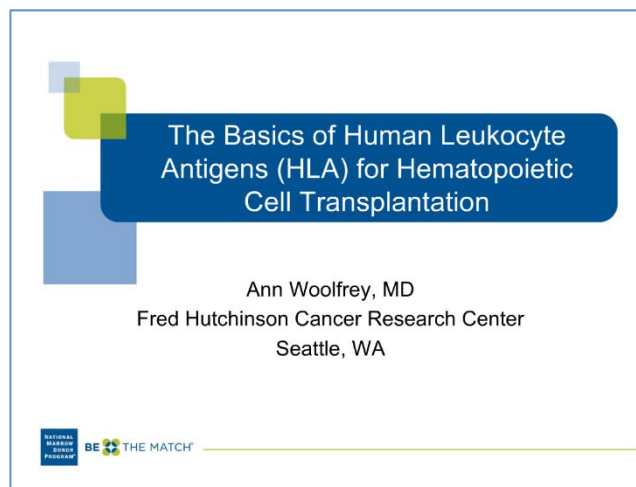


The Basics of HLA for Hematopoietic Cell Transplantation

Diapositiva 1

ANN WOOLFREY, M.D.: Esta charla es sobre los aspectos básicos de los antígenos leucocitarios humanos para el trasplante de células hematopoyéticas.



The Basics of Human Leukocyte Antigens (HLA) for Hematopoietic Cell Transplantation

Ann Woolfrey, MD
Fred Hutchinson Cancer Research Center
Seattle, WA

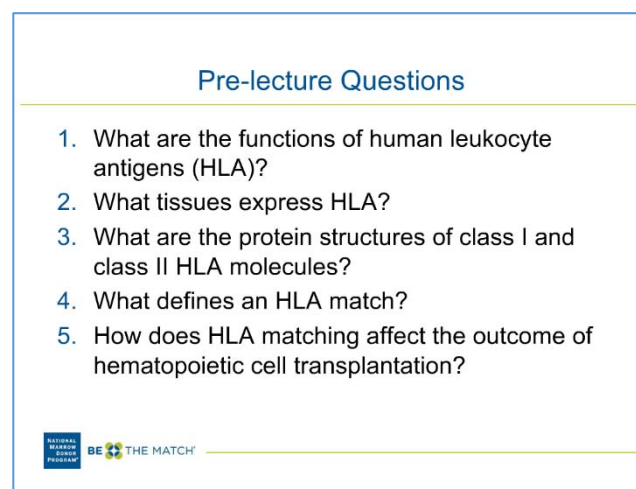
NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM® BE  THE MATCH®

Diapositiva 2

Los residentes de medicina tienen muchas preguntas sobre el sistema HLA. La pregunta más frecuente es: ¿por qué siempre estoy tan confundido sobre el HLA? La respuesta a esa pregunta es, primero, que les pasa a muchos, y segundo, que el sistema del complejo HLA es complejo, y la nomenclatura no ha sido uniforme.

La finalidad de esta exposición es explicar ciertos puntos clave sobre el sistema HLA que espero les ayuden a entender el proceso de selección de donantes para los trasplantes de células hematopoyéticas. Las preguntas clave que trataré en esta exposición son: ¿Cuáles son las funciones del HLA? ¿Qué tejidos expresan el HLA? ¿Cuáles son las estructuras proteicas de las moléculas de HLA de clase I y clase II? ¿Qué define una compatibilidad HLA? ¿De qué modo la compatibilidad HLA afecta el resultado de un trasplante de células hematopoyéticas?

Les aviso, voy a usar la abreviatura HCT para el término 'trasplante de células hematopoyéticas'.



Pre-lecture Questions

1. What are the functions of human leukocyte antigens (HLA)?
2. What tissues express HLA?
3. What are the protein structures of class I and class II HLA molecules?
4. What defines an HLA match?
5. How does HLA matching affect the outcome of hematopoietic cell transplantation?

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM® BE  THE MATCH®

Diapositiva 3

Al final de esta exposición, espero que estén familiarizados con algunos conceptos básicos. La función de las moléculas de HLA en la respuesta inmunitaria en seres humanos. La diferencia entre los genes HLA de clase I y clase II y las estructuras proteicas. La nomenclatura de los genes HLA. Terminología básica de la compatibilidad HLA. Criterio básico para la selección de donantes.

Learning Objectives

- Know the role of HLA molecules in the human immune response.
- Know the difference between class I and class II HLA genes and protein structures.
- Understand the nomenclature for HLA genes.
- Know the basic terminology used in HLA matching.
- Understand the approach to donor selection based on HLA matching.



Diapositiva 4

¿Exactamente qué son los HLA o antígenos leucocitarios humanos? Son proteínas de la superficie celular que cumplen una función clave en la respuesta inmunitaria. Los HLA se dividen en dos grupos principales: clase I y clase II. Los HLA de clase I se expresan de manera ubicua y constitutiva, lo que significa que todos los tipos de células, con unas pocas excepciones, expresan el HLA de clase I siempre.

La expresión del HLA de clase II es específica para cada tejido. Algunas células, como los linfocitos B y las células presentadoras de antígenos, siempre expresan el HLA de clase II, es decir, su expresión es constitutiva. En otras células, como los linfocitos T y algunas células presentadoras de antígenos, la expresión del HLA de clase II puede inducirse. Esto significa que una cierta señal molecular activará la expresión de los HLA de clase II.

El HLA desempeña dos papeles cruciales en la respuesta inmunitaria. Primero, la selección del repertorio de los linfocitos T depende de la expresión del HLA. Segundo, el inicio de la respuesta inmunitaria dependiente de los linfocitos T requiere la expresión del HLA.

Human Leukocyte Antigens

- HLA- Cell surface proteins that play a fundamental role in the immune response.
- HLA are expressed differentially
 - Class I HLA- Expression is ubiquitous and constitutive
 - Class II HLA- Expression is tissue specific; constitutive expression on B cells & most APCs; inducible expression on T cells & some APCs.
- HLA functions
 - Selection of the T cell repertoire
 - Initiation of the T dependent immune response



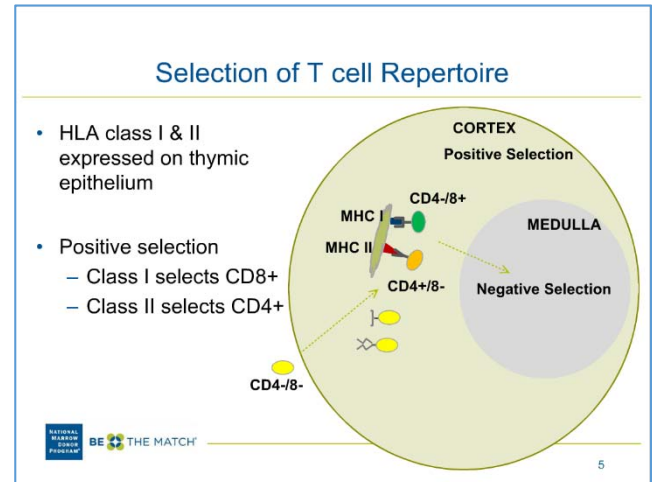
Diapositiva 5

¿Cómo funciona el HLA para seleccionar los linfocitos T? Un aviso en cuanto a la nomenclatura: HLA es la versión humana del complejo de histocompatibilidad mayor, o MHC. Muchas veces se usa MHC en lugar de HLA, especialmente cuando la explicación puede generalizarse a otros animales.

Esta imagen muestra el timo. Los complejos de histocompatibilidad mayor de clase I y clase II se expresan de manera constitutiva en las células epiteliales del timo. Los linfocitos T inmaduros que aún no están diferenciados en fenotipo CD4 o cooperador o CD8 supresor migran hacia la corteza tímica. Allí, encuentran el MHC expresado por las células epiteliales del timo.

La interacción del receptor del linfocito T con un antígeno presentado en una molécula de MHC de clase I diferenciará al linfocito T en un fenotipo CD8-positivo. En cambio, la interacción con un antígeno presentado por una molécula de MHC de clase II diferenciará al linfocito T en un fenotipo CD4-positivo.

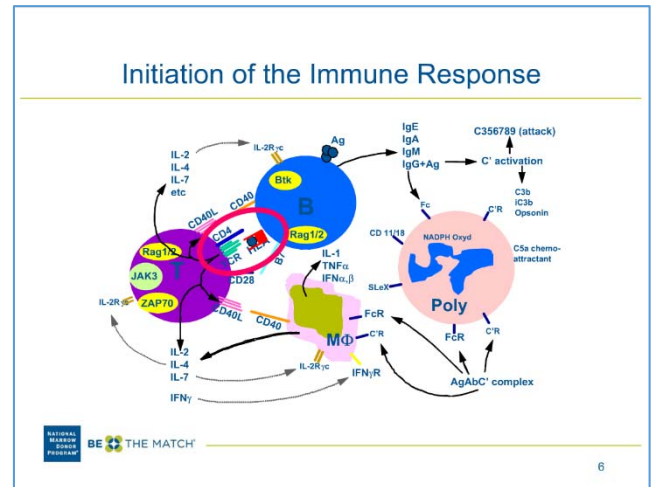
Cuando los receptores del linfocito T no interaccionan con un antígeno en el contexto del MHC, se produce la apoptosis. Los linfocitos T diferenciados en CD4 o CD8-positivos específicos para el antígeno migrarán entonces a la médula. En la médula tímica, los linfocitos T que reconocen autoantígenos son eliminados.



