

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR, FISIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**INDICACIÓN DE BÚSQUEDA DE
DONANTE EMPARENTADO PARA
TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA**

Bárbara Manzanares Martín

Córdoba, 2011

TITULO: *Indicación de búsqueda de donante emparentado para el trasplante de médula ósea*

AUTOR: *Bárbara Manzanares Martín*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-694-5925-6

D. Rafael Ángel González Fernández, Doctor en Medicina y Cirugía y
Facultativo Especialista de Área de Inmunología

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado: **“Indicación de búsqueda de donante emparentado para trasplante de médula ósea”** ha sido realizado bajo mi dirección por el grado Dña Bárbara Manzanares Martín en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y que reúne a mi juicio, las condiciones de originalidad y calidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación

Córdoba, a 9 de Mayo de 2011

Fdo: Dr Rafael A. González Fernández

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**INDICACIÓN DE BÚSQUEDA DE DONANTE
EMPARENTADO PARA TRASPLANTE DE
MÉDULA ÓSEA**

Bárbara Manzanares Martín

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universidad de Córdoba. Este trabajo se ha realizado bajo la supervisión del Dr Rafael Ángel González Fernández en el departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

Fdo: Bárbara Manzanares Martín

Córdoba, a 9 de Mayo de 2011

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en este punto mis agradecimientos a cuantos han ayudado, de una manera u otra, a que este trabajo se lleve a cabo:

A mis hijos por su cariño

A mis padres y hermanas por su aliento en mis momentos de agobio

A todo el personal del Servicio de Inmunología, en particular a los Doctores Manuel Santamaría, Rafael Solana, Corona Alonso, a la TEL Rafi Catalán y a Marisa Velarde, por su inestimable ayuda en todo momento. A mis compañeros del IMIBIC y del Departamento de Inmunología. A los Servicios de Hematología y a los Centros de Transfusiones Sanguíneas de Córdoba y Jaén. Al Dr. José Peña, por sus sabias correcciones y su constante ánimo y entusiasmo.

A mi director, el Dr. Rafael González, por su esfuerzo y trabajo, creer en mis posibilidades y su infinita paciencia.

A las entidades que directa o indirectamente han financiado en parte este proyecto.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCION	8
1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	9
1.1 Introducción	9
1.2 Tipos de trasplante	10
1.3 Concepto de alorreconocimiento	13
1.4 Consecuencias del alorreconocimiento	17
2. SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	18
2.1 Historia y definición	18
2.2 Organización genética de la región HLA	20
2.3 Moléculas HLA de clase I	25
2.4 Moléculas HLA de clase II	27
2.5 Polimorfismo y evolución de los genes MHC	30
2.6 Mecanismos generadores de polimorfismo: la conversión génica	31
2.7 Mantenimiento del polimorfismo	33
2.8 Nomenclatura HLA	38
2.9 Informes ambiguos	42
3. SELECCIÓN DE DONANTES	43
3.1 HLA y trasplante	43
3.2 Elección del donante/tipo de trasplante	44
3.3 Compatibilidad donante/receptor	46
3.3.1 Donantes familiares	46
3.3.2 Búsqueda familiar ampliada	48
3.3.3 Búsqueda de donante no emparentado	51
4. IMPORTANCIA DE LA IDENTIDAD HLA EN EL TPH	57
4.1 Trasplantes con donante familiar	57
4.2 Trasplantes con donante no emparentado o unidades de cordón	59
OBJETIVOS	63
MATERIAL Y METODOS	66
1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA	67
2. METODOLOGÍA	68
2.1 Purificación automática de ADN	68
2.1.1 Método	69
2.1.2 Material necesario	70
2.2 Purificación de ADN por columnas	71
2.2.1 Método	72
2.2.2 Material necesario	72
2.3 Tipaje HLA génico	73
2.3.1 Tipaje genérico baja resolución	73
2.3.1.1 Preparación de la PCR	74
2.3.1.2 Amplificación	74
2.3.1.3. Hibridación y detección	76
2.3.1.4 Material y reactivos necesarios	78
2.3.1.5 Preparación de soluciones de trabajo	79
2.3.1.6 Análisis de resultados	80
2.3.2 Tipaje HLA clase I alta resolución	81
2.3.2.1 Preparación de la PCR	81
2.3.2.2 Amplificación	82
2.3.2.3 Detección	83
2.3.2.4 Material y reactivos necesarios	83
2.3.2.5 Análisis de resultados	85
2.3.3 Tipaje HLA clase II alta resolución	86
2.3.3.1 Preparación de la PCR	87
2.3.3.2 Amplificación	87

ÍNDICE

2.3.3.3 Hibridación y detección	88
2.3.3.4 Análisis de resultados	90
3. ANALISIS ESTADISTICO	90
RESULTADOS	93
1. ALELOS HLA CLASE I	95
1.1 Alelos HLA-A	95
1.2 Variabilidad interalélica HLA-A	97
1.3 Alelos HLA-B	98
1.4 Variabilidad interalélica HLA-B	100
1.5 Alelos HLA-C	102
1.6 Variabilidad interalélica	104
2. ALELOS HLA CLASE II	105
2.1 Alelos HLA-DRB	105
2.2 Variabilidad interalélica HLA-DRB1	107
2.3 Alelos HLA-DQB1	108
2.4 Variabilidad interalélica HLA-DQB1	110
2.5 Alelos HLA-DPB1	111
2.6 Variabilidad interalélica HLA-DPB1	112
3. HAPLOTIPOS HLA	114
3.1 Haplotipos HLA clase I	114
3.2 Haplotipos HLA-B, C	116
3.3 Asociaciones DRB1-DQB1	122
3.4 Haplotipos C-B-DRB1	126
3.5 Haplotipos HLA-A/B/C/DRB1	128
3.6 Haplotipos HLA-A/B/DRB1	130
DISCUSION	133
1. BÚSQUEDA DONANTE	135
2. DONANTES EMPARENTADOS	137
3. ALELOS Y HAPLOTIPOS EN NUESTRA MUESTRA	140
3.1 Alelos comunes HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1,-DPB1	141
3.1.1 HLA-A	144
3.1.2 HLA-B	145
3.1.3 HLA-C	146
3.1.4 HLA-DRB1	147
3.1.5 DQB1	148
3.1.6 DPB1	149
3.2 Haplotipos	150
3.2.1 Asociaciones B-C	151
3.2.2 Asociaciones DRB1-DQB1	155
3.2.3 Asociaciones 3 alelos	155
3.2.3.1 Haplotipos HLA clase I (A/B/C)	156
3.2.3.2 Asociaciones B/CDRB1	156
3.2.3.3 Asociaciones A-B-DRB1	157
3.2.4 Haplotipos A-B-C-DRB1	162
CONCLUSIONES	168
BIBLIOGRAFÍA	171
ABREVIATURAS	196

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

1.1 Introducción

El trasplante de progenitores hematopoyéticos constituye un recurso terapéutico cada vez más utilizado para un gran número de enfermedades malignas y no malignas (1, 2). Las principales indicaciones actuales aparecen en la tabla 1.

Con esta intervención terapéutica se pretende sustituir la hematopoyesis del receptor/paciente por ser total o parcialmente defectuosa o neoplásica mediante la infusión de progenitores hematopoyéticos sanos obtenidos de médula ósea (MO), sangre periférica (CPSP) o cordón umbilical (CU) procedentes bien del mismo paciente (trasplante autólogo) (3), o bien de un donante familiar o no emparentado (trasplante alogénico), que restauren una médula ósea sana y que a su vez, ejerzan un efecto inmunomodulador sobre las células neoplásicas residuales (4-6).

En determinadas circunstancias también permite un tratamiento antineoplásico a dosis muy elevadas de quimioterapia y/o radioterapia para erradicar las células tumorales (7).

Esto origina una mielodepresión prolongada o definitiva, que sería solucionada por células madre hematopoyéticas que regeneran la médula ósea.

En los últimos años, se ha demostrado ampliamente en el trasplante alogénico que las células inmunocompetentes infundidas con las células progenitoras hematopoyéticas o que se originan a partir de ellas, dan lugar a un potente efecto injerto contra tumor que es independiente de los efectos de las altas dosis de quimioterapia (1).

INTRODUCCIÓN

Estas reacciones inmunológicas son recíprocas, del injerto contra su nuevo huésped y las propias del huésped frente al injerto (7).

Tabla 1: Indicaciones de trasplante de médula ósea

Enfermedades congénitas	Enfermedades adquiridas
Inmunodeficiencia congénita combinada	Aplasia medular grave
Aplasia medular de Fanconi	Hemoglobinuria paroxística nocturna
Talasemia mayor	Leucemias agudas
Drepanocitosis	Leucemia mieloide crónica
Eritroblastopenia de Blackfan-Diamond	Linfomas
Osteopetrosis	Mieloma múltiple
Tesaurismosis	Síndromes mielodisplásicos

1.2 Tipos de trasplante

Existen diferentes clasificaciones dependiendo del tipo de donante, de la procedencia de los progenitores hematopoyéticos o del tipo empleado de acondicionamiento.

La procedencia de los progenitores hematopoyéticos puede ser diferente médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical. A continuación se detalla el método de obtención:

- Médula ósea: los progenitores se obtienen mediante aspirados de médula ósea (crestas iliacas).
- Sangre periférica: los progenitores son obtenidos mediante aféresis, Se requiere movilización de las células madre de la médula ósea a sangre periférica mediante factores de crecimiento (normalmente G-CSF, factor de crecimiento de granulocitos).

INTRODUCCIÓN

- Cordón umbilical: se recogen por punción de la vena umbilical inmediatamente después del parto. Se obtienen de 70-120 ml de sangre que se congela en un Banco de Cordón Umbilical.

Según el tipo de donante y su relación con el paciente:

- Singénico: procedente de gemelo univitelino
- Xenogénico: donante de distinta especie.
- Autólogo: los progenitores hematopoyéticos son del propio paciente, obtenidos cuando el paciente ha respondido al tratamiento.
- Emparentado: donante familiar del receptor, generalmente un hermano HLA idéntico (tabla 2).

Tabla 2: Factores que afectan el resultado del trasplante alogénico emparentado HLA idéntico.

Factores pronósticos
Diagnóstico y estadio de la enfermedad.
Edad del receptor
Diferencias en sistemas menores de histocompatibilidad
Exposición a infección por CMV del donante.
Exposición a infección por CMV del receptor
Aloinmunización del donante
Aloinmunización del receptor

- No emparentado: el donante es un individuo sin ningún parentesco. En la tabla 3 se enumeran los principales factores que influyen en el desarrollo de este tipo de trasplante. Se puede observar como al no existir relación de parentesco directo entre el donante y receptor cobra gran importancia el grado de compatibilidad HLA. Sin embargo, éste, aún siendo muy importante, no es el único

Tabla 3: Factores que afectan el resultado del trasplante no emparentado

Factores pronósticos
Compatibilidad HLA
Diagnóstico y estadio de la enfermedad
Tiempo transcurrido del diagnóstico al trasplante
Edad del receptor
Edad del donante
Exposición a infección por CMV previa al trasplante del receptor
Exposición a infección por CMV previa al trasplante del donante.

- Alogénico: procedente de un individuo de la misma especie distinto a gemelo. Se persigue máxima identidad en el Sistema HLA. Es en la búsqueda de donante en trasplante alogénico, donde se va a centrar este trabajo, ya que en el mismo, el estudio de las moléculas HLA para conseguir el grado de histocompatibilidad deseable se hace imprescindible (tablas 2 y 4).

Según el tipo de acondicionamiento hablamos de trasplante mieloablativo o no mieloablativo:

- Mieloablativo: Quimioterapia asociada o no a irradiación corporal total en suficiente dosis para la deplección completa de la hemopoyesis (autólogo, alogénico, singénico). Es el trasplante de progenitores hematopoyéticos convencional.
- No mieloablativo o mini-trasplante: el acondicionamiento es de menor intensidad, con lo cual no se destruye la hemopoyesis del receptor y produce menor toxicidad. Esta nueva modalidad permite realizar el

INTRODUCCIÓN

trasplante a pacientes de edad más avanzada o que por su estado general no pueden recibir un trasplante convencional.

Tabla 4: Efectos no deseados en el trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico

Peritrasplante	A largo plazo
Infecciones bacterianas Infecciones fúngicas Infecciones virales Toxicidad tisular Enfermedad de injerto frente a huésped Rechazo de injerto primario y secundario	Infecciones virales Injerto contra huésped crónico Recidivas tumorales

1.3 Concepto de alorreconocimiento

Cuando el injerto es singénico o autólogo no se provoca ninguna respuesta inmune significativa. Sin embargo cuando la compatibilidad no es absoluta, se desencadena una reacción contra los antígenos extraños por parte del sistema inmune.

Podríamos definir el alorreconocimiento como la capacidad de las células T para reconocer, entre miembros de la misma especie, polimorfismos genéticamente codificados a nivel de moléculas con capacidad antigénica.

Los antígenos que se reconocen son principalmente las proteínas HLA clásicas (clase I y II), pero también los antígenos menores de histocompatibilidad, MIC y otras proteínas también polimórficas que pueden ser diferentes en el donante y receptor (8).

