

## Estudios inmunológicos en la pareja donante/receptor para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

### Immunological studies in the donor/recipient pair for Hematopoietic progenitor cells transplantation

Odalís M. de la Guardia Peña, María de los Ángeles García García, Catalino Ustariz García, Luz M. Morera Barrios

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

Se analizaron los resultados de los estudios inmunológicos pretrasplante (tipificación de antígenos HLA de donantes y receptores relacionados y determinación de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II en los receptores), para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, en el período de enero a diciembre de 2013 en el Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL) del Instituto de Hematología e Inmunología. La tipificación molecular HLA de los loci A, B, DR y DQ se realizó con el kit de *Olerup SSP HLA A B DR DQ SSP combi tray* de baja resolución. Para determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA se empleó la técnica inmunoenzimática (ELISA), *Kit LIFECODES QuikScreen* y *LIFECODES B-Screen anti-HLA clase I y II*. Las leucemias agudas constituyeron los diagnósticos más frecuentes para la solicitud del estudio. El 45,6 % de todos los posibles donantes resultaron haplo idénticos con su receptor; el 21 % totalmente incompatibles y el 33,3 % idénticos. Con relación al polimorfismo HLA en la población de estudio, para la clase I, locus A: los antígenos A\*02 y A\*24 resultaron los más frecuentes en la totalidad de los individuos; para el locus B, en individuos blancos prevalecieron los antígenos B\*35 y B\*44; y en no blancos, B\*35 y B\*18. Para los antígenos clase II, locus DRB1, fueron frecuentes los antígenos DRB1\*03 y DRB1\*04 en individuos blancos; en los no blancos, acompañando al DRB1\*03 estuvo el DRB1\*15; para el locus DQB1, los antígenos DQB1\*03 y DQB1\*05 fueron frecuentes para blancos y DQB1\*06 para los no

blancos. Las mayores incompatibilidades se presentaron en los loci B y DRB1. La población evaluada mostró elevada presencia de anticuerpos anti HLA, 44 % para clase I y 72 % para clase II.

**Palabras clave:** antígenos HLA; tipificación; anticuerpos anti HLA.

---

## ABSTRACT

Pretransplantation results of immunological studies were analyzed (HLA donor and related recipient typing and measurement of anti HLA class I and class II receptors) for hematopoietic progenitor cells transplantation in the period from January to December, 2013 at the Center for Cell Engineering and Transplantation (CICEL) of the Institute of Hematology and Immunology (IHI). Molecular typing of HLA loci A, B, DR and DQ was performed with *Olerup SSP HLA SSP AB comby tray DR DQ low resolution kit*. To determine the presence of antibodies to HLA immunoenzymatic technique (ELISA), *LIFECODES QuikScreen LIFECODES Kit B-Screen anti-HLA class I and II* was used. Acute leukemias were the most frequent diagnoses. Of all potential donors 45,6% were haploidentical with the receptor; totally incompatible 21%, and 33,3% were identical. Regarding the HLA polymorphism in the population studied, for class I, locus A: antigens A\*02 and A\* 24 were the most common in all individuals. For locus B, antigens B\*35 and B\* 44 prevailed in white persons; and B \*35 and B \*18 in nonwhites. For class II DRB1 locus, DRB1\*03 and DRB1\*04 antigens were common in white; in nonwhite individuals DRB1\*15 accompanied DRB1\*03; for locus DQB1 antigens DQB1\*03 and DQB1\*05 were frequent for whites, and DQB1\*06 for non-whites. The major incompatibilities occurred in loci B and DRB1. The population tested showed high presence of anti-HLA antibodies, 44% for class I and 72% for class II.

**Keywords:** anti HLA antibodies; HLA antigens; typing.

---

## INTRODUCCIÓN

La tipificación del sistema HLA es muy importante en la medicina contemporánea; las moléculas HLA son el objetivo principal de las respuestas inmunitarias a los trasplantes alogénicos y son elementos esenciales para las respuestas a estímulos antigénicos. Además, se implican en la susceptibilidad genética a padecer enfermedades autoinmunes. Una de las características cardinales de las moléculas del sistema HLA es su diversidad en la población humana. La tipificación del HLA detecta y clasifica tal diversidad<sup>1</sup>. Se denomina tipificación HLA al análisis llevado a cabo en el laboratorio para conocer los alelos HLA de un determinado individuo mediante métodos serológicos, análisis de genes por biología molecular y métodos celulares<sup>2</sup>.