Diapositiva 6

Las moléculas del HLA también desempeñan un papel central en el inicio de la respuesta inmunitaria dependiente de los linfocitos T. Esta diapositiva ilustra muchos de los eventos de señalización celular e interacciones que se requieren para generar respuestas inmunitarias normales. El primer paso en esta cascada de eventos consiste en la interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T, y el HLA tiene el papel central de esta interacción.

El antígeno es presentado al receptor del linfocito T por las moléculas del HLA. El antígeno presentado por las moléculas del HLA de clase I es reconocido por los linfocitos T CD8-positivos, mientras que el antígeno presentado por las moléculas del HLA de clase II es reconocido por los linfocitos T CD4-positivos. Una vez que el receptor del linfocito T reconoce el antígeno en el contexto del HLA y siempre que ocurran eventos secundarios de señalización, el linfocito T se activa y prolifera.



Diapositiva 7

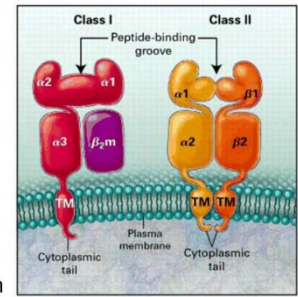
Para entender la nomenclatura del HLA y la compatibilidad HLA, resulta útil entender las estructuras de las proteínas. Tanto las moléculas del HLA de clase I como de clase II son moléculas de superficie celular en las que una pequeña parte de la proteína se forma en la región intracelular y transmembránica y el resto de la molécula en la superficie extracelular.

Las moléculas del HLA de clase I están compuestas de una única cadena proteica que se curva para formar la hendidura donde se presenta el antígeno. Hay dos regiones helicoidales alfa que forman los lados de la hendidura al entrar en contacto con el receptor del linfocito T. La lámina plegada beta forma el suelo de la hendidura donde descansa el antígeno.

Las moléculas del HLA de clase I se asocian con otra proteína llamada microglobulina beta-2. La microglobulina beta-2 es necesaria para estabilizar la molécula en la superficie. En cambio, las moléculas del HLA de clase II están formadas por la asociación no covalente de dos cadenas proteicas separadas llamadas cadenas alfa y beta. Cada cadena incluye una región helicoidal alfa que forma el lado derecho de la hendidura de presentación del antígeno e incluye una lámina plegada beta. La lámina plegada beta de cada proteína se junta con la de la otra para formar el suelo de la hendidura.

Protein Structure

- HLA Class I
 - Two α -helical regions
 - One β -pleated sheet
- HLA Class II
 - Two separate chain
 - One α -helical region
 - One β -pleated sheet
 - Noncovalent association



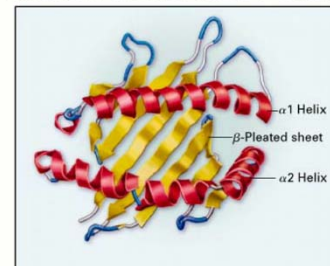
Klein and Sato NEJM 343 (10): 702, September 7, 2000

Diapositiva 8

Si vemos esta molécula HLA de clase I desde la perspectiva de un linfocito T, se puede ver el bolsillo que presenta al antígeno. El antígeno yace "acostado" en la hendidura. El receptor del linfocito T entonces entra en contacto con el antígeno y las regiones helicoidales alfa de la molécula de HLA. Esta información sobre qué parte de la molécula de HLA reconoce el linfocito T les ayudará a entender el modo en que se encara actualmente la tipificación del HLA.

Peptide Binding

Tertiary Structure of HLA Class I Binding Module



Klein and Sato NEJM 343 (10): 702, September 7, 2000

Diapositiva 9

Los genes que codifican las proteínas del HLA se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6. El complejo de genes del HLA consta de tres regiones. La más telomérica es la región de la clase I, la más centromérica es la región de la clase II y en el medio está la región de la clase III.

La región de la clase II del HLA se muestra en la línea celeste. Esta región incluye otros genes pero para nuestros fines nos interesan los genes que forman la molécula HLA: HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Recuerden que los antígenos HLA de clase II están formados por la asociación de dos proteínas llamadas alfa y beta.

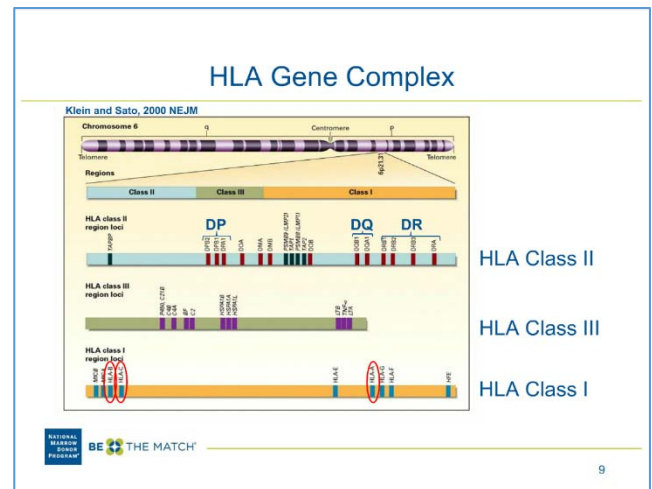
Los genes que codifican estas proteínas se llaman genes A o B, y se encuentran juntos en cada locus. En cada región, hay un gen para la cadena A, por ejemplo DRA. En cada región, hay un gen que codifica cadenas beta mayores, por ejemplo DRB1. En algunas regiones como DR, puede haber otros genes B que codifican cadenas beta menos importantes.

Pueden ver que, en términos relativos, las regiones DR y DQ están más próximas entre sí que la región DP. Esto contribuye a explicar por qué ciertos genes DR y DQ se expresan más comúnmente juntos o están ligados, mientras que hay una asociación menos estrecha entre los genes DR y DP.

Dentro de la región de la clase III ilustrada en verde hay algunos genes que codifican proteínas importantes que intervienen en la respuesta inmunitaria, incluso ciertas citocinas como TNF-alfa y algunas proteínas del sistema del complemento. En la línea amarilla de abajo, se puede ver los genes HLA de clase I y la relación entre ellos.

Hacia la izquierda se puede ver el locus HLA-B, el tercer segmento a la izquierda, relativamente cerca del locus HLA-C, el cuarto segmento azul a la izquierda. Ahora, hacia la derecha se puede ver el locus HLA-A, el tercer segmento azul desde la derecha.

La proximidad entre los locus B y C explica por qué los genes HLA-B y C están estrechamente ligados. Por lo tanto, si conocemos el gen HLA-B de una persona, generalmente podemos predecir el gen HLA-C. Sin embargo, la gran distancia relativa entre HLA-B y HLA-A explica por qué hay más variabilidad en el vínculo entre HLA-B y HLA-A.



Diapositiva 10

El sistema HLA es el sistema génico más polimórfico.

Se dice que un gen es polimórfico cuando hay más de una secuencia del gen normal que puede producir una proteína funcional. Desde julio de 2012, existen más de 8,000 HLA y alelos relacionados en la base de datos del HLA.

El polimorfismo del sistema HLA es la razón por la cual el sistema inmunitario de una persona puede programarse para que reconozca qué es propio y aceptable de lo que no es propio y es extraño. No solo hay múltiples locus de HLA en cada cromosoma; cada locus de HLA es polimórfico. Por ejemplo, hay muchos antígenos HLA posibles y muchos antígenos HLA-B posibles, etcétera.

La tabla a la izquierda muestra una lista de algunos antígenos HLA dentro de cada región. Los antígenos al comienzo de cada lista, por ejemplo A1, A2 y A3, o B7 y B8, fueron los primeros en describirse. Los antígenos con números más altos, como A74 y B81, fueron descritos posteriormente. Con el advenimiento de la tipificación de ADN, ahora sabemos que cada antígeno también puede ser polimórfico. Por ejemplo, se conocen ahora más de 100 alelos polimórficos del antígeno HLA-A2.

July 2012- 8,159 HLA & related alleles included in the IMGT/HLA Database.