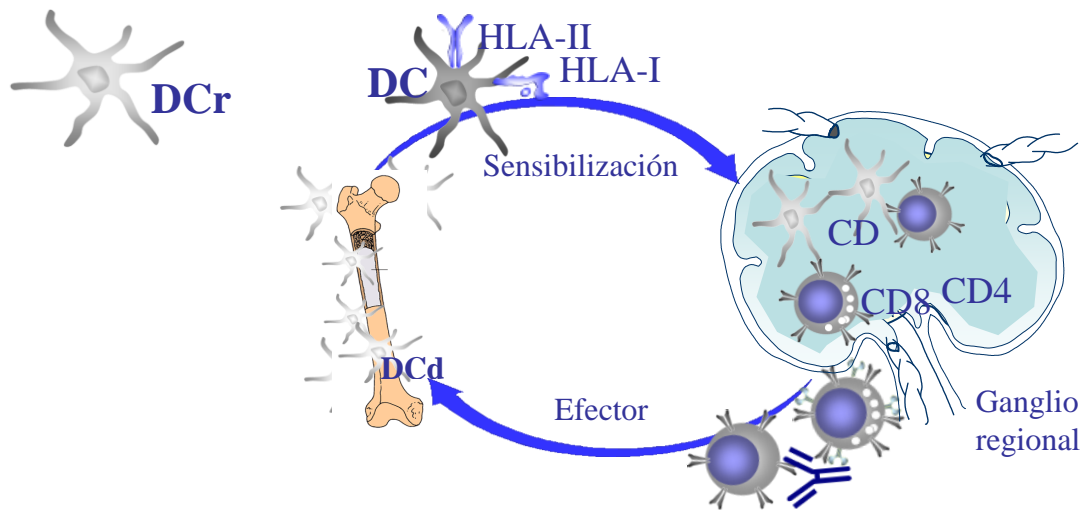


Figura 1: Alorreconocimiento: es el fenómeno por el que las células T reconocen las moléculas HLA extrañas del donante

Cuando se efectúa un trasplante, las células dendríticas residentes en el injerto, migrarán hacia los órganos linfoides secundarios del receptor permitiendo que los linfocitos T del receptor reconozcan las moléculas de clase I y clase II del donante (Fig. 1). Este reconocimiento se denomina “alorreconocimiento” directo (9).

Asimismo, a medida que el tiempo transcurre, el trasplante puede ser repoblado por APC del receptor. Estas APC presentan péptidos derivados de proteínas del donante entre ellos HLA. Este reconocimiento se conoce como “alorreconocimiento” indirecto (10,11).

También se ha descrito un tercer mecanismo denominado alorreconocimiento semi-directo cuando las células dendríticas pasajeras del receptor adquieren complejos intactos HLA/péptido del donante a partir de células del injerto lo que les permite a continuación estimular la respuesta inmune específica de antígeno (12).

INTRODUCCIÓN

Las células APC del receptor, ahora quiméricas para MHC, pueden estimular vía directa a través de HLA extraños intactos y/o indirecta a través del procesamiento y presentación de péptidos de HLA extraños adquiridos a partir de material celular necrótico o apoptótico.

Otra situación que requiere especial consideración es la denominada enfermedad de injerto contra huésped (EICH), principalmente en el trasplante de médula ósea, donde se incorporan células de un sistema inmune completo en un individuo que fue inmunosuprimido completamente como régimen de acondicionamiento previo.

El mecanismo de alorreconocimiento durante la EICH es similar al reconocimiento por el huésped de antígenos del donante, pero en sentido contrario (Fig 2), es decir las células T del donante reconocen aloantígenos en las APC del receptor (alorreconocimiento directo) y en las APC singénicas (del donante) (alorreconocimiento indirecto) aunque probablemente la contribución de las APC del anfitrión, tenga una importancia crítica en la EICH (13)

En esta situación, por tanto los linfocitos T maduros presentes en la médula ósea del donante pueden reconocer a las células del huésped como extrañas produciendo la EICH.

De igual manera, también se podrán activar contra células leucémicas remanentes que sobrevivieron al condicionamiento del receptor y mediar el tan deseado efecto de injerto contra tumor (EICT).

Simultáneamente, las células madre presentes en la médula del donante madurarán en los órganos linfoides primarios del receptor. Aquéllas células T maduras que fueron seleccionadas negativamente por células epiteliales del timo (que son del receptor) serán tolerantes contra los aloantígenos del

INTRODUCCIÓN

receptor. Sin embargo, las seleccionadas negativamente por células dendríticas del timo (que son de origen hematopoyético y por lo tanto, tendrán el mismo HLA que el donante) serán tolerantes contra el HLA del donante pero no contra el del receptor.

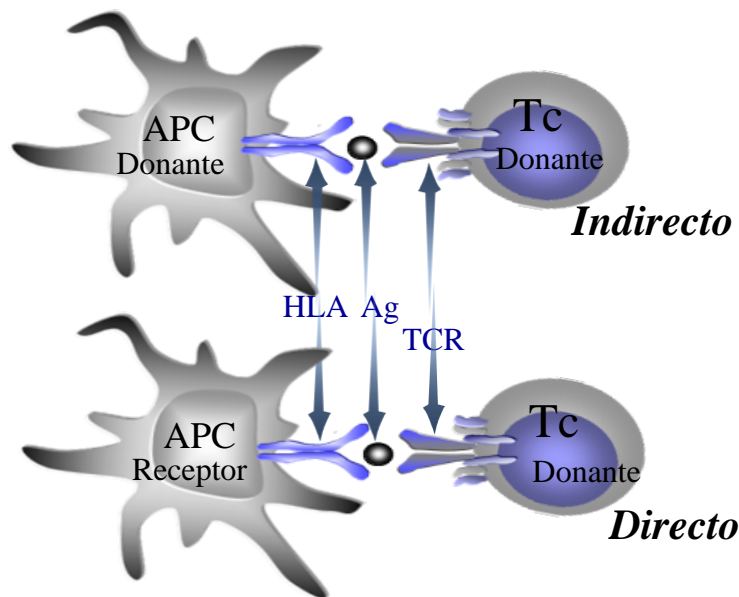


Figura 2: Alorreconocimiento en EICH: Las células T del donante reconocen aloantígenos en las APC del receptor (alorreconocimiento directo) y en las APC del donante (alorreconocimiento indirecto)

Por lo tanto, estas células T, a pesar de hacer su ontogenia en el receptor, no son tolerantes contra éste y podrán activarse por la vía directa de alorreconocimiento, produciendo la EICH y también como hemos dicho EICT (14).

La EICH puede mostrar a menudo especificidad para distintos antígenos, entre ellos mHAg (15), que resulta de gran interés en los casos de parejas donante-receptos idénticas para los antígenos HLA clásicos (16). No sorprende por tanto que el riesgo de GvHD sea más alto si donante y receptor no tienen

INTRODUCCIÓN

igual género, sobre todo si el donante femenino es múltipara o ha tenido transfusiones de sangre (por la sensibilización al antígeno H-Y (17)).

Aunque GvHD es más frecuente en TMO (91), también ocurre en trasplantes sólidos incluyendo el hígado (18), el intestino (19), el pulmón (20), el páncreas (21) y el riñón (22).

1.4 Consecuencias del alorreconocimiento

El sistema HLA contiene los genes funcionales más variables descritos en vertebrados (23,24). Este polimorfismo es la base de la extrema dificultad de encontrar donantes no relacionados de médula ósea que no induzcan una fuerte alorrespuesta anti-HLA. La ausencia de identidad inmunológica entre donante y receptor tiene por tanto tres consecuencias fundamentales (25-27):

- El receptor genera una respuesta inmunológica contra el injerto, lo que puede conllevar su rechazo. Está mediado principalmente por células T residuales del receptor con especificidad antidonante (anti-injerto).
- Las células inmunocompetentes alorreactivas del injerto reaccionan contra las células de los tejidos del receptor que presentan antígenos menores o mayores de histocompatibilidad distintos a los suyos, lo que puede desencadenar la enfermedad injerto contra huésped aguda (EICHa) o crónica (EICHc).
- El efecto injerto contra tumor (EICT) parece estar mediado por las células T del donante, ya que hay poblaciones que reconocen aloantígenos expresados en células normales y malignas, y otras que reconocen

INTRODUCCIÓN

antígenos específicos del tumor. Los dos grupos, al reconocer las células tumorales ejercen una actividad citolítica mediando el EICT. Este fenómeno está íntimamente asociado al desarrollo de la EICH.

Por último, se pueden llegar a producir otros dos fenómenos: el establecimiento de quimerismo, al coexistir en el receptor del injerto células provenientes de dos individuos distintos y la tolerancia post-trasplante (28,29).

2. SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

2.1 Historia y definición

El Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex) está constituido por una serie de genes implicados en la activación de la respuesta inmunológica adaptativa. Se trata de un sistema altamente polimórfico que está presente en todos los vertebrados (30) y que codifica proteínas de superficie cuya función es presentar antígenos a los linfocitos T, células inmunitarias que son capaces de poner en marcha una respuesta inmunológica eficaz y específica contra el agente causante de su activación (31,32).

Las distintas variantes alélicas expresadas por los genes MHC difieren en su capacidad para reconocer y presentar el amplio repertorio de antígenos a los que se encuentran expuestas (33).

Los genes de histocompatibilidad en humanos fueron descubiertos por Jean Dausset cuando, investigando el origen de la leucopenia en pacientes que habían recibido múltiples transfusiones sanguíneas, detectó la presencia de

INTRODUCCIÓN

anticuerpos que provocaban la aglutinación de leucocitos del donante, pero no del receptor (34,35).

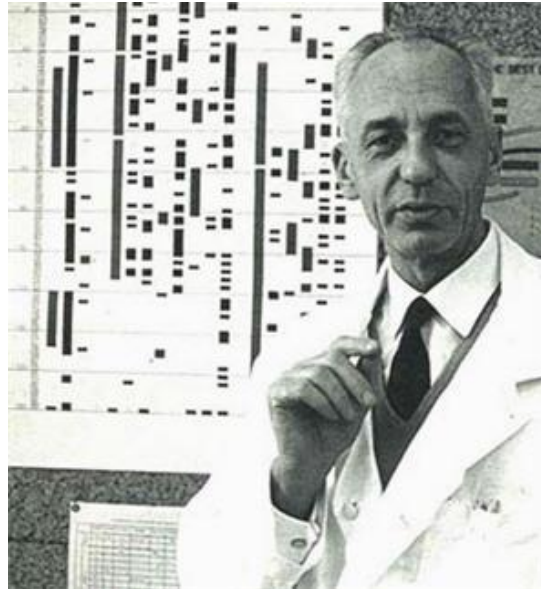


Figura 3. Jean Dausset, descubridor del sistema HLA en humanos

Después se verificó que dichos anticuerpos eran resultado de la inmunización contra los antígenos leucocitarios de los donantes. Estos anticuerpos también serían detectados en mujeres multíparas que habían desarrollado inmunidad contra los antígenos leucocitarios paternos presentes en el feto (36,37). En la década de 1960 se comprobó que estos antígenos leucocitarios representaban el Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano, que fue denominado HLA (human leukocyte antigen) (38,39).

A pesar de su función inmunológica, y por motivos históricos, ha conservado este nombre por su relación con la compatibilidad entre tejidos y su importancia en el trasplante (38).

2.2 Organización genética de la región HLA

Los genes de histocompatibilidad humanos se encuentran ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31-6p21.32), en una región que se denomina HLA (Human Leucocyte Antigen) a pesar de contener genes no directamente relacionados con la presentación antigénica ni, en ocasiones, con la función inmunológica.

El primer mapa genético de esta región se completó en 1993 (40). Unos años más tarde se elaboró otro mapa según el cual la región HLA ocupa 3.6 Mb y contiene 224 genes de los que se expresan algo más de la mitad: unos 128 genes (The MHC sequencing consortium, 1999).

Por otro lado, la secuenciación completa del cromosoma 6 reveló la existencia de nuevos genes relacionados con el MHC más allá de las 3.6 Mb descritas inicialmente, por lo que se elaboró un nuevo mapa que recibió el nombre de MHC extendido ("Ingles extended MHC) (41) para diferenciarlo del mapa de 1999/2004 que ahora es aludido como mapa clásico (42).

El mapa clásico está dividido en 3 regiones denominadas región de clase I (HLA-I), región de clase III (HLA-III) y región de clase II (HLA-II), situadas en este orden de telómero a centrómero en el brazo corto del cromosoma 6 (tabla 5).

El mapa extendido completa el anterior al añadir dos nuevas regiones: una en el extremo telomérico (región de clase I extendida) y otra en el extremo centromérico (región de clase II extendida), ampliándose así las dimensiones de la región HLA hasta las 7.6 Mb.

Tabla 5. Nombres de los genes de la región HLA

Nombre	Equivalentes	Características moleculares
HLA-A	—	Class I α -chain
HLA-B	—	Class I α -chain
HLA-C	—	Class I α -chain
HLA-E	E, '6.2'	Associated with class I 6.2-kB Hind III fragment
HLA-F	F, '5.4'	Associated with class I 5.4-kB Hind III fragment
HLA-G	G, '6.0'	Associated with class I 6.0-kB Hind III fragment
HLA-H	H, AR, '12.4', HLA-54	Class I pseudogene associated with 5.4-kB Hind III fragment
HLA-J	cda12, HLA-59	Class I pseudogene associated with 5.9-kB Hind III fragment
HLA-K	HLA-70	Class I pseudogene associated with 7.0-kB Hind III fragment
HLA-L	HLA-92	Class I pseudogene associated with 9.2-kB Hind III fragment
HLA-N	HLA-30	Class I gene fragment associated with a 1.7kb Hind III fragment
HLA-P	HLA-90	Class I gene fragment associated with 9.0-kB Hind III fragment
HLA-S	HLA-17	Class I gene fragment associated with a 3.0kb Hind III fragment
HLA-T	HLA-16	Class I gene fragment associated with 16.0-kB Hind III fragment
HLA-U	HLA-21	Class I gene fragment associated with 2.1-kB Hind III fragment
HLA-V	HLA-75	Class I gene fragment associated with 7.5-kB Hind III fragment
HLA-W	HLA-80	Class I gene fragment associated with 8.0-kB Hind III fragment
HLA-X	HLA-X	Class I gene fragment
HLA-Y	HLA-BEL/COQ/DEL	Class I gene fragment
HLA-Z	HLA-Z1	Class I gene fragment located within the HLA Class II region
HLA-DRA	DR α	DR α chain
HLA-DRB1	DR β 1, DR1B	DR β 1 chain determining specificities DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 etc
HLA-DRB2	DR β II	Pseudogene with DR β -like sequences
HLA-DRB3	DR β III, DR3B	DR β 3 chain determining DR52 and Dw24, Dw25, Dw26 specificities
HLA-DRB4	DR β IV, DR4B	DR β 4 chain determining DR53
HLA-DRB5	DR β III	DR β 5 chain determining DR51
HLA-DRB6	DRBX, DRB σ	DRB pseudogene found on DR1, DR2 and DR10 haplotypes
HLA-DRB7	DRB ψ 1	DRB pseudogene found on DR4, DR7 and DR9 haplotypes
HLA-DRB8	DRB ψ 2	DRB pseudogene found on DR4, DR7 and DR9 haplotypes
HLA-DRB9	M4.2 β exon	DRB pseudogene, isolated fragment
HLA-DQA1	DQ α 1, DQ1A	DQ α chain
HLA-DQB1	DQ β 1, DQ1B	DQ β chain
HLA-DQA2	DX α , DQ2A	DQ α -chain-related sequence, not known to be expressed
HLA-DQB2	DX β , DQ2B	DQ β -chain-related sequence, not known to be expressed
HLA-DQB3	DV β , DQB3	DQ β -chain-related sequence, not known to be expressed
HLA-DOA	DNA, DZ α , DO α	DO α chain
HLA-DOB	DO β	DO β chain
HLA-DMA	RING6	DM α chain
HLA-DMB	RING7	DM β chain
HLA-DPA1	DP α 1, DP1A	DP α chain
HLA-DPB1	DP β 1, DP1B	DP β chain
HLA-DPA2	DP α 2, DP2A	DP α -chain-related pseudogene
HLA-DPA3	DPA3	DP α -chain-related pseudogene
HLA-DPB2	DP β 2, DP2B	DP β -chain-related pseudogene
TAP1	ABCB2, RING4, Y3, PSF1	ABC (ATP Binding Cassette) transporter
TAP2	ABCB3, RING11, Y1, PSF2	ABC (ATP Binding Cassette) transporter
PSMB9	LMP2, RING12	Proteasome-related sequence
PSMB8	LMP7, RING10	Proteasome-related sequence
MICA	MICA, PERB11.1	Class I chain-related gene
MICB	MICB, PERB11.2	Class I chain-related gene
MICC	MICC, PERB11.3	Class I chain-related pseudogene
MICD	MICD, PERB11.4	Class I chain-related pseudogene
MICE	MICE, PERB11.5	Class I chain-related pseudogene