Las moléculas HLA son proteínas especializadas codificadas por genes presentes en un locus denominado complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Los genes del CPH se expresan de forma codominante en cada individuo. Este sistema se hereda en bloques según las leyes de Mendel. Así cada persona tiene una mitad de cada progenitor o haplotipo (conjunto de moléculas del CPH presente en cada cromosoma);

---

de ahí el hecho del que dos hermanos sean HLA idénticos o no lo sean, es una cuestión de probabilidades. Así, poseen 25 % de probabilidades de compartir los dos haplotipos y por tanto ser HLA idénticos; 50 % de compartir un haplotipo y ser HLA haplo idénticos; y 25 % de no compartir ningún haplotipo) <sup>3</sup>.

En los seres humanos, cada molécula del HLA recibe una designación numérica. Por ejemplo, un haplotipo HLA de un sujeto podría ser HLA- A\*02, HLA-B \*05, HLA-DRB1\*03 <sup>4-5</sup>.

En el año 2010, se celebró el 25º aniversario de la introducción en Cuba del trasplante de médula ósea realizado con los requisitos de la ciencia en ese momento. El primer trasplante fue alogénico y se practicó en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) partiendo de los estudios iniciales de Donald Thomas (1957), quien comunicó una terapéutica para tratar el cáncer, novedosa en aquel momento, y que consistía en radiación y quimioterapia seguida de infusión endovenosa de médula ósea <sup>6</sup>.

Desde hace unos años se ha producido un progreso espectacular en el estudio del polimorfismo HLA a nivel genético. En el año 2012 se introdujeron en el país las técnicas moleculares de tipificación HLA en los estudios familiares, para la identificación de posibles donantes de células hematopoyéticas relacionados <sup>7</sup>. El uso de métodos moleculares amplía el conocimiento del polimorfismo HLA, de modo que permite saber con precisión el grado de disparidad entre donante y receptor. Una mejor identificación de los diferentes alelos sirve para elegir las parejas donante-receptor lo más compatibles posible.

El reconocimiento inmunológico del órgano trasplantado está vinculado a la distancia genética existente entre donante y receptor.

Existen diversos eventos inmunizantes, como la transfusión sanguínea, el embarazo y el propio trasplante, que pueden promover la aparición de anticuerpos anti-HLA. La presencia de anticuerpos (Ac) anti-HLA en candidatos a trasplante limita las posibilidades de este proceder, dado que es menor la probabilidad de encontrar un donante con antígenos HLA para los cuales el receptor no tenga anticuerpos<sup>8</sup>. Esto ha sido de vital importancia, sobre todo para el trasplante renal; sin embargo, también en el caso del trasplante de células madre hematopoyéticas cobra relevante importancia desde el punto de vista del éxito del injerto y la posterior evolución. La presencia de Ac anti-HLA puede comprometer la sobrevida del injerto, a largo plazo.

Desde la década de 1980 se habla de los anticuerpos HLA preformados en los receptores, en el fracaso del injerto; en el trasplante renal, por ejemplo, aparte de las pruebas de compatibilidad HLA AB, Terasaki y col. determinaron anticuerpos anti-HLA y demostraron su participación en los mecanismos de rechazo hiperagudo, agudo y crónico <sup>9</sup>.

En este trabajo se muestran los resultados del primer año de trabajo del Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL) del IHI para determinar la compatibilidad entre donante y receptor en el trasplante relacionado de células progenitoras hematopoyéticas, teniendo en cuenta la tipificación HLA y la presencia de anticuerpos anti-HLA.

## MÉTODOS

Se recolectó la información de la totalidad de las familias estudiadas para posible trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, en el período de enero a diciembre de 2013, la que se obtuvo del sistema de registros del centro y se agrupó por variables de interés para su procesamiento estadístico. La frecuencia antigénica es la proporción de sujetos del total que son portadores de un determinado antígeno, y se calcula en porcentaje, se determina por conteo directo, según la frecuencia de aparición de cada antígeno en la muestra evaluada <sup>10</sup>.