Antigen				Allele									
HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C										
A1	B7	B45(12)	Cw1	A*01:01	A*01:02	A*01:03	A*01:04	A*01:05	A*01:06	A*01:07	A*01:08	A*01:09	A*01:10
A2	B703(7)	B46(15)	Cw2	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06	A*02:07	A*02:08	A*02:09	A*02:10
A3	B8	B47	Cw3	A*03:01	A*03:02	A*03:03	A*03:04	A*03:05	A*03:06	A*03:07	A*03:08	A*03:09	A*03:10
A11	B13	B48(40)	Cw4	A*11:01	A*11:02	A*11:03	A*11:04	A*11:05	A*11:06	A*11:07	A*11:08	A*11:09	A*11:10
A23(9)	B14	B49(21)	Cw5	A*23:01	A*23:02	A*23:03	A*23:04	A*23:05	A*23:06	A*23:07	A*23:08	A*23:09	A*23:10
A24(9)	B62(15)	B50(21)	Cw6	A*24:01	A*24:02	A*24:03	A*24:04	A*24:05	A*24:06	A*24:07	A*24:08	A*24:09	A*24:10
A25(10)	B63(15)	B51(5)	Cw7	A*25:01	A*25:02	A*25:03	A*25:04	A*25:05	A*25:06	A*25:07	A*25:08	A*25:09	A*25:10
A26(10)	B70(15)	B52(5)	Cw8	A*26:01	A*26:02	A*26:03	A*26:04	A*26:05	A*26:06	A*26:07	A*26:08	A*26:09	A*26:10
A29(19)	B75(15)	B53		A*29:01	A*29:02	A*29:03	A*29:04	A*29:05	A*29:06	A*29:07	A*29:08	A*29:09	A*29:10
A30(19)	B76(15)	B54(22)		A*30:01	A*30:02	A*30:03	A*30:04	A*30:05	A*30:06	A*30:07	A*30:08	A*30:09	A*30:10
A31(19)	B77(15)	B55(22)		A*31:01	A*31:02	A*31:03	A*31:04	A*31:05	A*31:06	A*31:07	A*31:08	A*31:09	A*31:10
A32(19)	B21	B56(22)		A*32:01	A*32:02	A*32:03	A*32:04	A*32:05	A*32:06	A*32:07	A*32:08	A*32:09	A*32:10
A33(19)	B18	B57(17)		A*33:01	A*33:02	A*33:03	A*33:04	A*33:05	A*33:06	A*33:07	A*33:08	A*33:09	A*33:10
A34(10)	B27	B58(17)		A*34:01	A*34:02	A*34:03	A*34:04	A*34:05	A*34:06	A*34:07	A*34:08	A*34:09	A*34:10
A36	B35	B59		A*36:01	A*36:02	A*36:03	A*36:04	A*36:05	A*36:06	A*36:07	A*36:08	A*36:09	A*36:10
A43	B37	B67		A*43:01	A*43:02	A*43:03	A*43:04	A*43:05	A*43:06	A*43:07	A*43:08	A*43:09	A*43:10
A66(10)	B38(16)	B73(7)		A*66:01	A*66:02	A*66:03	A*66:04	A*66:05	A*66:06	A*66:07	A*66:08	A*66:09	A*66:10
A68(28)	B39(16)	B78(5)		A*68:01	A*68:02	A*68:03	A*68:04	A*68:05	A*68:06	A*68:07	A*68:08	A*68:09	A*68:10
A74(19)	B60(40)	B81(7)		A*74:01	A*74:02	A*74:03	A*74:04	A*74:05	A*74:06	A*74:07	A*74:08	A*74:09	A*74:10
A80	B41	B61(40)		A*80:01	A*80:02	A*80:03	A*80:04	A*80:05	A*80:06	A*80:07	A*80:08	A*80:09	A*80:10
	B42			A*42:01	A*42:02	A*42:03	A*42:04	A*42:05	A*42:06	A*42:07	A*42:08	A*42:09	A*42:10
	B44(12)			A*44:01	A*44:02	A*44:03	A*44:04	A*44:05	A*44:06	A*44:07	A*44:08	A*44:09	A*44:10

NATIONAL ALLIANCE
BE THE MATCH

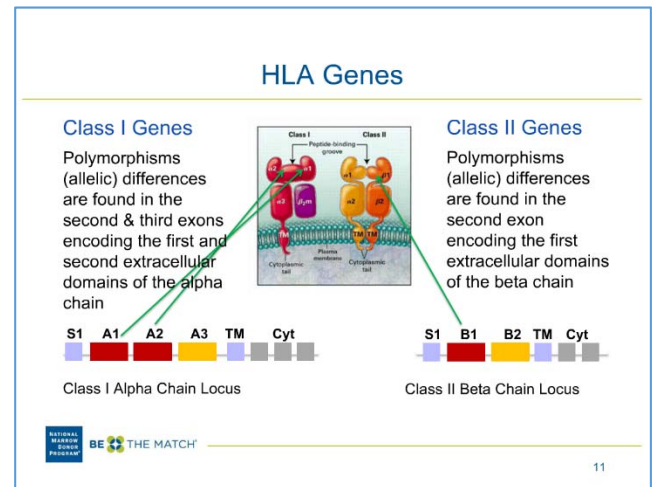
Diapositiva 11

Ahora, combinemos algunos conceptos. En la imagen del medio, que ya han visto antes, están las estructuras proteicas de los antígenos HLA de clase I y de clase II. La serie de rectángulos debajo de esta muestra los principales exones del gen HLA de clase I A a la izquierda y del gen HLA de clase II B a la derecha.

Dada la estructura proteica, uno pronosticaría que los polimorfismos funcionales son aquellos que intervienen en la presentación del antígeno. Estas diferencias en los aminoácidos residirían principalmente en genes que entran en contacto con un receptor del linfocito T. Recuerden que hay dos regiones helicoidales alfa en cada proteína HLA de clase I. La secuencia de ADN para estas regiones y para la lámina plegada beta se encuentra en el segundo y el tercer exón del gen de clase I.

En cambio, solo hay una región helicoidal alfa y una región plegada beta en la proteína HLA de clase II. Las secuencias que pasan por esta parte de la proteína de clase II se encuentran en el segundo exón. Es útil saber esta información porque el proceso real de tipificación HLA conlleva la detección de polimorfismos en las regiones presentadoras de antígeno de la proteína.

Por ejemplo, la tipificación moderna de ADN no requiere secuenciar cada exón en todo el gen HLA. Típicamente, la tipificación de genes HLA de clase I se basa en la detección de polimorfismos en el segundo y el tercer exón y la tipificación de los genes HLA de clase II se basa en detectar polimorfismos en el segundo exón.

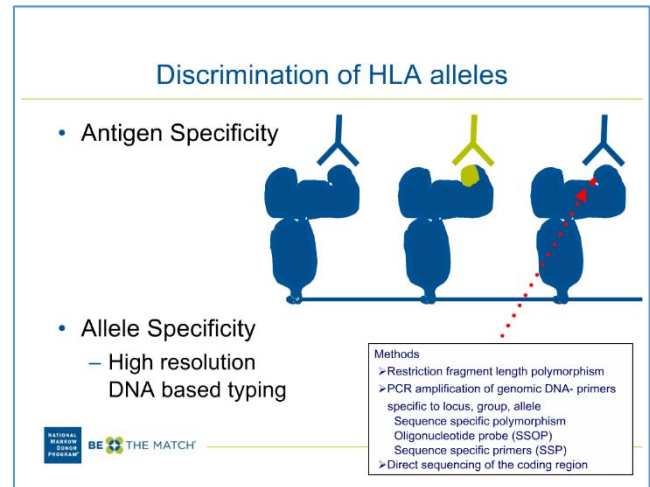


Diapositiva 12

Hay otra manera de pensar en los distintos niveles de polimorfismo en los genes HLA. Los primeros métodos de tipificación del HLA se basaban en el reconocimiento de diferencias antigénicas por anticuerpos específicos. Aquí se ven tres moléculas HLA de clase I. Cuando grandes áreas de la región presentadora de antígeno de las moléculas son diferentes o polimórficas, como se ve en la otra molécula, los anticuerpos pueden reconocerlo.

En esta imagen, el anticuerpo azul reconoce HLA-A1 y el anticuerpo verde reconoce HLA-A2. Por lo tanto, en la tipificación serológica, dos de estas moléculas se identifican como HLA-A1 y un tipo como HLA-A2. Por lo tanto, HLA-A1 y HLA-A2 se consideran antígenos separados. Sin embargo, los anticuerpos serológicos no son capaces de detectar diferencias más pequeñas en el contenido de los aminoácidos, particularmente cuando los cambios en los aminoácidos están ocultos en los pliegues de la proteína, y 'alelo de HLA' es un término que se usa para los polimorfismos de aminoácidos que no pueden detectarse mediante serología.

El advenimiento de la tipificación de ADN moderna nos ha permitido detectar este polimorfismo alélico. Algunos métodos comunes para detectar polimorfismos alélicos incluyen el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, llamado RFLP, amplificación basada en PCR usando cebadores o sondas específicos, y secuenciación directa de porciones de las regiones codificantes.



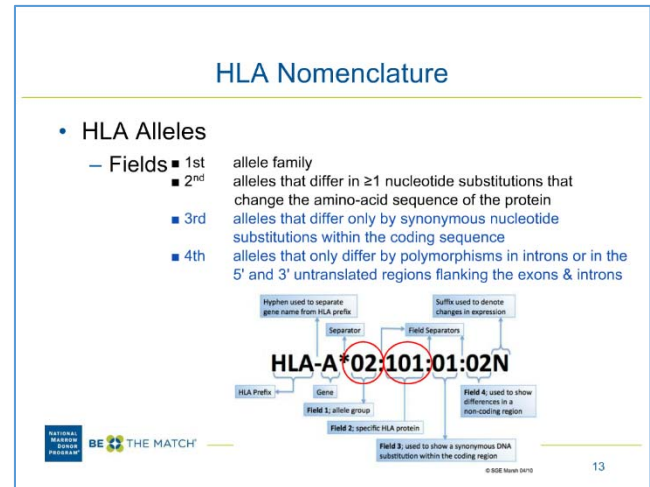
Diapositiva 13

Ahora que saben más acerca de las estructuras proteicas y la genética de las moléculas del HLA, la nomenclatura debería ser más fácil de entender. Lamentablemente para todos nosotros, la nomenclatura de las moléculas del HLA ha cambiado muchas veces con el transcurso de los años al ir incorporándose los descubrimientos de nuevas proteínas, genes o alelos. Solo hablaremos de la nomenclatura actual.

