


FIG. 3.—PCR con el *kit* comercializado para determinar el sexo. *M*: marcadores de peso molecular. *Carriles 1-6*: prueba de sensibilidad con 1.000, 100, 40, 10, 4 y 1 copias de cromosoma Y mezcladas con 600 pg de ADN de origen femenino, equivalente a unas 100.000 células de mujer. En todas las muestras se observó la banda correspondiente a la región homóloga X&Y específica del cromosoma X. En el *carril 1* se observa otra banda correspondiente a la región TSP (sensibilidad 1%). *Carriles 7-14*: en todas las muestras de sangre, piel afectada y piel sana de pacientes de los grupos A, B y C sólo se detectó la banda correspondiente a la

región homóloga X&Y específica del cromosoma X. *Carriles 15-18*: patrón de bandas correspondiente a pacientes del grupo D (*carril 15*: sangre del paciente 29, que había recibido un trasplante de médula ósea de su hermana; *carril 16*: sangre de la paciente 30, que había recibido un trasplante de médula ósea de su hermano y estaba afectada de enfermedad del injerto contra el huésped crónica esclerodermiforme; *carril 17*: piel indurada de la paciente 30, y *carril 18*: piel sana de la misma paciente).

se identificaron otras bandas correspondientes a secuencias específicas del cromosoma Y (Fig. 3).

En las pruebas de sensibilidad de la *nested* PCR descrita fuimos capaces de detectar entre una y cuatro copias de la secuencia *SRY*. Cuando el ADN de origen masculino estaba mezclado con grandes cantidades de ADN de origen femenino, el umbral de sensibilidad se situó aproximadamente entre cuatro y 10 copias de secuencias *SRY* por cada 100.000 células femeninas, lo que se correlaciona con los datos referidos en la bibliografía (80). En ninguna de las series de *nested* PCR realizadas se detectaron productos amplificados en los controles negativos incluidos sistemáticamente, consistentes en agua destilada y muestras de ADN extraído de sangre y piel de las pacientes del grupo C (Fig. 4 y tabla III).

Secuencias *SRY* detectadas mediante *nested* PCR en las muestras de sangre y piel

Excluyendo los controles negativos y positivos, en total se amplificaron 47 muestras de ADN procedentes de 21 pacientes expuestas a microquimerismos masculinos durante la gestación. Con la *nested* PCR utilizada se detectaron secuencias de ADN específicas del gen *SRY* en tres de los 10 (30%) pacientes con morfea, que correspondían a cuatro de las 25 (16%) muestras. En dos casos estas secuencias se detectaron en sangre (Fig. 5); en una de las pacientes anteriores además se amplificaron secuencias *SRY* en piel de una

placa de morfea y en otra paciente sólo se detectaron estas secuencias en piel aparentemente sana (Fig. 6). No se amplificaron secuencias de ADN específicas del gen *SRY* en ninguna de las 22 muestras procedentes de las pacientes del grupo B.

Comparando ambos grupos de pacientes no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados (tabla IV). La diferencia entre los resultados obtenidos con la *nested* PCR en el grupo A y en el grupo B tampoco fue estadísticamente significativa (p 0,0902). Por último, los datos clínicos, obstétricos, inmunológicos e histológicos de las tres pacientes afectas de morfea en las que se amplificaron secuencias *SRY* fueron similares a los de las otras siete pacientes del grupo A (tabla V).

DISCUSIÓN

En este trabajo prospectivo estudiamos por primera vez la presencia de microquimerismos masculinos adquiridos exclusivamente durante la gestación en mujeres afectas de morfea. Como marcador indirecto de éstos amplificamos secuencias específicas del cromosoma Y mediante *nested* PCR por tratarse de una técnica fácil, sensible y específica. En todos los experimentos se extremaron las medidas para evitar contaminación durante la toma o el procesamiento de las muestras y se incluyeron sistemáticamente controles negativos y positivos.