La tipificación molecular HLA de los loci A, B, DR y DQ se realizó con el *kit de Olerup HLA A B DR DQ SSP combi tray* de baja resolución y la amplificación se realizó en termocicladores *Q-CYcler II (Quanta Biotech LTd)*, mediante el programa recomendado en el *kit* de tipificación. La lectura de la amplificación se realizó por electroforesis capilar en equipo *QIAxcel Advanced (QIAGEN, GmbH)*, con el uso del cartucho *QIAxcel DNA Fast Analysis kit (QIAGEN, GmbH)*. La interpretación de los resultados se realizó con el uso del *software Helmberg-Score (Olerup)* <sup>11</sup>.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA se empleó la técnica inmunoenzimática (ELISA). Se realizaron ELISA de tipo heterogéneos, no competitivos, cualitativos e indirectos, usando estuches comerciales, IgG anti-HLA: *LIFECODES QuikScreen* y *LIFECODES B-Screen anti-HLA clase I y II* de la firma *GEN-PROBE*<sup>12</sup>.

Se estudió un total de 57 familias: el análisis se realizó entre el paciente (receptor) y sus hermanos consanguíneos (posibles donantes); se procesaron 57 receptores y 119 posibles donantes.

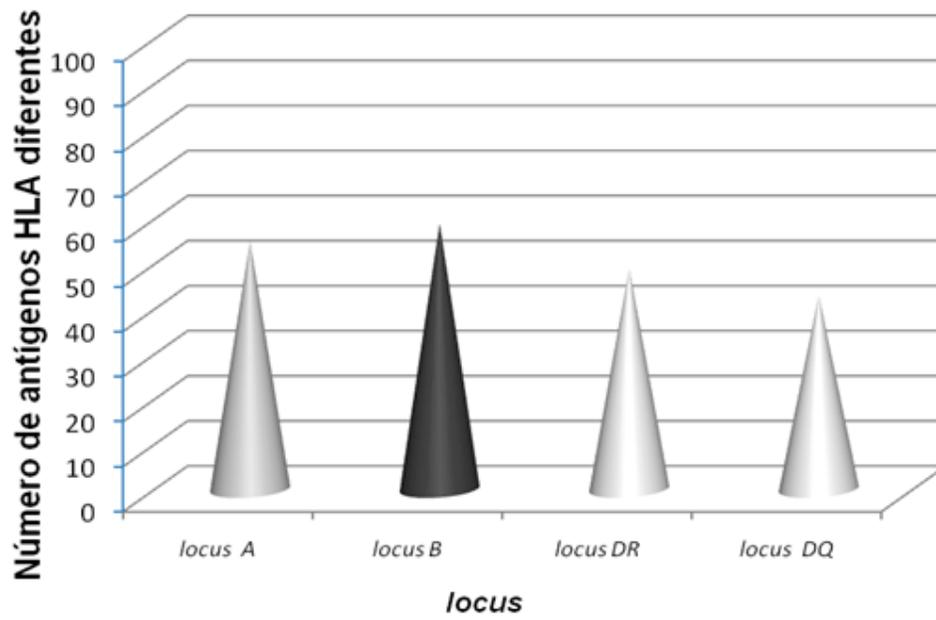
## RESULTADOS

Del total de familias estudiadas, el 68,4 % tenía piel blanca. Del total de individuos, el 82,4 % fueron adultos y el 17,6 % niños. Las leucemias agudas linfóide y mielóide constituyeron los diagnósticos más frecuentes, para el 37 %, seguidas del linfoma no Hodgkiniano (14 %).

