



## ROL DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS LEUCOCITARIOS, PLAQUETARIOS Y DE GRANULOCITOS EN MEDICINA TRANSFUSIONAL

### Sistema HLA en trasplantes y otras enfermedades

#### Tipificación HLA para trasplante

Los genes que codifican los antígenos HLA clase I y II están fuertemente ligados, de tal forma que se heredan en familias o bloques conocidos como haplotipos, con bajas frecuencias de recombinación. El genotipo HLA de un individuo refleja dos haplotipos, uno heredado de la madre y otro del padre. Para un paciente dado, existe una probabilidad del 25% que un hermano herede los mismos haplotipos materno y paterno, siendo por lo tanto HLA-genéticamente idéntico. Cuando el donante debe ser buscado fuera de la familia, los chances de encontrar un individuo HLA genéticamente idéntico son extremadamente bajos, dado que los antígenos HLA son altamente polimórficos, con cientos de tipos diferentes encontrados en humanos para cada gen relevante.

El término "HLA compatible" aplicado a individuos no relacionados, define la compatibilidad estrictamente de los polimorfismos que comprende la prueba de tipificación. Actualmente para el Trasplante de medula ósea se tipifican rutinariamente los loci HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DRB1 como mínimo (Bray et al, 2008). Dado que cada individuo tiene 2 antígenos para cada uno de estos loci, los niveles de compatibilidad entre donante y paciente se denotan por un fraccionario, por ejemplo 4/6, 5/6 o 6/6 si sólo los HLA-A, -B y -DR son tipificados, ó 9/10 o 10/10 cuando se tipifican además HLA-C y HLA-DQB1. Aún es materia de investigación cual o cuales loci son mejores candidatos para tolerar una incompatibilidad.

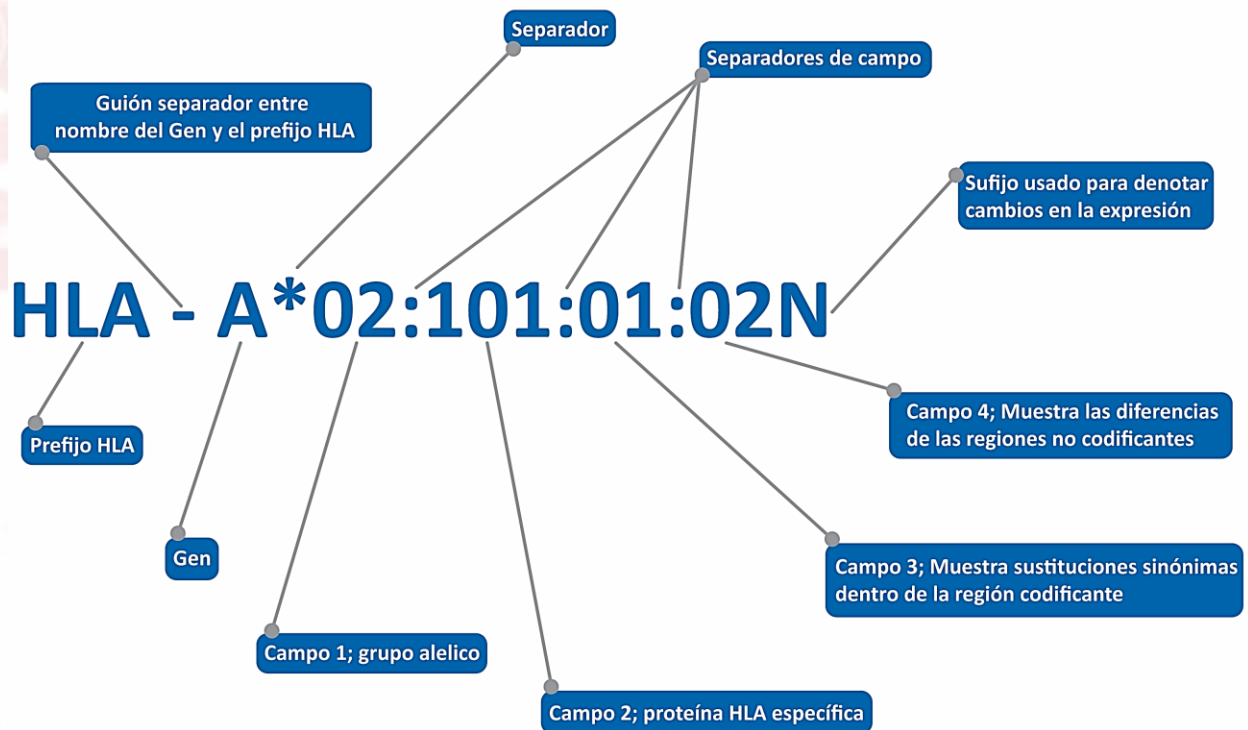
La nomenclatura del sistema HLA ha sufrido continuas modificaciones con el paso del tiempo, reflejando no solamente los cambios en las técnicas de tipificación (pruebas serológicas vs basadas en DNA), sino también la importancia de una nomenclatura cada vez más precisa. En la décima edición del International Histocompatibility Workshop (IHW) se adoptó nomenclatura de los alelos del HLA en base a la secuencia de nucleótidos (Shaw, 2008). Recientemente una nueva nomenclatura fue concertada (Marsh, 2010a y b), como se explica en la figura 1 y se ejemplifica en la tabla 1.