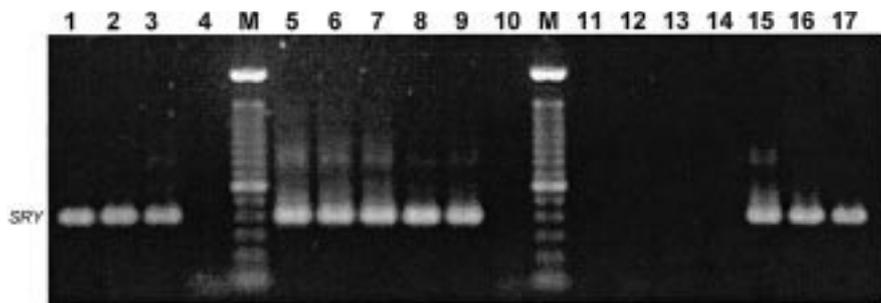


FIG. 4.—*Nested* PCR para detectar secuencias *SRY*. *M*, marcadores de peso molecular. *Carriles 1-4*: prueba de sensibilidad para detectar 10, 4, 1 y 0,1 copias de cromosoma Y en agua destilada, respectivamente. *Carriles 5-10*: prueba de sensibilidad para detectar 1.000, 100, 40, 10, 4 y 1 copias de cromosoma Y mezcladas con 600 pg de ADN de origen femenino, equivalente a unas 100.000 células (sensibilidad: 0,004%). *Carriles 11-14*: en las muestras de ADN extraído de sangre, piel afectada y piel sana de las pacientes de los grupos B y C no se detectaron productos amplificados. *Carriles 15-17*: banda correspondiente al fragmento *SRY* amplificado en todas las muestras de los pacientes incluidos en el grupo D.

TABLA III: RESULTADOS DE LA NESTED PCR PARA DETECTAR SECUENCIAS *SRY*

Paciente	Sangre periférica	Piel de la lesión	Piel sana perilesional
1	—	—	NA
2	+	+	—
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	+
7	—	NR	NR
8	—	—	—
9	—	—	—
10	+	NR	NR
11	—	—	—
12	—	NA	—
13	—	—	—
14	—	—	—
15	—	—	—
16	—	NR	NR
17	—	NR	NR
18	—	NR	NR
19	—	NR	NR
20	—	NR	NR
21	—	—	—
22	—	—	—
23	—	NR	NR
24	—	NR	NR
25	—	NR	NR
26	—	—	NR
27	+	+	+
28	+	NA	NR
29	+	+	+
30	+	+	+

NR: biopsia no realizada. NA: no se obtuvo ADN de la biopsia cutánea. Pacientes 1-10 (grupo A): mujeres afectas de morfea expuestas a microquimerismos de origen masculino durante la gestación. Pacientes 11-21 (grupo B): mujeres afectas de liquen escleroatrófico u otras dermatosis expuestas a microquimerismos de origen masculino durante la gestación. Pacientes 22-26 (grupo C): pacientes afectas de morfea no expuestas a fuentes evidentes de microquimerismos de origen masculino. Pacientes 27-30 (grupo D): pacientes varones y una mujer receptora de un trasplante de médula ósea procedente de su hermano (paciente 30).

Detectamos estas secuencias en tres de las 10 pacientes afectas de morfea que habían tenido uno o más hijos varones. En estos tres casos el número de hijos varones

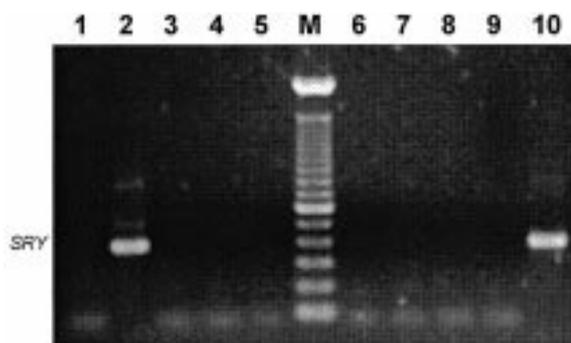


FIG. 5.—Nested PCR para investigar la presencia de secuencias *SRY* en muestras de sangre de las 10 pacientes afectas de morfea incluidas en el grupo A. *M*: marcadores de peso molecular. Se detectaron productos amplificados en las pacientes 2 (*carril 2*) y 10 (*carril 10*).

tendió a ser significativamente superior ($p 0,0554$) que en el resto, lo que sugiere una mayor impregnación por células masculinas. Los resultados fueron negativos en las 11 mujeres afectas de otras dermatosis con antecedentes obstétricos similares, al igual que en las cinco mujeres con morfea que no había tenido hijos varones.