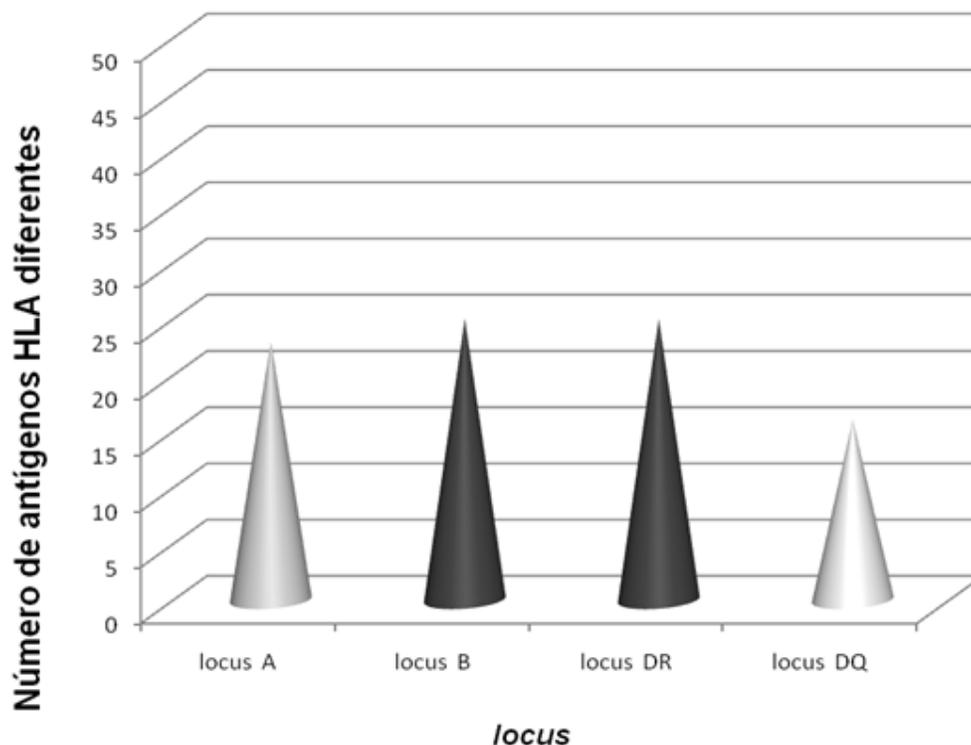
En el 33 % de las familias estudiadas se encontró compatibilidad completa entre el donante y el receptor (idénticos) y en el 45,6 % la compatibilidad fue de un solo haplotipo entre ambos (haploidénticos). El 21 % de las familias no compartió haplotipos.

Los antígenos más frecuentes entre los individuos blancos fueron: A\*02; A\*24; B\*35; B\*44; DRB1\*03; DRB1\*04 y DQB1\*03; DQB1\*05 y para los no blancos: A\*02; A\*24; B\*18; B\*35; DRB1\*03; DRB1\*15 y DQB1\*06.

Las incompatibilidades por *locus* en las familias con donantes haploidénticos (26 familias, 81 personas, 648 antígenos) fueron mayores en el locus B, con 59 incompatibilidades (Fig. 1); mientras que en las familias con donantes totalmente incompatibles (12 familias, 32 personas, 258 antígenos), las incompatibilidades fueron en los loci B y DRB1, 25 cada uno (Fig. 2).



**Fig. 1.** Incompatibilidades según *locus* en familias haploidénticas (26 familias, 81 personas, 648 antígenos).



**Fig. 2.** Incompatibilidades según *locus* en familias totalmente incompatibles (12 familias, 32 personas, 258 antígenos).

La pesquisa de anticuerpos IgG anti-HLA evidenció 44 % de positividad en los pacientes (receptores) para HLA clase I, mientras que para HLA clase II, el 72 % resultó positivo.

## DISCUSIÓN

El trasplante de células hematopoyéticas posee características que lo diferencian de todos los demás. El donante de la médula ósea es siempre un individuo vivo que, además, no pierde en el proceso ningún órgano ni función biológica; es el único tipo de trasplante en el que el material trasplantado posee competencia inmunológica para rechazar al receptor, fenómeno llamado reacción del injerto contra el huésped.

La probabilidad de encontrar dos individuos no relacionados con antígenos idénticos, es muy baja. Por este motivo, se recurre en primera instancia a los hermanos del paciente <sup>13</sup>.

El polimorfismo del sistema es muy elevado. Si tenemos en cuenta solo los loci A, B y DR se reporta que existirán  $2.8 \times 10^7$  posibles haplotipos, con  $7.5 \times 10^{14}$  posibles genotipos; por lo tanto, el número de posibles combinaciones es muy elevado <sup>14</sup>.

En este estudio, el grado de compatibilidad entre donante y receptor coincidió con los resultados obtenidos anteriormente por técnicas serológicas, en los que se reportaron 37,8 % de compatibilidad entre familias <sup>12,15</sup>. Bengochea y cols realizaron la tipificación HLA-A, B, DR en receptores de trasplante de médula ósea y encontraron

que el 45 % de los candidatos a trasplante tuvo un donante histocompatible<sup>16</sup>. La determinación de la frecuencia antigénica en una población permite conocer la probabilidad que tiene una persona de encontrar un donante no relacionado compatible en esa población y sirve de referencia para estudios de asociación del HLA con diferentes enfermedades y aplicaciones en estudios antropogenéticos<sup>17</sup>.