Según el mapa extendido, la región HLA contiene 421 genes, de los cuales el 60% expresan proteínas funcionales, el 33% son pseudogenes (expresan proteínas aberrantes o bien no se expresan) y el 7% restante se transcriben dando lugar a moléculas de ARN transferente (ARNt), que participan en el proceso de traducción del ARN mensajero (ARNm) en el

INTRODUCCIÓN

ribosoma. La mayor concentración de genes se observa en la región de clase III, que contiene 58 genes funcionales (23%) en 0.7 Mb, lo que la convierte además en la región de mayor densidad génica de todo el genoma humano (42). La región HLA de forma muy resumida incluyendo los principales genes HLA podemos observarla en la figura 4.

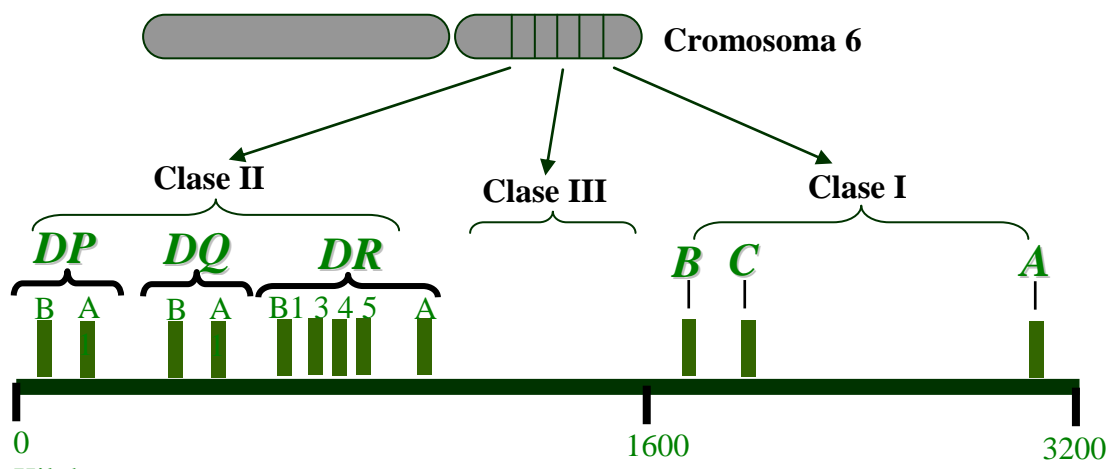


Figura 4: Representación esquemática de los principales genes HLA involucrados en el trasplante

En la actualidad se puede decir que es el complejo genético con más variabilidad del ser humano debido a que es un sistema:

- Poligénico: diversos antígenos codificados por distintos genes
- Polimórfico: cada uno de los genes presenta múltiples alelos.

Los genes HLA-I se caracterizan por expresar proteínas estructuralmente muy similares, aunque diferentes desde el punto de vista funcional. Según esto, se clasifican en genes de clase I clásicos (HLA-A, HLA-B y HLA-C, también denominados HLA-Ia), genes de clase I no clásicos (HLA-E, HLA-F y HLA-G, también conocidos como HLA-Ib), genes tipo HLA-I (MIC-A y MIC-B) y gen de la hemocromatosis (HFE). Excepto este último, que se

INTRODUCCIÓN

encuentra en la región de clase I extendida, todos están localizados en la región de clase I clásica, en la que también existen 17 pseudogenes.

El gen del *locus* de la cadena asociada a la cadena α de clase I, la β -2-microglobulina (β 2M), está en el cromosoma 15.

Los genes HLA-Ia son muy polimórficos y expresan proteínas implicadas en el reconocimiento de pépticos antigénicos de origen intracelular (derivados de virus y tumores), que son presentados a los linfocitos T citotóxicos (Tc, CD8+) para poner en marcha una respuesta inmunológica de tipo celular (citotóxica). Se expresan en todas las células nucleadas del organismo (Fig 5).

El patrón de expresión de los genes HLA-Ib es mucho más reducido y la función exacta de sus productos proteicos no está muy clara. Su polimorfismo es mucho menor y podrían estar relacionados con fenómenos de tolerancia inmunológica.

Los genes MIC expresan proteínas que son reconocidas por los receptores activadores NKG2D de las células NK y que pueden tener una función inmunológica asociada a la mucosa intestinal. Por su parte, el gen HFE esta implicado en el transporte de hierro.

Los genes HLA-II están ubicados en la región de clase II y dan lugar a proteínas polimórficas implicadas en la presentación antigénica que se denominan HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Fig 5). Se han descrito numerosos genes funcionales y también pseudogenes.

INTRODUCCIÓN

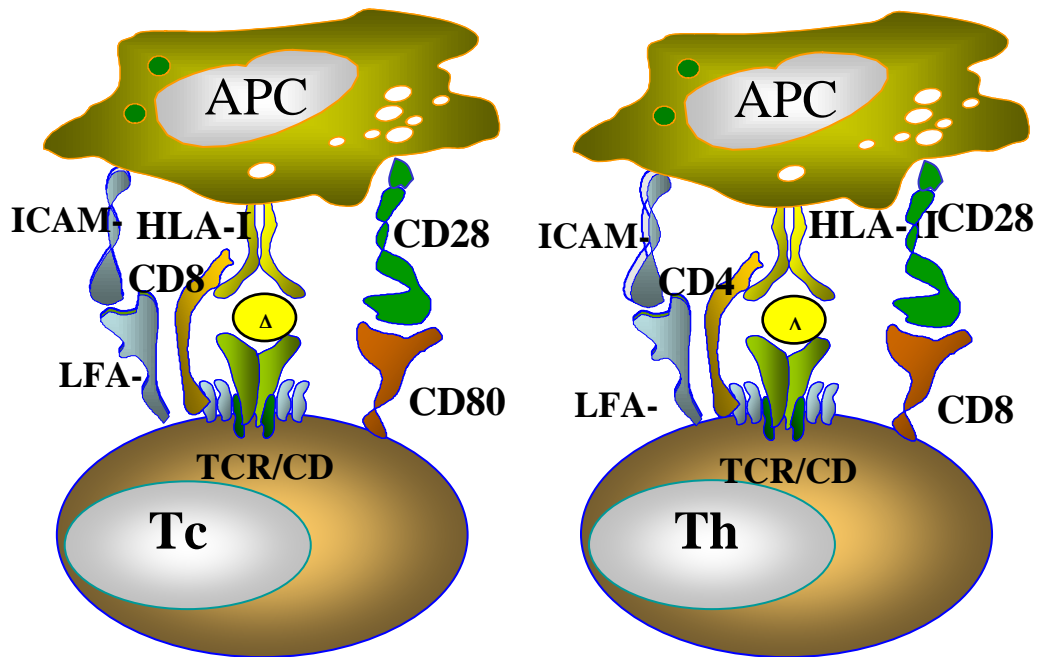


Figura 5: Presentación antigénica. Las moléculas HLA clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos y las de clase II a los colaboradores

En esta región hay también otros 4 genes que intervienen en el procesamiento de antígenos; PSMB8 y PSMB9 que codifican componentes del proteosoma responsables de transformar proteínas en péptidos y TAP1 y TAP2 que participan en el transporte de estos péptidos del citosol al retículo endoplasmático para su unión a las moléculas de HLA y la formación del complejo proteico HLA-péptido.

Las proteínas de clase II se expresan en células especializadas en la presentación antigénica (denominadas APC, antigen presenting cells), fundamentalmente células dendríticas (DC, dendritic cells), macrófagos y linfocitos B. Su función es unir péptidos de origen extracelular (generalmente procedentes de bacterias) y presentarlos a linfocitos T cooperadores (Th,

INTRODUCCIÓN

CD4+) para poner en marcha una respuesta inmunológica de tipo humoral, mediada por anticuerpos.

Este grupo de genes tiene herencia mendeliana y se expresan como caracteres codominantes simples. La región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA transmitidos en un mismo bloque se denomina haplotipo HLA.

Una característica fundamental de la región HLA es que los genes que contiene están muy próximos entre sí, generando disequilibrios de ligamiento muy acentuados (la recombinación entre ellos es altamente improbable) que provocan la existencia de haplotipos que se transmiten como unidades genéticas indestructibles a lo largo de muchas generaciones.

Por tanto a pesar del amplio polimorfismo de estos genes, en condiciones normales sólo tenemos cuatro posibilidades de hermanos que resultan de combinar los dos haplotipos de cada padre

Finalmente, la región de clase III codifica varias moléculas estructural y funcionalmente distintas, incluyendo las fracciones del complemento C4, C2 y el factor Bf, la 21-hidroxilasa, el factor de necrosis tumoral (TNF α) y la proteína de choque térmico Hsp70 (*Heat shock protein 70*).

2.3 Moléculas HLA de clase I

Normalmente, al hablar de moléculas de clase I se está haciendo alusión a las proteínas que resultan de la expresión de los genes HLA de clase I

INTRODUCCIÓN

clásicos (HLA-A, -B, -C) y no clásicos (HLA-E, -F, -G), quedando excluidas las proteínas expresadas por los genes MIC y el gen HFE.

Se trata de glicoproteínas de membrana resultantes de la asociación entre un polipéptido denominado cadena alfa y la proteína beta-2 microglobulina ($\beta 2m$). En la cadena alfa se distinguen 3 regiones: una extracelular formada por 3 dominios (alfa 1, alfa 2, alfa 3), otra transmembrana y una tercera citoplásmica.

La $\beta 2m$ esta acoplada al dominio alfa 3 mediante una unión no covalente (formando una subestructura que recuerda mucho a la de las inmunoglobulinas) y todo el complejo proteico está anclado a la membrana plasmática, de manera que el extremo amino-terminal (NH_3^+) de la cadena alfa queda en el exterior celular y el extremo carboxilo-terminal (COO^-) en el citoplasma celular (Fig 6).

La gran similitud estructural entre las distintas proteínas HLA de clase I se debe a que la estructura de los genes en los que están codificadas sus respectivas cadenas alfa (formados por 8 exones) es también muy parecida.

La estructura de las moléculas HLA de clase I fue descrita por primera vez a partir del antígeno HLA-A2, cristalizado y analizado por difracción de rayos X (43). El resultado de este análisis reveló la existencia de dos dominios tipo inmunoglobulina próximos a la membrana (alfa 3 y $\beta 2m$) y otros dos dominios más alejados (alfa 1 y alfa 2) asociados a un pequeño péptido no identificado ajeno a la molécula de histocompatibilidad. Esos dos dominios distales forman una especie de concha o 'valva', cuyo fondo está constituido por 8 láminas beta (4 de cada dominio) y limitado por 2 hélices alfa (1 de cada dominio) y son capaces de alojar un pequeño péptido (8-10 aminoácidos).

INTRODUCCIÓN

La función de estas moléculas no depende sólo de su estructura, sino también de su polimorfismo. Las moléculas no clásicas tienen poca variabilidad y su capacidad de unir péptidos tiene una finalidad aún por determinar. Las moléculas clásicas, sin embargo, son muy polimórficas y su capacidad para unir péptidos está relacionada con la presentación antigénica, que es consecuencia de la interacción específica entre las moléculas HLA asociadas a un péptido y el receptor de los linfocitos T citotóxicos (TCR-CD8).

De la comparación de numerosas secuencias de histocompatibilidad de clase I clásicas se determinó que la mayor variabilidad se concentra precisamente en los dominios alfa 1 (en la hélice alfa) y alfa 2 (en las láminas beta) y muchas de las posiciones variables forman parte del denominado sitio de reconocimiento antigénico (ARS, antigen recognition site) (44), constituido por aminoácidos cuyas cadenas laterales son accesibles y están implicadas en la unión del péptido y en la interacción con el receptor de la célula T (TCR) (45).

2.4 Moléculas HLA de clase II

Las moléculas HLA de clase II son proteínas de membrana constituidas por dos cadenas proteicas (denominadas alfa y beta) ensambladas mediante uniones no covalentes y ancladas a la membrana plasmática. Cada cadena tiene dos dominios extracelulares (alfa 1 y alfa 2 la cadena alfa; beta 1 y beta 2 la cadena beta), un dominio transmembrana y una región citoplásmica.

Los dominios extracelulares alfa 1 y beta 1 contienen los extremos amino terminales (NH₃⁺), mientras que los extremos carboxilo terminales (COO⁻) se encuentran en la porción citoplásmica de cada cadena.

INTRODUCCIÓN

Nuevamente, los dominios extracelulares más cercanos a la membrana (alfa 2 y beta 2) forman una subestructura similar a la de las inmunoglobulinas (Fig 6).

