

TIPIFICACIÓN GENÓMICA HLA DE ALTA RESOLUCIÓN Y APLICACIONES EN TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Manuel Muro Amador

*Facultativo Especialista de Inmunología. Co-Director del Laboratorio Regional de Referencia para Histocompatibilidad e Inmunogenética. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia
E-mail: manuel.muro@carm.es*

Introducción

Una de las principales causas de fracaso de los órganos trasplantados es el rechazo de los mismos, esto es la destrucción del injerto por parte del sistema inmune del receptor, de tal manera que los órganos pueden perder su capacidad funcional. Para garantizar una buena evolución de todo trasplante se requiere una adecuada selección del donante para cada uno de los receptores posibles.

La mayor compatibilidad entre donante y receptor se asocia a una mejor supervivencia del trasplante. Es por eso, que en cuanto ocurre la donación de un órgano se sigue un minucioso protocolo encaminado a encontrar el receptor más compatible con el donante, para minimizar la posibilidad de rechazo.

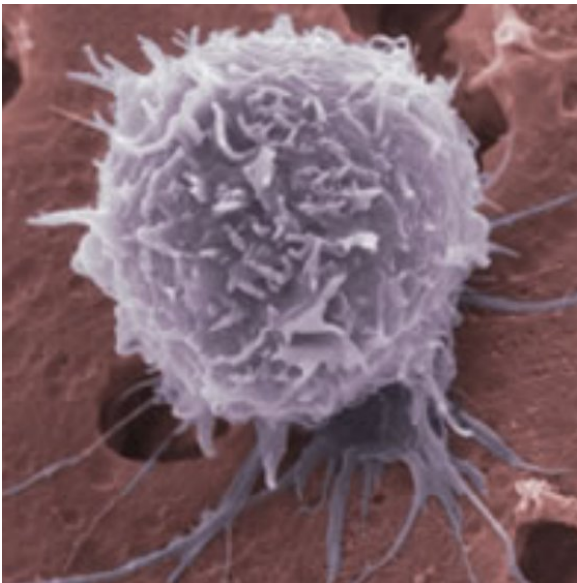


Figura 1: Célula madre de médula ósea humana con microscopía electrónica de barrido (MEB).

Sistema HLA

Las limitaciones de la discriminación molecular de la serología clásica (estudiando con anticuerpos la molécula en membrana) han hecho volver la vista hacia el estudio de los genes que codifican dichas moléculas, sobre todo en el caso del trasplante de células madre hematopoyéticas (figura 1), donde la compatibilidad debería ser casi identidad total.

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, para cualquier especie) se codifican en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos [denominado HLA (Antígeno Leucocitario Humano)].

Los genes principales del sistema HLA se definen como HLA de clase I (son HLA-A, -B y -C) y HLA de clase II (son HLA-DR, -DQ y -DP). Cada uno de esos genes posee un elevado polimorfismo alélico en las diferentes poblaciones mundiales (por ejemplo, del gen HLA-B se conocen más de 800 alelos o variantes).

En este sentido, hay un progreso espectacular del análisis del polimorfismo HLA con más de 6000 alelos o variantes descritas en todo el mundo, las cuales debemos poder identificar los laboratorios de histocompatibilidad.

Tipificación genómica de Alta Resolución

Las técnicas de tipificación molecular HLA se han diversificado, utilizando métodos que emplean un paso previo de amplificación PCR. Los más utilizados son:

- a) PCR-SSO (oligonucleótidos o sondas específicas de secuencia) que consiste en la amplificación PCR de los distintos exones polimórficos de los genes HLA (exón 2 en los genes HLA-DR, -DQ y -DP; y exones 2 y 3 en HLA-A, -B y -C) y su hibridación posterior con SSOs.
- b) PCR-SSP (primers o cebadores específicos de secuencia), que consiste en la amplificación con SSPs, que sólo amplifican las muestras en las que los primers o cebadores reconozcan el alelo para el que son específicos.
- c) PCR-SBT (Tipaje Basado en la Secuenciación), consiste en la amplificación y secuenciación de los exones polimórficos de los genes HLA.
- d) Tecnología Luminex ó Microbeads array o ensayo en fase sólida (figura 2), es una modificación del método PCR-SSO que permite el análisis de alta resolución de manera masiva y rápida.