La frecuencia antigénica por locus se correspondió en gran medida con lo publicado por Ferrer y cols en el año 2007, en pruebas realizadas por técnicas de biología molecular en la población cubana; con relación al polimorfismo para clase I, locus A corresponden los antígenos A\*02 y A\*24 para la totalidad de los individuos, sin importar el color de la piel. El locus B se comportó como sigue: para la piel blanca prevalecieron los antígenos B\*35 y B\*44, en coincidencia absoluta con lo publicado. Sin embargo, Ferrer y cols encontraron mayor frecuencia para los mulatos en los antígenos B\*15, B\*35 y B\*53; los casos estudiados mostraron una mayor frecuencia para antígenos B\*35 y B\*18.<sup>18</sup>

En el año 2013, autores colombianos determinaron frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente de Colombia, usando técnicas de biología molecular. Los alelos más frecuentes para la población colombiana estudiada fueron A\*02 (25 %), B\*35 (17,7 %) y DRB1\*04 (23 %), lo cual coincidió con los resultados encontrados, si se toma en cuenta que para el locus DRB1 el antígeno DRB1\*03 fue frecuente, tanto en individuos blancos como en no blancos<sup>19</sup>.

Autores mexicanos estudiaron por biología molecular, poblaciones mestizas derivadas de tres fuentes principales: españoles, amerindios y africanos, y obtuvieron que el alelo más frecuentemente observado fue A\*02<sup>20</sup>.

Las mayores incompatibilidades por locus se presentaron para familias haploidenticas en el locus B; y para familias totalmente incompatibles, en los loci B y DRB1, respectivamente.

En cuanto a la determinación de anticuerpos anti HLA, la población estudiada, en este caso los receptores del trasplante, presentó una elevada frecuencia de aparición de estos anticuerpos, sobre todo anti-HLA clase II, aunque este resultado difiere de lo reportado hasta el presente, donde la mayor alosensibilización corresponde a los antígenos de clase I<sup>12</sup>. Este hecho puede deberse al pequeño tamaño de muestra, por lo que se hace necesario extender la investigación a años posteriores.

Marcell y cols demostraron en pacientes de toda Cuba en espera de trasplante renal, que el 50,8 % se encontraban sensibilizados con anticuerpos anti-HLA; el 87,9 % de los pacientes sensibilizados presentaron anticuerpos anti-HLA clase I; y el 69,7 %, anticuerpos anti-HLA clase II, I<sup>12</sup>.

Triulzi y cols confirmaron que los embarazos y la transfusión de productos sanguíneos son las principales causas de la aloinmunización en las poblaciones de trasplante<sup>21</sup>.

El trasplante de células hematopoyéticas en Cuba hasta nuestros días, se realiza utilizando como donantes hermanos consanguíneos completamente idénticos con relación a los antígenos HLA, por lo cual se minimiza el posible efecto de los anticuerpos anti-HLA. Sin embargo, la posibilidad de trasplantar pacientes haploidenticos hace buscar con más rigor la presencia de dichos anticuerpos. Ciurea y cols evaluaron en 24 pacientes la presencia de anticuerpos HLA mediante Luminex, y encontraron que 3 de 4 pacientes positivos pretrasplante rechazaron el injerto (75 %), en comparación con 1 de 20 (5 %) en pacientes negativos ( $p = 0,008$ )<sup>22</sup>.

Es de gran importancia buscar la mayor compatibilidad posible entre el donante y el receptor, por todo lo cual, incluir la determinación de anticuerpos anti HLA en los estudios protocolizados de trasplante de células hematopoyéticas garantizará mayor aceptación y sobrevida al injerto.