Las técnicas de tipificación pueden resultar en baja, media, alta resolución o resolución alélica. La baja resolución provee una tipificación serológica (antigénica). La tipificación de media



resolución implica que el resultado obtenido es más específico que la tipificación serológica, pero no lo suficientemente discriminatoria para proveer una asignación precisa del alelo. Los métodos de alta resolución permiten mayor poder de discriminación entre un set de potenciales alelos candidatos, mientras el nivel alélico ofrece la posibilidad de eliminar la mayor cantidad de ambigüedades.

## Nomenclatura del HLA - 2011



**Fig. 1** Significado de los términos usados en la nueva nomenclatura del sistema HLA (Tomado de: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)



**Tabla 1.** Ejemplos de nomenclatura del sistema HLA

NOMENCLATURA	SIGNIFICADO
HLA	Prefijo del locus HLA correspondiente
HLA-DRB1	Se refiere a cada locus en particular
HLA-DRB1*13	Asignación molecular de cada alelo en baja resolución
HLA-DRB1*13:01	Especifica el subtipo correspondiente de cada alelo en alta resolución
HLA-DRB1*13:01:02	Siempre que se adicione un 02 a la nomenclatura del subtipo esto indica una mutación sinónima del alelo DRB1*13:01:01
HLA-DRB1*13:01:01:02	Indica que este alelo tiene una mutación que esta por fuera de la región codificante de DRB1*13:01:01:01
HLA-A*24:09N	Indica la existencia de un alelo nulo que no se expresa
HLA-A*30:14L	Indica baja expresión de la proteína en la superficie celular
HLA-A*24:02:01:02L	Indica baja expresión de la proteína en la superficie celular pero la mutación es encontrada por fuera de la región codificante
HLA-B*44:02:01:02S	Indica que la proteína codificada solo se presenta a nivel serológico, no a nivel celular
HLA-A*32:11Q	indica baja expresión de la proteína en la superficie celular pero su existencia no ha sido confirmada

Tomado de: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

Todas las técnicas de resolución media a alta empleadas actualmente están basadas en PCR. Solo pequeñas cantidades de DNA son requeridas, cuyas fuentes pueden ser sangre o saliva. Están disponibles diversos kits de extracción comerciales comúnmente asociados a



procedimientos automatizados o semirobóticos que procuran erradicar errores en el etiquetado. Las muestras de DNA pueden ser almacenadas en pequeñas alícuotas, reduciendo el espacio necesario y el costo de almacenamiento.

En la técnica PCR-SSP (en inglés: sequence specific primers), un panel de primers específicos designados para detectar todos los polimorfismos de un locus particular son usados en una reacción de PCR. Los productos son luego corridos sobre geles de agarosa y el tipo HLA es inferido de la presencia o ausencia de bandas específicas de las varias PCRs. Es un método rápido de mediana a alta resolución, dependiendo del número de primers usados, aunque incluso puede proveer resultados a resolución alélica si son usados primers de alta especificidad.