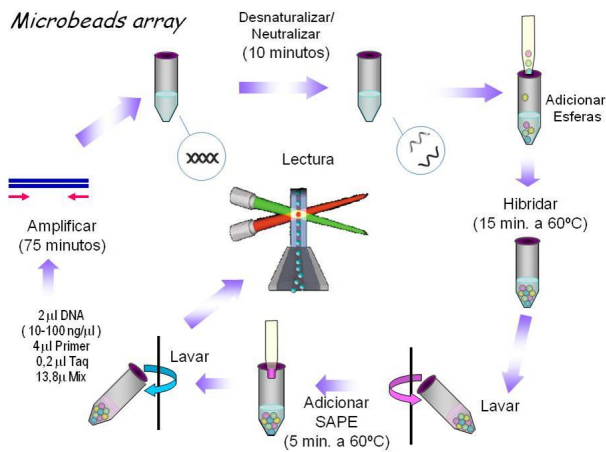


Figura 2: Tipaje HLA alta resolución por ensayo en fase sólida, microbeads array o tecnología luminex.

El uso de métodos moleculares de alta resolución, 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 más compatibles (figura 4). En este último sentido, resultan de especial interés en el trasplante de médula, donde es obligado evitar ambigüedades y se requiere la identificación de todas las discrepancias, pues se trata de evitar no sólo la respuesta del huésped contra el injerto sino también la respuesta del injerto contra el huésped (EICH).

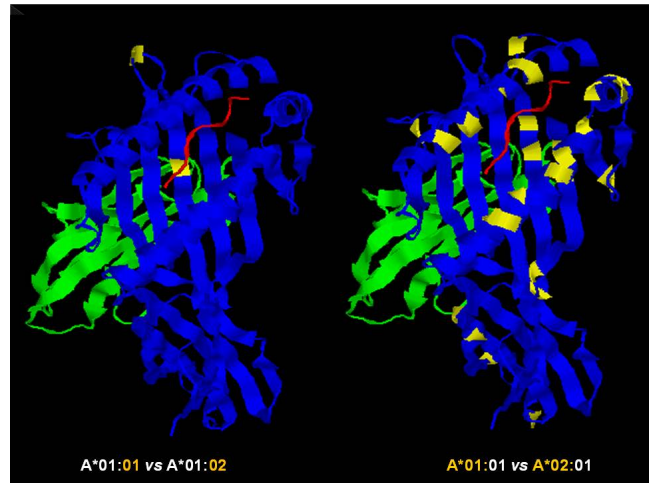


Figura 4. Derecha, Incompatibilidad menor o de subtipo alélico (diferencias en alta resolución). Izquierda, Incompatibilidad en subtipos serológicos (diferencias en baja resolución). Incompatibilidades entre moléculas se marcan en amarillo (aminoácidos).

Sistema HLA y trasplante de progenitores

Nuestra sociedad sufre hoy día un gran impacto social y económico de las enfermedades oncohematológicas. En éstas, muchas veces se ha de recurrir al trasplante de progenitores hematoyéticos (TPH) como solución terapéutica.

Este tipo de trasplante posee varias características que lo diferencian de todos los demás:

- 1) el donante de la médula ósea es siempre un individuo vivo que además no pierde en el proceso ningún órgano ni función biológica.
- 2) es el único tipo de trasplante en el que el material trasplantado posee competencia inmunológica para rechazar al receptor (EICH). Esto obliga a seguir una estrategia distinta para seleccionar los donantes ya que se requiere entre donante y receptor la identidad molecular HLA absoluta o casi absoluta.

Conocido el extraordinario polimorfismo del Sistema HLA, la probabilidad de encontrar dos individuos no relacionados con antígenos HLA idénticos es muy baja (1/40.000). Por este motivo, se recurre en primera instancia a los hermanos del paciente. Los genes de un haplotipo HLA (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ y -DP que se hereda del padre o madre en un cromosoma) se transmiten en bloque (los sobre-cruzamientos son muy raros), por lo que el que dos hermanos sean o no HLA idénticos es una cuestión de probabilidad (25 % de probabilidad de compartir los dos haplotipos y ser HLA idénticos, 50 % de compartir 1 haplotipo y ser haploidenticos y 25 % de no compartir ningún haplotipo) (figura 5).