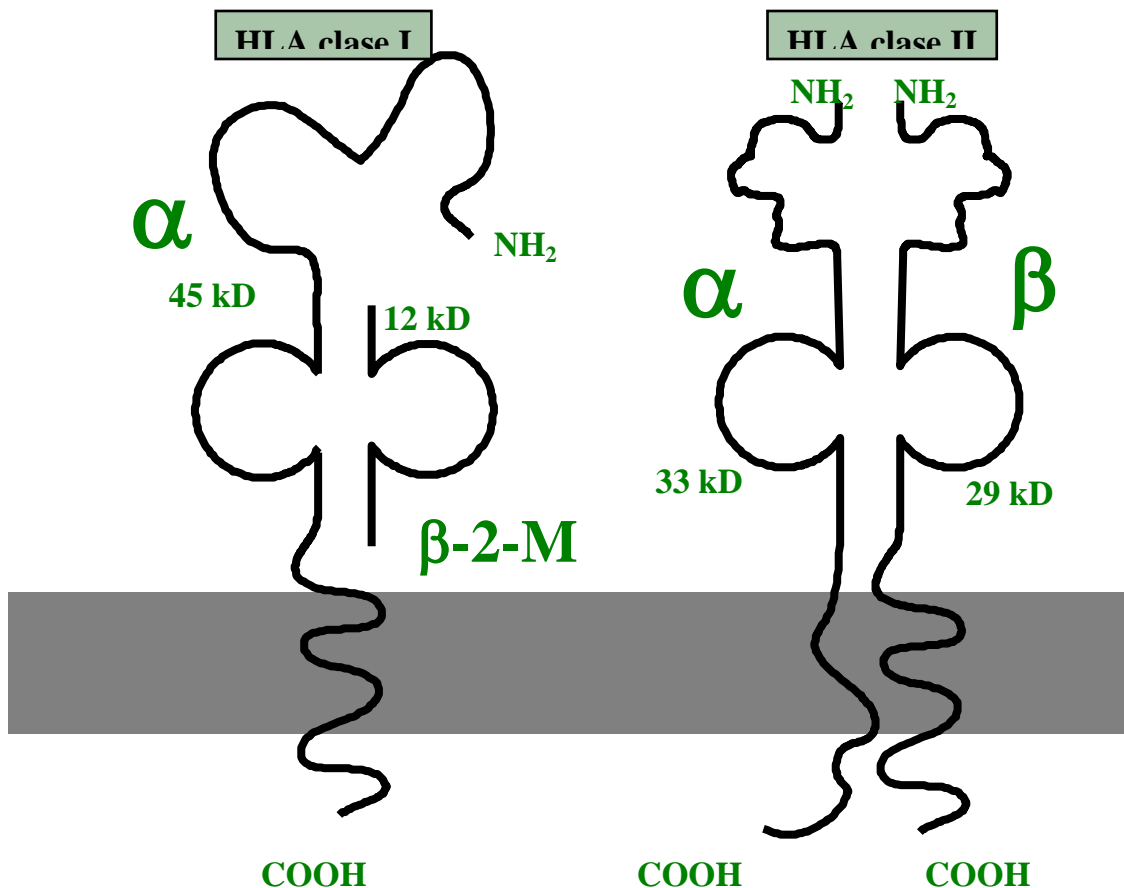


Figura 6. Estructura de las moléculas de histocompatibilidad clase I y clase II

Existen 5 proteínas de clase II: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las cadenas alfa están codificadas en genes denominados 'A' (HLA-DMA, HLA-DPA, etc.) y las cadenas beta están codificadas en genes denominados 'B' (HLA-DMB, HLA-DPB, etc.). Se han descrito en algunos casos varios genes 'A' y también varios genes 'B' codificantes para la misma proteína de clase II.

INTRODUCCIÓN

En concreto hay identificados: 3 genes DPA (denominados DPA1, DPA2, DPA3) y 2 genes DPB (DPB1, DPB2); 1 gen DRA y 9 genes DRB (DRB1, DRB2,..., DRB9); 2 genes DQA (DQA1, DQA2) y 3 genes DQB (DQB1, DQB2, DQB3).

Es destacable que muchas de esas copias extra no son funcionales. De hecho sólo se expresan DPA1, DPB1, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQA2, DQB1, DQB2 y por supuesto los genes que aparecen en copia única (DMA, DMB, DOA, DOB, DRA) (42).

El fenómeno más notable en esta región afecta a los genes HLA-DRB y se denomina polimorfismo de dosis génica. Significa que no todos los individuos poseen todas las copias descritas de genes codificantes de cadenas beta de las moléculas HLA-DR. Si bien todos los individuos poseen el gen HLA-DRB1 (y por supuesto el gen HLA-DRA, que es de copia única), la presencia o no de los otros depende del alelo expresado por el gen HLA-DRB1.

Los dominios alfa 1 y beta 1 en estas proteínas HLA de clase II conforman una valva muy parecida a la de las moléculas HLA de clase I, y también son capaces de unir péptidos, en este caso de mayor longitud (más de 13 aminoácidos).

El polimorfismo también se concentra en el sitio de reconocimiento antigénico (ARS) y afecta fundamentalmente a la cadena beta (dominio beta 1), ya que la cadena alfa suele ser monomórfica en la mayoría de estas proteínas.

La variabilidad está relacionada con la función presentadora de antígenos que desempeñan estas moléculas, que una vez unido el péptido (que es de

INTRODUCCIÓN

origen extracelular, generalmente bacteriano) contactan con el receptor de los linfocitos T cooperadores (TCR-CD4) para activar la respuesta inmune.

Tabla 6. Descripción de las moléculas HLA clásicas.

	HLA-Clase I	HLA-Clase II
Cadenas	2, 1 polimórfica a y otra no	2, ambas polimórficas
Tipos	A, B y C	DR, DP y DQ
Presentan	Antígenos intracelulares	Antígenos extracelulares
Expresión	Todas las células excepto hematíes	Macrófagos, dendríticas, Langerhans, endoteliales, linfocitos B, Kupffer
Inducen	Respuesta citotóxica	Activación células colaboradoras

Un resumen de las principales características de las moléculas HLA clásicas I y II que intervienen en el reconocimiento y respuesta inmune se encuentra en la tabla 6.

2.5 Polimorfismo y evolución de los genes MHC

Como ya se ha comentado, el MHC es el sistema genético mas polimórfico descrito hasta ahora en vertebrados y en humanos es el que registra mayor variabilidad de todo el genoma como lo demuestra los más de 3.000 alelos descritos hasta la fecha (23, 24, 46, 47)

Parece lógico pensar que esa variabilidad deriva de la función presentadora de antígenos de las moléculas expresadas por estos genes, que deben tener la capacidad de reconocer un repertorio de antígenos lo más amplio posible (32).

INTRODUCCIÓN

Si hubiera una distribución aleatoria de los alelos HLA, existirían unos 10^{23} genotipos únicos HLA-A, -B, -C, -DR y -DQ. Sin embargo, se sabe que hay asociaciones más frecuentes que la que cabría esperar si la asociación fuera únicamente al azar, lo que se conoce como desequilibrio de unión. Además, la frecuencia de los distintos alelos varía entre poblaciones.

Por tanto se hacen necesarios estudios más completos para analizar los mecanismos que generan tanto polimorfismo y las fuerzas responsables de su mantenimiento en el tiempo (48, 49, 50, 51, 52).

A continuación en la tabla 7 se refleja una muestra del gran polimorfismo presente en estos genes

Tabla 7: Número de alelos descritos y validados de las moléculas clásicas HLA clase I y clase II (datos de IMGT/HLA).

Molécula	Locus	Especificidades serológicas	Alelos (ADN)
HLA-A	A	28	1601
HLA-B	B	59	2125
HLA-C	C	10	1102
HLADR	DRA+DRB1	21	7 + 1027
HLA-DP	DQA1+DQB1	6	44 + 153
HLA-DQ	DPA1+DPB1	9	32 + 149

2.6 Mecanismos generadores de polimorfismo: la conversión génica

Como norma general se asume que los genes evolucionan al acumular mutaciones en posiciones concretas del ADN. Sin embargo, en el caso del

INTRODUCCIÓN

MHC este fenómeno no es capaz de explicar por sí sólo la enorme diversidad alélica encontrada. Así, es conocido que en esta región además se produce recombinación entre alelos de un mismo locus e incluso entre alelos situados en diferentes loci.

Este fenómeno, denominado conversión génica, provoca el intercambio de pequeños fragmentos de ADN entre unos alelos y otros y afecta sobre todo a los exones implicados en el reconocimiento del antígeno.

Las primeras evidencias se obtuvieron al comparar entre sí secuencias de distintos alelos. En un estudio en el que se comparaban alelos HLA de clase I se comprobó que en algunos casos dos alelos determinados eran idénticos entre sí salvo por un pequeño segmento (de no más de 35 nucleótidos) que parecía pertenecer a un tercer alelo (53).

En esa misma línea, otro trabajo mostraba que las diferencias entre las secuencias de clase I analizadas eran atribuibles a mutaciones puntuales y a fenómenos de conversión génica (54).

También se ha observado que el alelo HLA-B53 que confiere resistencia a la malaria (55), es idéntico al alelo HLA-B*3501 excepto por un segmento de 6 codones, que además parece ser el responsable de la resistencia puesto que HLA-B*3501 no previene la enfermedad (56). Otros estudios más recientes implican a los grupos de alelos HLA-B27 (57), HLA-B17 (58) y HLA-B41 (59).

Por otro lado está el hecho de que numerosas poblaciones nativas de Sudamérica presentan un elevado porcentaje de alelos de nueva creación que no se encuentran en ninguna otra parte del mundo (60) y que se descarta que se hayan originado sólo por mutaciones puntuales ya que no han tenido tiempo, al estimarse que dichas poblaciones no tienen una antigüedad superior

INTRODUCCIÓN

a 20.000 años (unas 1.000 generaciones), momento en el que se supone se separaron de su grupo original (tal vez asiático) para introducirse en el continente americano.

El caso más llamativo es el de la población Guaraní de Brasil, en la que se han encontrado 6 alelos HLA-B de los cuales 5 parecen haberse generado por conversión génica (61).

La verificación de que éste es un fenómeno relativamente frecuente en los genes MHC fue obtenida experimentalmente. Se analizó la proporción de espermatozoides en los que aparecían secuencias nuevas del exón 2 del gen HLA-DPB1, encontrándose que 1 de cada 10.000 gametos había sufrido algún proceso de conversión génica en ese fragmento de gen (62).

En otro trabajo, realizado con ratones, se estimó que la tasa de intercambio genético entre alelos situados en loci diferentes era de 0.5×10^{-6} , muy inferior a la tasa de recombinación entre alelos de un mismo locus, pero suficiente para introducir variabilidad (63). Por tanto parece claro que el principal mecanismo generador de variabilidad HLA es la conversión génica.

2.7 Mantenimiento del polimorfismo

Una vez conocidos los mecanismos que generan la variabilidad en los genes MHC es importante analizar que otros mecanismos (en este caso de tipo selectivo) están actuando sobre ellos para mantener las variantes alélicas a lo largo del tiempo. Los principales agentes selectivos propuestos como responsables del mantenimiento de la variabilidad son los patógenos, que favorecen la permanencia de alelos en la población ejerciendo un tipo de selección denominada selección de balance.

INTRODUCCIÓN

Sin embargo se han sugerido otros mecanismos accesorios que podrían contribuir al mantenimiento del polimorfismo, como son las interacciones materno-fetales (al menos en mamíferos) y los emparejamientos no al azar.

Estos tres mecanismos serían los responsables de la diversidad alélica observada en las poblaciones así como del elevado grado de heterocigosidad que presentan los individuos en los diferentes loci MHC.

- Selección de balance: fue propuesta inicialmente como una estrategia evolutiva encaminada a mantener las distintas variantes alélicas de genes polimórficos en una población con el fin de incrementar sus opciones de supervivencia al favorecer el predominio de individuos heterocigotos, supuestamente más aptos que los homocigotos (51, 64).

Varios polimorfismos moleculares se consideran mantenidos de esta manera, como los que afectan a la cadena beta de la hemoglobina humana (65), al receptor de citoquinas CCR5 humano (66), al sistema de genes de incompatibilidad (SI, self incompatibility) de plantas (67) o al sistema de genes de histocompatibilidad (MHC) en vertebrados (52).

Se han propuesto 3 modelos de selección de balance que explicarían como se mantiene elevado el número de alelos en la población para favorecer el predominio de los heterocigotos.

a) Selección dependiente de frecuencia (68, 69): esta teoría defiende la importancia evolutiva de los llamados alelos raros. En una población en la que existe una variedad de alelos, cada alelo está presente con una frecuencia determinada.

Teóricamente, los alelos más frecuentes son los que más posibilidades de supervivencia aportan a los individuos que los poseen y por ello han ido

INTRODUCCIÓN

incrementando (o manteniendo) su frecuencia generación tras generación. Por el contrario, los alelos menos frecuentes lo son bien porque resultan deletéreos o bien porque no aportan una ventaja adicional.

Estos alelos raros no llegan a desaparecer porque eventualmente pueden resultar ventajosos ante la presencia de un nuevo agente infeccioso que haya desarrollado resistencia frente a los alelos más frecuentes por un fenómeno de coevolución, de manera que empezaran a aumentar su frecuencia a la par que los otros serán cada vez menos frecuentes.

Este proceso, repetido indefinidamente, favorecería la permanencia de alelos en la población, y el número de alelos iría aumentando a medida que se generaran nuevas variantes. Así se establece un balance de frecuencias de alelos a lo largo del tiempo.

b) Ventaja de los heterocigotos: este modelo, también denominado selección sobredominante sostiene que un heterocigoto es capaz de reconocer más antígenos que un homocigoto, por lo que los heterocigotos son seleccionados favorablemente (70. 71).

Sin embargo, la eficacia biológica de cada genotipo es difícil de establecer ya que no todos los posibles heterocigotos son igualmente ventajosos ni tienen por qué ser más aptos que cualquiera de los posibles homocigotos y es casi imposible predecir como evolucionará (o como ha evolucionado) el sistema y hasta qué punto este mecanismo de selección influye en el diseño de la variabilidad observada en una determinada población (48).

c) Selección variable en el tiempo y en el espacio: Según este modelo, la presión ejercida por los patógenos no es constante a lo largo del tiempo ni está

INTRODUCCIÓN

presente en todos los ambientes. Los alelos que aporten resistencia o susceptibilidad a tales patógenos aumentarán o reducirán su frecuencia en función de si el patógeno está o no presente en cada momento y en cada lugar (72, 73).