Por otro lado, la posibilidad de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas entre donantes y receptores haploidénticos abre una puerta a la mejoría de la calidad de vida de muchos más pacientes afectados con enfermedades crónicas limitantes. Entonces, proporcionar estudios inmunológicos lo más completos posible garantizará el éxito del proceder.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mahdi BM. A glow of HLA typing in organ transplantation. *Clin Transl Med.* 2013;2(1):6.
2. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2012 Jul;80(1):1-11.
3. Parslow TG, Stites DP, Terr A, Imboden J. Presentacion de antígenos y complejo principal de histocompatibilidad. En: *Inmunología básica y clínica.* 10 ed. México DF: El manual moderno; 2007. p. 93-108.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Major Histocompatibility Complex Molecule and Antigen Presentation to T Lymphocytes. *Cellular and molecular immunology.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2010. p. 97-112.
5. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens.* 2010 Apr;75(4):291-455.
6. Dorticós-Balea E, Jaime-Fagundo JC, Pavón-Morán V, Reboredo-Domínguez M, Hernández-Ramírez P. Actualización en trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes pediátricos en los últimos 15 años. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [revista en la Internet]. 2011 Mar [citado 2015 Sep 14] ; 27(1):. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892011000100010&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000100010&lng=es).
7. Bencomo-Hernández A. A propósito del primer año del Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2014; 30(3): 192-5.
8. Toledo N, Tiscornia A, Bengochea M, Carretto E, Silva E, Cabrera A, et al. Monitoreo de anticuerpos HLA en insuficientes renales crónicos en lista de espera uruguaya para trasplante renal 2005. *Rev Méd Urug.* 2008 Mar;24(1):15-23.
9. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation.* 2008 Aug;86(3):377-83.

10. Godorezky C. Métodos para el análisis estadístico del complejo HLA. En: Manual de procedimientos serológicos y celulares de histocompatibilidad. 9<sup>na</sup>. Ed. Mexico DF: Instituto de diagnóstico y referencia Epidemiológicas de México DF; 2007.
11. Instrucciones de uso Kits de tipificación de HLA *Olerup* SSP® Olerup SSP AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden. <http://www.olerup-ssp.com>.
12. Marcell-Rodríguez L, Morera-Barrios LM, Ustariz-García C R, Costales-Elizalde DT, Chang- Monteagudo A, Bencomo-Hernández A. Identificación de anticuerpos anti-HLA en pacientes en espera de trasplante renal. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2015 Jun; 31(2): 138-49.
13. Zadrazil J, Krejci K, Bachleda P, Al-Jabry S. Protocol biopsy of donor kidney in renal transplantation. Ann Transplant. 2004; 9(4):8-11.
14. Ringdén O, Schaffer M, Le Blanc K, Persson U, Hauzenberger D, Abedi MR, et al. Which donor should be chosen for hematopoietic stem cell transplantation among unrelated HLA-A, -B, and -DRB1 genomically identical volunteers? Biol Blood Marrow Transplant. 2004 Feb; 10(2): 128-34.
15. Morera-Barrios LM, Ustáriz-García CR, García-García MA, Lam-Díaz RM, Guerreiro-Hernández AM, Hernández-Ramírez P. Probabilidad de encontrar donantes HLA idénticos en familiares no relacionados para posible trasplante de células hematopoyéticas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [serie en internet]. 2008; 24: Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892008000100008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892008000100008&lng=es)
16. Bengochea M, Álvarez I, Hidalgo PC, Cabrera A, Senatore O, Toledo R, et al. HLA-A, -B, -DR en receptores de trasplante de médula ósea en Uruguay.: Sistema nacional de registro, tipificación y búsqueda de donantes de médula ósea y progenitores hematopoyéticos (SINDOME). Rev Méd Urug. 2003 Aug; 19(2): 149-158.
17. Rodgers JR, Cook RG. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. Nat Rev Immunol. 2005 Jun; 5(6): 459-71.
18. Ferrer A, Nazábal M, Companioni O, Fernández de Cossío ME, Camacho H, Cintado A, et al. HLA class I polymorphism in the Cuban population. Hum Immunol. 2007 Nov; 68(11): 918-27.
19. Arrunategui AM, Villegas A, Ocampo LA, Rodríguez LM, Badih A. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente colombiano. Acta Med Colomb. 2013 Jan; 38(1): 16-21.
20. Flores-Arechiga A, Gómez-Espinel I, Castro-Cárdenas L, Treviño-Zuñiga J, Silva-Ramírez B, Cerda-Flores R. Estructura genética de tres poblaciones mexicanas en base al sistema HLA-A. Rev Salud Pública Nutr. 2009; 10: 115-22.
21. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. Transfusion. 2009 Sep; 49(9): 1825-35.

22. Ciurea SO, de Lima M, Cano P, Korbling M, Giralt S, Shpall EJ, et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009 Oct 27;88(8):1019-24.

Recibido: junio 06, 2015.

Aceptado: noviembre 25, 2015.

*Dra. Odalis M de la Guardia Peña*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268.  
Email: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)