A pesar de que la frecuencia de microquimerismos masculinos no fue significativamente diferente en pacientes y controles, probablemente debido al tamaño reducido de la muestra; estos hallazgos sugieren que podrían estar relacionados con la enfermedad en algunos casos. Según el diseño de nuestro estudio conviene señalar que no podemos excluir la existencia de microquimerismos fetales masculinos que cuantitativamente no superaban el umbral de sensibilidad de la técnica utilizada u originados a partir de gestaciones de fetos hembra (cariotipo 46XX). Tampoco podemos descartar la presencia de microquimerismos maternos, tal vez implicados en el desarrollo de la enfermedad en mujeres nulíparas y en varones. Para su detección serían útiles técnicas de amplificación genómica capaces de identificar polimorfismos del ADN, tales como los genes que codifican el sistema antigénico leucocitario humano (HLA) o las secuencias repetitivas en tándem (77, 81-87).

En las pacientes estudiadas las únicas fuentes aparentes de secuencias de ADN del gen *SR*Y, específicas del cromosoma Y fueron los embarazos de hijos varones que se produjeron más de 16 años antes. Este hallazgo se explicaría por la persistencia de células

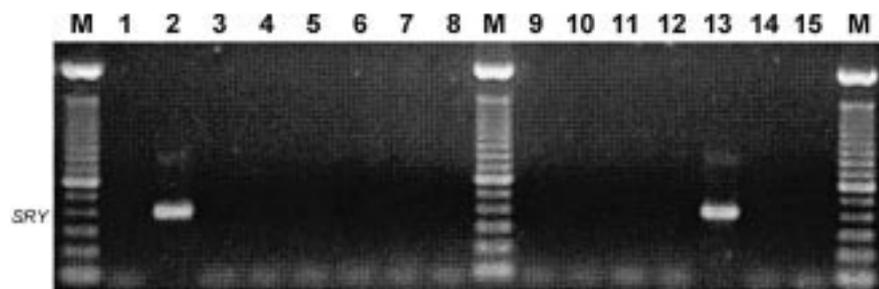


FIG. 6.—Nested PCR para investigar la presencia de secuencias *SRY* en biopsias cutáneas de las pacientes afectas de morfea incluidas en el grupo A. *M*: marcadores de peso molecular. *Carriles 1-8*: muestras de piel afecta. *Carriles 9-15*: muestras de piel aparentemente sana. Se detectaron productos amplificados en piel afecta de la paciente 2 (*carril 2*) y en piel sana de la paciente 6 (*carril 13*).

TABLA IV: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES EXPUESTAS A FUENTES DE MICROQUIMERISMOS DE ORIGEN MASCULINO DURANTE LA GESTACIÓN

Parámetro	Morfea (n = 10)	LEA y otras dermatosis (n = 10)
Edad media (años)	56,60 (± 10,98)	58,60 (± 10,631)*
N.º medio de embarazos	3,30 (± 1,49)	2,80 (± 1,39)
N.º medio de abortos	0,80 (± 0,78)	0,30 (± 0,48)
N.º medio de hijos varones	1,80 (± 1,39)	1,50 (± 1,08)
Tiempo transcurrido desde la última exposición a fuentes de microquimerismos masculinos (años)	23,70 (± 8,47)	26,20 (± 10,60)*
N.º de pacientes con incidentes obstétricos	2	3
N.º de pacientes con otras alteraciones autoinmunes	4	6*

Entre paréntesis, desviación estándar de la muestra. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos respecto a ninguno de los parámetros analizados. * Incluyendo la paciente 11 (n = 11), cuya fuente potencial de microquimerismos era su hermano gemelo, la diferencia entre estos parámetros tampoco fue estadísticamente significativa.

progenitoras hematopoyéticas fetales en la madre como se ha demostrado en estudios previos (4, 32, 35).