En la parte de abajo de la diapositiva, verán el nombre de un gen HLA. Las letras iniciales identifican el gen como uno del locus HLA-A. Hay un separador o un asterisco que permanece de la nomenclatura anterior y que define el uso de métodos de tipificación de ADN. Después del separador, viene el campo. El primer campo es el nombre de la familia alélica o lo que normalmente consideramos que es el tipo de antígeno. En este caso, el campo es 02.

El segundo campo indica el alelo específico en la familia. Para que un alelo reciba un número debe haber diferencias en la secuencia de ADN que deriven en un cambio en la secuencia de aminoácidos. En este caso, el alelo es A*02:101. Si solo recuerdan los primeros dos campos, está bien.

Los médicos no utilizan los últimos dos campos en la tipificación HLA pero resultan útiles para describir la relación de la secuencia genética con la proteína. El tercer campo se usa para diferenciar alelos que pueden diferir en la secuencia de nucleótidos pero tienen la misma secuencia de aminoácidos, lo que se llama sustituciones nucleotídicas silenciosas, y el tercer campo se usa para diferenciar alelos que difieren en la secuencia de nucleótidos en las regiones no codificantes.



Diapositiva 14

Para entender la compatibilidad HLA de los donantes, necesitan conocer cierta terminología y ciertos conceptos que cubriré en las próximas diapositivas. Recuerden que los genes HLA están estrechamente ligados en el cromosoma 6 y se heredan juntos. Todo el grupo de genes HLA-A, B, C y DRB1 se denomina haplotipo.

Recuerden que una persona hereda un haplotipo de cada uno de los padres. El genotipo HLA de una persona incluye ambos haplotipos de los padres. Típicamente, en cada locus hay diferentes genes heredados de cada uno de los padres. Por lo tanto, la mayoría de las personas son heterocigóticas para cada locus de HLA.

Algunas personas son homocigóticas, lo que significa que heredan el mismo gen HLA, por ejemplo, HLA-01:01 de cada uno de los padres. Ya sean heterocigóticos u homocigóticos, los genes de cada uno de los padres se expresan igualmente y se denominan expresión codominante.

La prevalencia de alelos HLA específicos varía entre los grupos étnicos y dentro de cada grupo étnico. Algunos alelos son más comunes que otros. 'Desequilibrio de ligamiento' es el término que utilizamos para la asociación no aleatoria de alelos de HLA. Esto se puede considerar como una manera en que los genes HLA viajan juntos en grupo.

Terminology

- **Haplotype**- closely linked HLA genes inherited together
- **Genotype**- combination of parental haplotypes
 - Co-dominant expression at each locus
 - Most individuals are heterozygous at each locus
- **Prevalence** of alleles vary between ethnic groups
- **Linkage disequilibrium**- nonrandom association of HLA alleles

Diapositiva 15

El desequilibrio de ligamiento es un valor calculado. Es la diferencia entre la frecuencia observada de una combinación de alelos en dos locus ligados y la frecuencia prevista de asociaciones aleatorias.

Veamos un ejemplo. Digamos que uno de los haplotipos de una persona es HLA-A1, B8, DR3. En la población general, HLA-A1 se encuentra en el 16% de las personas. HLA-B8 se encuentra en el 9% de las personas y DRB3 se encuentra en el 10% de las personas. Al multiplicar sus frecuencias, se puede calcular lo que se esperaría si los genes se heredaran al azar. Por lo tanto, el 1.4% de la población heredaría aleatoriamente ambos, A1 y B8, y se esperaría que el 0.9% de la población heredaría aleatoriamente ambos, B8 y DR3.

Sin embargo, en realidad, la combinación de A1 y B8 se observa en el 8.8% de la población. La diferencia entre la cifra observada y la esperada es de 7.5%. Por consiguiente, el desequilibrio de ligamiento es del 7.5%. Cuanto más alto el desequilibrio de ligamiento, más estrechamente ligados los dos genes.

Linkage Disequilibrium

- The difference between the observed frequency of a combination of alleles at two linked loci and the frequency expected for random associations

Allele frequency in a population (%):	A1	B8	DR3
	16%	9%	10%
Expected (a x b):		1.4%	0.9%
Observed:		8.8%	7.0%
LD		7.5	6.1

Diapositiva 16

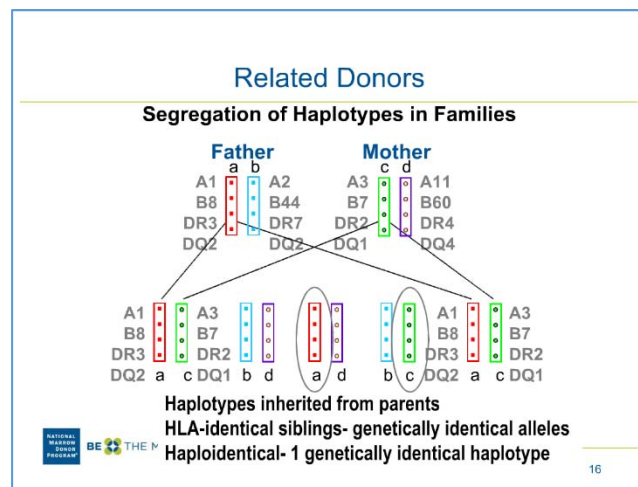
Aquí se puede ver de qué modo los haplotipos HLA se heredan y bloquean. A la izquierda, pueden ver al padre con dos tipos de HLA distintos, ilustrados en rojo y azul. A la derecha está la madre con dos haplotipos HLA distintos, en verde y violeta. Sus hijos se muestran a continuación. Del padre, cada hijo tiene un 50% de probabilidad de heredar el haplotipo rojo o el azul. Del mismo modo, de la madre, cada hijo tiene un 50% de probabilidad de heredar el haplotipo verde o violeta.

En esta familia, hay dos hermanos que heredaron los mismos haplotipos, el rojo del padre y el verde de la madre. Estos se llaman hermanos con HLA idéntico. Sabemos que los alelos HLA son genéticamente idénticos porque se heredan del mismo progenitor.

Recuerden que hay mucho material genético en el cromosoma 6 en las regiones HLA, incluso genes que no son del HLA. Estos genes implicados también se heredan como parte de los haplotipos.

En esta familia, hay también hermanos que han heredado solo uno de los mismos haplotipos. Por ejemplo, el primer hermano y el tercero han heredado el haplotipo rojo del padre pero tienen otro haplotipo de la madre.

Cada uno de estos hermanos es haploidentico, lo que significa que tienen un haplotipo en común que es genéticamente idéntico. Por supuesto que cada uno de los padres y de los hijos es haploidentico con respecto al otro.



Diapositiva 17

En el caso de las personas que no tienen parentesco, si bien algunas pueden tener el mismo tipo de HLA, no podemos presuponer que sean genéticamente idénticos. Esta figura muestra dos haplotipos, rojo y azul, para nuestro paciente de la izquierda. Los cuatro donantes HLA compatibles posibles se muestran a la derecha. En otras palabras, tanto el paciente como los cuatro donantes se tipificaron como HLA-A1, A3, B8, B7 y DR3, DR2, pero como pueden ver, algunos de los donantes heredaron el gen HLA de distintos haplotipos.

Por eso el gen HLA-A1 del paciente está asociado o ligado con el HLA-B8 y DR3 y su haplotipo. El gen HLA-A1 del cuarto donante en la extrema derecha tiene B7 y D3 en su haplotipo. Por lo tanto, la identidad fenotípica determinada por la tipificación HLA no se correlaciona con la identidad genotípica. Es decir, no se correlaciona con un haplotipo heredado. Podemos suponer que gran parte del material genético que se encuentra dentro de los haplotipos es diferente, incluidas las diferencias alélicas en los genes HLA.

Haplotypes of Unrelated Donors

- Phenotypic identity does not correlate with genotypic identity
- Cannot assume a haplotype
- Allelic polymorphisms may be present at HLA-A, B, C

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE THE MATCH Petersdorf et al, 2007, PLoS Medicine 4:e8 17

Diapositiva 18

Ahora, vamos a explicar algunos conceptos generales relacionados con la compatibilidad del donante. Recuerden que aprendimos la diferencia entre un antígeno HLA y un alelo. Cuando hablamos de compatibilidad HLA o, más bien, incompatibilidad HLA, definimos la incompatibilidad con respecto a si la incompatibilidad es a nivel alélico o a nivel antigénico.

La tabla muestra algunos ejemplos de compatibilidad e incompatibilidad HLA. La fila de arriba muestra un único locus de HLA del receptor y el posible donante. En este caso, tanto el paciente como el donante tienen HLA-A*02:01. Son compatibles.

En la fila del medio, el paciente y el donante son compatibles en cuanto al antígeno HLA-A2. Sin embargo, la tipificación de ADN muestra que el paciente tiene el alelo HLA-A*02:05, mientras que el donante tiene el alelo HLA-A*02:01. Esto muestra que el paciente y el donante son incompatibles a nivel alélico, si bien son compatibles a nivel antigénico. En la fila de abajo, el paciente tiene el antígeno HLA-A1 y el donante tiene HLA-A2. Son incompatibles en cuanto al antígeno HLA-A.