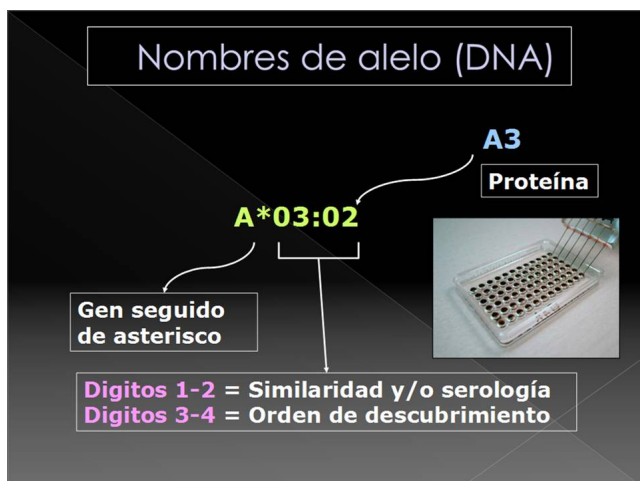


Figura 3: Nomenclatura serológica clásica (A3), nomenclatura molecular de baja resolución o genérica (A*03) y de alta resolución o alélica (A*03:02).

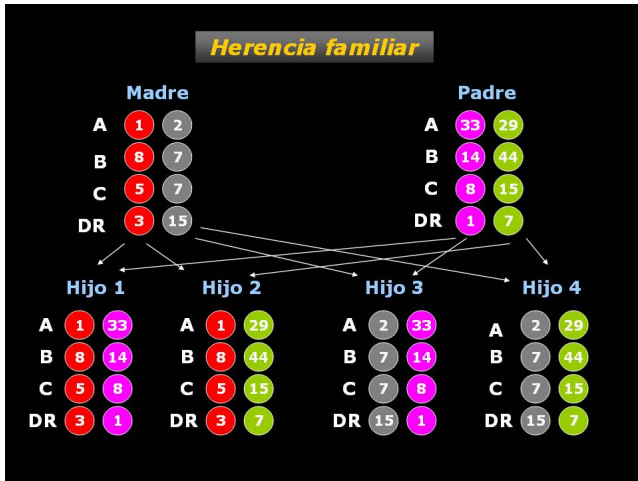


Figura 5. Modelo de herencia familiar del sistema HLA. Cada rosario de colores es un haplotipo HLA que los padres pueden transmitir a los hijos y a su vez les ha sido transmitido a ellos desde sus progenitores.

De forma práctica, la estrategia utilizada es la siguiente: primero se realiza el tipaje genético de HLA-A, -B y -DRB1 de baja resolución del paciente, sus hermanos y padres. Se considerará que un hermano es HLA idéntico, y por tanto un donante ideal aquel que comparte los mismos alelos de estos genes (figura 5) a baja resolución (compartiría 2 alelos HLA-A, 2 B y 2 DR, es decir, 6/6). Se considera un donante familiar aceptable el que comparte, al menos, 7/8 especificidades por análisis de alta resolución incluyendo ya el gen HLA-C (podría compartir 2 alelos HLA-A, 2 B, 2 C y 2 DRB1).

Si alguno de los haplotipos familiares es frecuente en la población, se realiza una búsqueda familiar ampliada en primos o tíos del paciente. Se elige inicialmente la rama de la familia con el haplotipo menos frecuente ya que la probabilidad de encontrarse éste entre los familiares es mayor, y siempre será más posible hallar al azar el otro que es más frecuente en la población general.

Pero el donante también puede ser una persona sin consanguinidad con el paciente; son los donantes no emparentados (DNE), los cuales pueden obtenerse mediante la búsqueda a través de los Bancos y Registros de donantes voluntarios de todo el mundo.