No observamos correlación entre la presencia de secuencias de ADN masculino mediante *nested* PCR en muestras de sangre, de piel afecta y de piel aparentemente sana procedentes de pacientes con morfea y antecedentes de gestaciones de hijos varones. Su detección en piel aparentemente sana apoya la hipótesis de que las células de origen fetal pueden migrar selectivamente a la piel como se ha demostrado en pacientes receptores de trasplantes de órganos sólidos (19). Sin embargo, sugiere que no son suficientes para el desarrollo de las lesiones cutáneas y que son necesarios factores adicionales como ocurre en la esclerosis sistémica (88). Esto explicaría por qué no se observa una mayor incidencia de fenómenos «autoinmunes» en pacientes que han recibido trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas o transfusiones sanguíneas de donantes sanos (89). La capacidad patogénica parece estar determinada por el grado de compatibilidad entre los antígenos HLA de las células microquiméricas y del receptor y ciertos factores exógenos (químicos, físicos o infecciosos). Estudios experimentales en ratones han demostrado que la cantidad de células microquiméricas se incrementa al inyectarles cloruro de polivinilo (90).

Muchas enfermedades actualmente consideradas autoinmunes predominan en mujeres y tienen una gran similitud clinicopatológica con las manifestacio-

TABLA V: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES CON MORFEA EXPUESTAS A FUENTES DE MICROQUIMERISMOS DE ORIGEN MASCULINO EN FUNCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA *NESTED* PCR

Parámetro	SRY+ (n = 3)	SRY- (n = 7)
Edad media (años)	52,66 (± 8,14)	58,28 (± 12,16)
N.º medio de embarazos	4,0 (± 2,64)	3,0 (± 0,81)
N.º medio de abortos	1,0 (± 1)	0,71 (± 0,75)
N.º medio de hijos varones*	3,0 (± 1,73)	1,28 (± 0,95)
Tiempo medio transcurrido desde la última exposición a fuentes de microquimerismos masculinos (años)	20,0 (± 3,46)	25,28 (± 9,69)
N.º de pacientes con incidentes obstétricos	0	2
Edad media de inicio de la morfea (años)	49,0 (± 7,21)	54,14 (± 10,38)
Tiempo medio entre la última exposición a fuentes de microquimerismos masculinos y el inicio de la morfea (años)	16,33 (± 4,04)	21,14 (± 8,62)
Tiempo medio de evolución de la morfea (años)	3,44 (± 1,89)	4,09 (± 5,27)
N.º de pacientes con halo inflamatorio en las lesiones	3	4
Intensidad media del infiltrado inflamatorio	1 (± 0)	1,28 (± 0,95)
N.º de pacientes con alteraciones autoinmunes asociadas	2	2

Entre paréntesis, desviación estándar de la muestra. La intensidad del infiltrado inflamatorio se calculó considerando ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos respecto a los diferentes parámetros analizados. * Sólo el número medio de hijos varones tendió a ser significativamente superior en las pacientes afectas de morfea con secuencias *SRY* detectables (p 0,0554).

nes de la enfermedad del injerto contra el huésped crónica postrasplante de médula ósea alogénico. En este contexto, la presencia de microquimerismos fetales y maternos persistentes plantea un nuevo modelo etiopatogénico para muchos de estos procesos: la aloinmunidad. El estudio de series amplias de pacientes con dichas patologías utilizando técnicas de micromanipulación para seleccionar células y análisis de regiones polimorfas del ADN ayudará a valorar su importancia en patología humana.

Abstract.-Pregnancy results in cellular migration from the fetus to the mother and from the mother to the child. Some of these cells are haematopoietic progenitor cells that can persist decades after

delivery as microchimerism. Several diseases, such as systemic sclerosis and polymorphic eruptions of pregnancy, could be related to microchimerism.