Es difícil determinar cual de los tres modelos de selección de balance es más importante para mantener el polimorfismo. Por una parte existe una proporción de individuos heterocigotos superior a la esperada en condiciones de neutralidad. Por otra, la exposición variable de los individuos frente a diversos patógenos provoca que los alelos que garantizan mejor la supervivencia también varíen, de manera que a la larga los individuos más aptos suelen ser heterocigotos.

También, la eventual ventaja que supone la presencia de alelos raros en una población garantiza la permanencia de dichos alelos contribuyendo al mantenimiento del polimorfismo (49). Por tanto, los 3 modos de selección descritos anteriormente parecen estar interconectados.

El resultado de un proceso de selección de balance se identifica analizando la proporción entre la tasa de sustituciones no sinónimas (dN, provocan cambio de aminoácido) y la tasa de sustituciones sinónimas (dS, no provocan cambio de aminoácido) en las zonas de un gen que están sujetas a selección (74, 75).

En el caso de los genes MHC dichas zonas son las implicadas en el reconocimiento antigénico. Cuando la tasa de mutaciones no sinónimas es superior a la tasa de mutaciones sinónimas en los codones que determinan el sitio de reconocimiento antigénico (ARS), mientras que en el resto de la

INTRODUCCIÓN

secuencia ocurre lo contrario, se asume que el gen analizado ha estado sujeto (y probablemente lo siga estando) a un fenómeno de selección de balance.

- Emparejamientos no al azar: como resultado de diversos estudios se ha propuesto que antes de la selección de balance debe existir otra etapa selectiva que favorece el exceso de individuos heterocigotos en una población y que se debe a emparejamientos no al azar.

Se llegó a esta conclusión al observarse que en algunas especies los individuos que se emparejan presentan menos coincidencias de alelos MHC de las esperables por azar, por lo que se supuso que existía algún mecanismo que permitía seleccionar a las parejas que poseían alelos diferentes a los propios. Este fenómeno se ha observado en humanos (76), en ratones (77-79) en peces (80, 81) y en aves (82). Sin embargo, otros estudios realizados en humanos (83) y en ovejas (84) no han detectado este sesgo.

En cualquier caso, el gran número de alelos presentes en las poblaciones hace que las posibles combinaciones de alelos resultantes de emparejamientos tengan una probabilidad tan baja que sea difícil determinar si las parejas formadas se ajustan o no a lo esperable por azar (48, 52).

- Interacción materno-fetal: Otro fenómeno selectivo que se ha propuesto resulta de la observación de que la incidencia de abortos espontáneos parece afectar más a parejas que comparten varias proteínas de histocompatibilidad (85, 86).

Por tanto, las interacciones materno-fetales, los emparejamientos no al azar y la selección ejercida por patógenos son los tres mecanismos selectivos a los que se atribuye la gran variabilidad observada en el sistema MHC y el predominio de individuos heterocigotos (48, 52).

2.8 Nomenclatura HLA

En la actualidad hay en uso dos formas de nomenclatura HLA, la serológica y la molecular. Aunque en términos generales están interrelacionadas se observan diferencias entre ambas:

- Serológica: establecida en 1975 y modificada en 1984 (87, 88). Se basa en las especificidades (epítomos) de los productos de los genes HLA definidos por técnicas inmunológicas serológicas o celulares. La nomenclatura oficial fue establecida por la OMS. La letra (A, B, etc) se refiere al locus y el número al antígeno en particular codificado por ese locus. Los números entre paréntesis denotan los antígenos ("broad") de los cuales derivan las especificidades "subtipicas" ("split") en que se desdoblan (tabla 8).
- Molecular: establecida en 1987 y que se basa en alelos definidos por secuenciación (89). En esta nomenclatura, el locus HLA (A, B, C, DR, DQ y DP) se separa mediante el símbolo "*" de un número que puede tener diferentes dígitos.

Tabla 8 Lista de las especificidades HLA serológicas y celulares

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
A1	B5,B7	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B703	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B8,B12	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B13,B14	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B15,B16	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B17,B18	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B21,B22	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B27	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B2708	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B35,B37	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B38(16)		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B39(16)		Dw12	DR11(5)		

INTRODUCCIÓN

A25(10)	B3901		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B3902		Dw14	DR13(6)		
A28	B40,B4005		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B41,B42		Dw16	DR1403)		
A30(19)	B44(12)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B45(12)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A32(19)	B46,B47		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B48		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B49(21)		Dw21	DR18(3)		
A36	B50(21)		Dw22	DR51		
A43	B51(5)		Dw23	DR52		
A66(10)	B5102		Dw24	DR53		
A68(28)	B5103		Dw25			
A69(28)	B52(5)		Dw26			
A74(19)	B53					
A80	B54(22)					
	B55(22)					
	B56(22)					
	B57(17)					
	B58(17)					
	B59					
	B60(40)					
	B61(40)					
	B62(15)					
	B63(15)					
	B64(14)					
	B65(14)					
	B67,B70					
	B71(70)					
	B72(70)					
	B73					
	B75(15)					
	B76(15)					
	B77(15)					
	B78,B81					
	B82,Bw4					
	Bw6					

Quando se lleva a cabo un tipaje HLA génico, la nomenclatura debe asignarse de acuerdo con el nivel de discriminación del procedimiento empleado. El estudio con los dos primeros dígitos se denomina baja resolución, ya que no llegan a discriminar entre alelos, pero indica similitud con los miembros de un grupo ya definido, incluso aunque estos puedan no ser serológicamente similares.

Los estudios de alta resolución (al menos 4 dígitos) sí permiten discriminar entre alelos. En concreto son los dígitos tercero y cuarto los que ya definen la

INTRODUCCIÓN

especificidad alélica. Ocasionalmente, un valor numérico adicional se añade para identificar un subtipo diferente por la sustitución de un nucleótido que no altera la secuencia de aminoácidos ni la expresión antigénica del producto proteico.

La nomenclatura de algunos alelos puede tener un 7° y un 8° dígito para indicar que hay polimorfismos en una región no codificante del alelo. La denominación 01 se refiere a la secuencia “normal” y 02 a la “modificada”.

Por último, podemos encontrar una “N” o una “L” en algunos alelos, en los que la “N” indica que el producto no es expresado y la “L” que es expresado con un nivel muy bajo.

En el año 2002, en vistas de que *A*02* y *B*15* tenía más de 100 alelos (90), se tomó la decisión de denominar los alelos posteriores como *A*92* y *B*95* respectivamente. Sin embargo para los alelos *HLA-DPB*, se decidió continuar la numeración de familias de alelos por encima de 100 ej *DPB1*0102*, *0203* etc.

Recientemente, la nomenclatura ha sufrido algunas modificaciones así, actualmente se introducen dos puntos “:” entre cada dos dígitos, se añade un cero delante de nomenclaturas con un solo dígito y desaparecen las denominaciones *A*92* y *B*95*: *A*9201* se convierte en *A*02:101* y *B*9501* en *B*15:101*.

Las denominaciones *A*02:100* y *B*15:100* no serán asignadas. En los casos que otra familia de alelos alcance 100 estos sí serán denominados secuencialmente, así por ejemplo el *A*24:99* será seguido del *A*24:100*. Los nombres de los alelos *DPB1* que fueron asignados según la anterior norma han sido renombrados como *DPB*0203** en *DPB1*101:01* (91).

INTRODUCCIÓN

En la tabla 9 se muestra un ejemplo de cómo se escribe un alelo HLA y del significado de los dígitos.

Tabla 9. Explicación de la nomenclatura HLA

Nomenclatura*	Indica
HLA	Región HLA y prefijo para un gen HLA
HLA-DRB1	Un <i>locus</i> particular de HLA
HLA-DRB1*13	Un grupo de alelos que codifican el antígeno DR13
HLA-DRB1*13:01	Un alelo específico HLA.
HLA-DRB1*13:01N	Un alelo nulo (no se expresa)
HLA-DRB1*13:01:02	Mutación silente o sinónima. Proteína expresada DRB1*1301
HLA-DRB1*13:01:01:02	Mutación intrónica (no codificante). Proteína expresada DRB1*1301
HLA-DRB1*13:01:01:02N	Alelo nulo con mutación intrónica
HLA-DRB1*13X	Alta resolución no realizada

También la 'w' desaparece de los alelos HLA-C pero permanece en el nombre de los antígenos para evitar la confusión con los factores del complemento.

Se diferencia entre la nomenclatura del gen y la proteína: la génica debe ir en mayúscula y en letra tipo "itálica" y las proteínas igual símbolo pero no van con letra "itálica".

La denominación génica *A*03:01* se corresponde por tanto con la proteica *A*03:01*. Todos estos cambios son oficiales y de obligado cumplimiento desde Abril 2010.

El listado con las denominaciones antiguas y las nuevas aparecen en IMGT/HLA Database www.ebi.ac.uk/imgt/hla (92, 93).

2.9 Informes ambiguos

El nivel de resolución alcanzado por las tecnologías de tipaje no siempre puede asignar un alelo inequívocamente.

A menudo sólo es posible resolver la presencia de un número de alelos estrechamente relacionado sin poder diferenciarlos (34, 91). Existen diferentes posibilidades para expresar estas ambigüedades:

- En primer lugar se debe diferenciar entre (/) que indica "o" para resultados ambiguos mientras que (,) indica 'y'. Así por ejemplo un informe podría quedar: A *02:01/02:09, 03:01; B*07:02, 15:02/15:73;
- Se puede utilizar un guión "-". Por ejemplo DRB1*0401-04 que indica DRB1* 0401 ó 0402 ó 0403 ó 0404 para diferenciarlo de DRB1*0401/04: que sólo incluye DRB1*0401 ó *0404. Por lo tanto sabemos que el paciente no es 02 ni 03, pero no podemos diferenciar si su alelo es 01 ó bien 04.

Cuando la nomenclatura tradicional es compleja como en el caso: B*1501/1502/1505/1515/1521/1545 puede ser simplificada mediante un código alfanumérico desarrollado por el National Donor Marrow Program (NMDP). Los distintos alelos posibles son codificados por varias letras. Así, HLA-B*1501+1502 se corresponde con HLA-B*15AB (listado de códigos disponible en: <http://www.nmdpresearch.org>)

También existen otras dos posibilidades para solucionar ambigüedades:

- Los alelos HLA con idéntica secuencia de nucleótidos en la región del dominio de unión al péptido (exón 2 y 3 para clase I y exón 2 sólo para clase II) se les asignará una 'P' que sigue la designación del alelo con menor numeración del grupo. Así por ejemplo:

INTRODUCCIÓN

*A*02:01:01:01/A*02:01:01:02L/A*02:01:01:03/A*02:01:02/A*02:01:03/A*02:01:04/A*02:01:05/A*02:01:06/A*02:01:07/A*02:01:08/A*02:01:09/A*02:01:10/A*02:01:11/A*02:01:12/A*02:01:13/A*02:01:14/A*02:01:15/A*02:01:17/A*02:01:18/A*02:01:19/A*02:01:21/A*02:01:22/A*02:01:23/A*02:01:24/A*02:01:25/A*02:01:26/A*02:01:27/A*02:01:28/A*02:01:29/A*02:01:30/A*02:01:31/A*02:01:32/A*02:01:33/A*02:01:34/A*02:01:35/A*02:01:36/A*02:01:37/A*02:01:38/A*02:01:39/A*02:01:40/A*02:01:41/A*02:01:42/A*02:09/A*02:66/A*02:75/A*02:89/A*02:97:01/A*02:97:02/A*02:132/A*02:134/A*02:140*

Pueden ser reducidos a *A*02:01P*

- Los alelos HLA que tienen una secuencia de nucleótidos que codifican la misma secuencia proteica en el dominio de unión al péptido. (exón 2 y 3 para clase I y exón 2 sólo para clase II) se les asignará una 'G' que sigue la designación del alelo con menor numeración del grupo. Así por ejemplo:

*A*02:01:01:01/A*02:01:01:02L/A*02:01:01:03/A*02:01:08/A*02:01:11/A*02:01:14/A*02:01:15/A*02:01:21/A*02:09/A*02:43N/A*02:66/A*02:75/A*02:83N/A*02:89/A*02:97:01/A*02:97:02/ A*02:132 /A*02:134/ A*02:140*

Pueden ser reducidos a *A*02:01:01G (24)*

3. SELECCIÓN DE DONANTES

3.1 HLA y trasplante

La principal aplicación del estudio del sistema HLA desde su descubrimiento ha sido en la selección de donantes adecuados para trasplante tanto de progenitores hematopoyéticos como de órganos sólidos.

INTRODUCCIÓN

En el contexto del alo-TPH lo ideal para los pacientes es localizar un donante HLA compatible entre los familiares sanos más directos, especialmente entre sus hermanos ya que en caso de compatibilidad HLA, las células T alorreactivas del donante presentan una menor o nula actividad frente a las células del receptor, y por tanto el riesgo de desarrollar EICH es más reducido que cuando existe incompatibilidad. También disminuiría el riesgo de rechazo.

Como único rasgo negativo de la identidad HLA es que el EICT es menos acusado y por tanto aumenta el riesgo de recaída respecto a la incompatibilidad HLA (94, 95).

Debido al polimorfismo tan elevado de las moléculas HLA, no se consideran estudiar todos los loci. Así en el trasplante de órganos sólidos se tienen en cuenta HLA-A, HLA-B y HLA-DR.

En el trasplante de progenitores hematopoyéticos además de los loci anteriormente citados se estudia también HLA-C.

3.2 Elección del donante/tipo de trasplante

Para asegurarnos en lo posible el éxito del trasplante se deben tener en cuenta una serie de variables como son:

- Tipo de enfermedad
- Estadio de enfermedad
- Edad del paciente
- Peso del paciente
- Compatibilidad HLA

INTRODUCCIÓN

Haciendo hincapié en este último punto, y considerando el grado de compatibilidad donante receptor, podemos definir los siguientes conceptos:

- Donante ideal: hermano HLA idéntico para locus A, B, C y DRB1
- Donante aceptable: familiar con 1 única diferencia HLA antigénica o alélica (7/8 identidades loci A,B, C y DRB1).