En caso de no encontrar donante familiar idóneo, se completa el estudio HLA-A, B, C y DRB1 de alta resolución para realizar la búsqueda internacional de DNE ó sangre de cordón umbilical (UCB). Se requiere al menos 7/8 compatibilidades a nivel de alta resolución (donante aceptable). Si hubiera más de 1 donante con las 8 compatibilidades (donante ideal) se amplía el tipaje a los genes HLA-DQB1 o -DPB1. En el caso de búsqueda de unidades de cordón umbilical tan sólo se tipa HLA-A y -B de baja resolución y HLA-DRB1 de alta. Una UCB ideal comparte 6/6 compatibilidades aunque se aceptan hasta 4/6. En el caso de no disponer de donante DNE ó UCB adecuado

se puede realizar también un trasplante haploidéntico, generalmente de padres o hermanos, como opción final.

En 1988, la Fundación Internacional Josep Carreras puso en marcha, en España, el Registro Español de Donantes voluntarios de Médula Ósea (REDMO). Esta fundación tiene un acuerdo con el Ministerio de Sanidad y las Comunidades Autónomas.

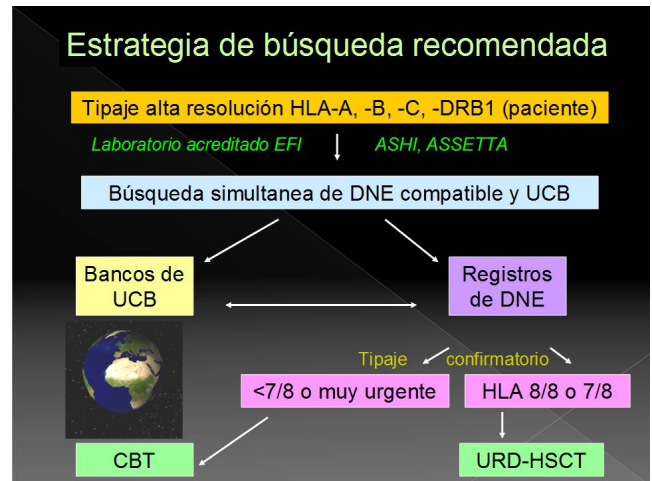


Figura 6. Algoritmo de búsqueda de DNE o sangre de cordón umbilical (UCB) en bancos de cordón y registros, para realizar trasplante de UCB (CBT) o de DNE (URD-HSCT).

El REDMO realiza su gestión como miembro de WMDA (World Marrow Donor Association), relacionándose con todos los Registros internacionales de DNE y Bancos de UCB, y que forman parte del Programa Internacional de Trasplante de médula ósea no emparentado. Así, los 63 registros existentes en el mundo disponen ya de más de 14 millones de DNE y los 49 Bancos de Sangre de Cordón Umbilical (UCB) de más de 500.000 unidades almacenadas y listas para ser utilizadas.

El Banco y Registro de DNE del Hospital U. Virgen de la Arrixaca de Murcia forma parte del REDMO (aporta más de 7000 DNE murcianos tipados para HLA), es el centro de referencia de la Región de Murcia y se creó hace diecisiete años. Como idea del trabajo realizado, en este año 2011, hemos realizado 204 estudios de alta resolución de DNE murcianos solicitados desde registros internacionales y DNE procedentes de otros registros (mayoritariamente de USA y Alemania) para pacientes murcianos con leucemia.

Por último, la actividad creciente de este Banco, con la esperanza de vida que ello conlleva es posible gracias a la generosidad de muchos. Desde aquí animamos a que la filantropía siga y así poder dar una salida a miles de pacientes, pues hoy por hoy, el trasplante de médula ósea es una de las mejores soluciones terapéuticas para la curación de la leucemia.

Bibliografía

- Muro M, Llorente S, Marin L et al. Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between FlowPRA, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:223.
- Muro M, Moya-Quiles MR, Álvarez-López MR. Histocompatibilidad en el trasplante. En: *Manual sobre donación y trasplante de órganos*. Ed. Aran. Madrid. 2008.
- Rojas GM, Álvarez MR, López A, Muro M. Descriptive study of activity of the Bone Marrow Donor Registry and Bank from the Murcia Region (Southeast of Spain) (1994-2004). *An Med Inter* 2006;23:525.
- Muro M, González MJ, Salgado G et al. Specific “intra-allele” (IA) and “intra-broad antigen” (IBA) HLA alloantibodies in kidney graft transplant. *Hum Immunol* 2010;71:857.
- Muro M, Bosch A, López R et al. Donor specific antibody (DSA) mediated humoral rejection and biological implications of B cells in human solid organ transplantation. En prensa.