Matching Terminology

Term	Matching Status	Donor	Recipient
Matched	Antigen matched Allele matched	HLA-A2 HLA-A*02:01	HLA-A2 HLA-A*02:01
Allele Mismatched	Antigen matched Allele mismatched	HLA-A2 HLA-A*02:01	HLA-A2 HLA-A*02:05
Antigen Mismatched	Antigen mismatched Allele mismatched	HLA-A2 HLA-A*02:01	HLA-A1 HLA-A*01:01

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE THE MATCH 18

Diapositiva 19

Para seleccionar el mejor donante, también tenemos que considerar la dirección de la incompatibilidad. Llamamos a esto vector de alorreactividad. Para determinar el vector de alorreactividad, se toma la perspectiva del donante o bien del paciente y se decide si esa persona puede reconocer una diferencia en el tipo de HLA.

Esta diapositiva muestra la tipificación de nuestro paciente a la izquierda. A la derecha hay tres posibles donantes. Cada donante es incompatible con el paciente en un locus de HLA. Sin embargo, funcionalmente, las incompatibilidades son distintas.

Veamos el donante de arriba. El donante es compatible con el paciente en cuanto a cinco de los antígenos. Sin embargo, no coinciden en DRB1. El paciente tiene DRB1*0401 y el donante tiene DRB1*1201. Desde la perspectiva del paciente, el donante tiene un tipo de HLA que el paciente no tiene. El paciente detecta la diferencia, lo que significa que hay un vector del huésped contra el injerto. Del mismo modo, desde la perspectiva del donante, el paciente tiene el alelo *0401 que el donante no tiene. Por lo tanto, desde la perspectiva del donante, hay un vector del injerto contra el huésped.

Veamos el donante del medio. El donante era compatible con el paciente en cuanto a cinco de los antígenos. Sin embargo, hay una falta de coincidencia en HLA-B. El paciente es homocigótico para HLA-B44, mientras que el donante es heterocigótico y además tiene HLA-B60. Desde la perspectiva del paciente, el antígeno B60 es distinto. Por lo tanto, la dirección de la incompatibilidad es huésped contra injerto. Sin embargo, desde la perspectiva del donante, los antígenos HLA son los mismos. Por lo tanto, no hay incompatibilidad en la dirección de la GVHD.

Finalmente, veamos al donante de abajo. El donante es compatible con el paciente en cuanto a cinco de los antígenos. Sin embargo, hay una falta de coincidencia en HLA-A. Esta vez el donante es homocigótico para HLA-A2, mientras que el paciente es heterocigótico y además tiene HLA-A24. Desde la perspectiva del paciente, los antígenos del donante no son diferentes de los antígenos del paciente. Sin embargo, desde la perspectiva del donante, el paciente tiene A24 que es diferente. Por lo tanto, en esta situación, la incompatibilidad solo se da en la dirección de la GVHD.

Alloreactivity Vector					
Host vs Graft			Graft vs Host		
A B DRB1	2	24		2	24
	44	44	→	44	44
				*1201	*0103
	*0401	*0103			
				2	24
			→	60	44
				*0401	*0103
				2	2
			←	44	44
				*0401	*0103

Diapositiva 20

Ahora que saben todo sobre la terminología de los antígenos y la compatibilidad HLA, vamos a practicar la selección de un donante. En esta situación, tenemos un paciente con dos hermanos. El laboratorio nos entrega este informe de tipificación.

¿Hay algún hermano HLA idéntico? La respuesta es sí. El hermano número 2 es HLA idéntico.

¿Comparten los mismos haplotipos? La respuesta es sí.

Ahora, ¿que pasaría si el paciente tuviera un solo hermano, el hermano número 1? ¿Hay algún hermano HLA idéntico? La respuesta es no. Este hermano no comparte ningún haplotipo.

¿Tenemos suficiente información para encontrar un donante no emparentado con compatibilidad 8/8? La respuesta es no. Una razón es que la tipificación HLA solo incluye HLA-A, B y DRB1. No conocemos la tipificación HLA-C del paciente. Recuerden que no podemos dar por sentado que un donante no emparentado compatible para HLA-A, B y DR tendrá el mismo haplotipo que el paciente.

Otra razón es que la resolución de la tipificación HLA es demasiado baja, esto significa que no muestra los alelos del HLA, sino solo la tipificación a nivel antigénico. Por lo tanto, puede haber incompatibilidades HLA ocultas. Es necesario pedir al laboratorio que realice una tipificación de ADN de alta resolución en cuanto a HLA-A, B, C y DRB1 del paciente para poder comenzar a buscar un donante no emparentado.

Donor Selection Exercise

Patient typing: A3, A24; B7, B49; DRB1 15, 11

Sibling #1 typing: A2, A26; B5, B27; DRB1 01, 04

Sibling #2 typing: A3, A24; B7, B49; DRB1 15, 11 

Is there an HLA identical donor? **YES**

Do they share the same haplotypes? **YES**

Patient typing: A3, A24; B7, B49; DRB1 15, 11

Sibling #1 typing: A2, A26; B5, B27; DRB1 01, 04

Is there an HLA identical donor? **NO**

Do we have enough information to find an 8/8 matched URD? **NO**



20

Diapositiva 21

Ahora tenemos un informe de tipificación HLA completo sobre el paciente. Noten que la tipificación incluye el asterisco en dos campos, lo cual significa que tenemos una tipificación a nivel alélico. También deben notar que algunos de los resultados de la tipificación de alta resolución se dan en forma de un código en vez de un número.

Un código alélico es una manera de mostrar que hay varios alelos posibles con la misma secuencia de ADN. Los códigos generalmente se listan al final del informe de tipificación; en este caso, se ven en color azul debajo del informe principal. En este caso, por ejemplo, A*24:KAKN indica que el alelo A24 puede ser 24:04 o 24:03, etcétera y que DRB1*11:JECW puede ser 11:01, 11:97 u 11:100.

Ahora, miramos el registro de donantes y encontramos cuatro donantes que podrían ser HLA compatibles. Vean que el primer donante no tiene una tipificación de alta resolución y no hay información sobre HLA-C. Este donante podría ser compatible, pero la tipificación no es suficiente para que podamos tomar una decisión. Vean también que los otros tres donantes tienen una tipificación de alta resolución porque hay un asterisco, lo que significa que se usó tecnología de ADN para la tipificación.

Comparen la tipificación del paciente con la del segundo donante. Verán que todos los números coinciden. Verán también que el donante tiene una compatibilidad A*24:02 que coincide con A*24:02 que se encuentra en el código A*24:KAKN, y que el donante tiene DRB1*11:01 que coincide con el DRB1 en el código 11:JECW.

El tercer donante también es compatible. En este caso, la tipificación del donante muestra A*24:ZPW. Si miramos el código, veremos que A*24:ZPW también incluye A*24:02. Consideramos que es compatible si dos códigos tienen uno de los mismos alelos.

El cuarto donante también es compatible. En este caso, la tipificación del donante muestra que los alelos de C son 07:CVAG y 07:FEAU. Si miramos los códigos, vemos que 07:CAVG incluye el 07:01 del paciente y que 07:FEAU incluye el 07:02 del paciente.

La respuesta a la pregunta es sí. Hay un donante con compatibilidad 8/8. De hecho, hay tres.

Donor Matching Exercise

Patient: A*03:01, *24:KAKN; B*07:01, *49:01; C*07:01, *07:02; DRB1 *15:01, 11:JECW		
Donor: A3, A24	B07, B49;	DRB1 *15:01, *11:01
Donor: A*03:01, *24:02;	B*07:01, *49:01; C*07:01, *07:02;	DRB1 *15:01, *11:01
Donor: A*03:01, *24:ZPW;	B*07:01, *49:01; C*07:01, *07:02;	DRB1 *15:01, *11:01
Donor: A*03:01, *24:ZPW;	B*07:01, *49:01; C*07:CVAG, *07:FEAU;	DRB1 *15:01, *11:01

Is there an
8/8 HLA matched donor?

YES

A*24:KAKN=*24:02/03/13/21/33/76/78/79/102/104/105/110/111/114/116-118, etc
A*24:ZWP=*24:02/05/07/20/21/25-27/35/37/38
C*07:CVAG=*07:01/06/18/52
C*07:FEAU=*07:02/50/66/74
DRB1*11:JECW=*11:01/97/100

 BE THE MATCH

Diapositiva 22

En las próximas diapositivas, vamos a explicar el papel que tiene la tipificación HLA en el resultado del trasplante de células hematopoyéticas, o HCT. La primera pregunta es si hay alguna diferencia entre este hermano HLA idéntico y un donante no emparentado HLA compatible ahora que podemos usar tipificación de alta resolución para buscar donantes no emparentados.

En un estudio retrospectivo en el que se usaron datos del Registro CIBMTR, se compararon 450 pacientes con LMC en fase crónica que recibieron un trasplante de un donante hermano HLA compatible con 667 pacientes que habían recibido un trasplante de donante no emparentado con compatibilidad HLA-A, B, C y DRB1; en otras palabras, compatibilidad 8/8. Este análisis mostró que la supervivencia era mayor en los pacientes con un donante hermano compatible y que había menos riesgo de GVHD.

Nos gusta estudiar pacientes con LMC en fase crónica porque tienen un bajo riesgo de recaída después del trasplante y es más fácil mostrar los efectos del trasplante en sí en un grupo de pacientes que fuera de eso sobrevivirían a largo plazo.