La técnica SSOP (en inglés: sequence specific oligonucleotide probing) ofrece resoluciones de media a alta, dependiendo del número de pruebas (oligonucleótidos) utilizadas. Esta técnica involucra la inmovilización de los productos amplificados en la PCR sobre una membrana de nylon. Los polimorfismos presentes en el producto amplificado son detectados usando un número de pequeños oligonucleótidos "prueba" los cuales están marcados para reaccionar con estas secuencias específicas. Otros métodos utilizados también son formas de SSO como el Lipa, dot blot reverso, y Luminex. Este último es una plataforma de múltiples arreglos en base a microesferas acopladas a un citómetro de flujo avanzado donde hasta más de 100 reacciones diferentes pueden ser analizadas y reportadas en una misma muestra. Cada microesfera tiene un oligonucleótido diferente anclado a su superficie. El producto de la PCR, el cual esta biotinilado, es luego hibridado a las esferas. Este sistema permite manejar altos volúmenes de trabajo gracias al corto tiempo del análisis.

Mediante un secuenciador es posible determinar la secuencia de nucleótidos de los exones polimórficos, técnica conocida como tipificación en base a secuencia o SBT (en inglés: sequence-based typing) (Rozemuller et al, 1995; Scheltinga et al, 1997). Se realiza una PCR, pretendiendo amplificar ambos alelos para un locus dado. Los dos alelos son luego secuenciados como una mezcla en un gel de poliacrilamida, luego de la adición de pruebas fluorescentes. Los resultados son luego analizados usando un software especial el cual identifica las áreas de heterocigocidad. De las comparaciones de los patrones obtenidos con aquellos esperados para todas las combinaciones de alelos, los posibles tipos en la muestra pueden ser inferidos por el software. La tipificación a nivel alélico también puede alcanzarse por secuenciamiento específico del locus, aunque esto incrementa las rondas de secuenciamiento. El SBT es más lento que el SSP y requiere de una base de datos actualizada de



todos los alelos HLA para resolver eficientemente todas las ambigüedades que puedan presentarse. En los últimos años, el advenimiento de la denominada NGS - Next Generation Sequencing (en inglés: secuenciación de siguiente generación) se ha establecido como toda una revolución en la ciencia genómica. Esta robusta y cada vez más accesible tecnología, se perfila como la solución a varias de las limitantes de la SBT en el estudio de la inmunología del trasplante (Johnsen et al., 2013).

Finalmente, las técnicas serológicas usan anticuerpos para detectar los antígenos sobre la superficie celular. La mayor limitación de esta técnica es que únicamente una minoría de los alelos HLA clase I y II tienen un equivalente serológico, y por lo tanto no son reconocidos. Esta técnica solo debería usarse en combinación con otras (Shaw, 2008).

### **El reconocimiento de lo propio y lo extraño a nivel del sistema inmune.**

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad dirigen la selección de clonas autoinmunes a través de las moléculas HLA en el timo embrionario durante la embriogénesis. Este proceso garantiza la individualidad biológica característica de la mayoría de los seres vivos. Se inicia con el ingreso de todos los clones de células inmunes del embrión a su médula tímica, donde están expresadas todas las proteínas heredadas por el individuo. Invariablemente todas las células inmunocompetentes que reconozcan cualquier proteína propia en la médula tímica serán eliminadas, proceso mediado por las moléculas HLA. Del 100% de las células que ingresan, solo un pequeño porcentaje salen vivas del timo para ir a colonizar los reservorios de células inmunes tales como la médula ósea, el bazo, los ganglios y el hígado, entre otros.

Es importante tener en cuenta que una vez nacemos las células inmunes que portamos y que durante toda la vida nos defienden contra cualquier cuerpo extraño, no nos reconocen; para las células de nuestro sistema inmune no existimos y cuando nos logran reconocer vienen las enfermedades autoinmunes. Es así como el sistema HLA puede distinguir lo propio de lo extraño, no ataca lo propio porque no lo reconoce (Zinkernagel et al., 1973).