Using a nested PCR assay for a Y-chromosome specific DNA sequence (*SRY* region), which was able to detect up to 4 male cells in 100.000 female cells, we investigated the presence of fetal microchimerism in 25 samples of peripheral blood, lesional skin and normal skin from 10 women with morphea, who previously had beared at least one male fetus. Y* DNA was amplified from 3 patients (2 blood samples, 1 lesional skin biopsy specimen and 1 normal skin biopsy specimen). This DNA sequence was not amplified from 30 samples of 16 control patients, 11 of which had been potentially exposed to male microchimerism during previous pregnancies.

These findings suggest a possible relationship between fetal microchimerism and morphea. However, the detection of such microchimerism in normal skin also suggests that other triggering event seems to be implicated.

García-Patos Briones V, Vidal Pérez F, Farssac Busquets E, Castell Rodellas A, Gallardo Sainz D. Study of the presence of microchimerism in morphea: alloimmunity as a possible etiopathogenic model. Actas Dermosifiliogr 2000;91:487-497.

Key words: Morphea. Pregnancy. Microchimera. PCR. Chromosome Y

BIBLIOGRAFÍA

- Diccionario de la Lengua Española (Real Academia Española). Edición electrónica. Versión 21.1.0. Ed. Espasa Calpe, SA; 1995.
- Gill III TJ. Chimerism in humans. *Transplant Proc* 1977; 9:1423-31.
- Rothberg PG, Gamis AS, Baker D. Use of DNA polymorphisms to monitor engraftment after allogenic bone marrow transplantation. *Clin Lab Med* 1997;17:109-18.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, y cols. Male fetal progenitor cells persists in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:705-8.
- Zhen DK, Wang JY, Falco VM, y cols. Poly-FISH: a technique of repeated hybridizations that improves cytogenetic analysis of fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 1998; 18:1181-5.
- Hall JM, Lingenfelter P, Adams SL, y cols. Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence *in situ* hybridization. *Blood* 1995;86:2829-32.
- Wessman M, Ruutu T, Volin L, y cols. *In situ* hybridization using a Y-specific probe: a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1989;4:283-6.
- Durnam DM, Anders KR, Fisher L, y cols. Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific *in situ* hybridization assay. *Blood* 1989;74:2220-6.
- Petit T, Dommergues M, Socié G, y cols. Detection of maternal cells in human fetal blood during the third trimester of pregnancy using allele-specific PCR amplification. *Br J Haematol* 1997;98:767-71.
- Nakahori Y, Hamano K, Iwaya M, y cols. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *Am J Med Genet* 1991;39:472-3.
- Lo YMD, Patel P, Baigent CN, y cols. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1993;90:483-8.
- Nakagome Y, Seki S, Fukutani K, y cols. PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet* 1991;41:112-4.
- Lo YMD, Patel P, Wainscoat JS, y cols. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989;2:1363-5.
- Holzgreve W, Gänshirt-Ahlert D, Burschtyk M, y cols. Detection of fetal DNA in maternal blood by PCR. *Lancet* 1990; 335:1220-1.
- Lo YMD, Patel P, Sampietro M, y cols. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990;335:1463-4.
- Sahota A, Yang M, McDaniel HB, y cols. Evaluation of seven PCR-based assays for the analysis of microchimerism. *Clin Biochem* 1998;31:641-5.
- Aractingi I, Uzan I, Dausset I, y cols. Microchimerism in human disease. *Immunol Today* 2000;21:116-8.
- Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, y cols. The lost chord: microchimerism and allograft survival. *Immunol Today* 1996;17:577-84.
- Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, y cols. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 1992;340:876-7.
- Lee TH, Pagliaroni T, Ohto H, y cols. Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients. *Blood* 1999;93:3127-39.
- Lo YMD, Lo ESF, Watson N, y cols. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996;88:4390-5.
- Caillet-Zuchman S, Legrande C, Suberbielle C, y cols. Microchimerism frequency two to thirty years after cadaveric kidney transplantation. *Hum Immunol* 1994;41:91-5.
- Collins RH Jr, Anastasi J, Terstappen LW, y cols. Donor-derived long-term multilineage hematopoiesis in a liver-transplant recipient. *N Engl J Med* 1993;328:762-5.
- Thomas MR, Williamson R, Craft I, y cols. Y-chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy. *Lancet* 1994;343:413-4.
- Cadavid A, Rugeles MT, Peña B, y cols. Cell microchimerism in patients with recurrent spontaneous abortion: preliminary results. *Early Pregnancy* 1997;3:199-203.
- Pertl B, Bianchi DW. First trimester prenatal diagnosis: fetal cells in the maternal circulation. *Semin Perinatol* 1999;23:393-402.
- Liou JD, Hsieh TT, Pao CC. Presence of cells of fetal origin in maternal circulation of pregnant women. *Ann N Y Acad Sci USA* 1994;731:237-41.