Si no existiera un donante ideal o aceptable entre los familiares estudiados se debe recurrir a la búsqueda de un donante no emparentado.

En este caso se puede plantear una donación de médula ósea, de sangre periférica o recurrir a unidades de cordón umbilical.

En caso de existir más de un donante totalmente compatible se sigue una serie de criterios para la elección del más conveniente.

Estos criterios siguen la premisa de reducir el riesgo de complicaciones post-trasplante y mejorar los resultados del procedimiento.

Se deben tener en cuenta los siguientes criterios en el orden de importancia que se citan:

- 1º. El que presente más compatibilidades (10/10; 9/10)
- 2º El más joven
- 3º El de mayor volumen corporal, mayor celularidad
- 4º Si el receptor es CMV negativo, el que tenga serología CMV negativa.
- 5º Isogrupo: se recomienda que no haya incompatibilidad ABO mayor con el receptor
- 6º Sin antecedentes transfusionales ni embarazo
- 7º Varón si el receptor es varón.

3.3 Compatibilidad donante/receptor

Se estudia mediante el análisis de los antígenos del sistema HLA.

3.3.1 Donantes familiares

Las exigencias de compatibilidad en el trasplante de médula ósea explicarían que en primer lugar se estudie al paciente, hermanos y padres. Al menos se debe realizar tipaje HLA A, B de baja resolución y si son idénticos se amplía el estudio a HLA-DRB1. El donante ideal para la práctica de un TPH es un hermano HLA genóticamente idéntico al paciente (96-98). La probabilidad de que un hermano sea HLA idéntico a un paciente es sólo del 25%. Lo que hace que la probabilidad de tener un hermano HLA idéntico sea de $1-0.75^n$ (35% para familias de 2,7 hermanos) siendo n el número de hermanos (Fig 7).

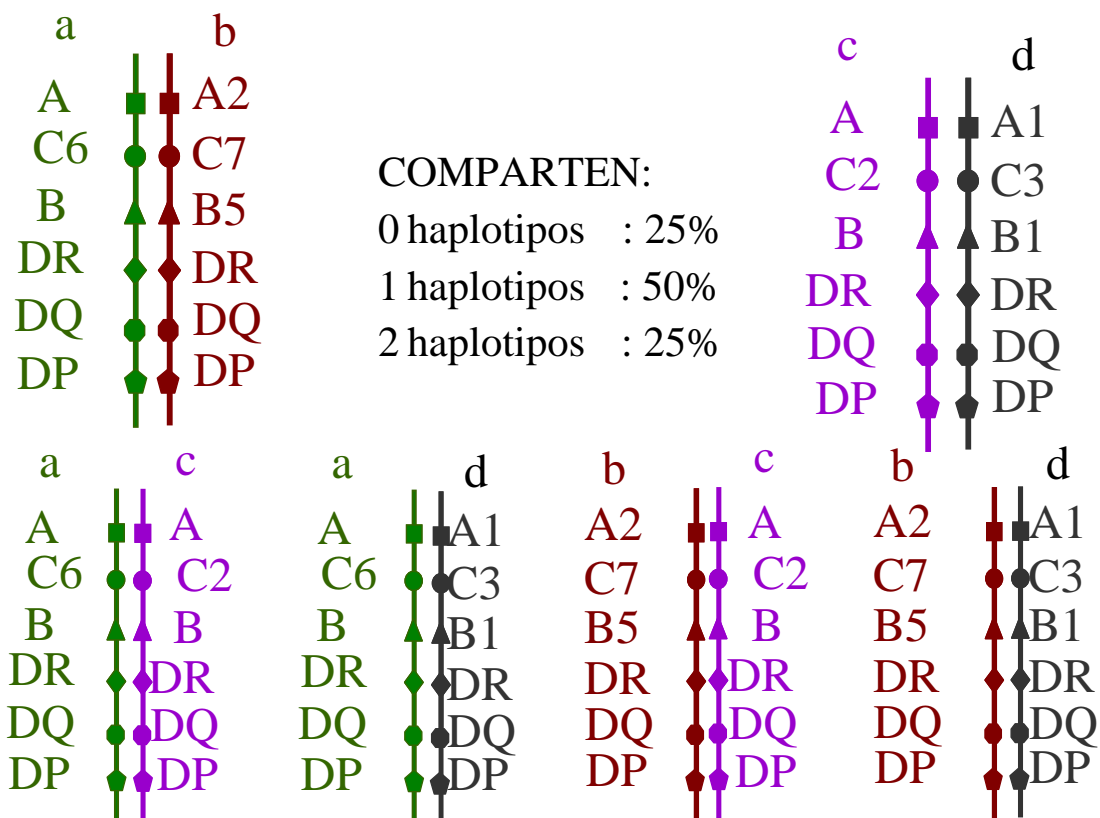


Figura 7. Herencia de los haplotipos HLA entre hermanos. Cada hermano tiene una probabilidad de ser idéntico del 25%. Entre todos los hermanos será $1-0.75^n$, siendo n el número de hermanos

INTRODUCCIÓN

En el cálculo no están considerados factores tales como posibles mutaciones y/o entrecruzamientos ya que éstos son raros (<1%). En caso de entrecruzamientos se heredaría un haplotipo que no está presente como tal en los padres y que es fruto de la unión complementaria de dos fragmentos de cada uno de los haplotipos de uno de los dos progenitores.

La identidad genotípica se establece mediante determinación de los haplotipos HLA familiares. En dicho supuesto es suficiente como hemos comentado, la determinación de los loci A, B y DRB1.

En casos necesarios se estudia por alta resolución a los no compatibles con el fin de establecer los 4 haplotipos.

Con esto conseguimos conocer la composición alélica completa de los cuatro cromosomas posibles y establecer identidad genotípica (cuando no exista homocigosidad en alguno de los loci de los padres), o fenotípica cuando no se obtienen los 4 cromosomas (o bien hay homocigosidad en alguno de los loci en alguno o los dos padres).

Si no es posible establecer la identidad genotípica, debemos basarnos en la identidad fenotípica. En estos casos se deben realizar estudios de alta resolución al menos para HLA-DRB1.

La determinación alélica de alta resolución para clase I puede estar indicada también, por ejemplo, en el caso de identidad paciente-padre (<1% de probabilidad), a no ser que el haplotipo compartido entre ambos padres lo sea por consanguinidad entre ellos.

INTRODUCCIÓN

En el supuesto de disponer de diversos hermanos compatibles puede plantearse ampliar el tipaje a alelos frecuentemente dispares, como DPB1, para seleccionar al hermano con mayor compatibilidad.

Si no se dispone de un donante ideal, puede considerarse donante aceptable un hermano, progenitor o descendiente que presente una única diferencia HLA, analizando los loci A, B, C, DRB1.

Dependiendo del grupo clínico esta diferencia podría localizarse sólo en clase I, HLA-A o HLA-B o HLA-C. Si existe más de un familiar con estas características se dará preferencia las diferencias alélicas sobre las diferencias antigénicas (99).

3.3.2 Búsqueda familiar ampliada

Sin embargo en un elevado número de casos no existen hermanos HLA idénticos y es necesario iniciar una búsqueda familiar ampliada (tíos y primos) o localizar un donante compatible no emparentado del Registro Internacional de Médula Ósea.

El estudio familiar ampliado debe ponerse en marcha en aquellos receptores con un haplotipo de alta frecuencia (>1%) (Tabla 10) y otro poco frecuente (<0,1%).

Si los dos fueran frecuentes tendríamos la certeza de encontrar donantes no emparentados compatibles en los registros internacionales (se puede realizar una búsqueda preliminar de donante no emparentado en www.bmdw.org y solicitar un informe de REDMO).

Tabla 10. Haplotipos frecuentes >1% en la población española, según REDMO.

HLA-A*01, HLA-B*08, HLA-DRB1*03
HLA-A*02, HLA-B*07, HLA-DRB1*15
HLA-A*02, HLA-B*15, HLA-DRB1*04
HLA-A*02, HLA-B*44, HLA-DRB1*04
HLA-A*02, HLA-B*44, HLA-DRB1*07
HLA-A*02, HLA-B*44, HLA-DRB1*13
HLA-A*02, HLA-B*49, HLA-DRB1*04
HLA-A*02, HLA-B*50, HLA-DRB1*07
HLA-A*02, HLA-B*51, HLA-DRB1*04
HLA-A*02, HLA-B*51, HLA-DRB1*13
HLA-A*03, HLA-B*07, HLA-DRB1*15
HLA-A*03, HLA-B*35, HLA-DRB1*11
HLA-A*11, HLA-B*35, HLA-DRB1*01
HLA-A*23, HLA-B*44, HLA-DRB1*07
HLA-A*29, HLA-B*44, HLA-DRB1*07
HLA-A*30, HLA-B*13, HLA-DRB1*07
HLA-A*30, HLA-B*18, HLA-DRB1*03
HLA-A*32, HLA-B*14, HLA-DRB1*07
HLA-A*33, HLA-B*14, HLA-DRB1*01

Se inician los estudios HLA por la rama familiar que lleve el haplotipo más raro de modo que sea más fácil encontrar un sujeto que presente el infrecuente (el mismo que el del paciente) y el frecuente por azar.

INTRODUCCIÓN

Se hace tipaje HLA-A y B baja resolución a tíos y primos. Si no tenemos incompatibilidades en A y B, se tipa, A, B, C y DRB1 por alta resolución.

Diferencias en DPB1 (normalmente por recombinación) no son consideradas para la selección del donante, pudiéndose acumular a otra diferencia en cualquiera de los otros loci (para los grupos clínicos más estrictos sólo en clase I).

Un miembro familiar (aunque no sea un hermano HLA idéntico) es mejor opción que un donante no relacionado por diferentes motivos (100-103):

- Los familiares directos presentan mayor similitud genética que individuos no emparentados, al compartir no sólo los genes estudiados, sino otros genes polimórficos que también se han podido transmitir como los antígenos menores de histocompatibilidad (mHLA).
- Se ha demostrado que presentan un significativo mayor efecto injerto contra leucemia.
- La cercanía e inmediata disponibilidad y la posibilidad de recolecciones adicionales de células del donante para inmunoterapia influyen en la elección de un donante familiar.

Además el elevado polimorfismo de las moléculas HLA, unido a las exigencias de compatibilidad de REDMO para aceptar a un donante no emparentado (compatibilidad en los loci A, B, C y DRB1 por alta resolución), hacen cada vez más necesario la búsqueda de donantes en el entorno familiar (104).

Si embargo para poner en marcha esta estrategia, se hace imprescindible conocer la frecuencia de los alelos y haplotipos HLA en las

INTRODUCCIÓN

diferentes zonas geográficas para determinar aquellos casos susceptibles de iniciar la búsqueda familiar ampliada teniendo en cuenta que la frecuencia de los haplotipos HLA varía de forma considerable entre unas poblaciones y otras, incluso entre poblaciones cercanas

La limitante que se nos presenta en estos casos es el número limitado de potenciales donantes familiares, así en la práctica, únicamente un 30% de los pacientes disponen de un donante emparentado compatible. Ello implica que el 70% restante debe localizar un donante compatible entre donantes voluntarios no emparentados (105, 106).

Tíos

Probabilidad haplotipo familiar 0.5

Probabilidad de tener el otro: 0.01*

Probabilidad de tener los dos: $0.5 \times 0.01 = 0.005$ (1/200)

Primos

Probabilidad de tener los dos: $0.5 \times 0.01 \times 0.25 = 0.00125$ (1/800)

* suponiendo que la frecuencia haplotípica es del 1%.

Figura 8. Probabilidad de que un primo o un tío sean donantes. Partimos de la premisa de buscar un haplotipo frecuente. En este caso 1%

3.3.3 Búsqueda de donante no emparentado

La probabilidad de que dos personas no emparentadas entre sí sean compatibles se reduce a aproximadamente 1/10.000 (aunque la probabilidad varía en función de la frecuencia de los haplotipos HLA).

INTRODUCCIÓN

La probabilidad de localizar un donante compatible no emparentado se ha visto incrementada de forma muy importante gracias a la implantación de registros de donantes voluntarios de progenitores hematopoyéticos (107-110).

Se deben reunir una serie de requisitos para iniciar la búsqueda:

- Edad del paciente igual o inferior a 45 años. Para los enfermos entre 46 y 55 años se aceptará el criterio del centro de trasplante encargado de su realización.
- Ausencia de donante familiar HLA-idéntico o con una incompatibilidad menor. Se considera incompatibilidad menor cuando el donante comparte un haplotipo con el paciente y en el otro haplotipo existe una única diferencia bien entre antígenos subtípicos (*split*) de los *loci* A o B, o bien en los dos últimos dígitos del *locus* DRB1 valorado mediante técnicas de alta resolución.
- En el caso de enfermedades congénitas, ausencia de alteraciones neurológicas.
- Que los resultados esperables superen a los obtenidos con otros procedimientos.

Una vez revisado que todos los requisitos se cumplen, se debe enviar al REDMO la siguiente documentación:

- Impreso de solicitud de inicio de la Búsqueda de DNE (AX01-POE-V1-CLI_TPH-006) (www.fcarreras.org)
- Fotocopia de tipaje HLA completo clase I (A, B y C) y II (DRB1) por alta resolución.
- Resumen de la historia clínica

INTRODUCCIÓN

- Conformidad del inicio de la búsqueda por la Dirección Médica.

También con la documentación enviada, el médico responsable deberá especificar de forma razonada el tipo de búsqueda solicitado:

- Médula ósea / sangre periférica exclusivamente.
- Sangre de cordón umbilical exclusivamente.
- Médula ósea / sangre periférica y sangre de cordón umbilical de forma simultánea. Es la opción preferida en nuestro hospital (Fig 9).

En el laboratorio se reciben donantes compatibles en baja o en alta resolución. Se confirman los tipajes de los donantes por alta resolución (HLA-A, -B, -C, -DRB1) y si hay varios idénticos con el paciente se completa el estudio (de los donantes y pacientes) también con otros loci.

Se pueden conseguir donantes no emparentados HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1 compatibles a nivel de alta resolución (12 de 12) para un 40%-50% de los pacientes y con una sola diferencia en alguno de estos loci para un 20% más (111).