### **HLA y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH)**

El TCPH es inmunológicamente particular comparado con otros tipos de trasplante. En el trasplante de órgano sólido, el injerto (órgano) contiene sólo un número limitado de células con



función inmunológica, haciendo que la preocupación clínica principal sea la prevención del rechazo al injerto por el sistema inmune del receptor (Martin, 2008). Gracias a ello, la administración de por vida de inmunosupresores es usualmente necesaria.

El régimen de preparación administrado previo al TCPH elimina la mayoría de los precursores y células maduras del sistema inmune del receptor, aunque no la totalidad. El injerto, por su parte, contiene un amplio número de células precursoras y maduras destinadas a reemplazar y generar de nuevo el sistema inmune del receptor. Así, la preocupación clínica principal no solo radica en prevenir el rechazo del injerto mediado por las células sobrevivientes al régimen de condicionamiento, sino también en prevenir que las células del donante causen enfermedad injerto vs huésped (EIVH), permitiendo al tiempo la reconstitución inmunológica.

La terapia inmunosupresora administrada posterior al TCPH busca principalmente la prevención de la EIVH, por lo que eventualmente es posible discontinuar el tratamiento. La persistencia del injerto, la ausencia de EIVH y el restablecimiento del sistema inmune del receptor indican que se ha alcanzado un estado de "tolerancia inmunológica" entre donante y receptor.

Compartir antígenos de histocompatibilidad continua teniendo gran importancia en el trasplante de órganos vascularizados y de células madre hematopoyéticas, en especial para el balance entre el rechazo del injerto y el efecto injerto vs tumor. Para los trasplantes alogénicos no relacionados de adultos, se prefieren grados de compatibilidad no menores de 6/8, mientras que para cordón umbilical no menos de 4/6.

Durante la segregación de los haplotipos del HLA en la progenia, puede suceder que entre dos hermanos no compartan ninguno de los 4 haplotipos parentales a pesar de ser tanto la paternidad como la maternidad compatibles. Esta situación es aún peor cuando el donante debe ser buscado fuera de la familia. En teoría, para que dos personas independientes, es decir que no provengan de un tronco familiar común, compartan los 5 loci, queriendo decir con compartir, que sean HLA idénticos, sucede que se daría una vez cada 21.000.000.000 millones de seres humanos aproximadamente. En la realidad este valor es menor dado que la frecuencia de estos genes varía enormemente, siendo más o menos frecuentes en los diferentes grupos étnicos.



### **HLA y enfermedades autoinmunes**

Se han producido grandes desarrollos en el conocimiento de la etiología y la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, donde los genes HLA clase I y II se encuentran claramente comprometidos en la predisposición o susceptibilidad a la autoinmunidad (Rizzo et al., 2014), campo en el cual el estudio del HLA jugará un papel de primera línea en la predicción y prevención de este tipo de enfermedades. Fue la espondilitis anquilosante y su relación con el HLA-B27, la patología que despegó la atención sobre el estudio del HLA y la susceptibilidad a enfermedades.

### **HLA y enfermedades infecciosas**

El sistema HLA también se encuentra asociado y comprometido con la susceptibilidad o resistencia a las enfermedades infecciosas (Trowsdale & Knight, 2013). Aquí se puede ver claramente cómo los antígenos de histocompatibilidad, tanto de la clase I y de la clase II, tienen un rol primordial para la eficiente presentación de antígenos ya sean extracelulares o intracelulares durante la respuesta inmune adaptativa y efectora respectivamente. Es a este nivel donde podemos distinguir las personas que portan alelos HLA que les hacen buenos respondedores o, por el contrario, malos respondedores a las diversas ofensas proferidas por los microorganismos con quienes inevitablemente compartimos nuestro hábitat. Los buenos respondedores estarán mejor adaptados y con el tiempo abundarán y con ellos sus polimorfismos HLA, mientras que los menos adaptados disminuirán en frecuencia. Esta es una de las causas por las cuales se da una marcada estructura geográfica en la distribución de las frecuencias de las moléculas HLA