28. Gänhirst D, Garritsen HSP, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood. *Curr Opin Gynecol Obstetr* 1995;7:103-8.
29. Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1998;26:175-85.
30. Steele CD, Wapner RJ, Smith JB, y cols. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review. *Clin Obstet Gynecol* 1996;39:801-13.
31. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999;105:574-83.
32. Evans PC, Lambert N, Maloney S, y cols. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 1999;93:2033-7.
33. Piotrowski P, Croy BA. Maternal cells are widely distributed in murine fetuses in utero. *Biol Reprod* 1996;54:1103-10.
34. Pollack MS, Kirpatrick D, Kapoor N, y cols. Identification by HLA typing of intrauterine-derived maternal T cells in four patients with severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1982;307:662-6.
35. Maloney S, Smith A, Furst DE, y cols. Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J Clin Invest* 1999;104:41-7.
36. Artlett CM, Smith JB, Jiménez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:1186-91.
37. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, y cols. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998;351:559-62.
38. Tanaka A, Lindor K, Gish R, y cols. Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999;30:833-8.
39. Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 1945;102:400-5.
40. De Moor G, De Bock G, Noens L, y cols. A new case of human chimerism detected after pregnancy: 46,XY karyotype in the lymphocytes of a woman. *Acta Clin Belg* 1988;43:231-5.
41. Gonsoulin W, Copeland K, Carpenter R, y cols. Fetal blood sampling demonstrating chimerism in monozygotic twins discordant for sex and tissue karyotype (46,XY and 45,XX). *Prenatal Diagn* 1990;10:25-8.
42. Nelson JL. Pregnancy immunology and autoimmune disease. *J Reprod Med* 1998;43:335-40.
43. Alamas SP, Wigley FM, White B. Is microengraftment with maternal or fetal cells a risk factor for the development of systemic sclerosis? *Arthritis Rheum* 1997;40:S199.
44. Nelson JL. Microchimerism and autoimmune disease. *N Engl J Med* 1998;338:1224-5.
45. Tyndall A, Gratwohl A. Microchimerism: friend or foe? *Nat Med* 1998;4:386-8.
46. Nelson JL. Pregnancy, persistent microchimerism, and autoimmune disease. *J Am Med Women Assoc* 1998;53:31, 32, 47.
47. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. New perspectives on the etiology of systemic sclerosis. *Mol Med Today* 1999;5:74-8.
48. Aractingi S, Dausset J, Carosella DE. Chimerism in scleroderma. *Lancet* 1998;351:1886.
49. Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum* 1996;39:191-4.
50. Aractingi S. La sclérodermie est-elle una maladie allo-immune? *Ann Dermatol Venereol* 1999;126:291-4.
51. Mullinax F, Mullinax GL. Pregnancy induced scleroderma. Identification of offspring-derived cells in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1996;39:S231.
52. Connolly MK, McCalmont TH. Fetal DNA and cells in women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998;339:771-2.
53. Murata H, Nakauchi H, Sumida T. Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *Lancet* 1999;354:220.
54. Kaal SE, van Den Hoogen FH, de Jong EM, y cols. Systemic sclerosis: new insights in autoimmunity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:1-8.
55. Mullinax F. Chimerism in scleroderma. *Lancet* 1998;351:1886.
56. Nelson JL, Tsao B, Hahn B, y cols. Microchimerism of fetal and maternal origin in autoimmune diseases including SSc, PBC and SLE. Symposium International concernant le microchimerisme au cours des pathologies humaines (abstract book). Paris, 8 de octubre de 1999.
57. Nelson JL. Autoimmune disease and the long-term persistence of fetal and maternal microchimerism. *Lupus* 1999;8:493-6.
58. Nelson JL. Microchimerism: implications for autoimmune disease. *Lupus* 1999;8:370-4.
59. Nelson JL. Microchimerism and the causation of scleroderma. *Scand J Rheumatol* 1998;27(Supl 107):10-3.
60. Welsh K. Scleroderma: chimerism, the blind man, and the scientist. *Lancet* 1998;351:540-1.
61. Famularo G, DeSimone C. Systemic sclerosis from autoimmunity to alloimmunity. *South Med J* 1999;92:472-6.
62. Nelson JL. Chimerism in transplantation and in spontaneous occurring autoimmune disease. *Transplant Proc* 1999;31:798-9.
63. Nelson JL. Microchimerism and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheum* 1998;10:564-71.
64. Nelson JL. Non-host cells in the pathogenesis of autoimmune disease: a new paradigm? *Ann Rheum Dis* 1999;58:518-20.
65. Aractingi S, Berkane N, Bertheau P, y cols. Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. *Lancet* 1998;352:1898-901.
66. Reed AM, Shock LP, Picornell YJ. Microchimerism in children with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1998;41:S264.
67. McMILIN KD, Johnson RL. HLA homozygosity and the risk of related-donor transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfus Med Rev* 1993;7:37-41.
68. Orlin JB, Ellis MH. Transfusion associated graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 1997;4:442-8.
69. Artlett CM, Welsh KI, Black CM, y cols. Fetal-maternal HLA compatibility confers susceptibility to systemic sclerosis. *Immunogenetics* 1997;47:17-22.
70. Winkelmann RK. Localized cutaneous scleroderma. *Semin Dermatol* 1985;4:90-103.
71. Peterson LS, Nelson AM, Daniel Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc* 1995;70:1068-76.
72. Salmon-Ehr V, Eschard C, Kalis B. Morphées: classification et prise en charge. *Ann Dermatol Venereol* 1998;125:283-90.