Los pacientes con leucemia, LAL o LMA están clasificados como con enfermedad más avanzada porque la causa de muerte más frecuente después del trasplante es la recaída. Pero en esta época, los pacientes a quienes más se recomienda recibir un trasplante tienen leucemia aguda y no leucemia crónica. Realizamos el estudio retrospectivo con pacientes que habían recibido un trasplante en el Fred Hutchinson Center por leucemia aguda.

Comparamos 885 receptores de injerto de donante hermano compatible con 563 pacientes con un donante con compatibilidad HLA 10/10 que también incluye compatibilidad HLA-DQ. No encontramos diferencias significativas en la supervivencia global ni en la supervivencia sin leucemia entre los dos grupos. No obstante, los receptores no emparentados sí tuvieron un riesgo mayor de GVHD.

Estos dos estudios juntos mostraron que los donantes no emparentados muy compatibles pueden ser tan buenos como los donantes hermanos compatibles en el tratamiento de algunas enfermedades, particularmente cánceres de alto riesgo. Por consiguiente, si no se cuenta con un hermano HLA compatible como donante, se debe tomar la decisión de si usar un donante no emparentado sopesando el riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante y enfermedad del injerto contra el huésped con el riesgo de recaída de la enfermedad.

Donor Selection

- Preference for HLA identical sibling

Early phase disease (e.g., CML-CP): Weisdorf, BBMT 2009
LFS & OS higher, aAGVHD & cGVHD lower, no difference in relapse for recipients of MSD (n=450) vs 8/8 URD (n=667)

Advanced disease (e.g., AML-CR2): Woolfrey, BBMT 2010.
aAGVHD & cGVHD lower, no difference in relapse, LFS, OS for recipients of MSD (n=885) vs 10/10 URD (n=563)

Balance of risks (TRM & relapse) depends on the disease phase & regimen intensity



BE THE MATCH

Diapositiva 23

Lamentablemente, la mayoría de los pacientes no cuentan con un hermano compatible como donante. Varios estudios han informado sobre el efecto de la incompatibilidad HLA a nivel alélico realizando una tipificación de alta resolución de muestras de donantes del NMDP y comparando los resultados mediante análisis retrospectivos.

El estudio más grande incluyó más de 3,800 pacientes que recibieron un régimen de acondicionamiento mieloablativo e injertos de médula ósea con linfocitos T para el tratamiento de un cáncer hematológico. Ni la incompatibilidad HLA-DQ ni la HLA-DP tuvieron un efecto significativo en el resultado en pacientes que, por lo demás, tenían compatibilidad HLA-A, B, C o DRB1.

Hubo un efecto de la incompatibilidad en los locus HLA-A, B, C o DRB1 con un riesgo relativo significativamente más alto de mortalidad y mortalidad relacionada con el trasplante, así como una supervivencia global más baja en quienes recibieron injertos con compatibilidad 7/8 que en quienes recibieron injertos con compatibilidad 8/8. En este estudio, tanto la incompatibilidad a nivel alélico como a nivel antigénico confirieron una peor supervivencia.

Una pregunta es si estos resultados podrían traducirse a los receptores de injertos de células madres de sangre periférica que cada vez se usan más en los trasplantes. Hay diferencias biológicas entre los productos de células madres de médula ósea y de sangre periférica, principalmente las dosis de linfocitos T y linfocitos CD34 son más altas en las células madres de sangre periférica, y también hay una alteración en las proporciones que son importantes en las células inmunitarias.

Por consiguiente, un segundo estudio en que se usó la tipificación retrospectiva en muestras del NMDP evaluó los desenlaces de 1,900 receptores de injertos de células madres de sangre periférica de donante no emparentado como tratamiento de cánceres hematológicos. En esta cohorte, el 35% de los pacientes recibió acondicionamiento de intensidad reducida. Los resultados confirmaron la falta de significación de la incompatibilidad en HLA-DP o HLA-DQ.

La incompatibilidad a nivel antigénico para HLA-A, B, C o DRB1 estuvo asociada con una mortalidad más alta. Sin embargo, a diferencia de los injertos de médula ósea, las incompatibilidades a nivel alélico aisladas no afectaron la mortalidad. Estos dos estudios juntos indican que, siempre que sea posible, el donante debe ser compatible con el paciente al nivel alélico en cuanto a HLA-A, B, C y DRB1.

Preference for Unrelated Donor Match at HLA-A, B, C, DRB1 (8/8 Match)

- Marrow Transplant (n=3,857): Lee, Blood 2007
 - Myeloablative regimen; T replete (79%); marrow (94%)
 - HLA-DQ or –DP mismatch- no significant effect on mortality, TRM, or relapse
 - Single mismatch (8/8 v. 7/8)- significant effect on mortality (RR 1.25), LFS (RR 1.23), & TRM (RR 1.4)
 - HLA-antigen vs. allele mismatch- no significant difference
- PBSC Transplant (n=1,933): Woolfrey, BBMT 2011
 - Myeloablative (65%) & RIC/NM (35%) regimens
 - HLA-DQ or –DP mismatch- no significant effect on mortality
 - Single antigen mismatch (8/8 vs 7/8)- significant effect on mortality (RR 1.33); single allele mismatch- (RR 1.11)



BE THE MATCH

Diapositiva 24

¿Y qué sucede si la única opción es un donante con una compatibilidad 7/8? ¿Hay alguna incompatibilidad que sea preferible? Este es un estudio de Stephanie Lee. Aquí se tienen en cuenta el riesgo relativo de mortalidad, la mortalidad relacionada con el trasplante y la enfermedad del injerto contra el huésped, según el locus de la incompatibilidad y usando donantes con compatibilidad 8/8 como referencia.

En este estudio de receptores de médula ósea, hubo un mayor riesgo de mortalidad cuando la incompatibilidad era de HLA-A o DRB1. De hecho, la incompatibilidad en HLA-B no fue estadísticamente significativa, excepto que aumentó el riesgo de GVHD. Por lo tanto, si se debe usar un donante incompatible, en este caso, se debe evitar una incompatibilidad HLA-A o DRB1.

Preferred HLA Mismatch for Marrow Donor

	Survival		TRM		Acute GVHD	
	RR	p	RR	p	RR	p
8/8	1.00		1.00		1.00	
A MM	1.36	<.0001	1.47	<.0001	1.57	<.0001
B MM	1.16	.20	1.32	.03	1.63	.001
C MM	1.19	.006	1.32	.0002	1.43	<.0001
DR MM	1.48	.0005	1.56	.0007	1.27	.16

"Preferred" Mismatch: A or DRB1 vs. B or C

RR 1.18 (1.10-1.38), p=0.04



BE THE MATCH

Lee, Blood 2007

24

Diapositiva 25

La elección puede ser diferente en el caso de un donante de células madres de sangre periférica. Aquí muestro el riesgo relativo de mortalidad de un estudio de células madres de sangre periférica de acuerdo con el locus de la incompatibilidad, usando un donante con compatibilidad 8/8 como referencia. Solo la incompatibilidad antigénica HLA-C fue estadísticamente significativa, en asociación con un riesgo mayor de mortalidad. La incompatibilidad alélica, incluso en el alelo C, fue mejor tolerada así como las incompatibilidades a nivel antigénico en cuanto a HLA-A y B.

En la línea de abajo se puede ver que la incompatibilidad antigénica HLA-C no es la misma que la incompatibilidad alélica C, que conlleva un riesgo significativamente menor de mortalidad. Por lo tanto, cuando se usa un donante de células madres de sangre periférica, se debe evitar seleccionar un donante que sea incompatible en cuanto a HLA-C.

Preferred Mismatch for PBSC Donor

Mortality	RR	95% CI	p value
8/8 match	1.00		
A allele MM	1.16	0.80-1.67	0.43
A antigen MM	1.17	0.88-1.55	0.29
B allele MM	1.29	0.92-1.28	0.14
B antigen MM	1.01	0.50-2.04	0.97
C allele MM	0.82	0.57-1.19	0.30
C antigen MM	1.41	1.16-1.70	0.0005
DRB1 MM	1.30	0.87-1.94	0.20
C allele vs. antigen	0.58	0.39-0.88	0.009

Avoid HLA-C Antigen mismatch

Switching to marrow does not change risk



BE THE MATCH

25

Nos preguntamos si el único donante disponible fuera incompatible en HLA-C, ¿deberíamos cambiar de sangre periférica a médula ósea? Así, comparamos el resultado de la incompatibilidad HLA-C en receptores de sangre periférica con la incompatibilidad HLA-C en receptores de médula ósea del estudio de Stephanie Lee y no encontramos diferencias en los resultados. Cambiar a médula ósea no cambia el riesgo con un donante con incompatibilidad HLA-C.

Diapositiva 26

También nos preguntamos si los resultados con una incompatibilidad HLA-C corresponderían tanto al acondicionamiento mieloablativo como al no mieloablativo de intensidad reducida. Aquí se ve el riesgo de mortalidad en pacientes que recibieron acondicionamiento mieloablativo o acondicionamiento no mieloablativo usando donantes con compatibilidad 8/8 en cada grupo como referencia.

En ambos análisis, la mortalidad estuvo significativamente asociada con la incompatibilidad en cuanto al antígeno HLA-C, mientras que no hubo un riesgo mayor con ninguna otra incompatibilidad antigénica o alélica. Por lo tanto, los resultados parecen ser los mismos, independientemente de la intensidad del acondicionamiento, en los pacientes que reciben injertos de células madres de sangre periférica.