### **HLA y otras enfermedades**

El HLA también presenta una fuerte asociación con otros desordenes tales como cáncer, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson y diabetes entre otras. Una de las primeras asociaciones del HLA con tumores cancerosos fue con el linfoma de Hodgkin, lo cual hizo muy prometedor el estudio de las asociaciones de este sistema genético y cáncer. Falta aún mucho terreno por recorrer a este respecto y solo en el próximo futuro se espera encontrar y acumular mayor cantidad de información sobre este importante tema de salud pública



### HLA y farmacogenética

Se espera que el conocimiento del HLA se incremente en el campo de la farmacogenética, área que estudia las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos y vacunas basadas en epítopes. Es muy reciente el descubrimiento y además sorprendente encontrar que dependiendo del HLA que porte una persona así mismo puede responder diferencialmente a ciertos medicamentos, especialmente a aquellos cocteles, muy comunes en los casos de inducción de inmunosupresión o para tratamientos antivirales, como es el caso del Abacavir, uno de los medicamentos con el cual se trata al retrovirus del VIH. Notaron que los pacientes en tratamiento y que eran portadores del HLA B\*57:01 presentaban fuertes reacciones hepáticas y muchas veces sistémicas al tratamiento con este coctel de medicamentos. Ahora, antes de medicarlos, como rutina deben ser tipificados para este alelo HLA y así evitar los daños colaterales que venían sufriendo estos pacientes. Hoy en día se conocen varios medicamentos que presentan fuerte reacción de acuerdo con el alelo HLA que porte el paciente (Mallal et al., 2008).

### HLA y fertilidad

Sigue siendo debatida la participación de las moléculas HLA en la elección de pareja a través del sistema olfatorio femenino, donde la mujer puede detectar compatibilidad genética con un hombre mediante el olor que este exhale en algunas de sus secreciones, dándole la categoría de feromona a las moléculas HLA (Jacobs et al., 2002). Existen evidencias en animales experimentales, especialmente en ratones, donde se ha demostrado que el sistema H2, el homólogo al HLA humano, está relacionado directamente con la elección de pareja y que su sistema de histocompatibilidad se comporta como una feromona que rige la elección de una manera dirigida, con lo cual se evita el incesto (Cavalho et al., 2004).

### Bibliografía

Bray RA, Hurley CK, Kamani NR, et al. National Marrow Donor Program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(9, Suppl. 3):45-53.



Cavalho-Santos, P.S., Schinemann, J.A., Gabardo J. & Da Graça Biecalho, M. (2004). New evidence that MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students. *Elsevier*. 47, 384-388

Jacob, S., McClintock, M. K., Zelano, B., and Ober, C. (2002). Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. *Natural Genetics*. 30, 175-179.

Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood*. 2013 Nov 7;122(19):3268-75

Mallal. S., Phillips, E., Giampiero, C., Abad Santos, F. (2008). Aplicación clínica de la farmacogenética HLA-B\*5701 para evitar la hipersensibilidad a abacavir. *Actualidad en farmacología en terapéutica*. 6, 147-149.

Marsh et al. A nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 2010a; 75:291-455

Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, et al. *An update to HLA nomenclature, 2010*. *Bone Marrow Transplant*. 2010b May;45(5):846-8

Martin PJ (2008) Overview of Hematopoietic Cell Transplantation Immunology. In: Appelbaum et al. (eds.) *Thomas's hematopoietic cell transplantation*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, cap 11.

Rizzo R, Bortolotti D, Bolzani S, Fainardi E. HLA-G Molecules in Autoimmune Diseases and Infections. *Front Immunol*. 2014 Nov 18;5:592

Rozemuller EH, Bouwens AG, van Oort E et al. Sequencing-based typing reveals new insight in HLA-DPA1 polymorphism. *Tissue Antigens* 1995;45:57-62

Scheltinga SA, Johnston-Dow LA, White CB et al. A generic sequencing based typing approach for the identification of HLA-A diversity. *Hum Immunol* 1997;57:120-128

Shaw BE. (2008) Human leukocyte antigen matching, compatibility testing and donor selection. In: Treleaven J & Barret AJ (eds). *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice*. Oxford, UK: Churchill Livingstone Elsevier, cap. 23.

Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:301-23

Zinkernagel, R. Y Doherty, P. (1973). Cytotoxic thymus-derived lymphocytes in cerebrospinal fluid of mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Expmed*. 138:1266-9.