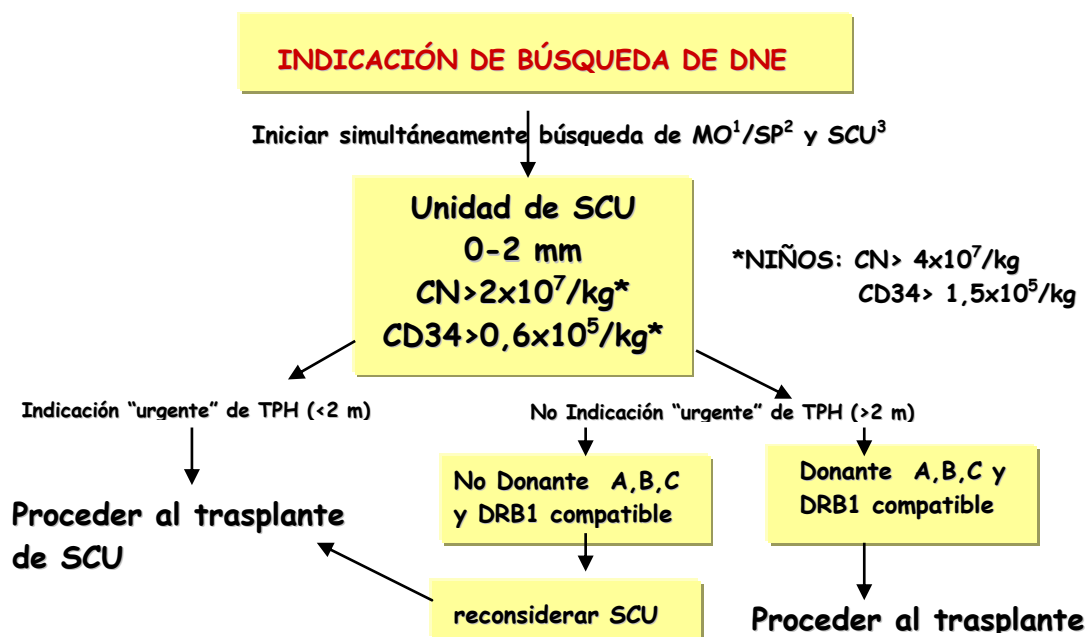
Entre el 85% y el 90% de los donantes compatibles señalados anteriormente presentan diferencias para DPB1, con lo que dada la dificultad en conseguir compatibilidad DP y que no es relevante se desconsidera este locus en la selección, aunque ante dos donantes igualmente compatibles se tomaría el que fuera DP idéntico (112, 113).

La normativa española permite realizar un TPH de DNE con una incompatibilidad antigénica en menores de 35 años. Cuando existe una

INTRODUCCIÓN

incompatibilidad HLA está indicado analizar el estatus de anticuerpos anti-HLA para elegir entre varios candidatos.

También es preferible una diferencia antigénica que dos alélicas. Si se puede escoger el locus en que está la diferencia, se debería elegir primero la diferencia en HLA-C (114). No se sabe si es mejor una diferencia en A, B o DRB1. La incompatibilidad DQB1 es menos importante que en C (115).



¹ Médula ósea ² Sangre periférica y ³ Unidades de cordón

Figura 9: Elección de la fuente: MO/SP/SCU. La elección de PH de MO o SP depende en la mayoría de los casos del donante. Habría que valorar: patología de base, urgencia, edad receptor y donante, tipo de acondicionamiento, peso de receptor y donante y grupos sanguíneos.

Cuando el paciente es de edad infantil (hasta 40-50 kg) se realizan búsquedas en paralelo de sangre de cordón (fig elección donante). Los

INTRODUCCIÓN

criterios de compatibilidad HLA en estos casos son más laxos, considerando baja resolución para los loci de clase I, HLA- A y B y alta resolución para HLA-DRB1. Con dos o más cordones compatibles se seleccionan en función de la máxima celularidad leucocitaria total.

Hoy en día están tipados más de 17 millones y medio de donantes válidos para HLA-A y HLA-B, provenientes de 66 registros de donantes de progenitores hematopoyéticos de 46 países y 47 bancos de cordón de 27 países, de los cuales poco más de 10 millones también están tipados para HLA-DR, y más de 300.000 pertenecen a unidades de cordón (de acuerdo con los datos publicados en BMDW).

Esto ha supuesto la realización de más de 10 millones de test HLA para clase I y II en un periodo corto de años únicamente para este propósito. Algunos registros reclutan sus donantes de una única población bastante homogénea, mientras que otros están compuestos de contribuciones de distinto origen étnico (116, 117).

En cualquier caso, el conocimiento de las frecuencias de haplotipos y de parámetros genéticos relacionados con la población es relevante tanto para el planteamiento estratégico de los registros de donantes, como para tomar decisiones en el proceso de búsqueda de donante para los distintos pacientes (118).

Una vez disponibles, estos estudios de los alelos y haplotipos presentes en una región determinada, pueden ser también de utilidad para otros

INTRODUCCIÓN

propósitos prácticos y científicos, como estudios de genética de poblaciones (119-123).

Para recopilar la información de todos los registros nacionales y coordinar la búsqueda de donantes a nivel internacional se creó la Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) (107), siendo la red española de donantes de médula ósea (REDMO) la que ejerce estas funciones a nivel nacional (109).

Las recomendaciones de REDMO (documento consenso, Octubre 2005) para trasplantes alogénicos incluyen los *loci* HLA-A, -B, y -DRB1 (6 loci) para donantes familiares, añadiendo el estudio del HLA-C para donantes no emparentados (8 loci).

En el caso de donante no familiar el grado de compatibilidad requerido es a nivel de alta resolución (cuatro dígitos), aunque no es infrecuente que en trasplante con donante familiar sea necesaria también la alta resolución en uno o varios loci (124).

Esto ocurre cuando uno de los padres o los dos son homocigotos para un *locus* o bien no se dispone de los haplotipos de los padres, ya que en estos casos hay que comprobar la posibilidad de una recombinación.

En estos casos se puede recurrir a ampliar o completar el tipaje de los hermanos aunque no sean compatibles para establecer de forma inequívoca la identidad genotípica.

4. IMPORTANCIA DE LA IDENTIDAD HLA EN EL TPH

El papel de las moléculas HLA va a depender en gran medida de la relación familiar del receptor y el donante. Aunque se busca identidad en HLA-A, B, C y DRB1, el resto de los genes presentes en el donante y el receptor podría ser o no iguales.

En este sentido los hermanos no sólo serían idénticos en estos loci comentados sino que compartirían los dos haplotipos en su totalidad. El resto de familiares compartirían sólo un haplotipo, mientras que los donantes no emparentados ninguno.

4.1 Trasplantes con donante familiar

En estos casos nos encontramos normalmente ante parejas donante/receptor HLA idénticas

En general, el fracaso del injerto por rechazo se cifra en torno al 1%, mientras que la enfermedad de injerto frente a huésped grave podría cifrarse en la actualidad en torno al 5%.

En pacientes de “bajo riesgo” (Leucemia aguda en 1ª ó 2ª RC, LMC FC, SMD no leucemizado) la supervivencia con un donante familiar con una incompatibilidad es menor que con un hermano idéntico, pero igual que con donante no emparentado (tabla 11).

En pacientes de “alto riesgo” (el resto) con un donante familiar con una incompatibilidad HLA no es necesario buscar un donante no emparentado 8/8

INTRODUCCIÓN

porque el resultado del trasplante es igual sea un donante no relacionado familiarmente, un familiar idéntico o un familiar con una diferencia (125).

Tabla 11. Porcentaje de trasplantes alogénicos con DNE totales en USA

Enfermedades Malignas.		Enfermedades no malignas.	
Leucemia mieloide crónica	33%	Anemia aplásica grave	4%
Leucemia mieloide aguda	20%	Errores congénitos metabolismo	2%
Leucemia linfoide aguda	19%	Inmunodeficiencias primarias	2%
Mielodisplasias	9%	Defecto congénito eritrocitario	1%
Linfoma no-Hodgkin	4%	Histiocitosis	1%
Otras leucemias	2%	Defecto congénito plaquetario	<1%
Desordenes de células plasmáticas (Mieloma Múltiple)	1%	Otras	<1%
Enfermedad de Hodgkin	<1%		
Otras neoplasias	<1%		

Se podría aceptar una única diferencia HLA en clase I, con resultados muy similares a los de hermanos genóticamente idénticos. Los pacientes con donante familiar con más de una incompatibilidad en clase I (A±B±C) en dirección huésped & injerto son los que tienen mayor riesgo de fallo del injerto.

Las incompatibilidades en clase II parece que no influyen en fallo del injerto: Los trasplantes procedentes de un familiar no idéntico con 1 incompatibilidad en DRB1 y/o DQB1 en dirección injerto & huésped son los que tienen mayor riesgo de EICH II-IV (75%) seguidos de aquellos que tienen una diferencia en clase I en dirección injerto & huésped (60%); en tercer lugar el trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado compatible y por ultimo los de hermano idéntico, cuyo riesgo es similar a los familiares no idénticos 5/6 que no tienen diferencias en dirección injerto & huésped (126, 127) .

INTRODUCCIÓN

Las diferencias en HLA-DP no influyen en la supervivencia total ni se correlaciona con el desarrollo de injerto contra huésped ni tampoco parece influir en el rechazo del injerto. Por esta razón normalmente no se incluye en el estudio.

Por tanto en pacientes sin un donante idéntico sólo debemos recurrir a donantes familiares con incompatibilidad en DRB1±DQB1 en dirección injerto & huésped o más de una diferencia en HLA-A±B±C en dirección huésped & injerto cuando no haya tiempo de localizar un donante no emparentado.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que lo que más afecta la supervivencia global es el estadio de la enfermedad al trasplante, de forma que con donante hermano idéntico, familiar con incompatibilidad o DNE compatible el resultado en cuanto a supervivencia es similar (128-130).

4.2 Trasplantes con donante no emparentado o unidades de cordón

La supervivencia global promedio (TPH no emparentado y SCU) está en la actualidad alrededor del 50% y se correlaciona con la enfermedad de injerto frente a huésped y ambas con el grado de disparidad HLA. En numerosas ocasiones el estudio HLA de los donantes de diferentes registros se ha realizado mediante técnicas serológicas y debemos diferenciar incompatibilidades a nivel de especificidades amplias o de sus subtipos (“splits”).

Las formas graves de injerto contra huésped suelen aparecer en un 20-40% de los pacientes. El fracaso de injerto primario se sitúa en torno al 10% y se asocia a diferencias en HLA clase I (131).

INTRODUCCIÓN

El rechazo inmune del injerto (TPH cordón) no está claramente delimitado del fracaso debido al pequeño número de células que se infunden y se produce hasta en un 15% de los casos.

El desarrollo de injerto frente a huésped aparece en menor número de casos y es menos grave con SCU que en el TPH de no emparentado y podría deberse a la falta de madurez de la población linfoide así como a su estatus “virgen” por el nulo o muy disminuido bombardeo antigénico.

Diferencias en HLA-I (básicamente en los loci B y C) y también en HLA-II (DRB1 y DQB1) contribuyen a la aparición de injerto contra huésped. Cuanto mayor sea el número de diferencias HLA peores son los resultados, siendo un factor primario (130).

La compatibilidad HLA con donante de SCU comienza a separar las curvas de supervivencia cuando hay 2/6 diferencias HLA contabilizando los loci A y B (baja resolución) y DRB1 (alta resolución).

Que la incompatibilidad sea en clase I o DRB1 tiene el mismo efecto en EICH y en la mortalidad relacionada con el trasplante. Sin embargo, una diferencia adicional en DPB1 o DQB1 no tiene efecto en supervivencia (132).

Otro aspecto que hay que considerar es el estado clínico del paciente porque puede influir de forma importante en el tiempo posible de búsqueda de un donante y el grado de disparidad HLA que sería aceptable (133, 134).

En un paciente con una enfermedad relativamente estable como leucemia mieloide crónica o un síndrome mielodisplásico de bajo riesgo no es

INTRODUCCIÓN

problema una espera de 4-6 meses. Sin embargo, en un paciente con leucemia aguda, una espera prolongada expone al paciente a quimioterapia con toxicidad adicional y riesgo de recaída.

Tabla 12. Antígenos HLA y sus especificidades "subtípicas" o "splits"

Antígenos	Splits y asociaciones antigénicas#
A2	A203#, A210#
A9	A23, A24, A2403#
A10	A25, A26, A34, A66
A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74
A24	A2403#
A28	A68, A69
B5	B51, B52, B5102#, B5103#
B7	B703#
B12	B44, B45
B14	B64, B65
B15	B62, B63, B75, B76, B77
B16	B38, B39, B3901#, B3902#
B17	B57, B58
B21	B49, B50, B4005#
B22	B54, B55, B56
B27	B2708#
B39	B3901#, B3902#
B40	B60, B61
B51	B5101#, B5103#
B70	B71, B72
Cw3	Cw9, Cw10
DR1	DR103#
DR2	DR15, DR16
DR3	DR17, DR18
DR5	DR11, DR12
DR6	DR13, DR14, DR1403#, DR1404#
DR14	DR1403#, DR1404#
DQ1	DQ5, DQ6
DQ3	DQ7, DQ8, DQ9
Dw6	Dw18, Dw19
Dw7	Dw11, Dw17

#variante

INTRODUCCIÓN

Por tanto si no existe donante no emparentado compatible 8/8 se debe considerar la alternativa de trasplantar con SCU o un donante no relacionado con una incompatibilidad.

Otra posibilidad en caso de tener dificultad para encontrar donante sería trasplantar con un familiar haploidéntico depleccionado de células T en vez de con un DNE con una incompatibilidad a nivel antigénico (tabla 12). En este caso se ha observado que los resultados son semejantes pero ofrece la ventaja de la disponibilidad de los familiares (135, 136).

En niños menores de 16 años con leucemia aguda los resultados con donante TPH de SCU con 6/6 identidades son mejores que con un TPH de donante no emparentado de médula ósea 8/8 y comparables cuando la SCU comparte 5/6 identidades particularmente si las dosis celulares son mayores de $3 \times 10^7/\text{kg}$. En adultos, sin embargo, los resultados de TPH de DNE de médula ósea/sangre periférica con compatibilidad 6/6 son comparables a los de un TPH de SCU 4-6/6 (137-140).