Preferred Mismatch for RIC PBSC HCT									
Mortality	Myeloablative					Non-myeloablative			
	N	OR	95% CI		P	N	OR	95% CI	
8/8 Match	796	1.00				447	1.00		
7/8 C Ag	122	1.42	1.08	1.87	0.01	65	1.71	1.21	2.43
7/8 Other Ag	77	1.26	0.89	1.77	0.19	24	0.72	0.36	1.44
7/8 Allele	130	1.23	0.93	1.63	0.15	78	1.05	0.74	1.49

Avoid HLA-C Antigen mismatch

BE

THE MATCH

26

Diapositiva 27

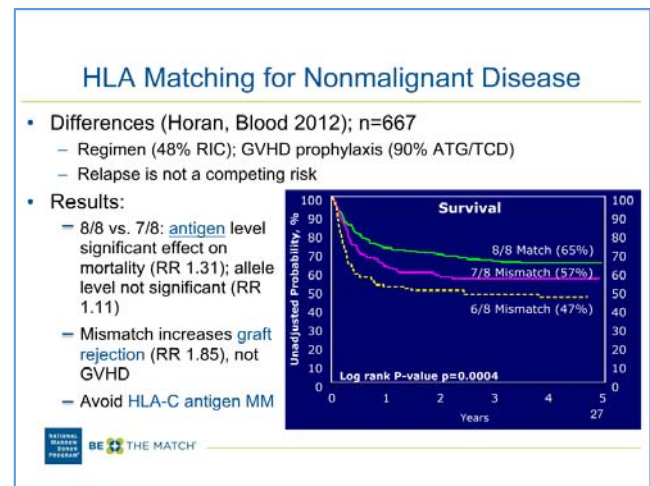
No se puede presuponer que los resultados en los estudios de pacientes con un cáncer hematológico se puedan aplicar a los pacientes que reciben un trasplante para el tratamiento de enfermedades no cancerosas, como la anemia aplásica.

Realizamos un análisis retrospectivo de 667 pacientes con enfermedades no cancerosas que recibieron trasplantes de donantes no emparentados. Algunas diferencias importantes en comparación con los estudios previos fueron que casi la mitad de los pacientes recibieron regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida y casi todos los pacientes recibieron injertos sin leucocitos T, o recibieron anticuerpos anti-leucocitos T, como ATG, o ambas cosas. Además, el resultado del trasplante no está determinado por la recaída. De hecho, la mortalidad está íntegramente relacionada con las complicaciones del procedimiento del trasplante.

Aquí se ven los resultados del estudio. Hay una asociación significativa con el grado de incompatibilidad HLA en los resultados con una supervivencia del 65% para los pacientes con donantes con compatibilidad 8/8, 57% para los pacientes con donantes con compatibilidad 7/8 y 47% para los pacientes con donantes con compatibilidad 6/8. Encontramos que la incompatibilidad a nivel antigénico pero no la de nivel alélico, estuvo significativamente asociada con un aumento de la mortalidad.

A diferencia de los pacientes que reciben trasplantes para cánceres hematológicos, no encontramos una correlación entre la incompatibilidad HLA y el riesgo de GVHD. Sin embargo, la incompatibilidad HLA estuvo fuertemente correlacionada con el riesgo de rechazo del injerto.

Finalmente, el análisis específico para el locus mostró que la incompatibilidad antigénica HLA-C es el único locus asociado con mortalidad. Por consiguiente, si se debe usar un donante no compatible para un paciente con una enfermedad no cancerosa, se debe evitar la incompatibilidad HLA-C.



Diapositiva 28

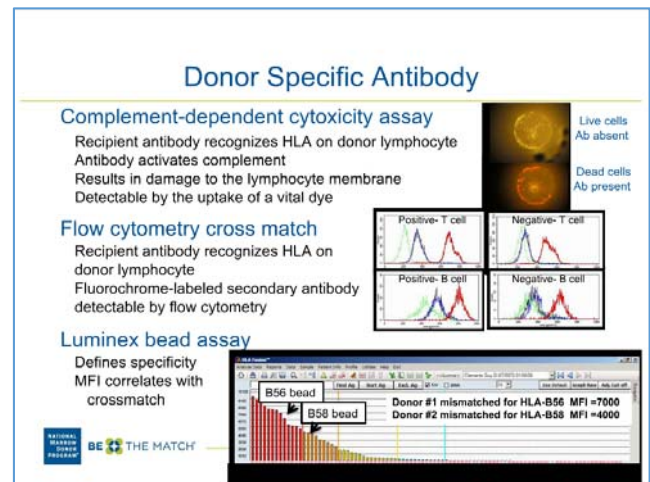
En la selección del donante no emparentado más compatible también deben tenerse en cuenta los anticuerpos específicos contra el donante, o DSA. Un DSA es un anticuerpo que se encuentra en un paciente y que reacciona contra un HLA específico que se encuentra en un posible donante. Es particularmente importante la detección de DSA en una situación en la que se debe usar un donante HLA incompatible.

¿Cómo detectamos DSA? Hay varios ensayos. Ensayos de compatibilidad cruzada con células del donante mezcladas con suero del paciente. En el ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento, el anticuerpo del paciente que se fija a las células del donante activará el complemento y causará la muerte celular, que puede detectarse visualmente bajo microscopio.

En el ensayo de compatibilidad cruzada por citometría de flujo, el pico verde es el control negativo. El pico rojo es el control positivo y el pico azul es el suero del paciente contra los linfocitos B o T del donante. En el panel de la izquierda, se puede ver un ejemplo de una compatibilidad cruzada positiva. El pico azul se desplaza hacia la derecha, hacia el control positivo. En el panel de la derecha se ven compatibilidades cruzadas negativas. El pico azul no se desplaza.

El ensayo de microesferas Luminex no requiere que las células del donante identifiquen un posible anticuerpo específico del donante. En este ensayo se usan microesferas revestidas en HLA que se mezclan con el suero del paciente para detectar un anticuerpo contra el HLA. En este ejemplo, el paciente ha detectado anticuerpos contra HLA-B56 y HLA-B58, entre otros. Si se detecta un anticuerpo en uno de estos ensayos, entonces podemos tratar de evitar un donante que tenga ese antígeno HLA.

Por ejemplo, el ensayo de microesferas Luminex ha detectado múltiples anticuerpos anti-HLA en el paciente. Podemos usar estos resultados para excluir a algunos donantes potenciales. Por ejemplo, el donante número 1 con HLA-B56 quedaría excluido y el donante número 2 con HLA-B58 también quedaría excluido.



Diapositiva 29

Los ensayos de compatibilidad cruzada también se pueden usar para ayudarnos a seleccionar el mejor donante. Las compatibilidades cruzadas positivas para linfocitos T y B sugieren que el anticuerpo del paciente es HLA de clase I. Por lo tanto, los donantes deben ser compatibles con el paciente en la clase I. Una compatibilidad cruzada linfocito B positiva y linfocito T negativa sugiere que el anticuerpo es anti-HLA de clase II, porque recuerden que los linfocitos T no expresan constitutivamente el HLA de clase II. Por consiguiente, los donantes deben ser compatibles con el paciente en cuanto a HLA de clase II.

Podemos entonces determinar que el anticuerpo es clínicamente relevante; esto significa que es un anticuerpo IgG específico contra el antígeno HLA.

Varios estudios han demostrado ahora que el anticuerpo específico del donante clínicamente relevante está asociado con el rechazo del injerto. Por lo tanto, al seleccionarse un donante HLA incompatible deben evitarse los donantes incompatibles en cuanto a antígenos identificados mediante un cribaje de DSA.

Preference for DSA-Negative Donor

Does the recipient have antibodies to donor cells (sensitivity)

<u>Antibody to class I</u>	<u>Antibody to class II</u>
T cell positive	T cell negative
B cell positive	B cell positive

Is the antibody clinically relevant (specificity)

<u>Relevant</u>	<u>Likely irrelevant</u>
IgG to HLA	IgM antibodies
	Non-HLA antibody
	Autoantibody

Clinically relevant DSA associated with increased risk for graft rejection ($p=0.0014$) Ciurea, et al Blood 2012

  THE MATCH

29

Diapositiva 30

No todos los pacientes conseguirán donantes no emparentados HLA compatibles o aceptablemente incompatibles. La sangre de cordón umbilical es una excelente alternativa. ¿Cómo se elige la mejor unidad de sangre de cordón umbilical? Un factor importante es la compatibilidad HLA.

Múltiples estudios han demostrado que el receptor de un trasplante tolera un mayor grado de incompatibilidad HLA si recibe sangre de cordón umbilical que si recibe médula ósea de donante no emparentado. Por lo tanto, en general, los criterios de compatibilidad HLA con la sangre de cordón umbilical son más laxos.

Por ejemplo, buscamos compatibilidad en seis locus en vez de ocho, e incluye HLA-A, B y DRB1. Esos estudios no encontraron ninguna diferencia en los resultados al comparar una unidad con compatibilidad 5/6 con una unidad 6/6. La mortalidad parece aumentar con las unidades 4/6, en comparación con las unidades 5/6 o 6/6.