73. Ghersetich I, Teofoli P, Benci M, y cols. Localized scleroderma. *Clin Dermatol* 1994;12:237-42.
74. Aractingi S, Chosidow O. Cutaneous graft-versus-host disease. *Arch Dermatol* 1998;134:602-12.
75. Johnson ML, Farmer ER. Graft-versus-host reactions in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:369-92.
76. Yén PH. Advances in Ychromosome mapping. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:275-81.
77. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-35.
78. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
79. Human Genome Project Information. www.ornl.gov/hgmis.
80. Reed W, Lee TH, Vichinsky EP, y cols. Sample suitability for the detection of minor white cell populations (microchimerism) by polymerase chain reaction. *Transfusion* 1998;38:1041-5.
81. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, y cols. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;46:335-67.
82. Carter AS, Cerundolo L, Bunce M, y cols. Nested polymerase chain reaction with sequence-specific primers typing for HLA-A, -B, and -C alleles: detection of microchimerism in DR-matched individuals. *Blood* 1999;94:1471-7.
83. Carter AS, Bunce M, Cerundolo L, y cols. Detection of microchimerism after allogenic blood transfusion using nested polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): a cautionary tale. *Blood* 1998;92:683-9.
84. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989;44:388-96.
85. Socié G, Gluckman E, Carosella E, y cols. Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two minisatellite sequences. *Blood* 1994;83:340-4.
86. Jungerman M, Sedzimirska M, Lange A, y cols. Application of microsatellite markers for monitoring of reconstruction pattern in patients after bone marrow transplantation/ peripheral blood progenitor cell transplantation. *Arch Immunol Ther Exp* 1998;46:39-43.
87. Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, y cols. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1055-60.
88. Grand round. Systemic sclerosis: current pathogenic concepts and future prospects for targeted therapy. *Lancet* 1996;347:1453-8.
89. Sherer Y, Shoenfeld Y. Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:873-81.
90. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, y cols. Increased circulating microchimeric cells in mice following injections of vinyl chloride. Symposium Internacional concernant le microchimerisme au cours des pathologies humaines (abstract book). París, 8 de octubre de 1999.