Otro factor importante es el número de células madres en la unidad de sangre de cordón. En todas las unidades de sangre de cordón se conoce el número total de células nucleadas (o TNC) y con frecuencia también se sabe el número de linfocitos CD34 positivo. Esos estudios sugieren que el resultado es mejor cuando el TNC es al menos $2.5 \times 10^7/\text{kg}$ de peso del receptor y/o con dosis CD34-positivas de al menos $2.0 \times 10^5/\text{kg}$ de peso del receptor.

El uso de una unidad con una dosis de células madres menor está asociado con una mayor mortalidad y mayor riesgo de rechazo del injerto. La infusión de dos unidades, que se llama trasplante de sangre de cordón umbilical doble, puede ser una manera eficaz de aumentar la dosis de células total, lo que favorece que el injerto prenda y disminuye la mortalidad.

Finalmente, hay datos que demuestran que el DSA también incide en el resultado de los trasplantes de sangre de cordón umbilical. Por consiguiente, identificar el anticuerpo anti-HLA del paciente y evitar las unidades que contengan antígenos parece mejorar el resultado. Estos resultados generan ciertos interrogantes y no siempre está claro qué es más importante: si la dosis de células o la compatibilidad HLA.

Selection of Umbilical Cord Blood Units

- Higher degree of HLA-mismatch tolerated by recipient
 - Matching criteria looser: HLA-A, B, & DRB1 (6 loci)
Eapen, Lancet Onc 2011
 - 5/6 equivalent to 6/6
 - Mortality increases with 4/6 match
- Cell dose is a critical factor
 - TNC $2.5 \times 10^7/\text{kg}$ &/or CD34+ $2.0 \times 10^5/\text{kg}$
Wagner, Blood 2002
Cohen, BMT 2011
Barker, Blood 2005
 - Mortality increases with lower dose (RR 1.67)
 - Using 2 units effectively increases the cell dose
- DSA is important for UCB- 2-fold increase in mortality
Takanashi, Blood 2005

- Can we put the factors together?



Diapositiva 31

Un estudio que ayuda a poner en perspectiva la cuestión de la dosis de células frente a la compatibilidad HLA es un análisis retrospectivo de trasplantes de una sola unidad de sangre de cordón umbilical en pacientes adultos realizado por el grupo de Sloan-Kettering. Compararon los resultados en cuanto a la compatibilidad HLA y el tamaño de la unidad y encontraron que ambos factores son significativos y están correlacionados con la supervivencia.

Eligieron una cohorte que recibió una unidad con compatibilidad 5/6 con un TNC de 2.5 a $4.9 \times 10^7/\text{kg}$ de peso del receptor como grupo comparativo. En comparación con este grupo, el riesgo de mortalidad o mortalidad relacionada con el trasplante aumentó con cualquier unidad incompatible con una dosis de células inferior a 2.5×10^7 y con cualquier unidad con una compatibilidad 3/6. Dentro del intervalo de dosis de 2.5 a 4.9 , las unidades con compatibilidad 4/6 conllevaron un riesgo más alto de mortalidad relacionada con el trasplante (o TRM) que las unidades con compatibilidad 5/6. Sin embargo, una unidad con compatibilidad 4/6 con una dosis de células de al menos 5×10^7 pareció conllevar el mismo riesgo de mortalidad que una unidad con compatibilidad 5/6 con una dosis de células de entre 2.5 y 4.9 .

Este estudio sugiere que las unidades se deben seleccionar teniendo en cuenta primero la dosis de células usando un límite inferior de $2.5 \times 10^7/\text{kg}$ de peso del receptor. Por encima de esa dosis, las unidades se deben seleccionar basándose en la mejor compatibilidad HLA. Por lo tanto, si tenemos una unidad con compatibilidad 5/6 con un TNC mayor de 2.5 , no parece haber un beneficio en seleccionar una unidad con compatibilidad 4/6 solo para incrementar la dosis de células. Por ejemplo, de acuerdo con este estudio, una unidad con compatibilidad 4/6 con una dosis de células de 4×10^7 no sería una mejor opción.

Selection of Umbilical Cord Blood Units

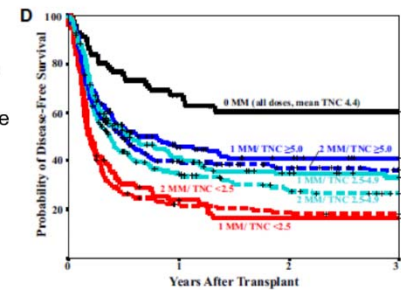
HLA / TNC	N	Overall Mortality		TRM	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
0 MM	56	0.5 (0.3-0.9)	0.11	0.4 (0.2-0.9)	0.19
1 MM $>5.0 \times 10^7/\text{kg}$	155	0.9 (0.7-1.3)	0.693	0.8 (0.6-1.3)	0.391
2 MM $>5.0 \times 10^7/\text{kg}$	212	1.0 (0.8-1.4)	0.822	1.0 (0.7-1.5)	0.847
1 MM $2.5-4.9 \times 10^7/\text{kg}$	130				
2 MM $2.5-4.9 \times 10^7/\text{kg}$	240	1.2 (0.9-1.5)	0.120	1.5 (1.1-2.1)	0.14
1 MM $<2.5 \times 10^7/\text{kg}$	67	1.5 (1.1-2.2)	0.018	1.9 (1.3-2.9)	0.002
2 MM $<2.5 \times 10^7/\text{kg}$	136	1.7 (1.3-2.3)	<0.001	2.4 (1.7-3.4)	<0.001
3 MM	65	1.5 (1.0-2.1)	0.039	1.7 (1.1-2.6)	0.020

Diapositiva 32

Estas son las curvas de supervivencia de cada cohorte. La línea verde lisa es un grupo de referencia de unidades con compatibilidad 5/6 con una dosis de células de entre 2.5 y 4.9. La línea negra son todas unidades con compatibilidad 6/6, independientemente de la dosis de células. La línea roja muestra un resultado inferior con unidades con dosis menores de células. Como pueden ver, no se ganó nada con cambiar de una unidad con compatibilidad 5/6 a una unidad con compatibilidad 4/6 si la dosis de células de la unidad con compatibilidad 5/6 excede 2.5.

Selection of Umbilical Cord Blood Units

- Above a threshold TCN ($>2.5 \times 10^7/\text{kg}$) HLA matching trumps cell dose



Diapositiva 33

Resumamos lo que hemos aprendido de estos estudios sobre la selección óptima de donantes. Cuando tenemos la opción de encontrar un donante no emparentado, el mejor resultado se logra con un donante con una compatibilidad HLA de 8/8. Si el único donante disponible tiene una compatibilidad 7/8, entonces el donante incompatible óptimo dependerá de cada situación en particular.

Para lograr un trasplante de médula ósea óptimo, se deben evitar las incompatibilidades HLA-A o DRB1. Para lograr trasplantes de células madres de sangre periférica óptimos, se debe evitar la incompatibilidad HLA-C. Cuando se planea un acondicionamiento de intensidad reducida, se debe evitar la incompatibilidad HLA-C. Cuando el trasplante es para el tratamiento de una enfermedad no cancerosa, se debe evitar la incompatibilidad HLA-C.

La incompatibilidad a nivel alélico confiere aproximadamente la misma desventaja que al nivel antigénico, con la excepción de HLA-C, donde las incompatibilidades a nivel alélico parecen tolerarse mejor. Finalmente, si el paciente tiene un anticuerpo anti-HLA, se debe evitar seleccionar un donante con ese alelo HLA específico.

Summary of Donor Selection

- Volunteer Unrelated Donor
 - High resolution 8/8 HLA match preferred
 - Selection of 7/8 match:
 - Marrow- avoid HLA-A & DRB1 mismatch
 - PBSC- avoid HLA-C antigen mismatch
 - RIC regimen- avoid HLA-C antigen mismatch
 - Nonmalignant diseases- avoid HLA-C antigen mismatch
 - Mismatch for allele = antigen (except HLA-C)
 - Avoid mismatch defined by DSA

Diapositiva 34

La selección óptima de una unidad de sangre de cordón umbilical incluye usar un umbral de dosis de células óptimo. Se debe seleccionar la unidad de mayor compatibilidad HLA entre las unidades que excedan el umbral de dosis de células. Si es posible, se debe determinar si el paciente tiene anticuerpos anti-HLA específicos y evitar unidades con este antígeno HLA.

Summary Donor Selection (2)

- Umbilical Cord Blood Unit
 - Use an optimal cell dose threshold (TNC $>2.5 \times 10^7/\text{kg}$ or CD34+ $>2.0 \times 10^5/\text{kg}$)
 - Select best HLA match above threshold
 - Avoid mismatch defined by DSA

Diapositiva 35

Espero que esta exposición les haya ayudado a entender mejor el HLA y su contribución a la selección de donantes. Los puntos para recordar más importantes son estos: Las moléculas de HLA cumplen una función fundamental en la respuesta inmunitaria humana. El complejo genético HLA consiste en múltiples genes altamente polimórficos que se heredan como haplotipos. La nomenclatura de los genes HLA se usa para describir las variantes alélicas para cada locus. La selección del donante debe tener en cuenta el genotipo HLA, el fenotipo, la tipificación al nivel alélico y el vector de alorreactividad.

Summary

- HLA molecules have a fundamental role in the human immune response.
- The HLA gene complex consists of multiple highly polymorphic genes that are inherited as haplotypes.
- The nomenclature for HLA genes is used to describe the allele variants for each locus.
- Donor selection must consider the HLA genotype, phenotype, allele level typing, and the vector of alloreactivity.