Objetivos

OBJETIVOS

Actualmente es suficientemente conocido que cuando el trasplante de médula ósea se realiza con un donante familiar, incluso aunque no sea hermano HLA idéntico, los resultados son mejores que con uno no emparentado.

Estas ventajas se deben sobre todo a factores inmunológicos dependientes de la mayor compatibilidad, pero también debemos considerar aspectos económicos y de organización.

Sin embargo, en un número considerable de hospitales todavía tiene prioridad la búsqueda en los Registros Internacionales de un donante no emparentado sobre una búsqueda familiar ampliada porque no existen estudios suficientemente amplios de los alelos y haplotipos HLA locales.

Debido al amplio polimorfismo del sistema HLA que puede variar de forma importante entre dos zonas geográficas distintas se hace necesario el conocimiento de los rasgos diferenciales de cada lugar.

Por tanto el estudio de las frecuencias HLA en nuestro medio podría solucionar este problema y ayudaría en gran medida a establecer en cada caso cual es la estrategia de búsqueda de donante más indicada.

No solamente estos resultados serán importantes en trasplantes de médula ósea sino que se pueden aplicar en trasplantes de órganos sólidos, estudios de asociación a enfermedad y en los de filiación de paternidad para el cálculo de las probabilidades reales en nuestro medio.

Por tanto, el presente trabajo se plantea como objetivo principal clarificar en qué situaciones estaría indicado iniciar una búsqueda familiar ampliada, incluyendo primos y tíos, para encontrar un donante para nuestros pacientes

OBJETIVOS

sin necesidad de esperar hasta que finalice la búsqueda de uno no emparentado.

Como objetivo secundario se plantea establecer una base de datos que sirva para calcular los riesgos relativos de padecer ciertas enfermedades asociadas a HLA y las probabilidades en los estudios de filiación de paternidad en nuestra área geográfica.

Para poder desarrollar estos objetivos se estudiaron los siguientes subapartados:

- Frecuencia de los alelos HLA-A, B, C y DRB1 en la población cordobesa y jienense. Secundariamente se estudiarán las de HLA-DQB1 y DPB1.
- Alelos predominantes dentro de cada grupo de especificidades.
- Haplotipos HLA-A/B/C/DRB1 en la muestra estudiada.
- Asociaciones HLA-B/C, HLA-DRB1/DQB1, HLA-A/B/C, HLA-B/C/DRB1 y HLA-A/B/DRB1

Finalmente se discutirán aquellos alelos y haplotipos considerados comunes o poco frecuentes y la estrategia de búsqueda de donantes que se recomienda en función de los resultados obtenidos.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se han estudiado 548 haplotipos de 184 familias de los correspondientes pacientes que han acudido al Servicio de Inmunología del Hospital Regional Universitario Reina Sofía de Córdoba para búsqueda de donante de progenitores hematopoyéticos. Estas familias proceden de las provincias de Córdoba y Jaén.

Se han tipado los loci HLA-A, B, C y DRB1 por alta resolución (4 dígitos) al paciente y los padres y se han asignado los cuatro haplotipos familiares. En los casos que no fue posible estudiar a los padres o no se pudieron asignar los haplotipos, se procedió al estudio de los hermanos.

Como resultado final en algunas familias se consiguió determinar los cuatro haplotipos que se integraron al estudio, en otras tres y en otras sólo dos. Aquellas familias en que no se pudieron discriminar al menos dos haplotipo fueron descartadas para el estudio.

74 familias contribuyeron con cuatro haplotipos, treinta y dos con tres y setenta y ocho con dos.

El análisis de los alelos y asociaciones se realizó de los 548 haplotipos incorporados al estudio.

También se ha tipado por alta resolución los loci HLA-DQB1 y DPB1. En estos casos sólo ha estado disponible para el análisis 151 alelos HLA-DQB1 y 126 DPB1, no incluyéndose en el estudio de haplotipos completos HLA-A/B/C/DRB1 aunque los datos de DQB1 se tuvieron en cuenta para determinar sus asociaciones con DRB1.

2. METODOLOGÍA

Se han estudiado los alelos HLA de las familias descritas anteriormente según las recomendaciones de la EFI. Este laboratorio está acreditado por la Federación Europea de Inmunogenética desde 1997 con la referencia de Acreditación: 09-ES-006.994.

En concreto se tiparán los loci HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 y DPB1 con resolución final de alta resolución cuatro dígitos por los siguientes protocolos:

2.1 Purificación automática de ADN

El ADN se ha aislado de muestras de sangre periférica anticoagulada con ACD mediante el Maxwell® 16 Blood DNA Purification System de Promega.

Maxwell® 16 System se utiliza para separar el ADN de forma automatizada en muestras humanas de sangre total y capa leucocitaria. La metodología de aislamiento usada por este método proporciona de una manera rápida ADN apto para ser analizado directamente mediante métodos de amplificación estándar.

Cuando se usa Maxwell® 16 Blood DNA Purification System (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 EE.UU) junto con Maxwell® 16 Instrument, éste automatiza el aislamiento de ácidos nucleicos de hasta 16 muestras usando como principio de separación la lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas.

Entre los pasos automatizados que realiza Maxwell® 16 System se incluyen:

- Lisis de la muestra en presencia de un agente caotrópico y detergente.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Unión de ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas.
- Lavado de las partículas unidas para separarlas del resto de componentes celulares.
- Elución de los ácidos nucleicos

La temperatura de las muestras se regula mediante un sistema de calentamiento controlado automáticamente por el sistema. El ADN extraído está listo para amplificación por PCR.

2.1.1 Método

Se han utilizado muestras de sangre total recogidas en tubos tratados con ACD. Hasta su uso se han almacenado a 4 °C y se han procesado en menos de 7 días posteriores a su extracción.

Aunque en general se han seguido las instrucciones del fabricante, el procedimiento es el que sigue:

Se enciende el “Maxwell® 16 IVD Instrument” y éste mostrará el número de versión de firmware, realizará las autocomprobaciones y colocará todas las piezas en la posición de inicio.

En la pantalla protocolos, se selecciona sangre y posteriormente se verifica que se han seleccionado el método y el usuario correctos. Se selecciona Run/Stop para continuar.

Cuando lo indique en pantalla, se abre la puerta y se selecciona Run/Stop. Se añaden 300 µl de sangre y los émbolos en el primer canal del cartucho. Se colocan los cartuchos en la plataforma del Maxwell® 16 con el lado estriado más cercano a la puerta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente, se coloca un tubo de elución azul por cada cartucho en las ranuras específicas que hay para ellos en la plataforma y se añaden 200 µl de tampón de elución a cada tubo de elución azul.

Ahora se pulsa el botón “Run/Stop”, la plataforma se retraerá y podemos proceder.

El Maxwell® 16 IVD Instrument iniciará de forma inmediata la purificación indicando la pantalla el tiempo aproximado restante que es aproximadamente 35 minutos

Una vez finalizado el proceso, se pulsa Run/Stop para extender la plataforma hacia afuera del instrumento. Luego, se retiran los tubos de elución de sus ranuras térmicas y se colocan en la gradilla de tubos de elución magnética.

Una vez aquí, se transfieren con una pipeta las muestras eluidas a los tubos de almacenamiento, desechándose posteriormente los tubos de elución, los cartuchos y émbolos ya utilizados.

Excepcionalmente, cuando algún paciente no daba resultado de tipaje, la concentración de ADN se midió por absorbancia a A260 o se confirmó la pureza del ADN con electroforesis en gel de agarosa y con el cociente A260/A280, que debe ser >1,7.

2.1.2 Material necesario

Componentes del producto suministrados

- 48 Cartuchos Maxwell® 16 Blood DNA.
- 50 Émbolos de purificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

- 50 Tubos de elusión.
- 20 ml Tampón de elusión.

Este material y reactivos se puede almacenar a temperatura ambiente (15–30°C).

Materiales no suministrados:

- Pipetas y puntas de pipeta
- Guantes
- Tubos de almacenamiento para muestras de ADN

2.2 Purificación de ADN por columnas

Este método alternativo tan sólo ha sido usado de forma puntual para comprobación de contaminación de nuestro principal método de extracción de ADN. En estos casos hemos empleado el QIAamp DNA Blood Mini Kit

QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) consigue una rápida purificación de 1 µl a 200 µl de sangre (4-12 µg/200 µl de sangre).

Los buffer optimizados lisan las muestras, estabilizan los ácidos nucleicos y favorecen la adsorción de ADN selectiva a la membrana QIAAMP de silica-gel.

Sin embargo, los inhibidores de la PCR como cationes divalentes y proteínas pasan a través de ella mediante diferentes lavados.

Finalmente el ADN listo para su uso es eluído en agua o un buffer suministrado en el equipo con baja concentración de sales.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Método

Brevemente:

- Añadir 20 µl de proteasa en un tubo de 2ml de capacidad.
- Se añaden 200 µl de sangre
- Se añaden 200 µl de Buffer AL
- Vortexar la mezcla
- Incubar 10 min a 56°C
- Añadir 200 µl de etanol
- Vortexar la muestra
- Pasar a columna incluida en el Kit
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm.
- Colocar columna en un tubo limpio
- Añadir 500 µl de buffer Aw1
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm
- Colocar columna en un tubo limpio
- Añadir 500 µl de buffer Aw2
- Centrifugar 3 min a 14000 rpm
- Colocar columna en un eppendorff
- Se añade 200 µl de buffer AE a la columna
- Se incuba 1 min
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm
- Se descarta columna
- Nos quedamos con el eluido que contiene el ADN

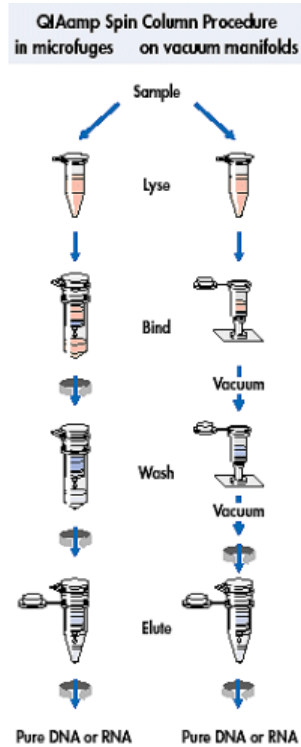


Figura 1: Protocolo de purificación de ADN por columnas. Se ha empleado el QIAamp DNA Blood Mini Kit que permite obtener ADN de alta pureza.

2.2.2 Material necesario

Los componentes suministrados en este mini kit para 50 pruebas son:

- 50 columnas Mini Spin QIA amp
- Proteinasas K de Qiagen.
- Reactivos, tampones y tubos para colección de muestras de 2 ml.

Este material y reactivos se puede almacenar a temperatura ambiente (15–30°C) excepto la proteinasas K que debe permanecer a 4°C.

Materiales no suministrados

- Pipetas, puntas de pipeta y guantes

MATERIAL Y MÉTODOS

- Etanol de alto grado de pureza para añadir a los tampones.

2.3 Tipaje HLA génico

Se ha realizado en todos los casos una amplificación previa de ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

A través de esta metodología obtendremos un número elevado de copias a partir de un segmento de ácido nucleico a estudiar por medio de una repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: se obtiene separando las cadenas de ADN con temperaturas elevadas, generando un molde de hebra simple.
- Anillamiento: ocurre una hibridación de iniciadores a sus secuencias homólogas del ADN sustrato sólo bajo condiciones específicas de temperatura.
- Polimerización o elongación: es la extensión en sentido 5'- 3' del complejo iniciador-sustrato. Se obtiene con la utilización de Taq polimerasa que va incorporando los deoxinucleótidos.

Se han utilizado diferentes técnicas de tipaje según el locus y la resolución. Así para la baja resolución se ha utilizado una metodología de PCR-SSO reversa y para la alta, PCR-SSP en clase I y PCR-SSO reversa en la II.

2.3.1 Tipaje genérico baja resolución

Para el tipaje genérico HLA-A, B, C y DRB se ha utilizado HLA RELI™ SSO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU). Este sistema de tipaje génico permite una resolución entre baja y media.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este procedimiento se basa en tres procesos clave: amplificación, hibridación de los productos amplificados con un panel de sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia inmovilizadas y detección del producto amplificado unido a la sonda por formación de color.

2.3.1.1 Preparación de la PCR

El procedimiento de preparación de la PCR se realiza en el área de preparación de reactivos (área de preamplificación). Se determina el número necesario de tubos para PCR para el análisis de las muestras y los controles. Se incluyen un 1 control positivo de ADN y un 1 control negativo con cada amplificación que se realice.

Preparación de la muestra: Con una punta limpia para cada vez, se depositan los reactivos en cada uno de los tubos de PCR en el siguiente orden:

	SOLUCIÓN DE 6,0 MGCL₂	*MEZCLA PRINCIPAL	ADN (100 NG/REACCIÓN) O CONTROLES
Por tubo	15 µl	30 µl	15 µl

***mezcla principal es diferente para HLA-A, B, C y DRB**

Se tapan los tubos con tapones. Y las muestras y los controles ya están listos para la amplificación.

2.3.1.2 Amplificación

El procedimiento de amplificación se realiza en el área de postamplificación. Se colocan las muestras en el bloque del termociclador. Se

MATERIAL Y MÉTODOS

programa el termociclador (idéntico para HLA-A/HLA-B/HLA-C/HLA-DRB) con los siguientes parámetros:

Paso	Número de ciclos	Temperatura	Duración
Ciclo	35	95°C	15 seg.
		60°C	45 seg.
		72°C	15 seg.
Extensión	1	72°C	5 min.
	1	15°C	ilimitada

Cuando se calienta a 95°C, se separa el ADN de doble hélice y se exponen las secuencias a amplificar específicas del cebador. A medida que la mezcla se enfría, los cebadores biotinilados se alinean con las secuencias a amplificar.

La ADN polimerasa termoestable recombinante *Thermus aquaticus* (Taq), en presencia de un exceso de deoxinucleósido-trifosfatos (dNTPs) que incluye deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxicitidina y deoxiuridina (en lugar de deoxitimidina), extiende los cebadores alineados con las plantillas a amplificar para producir una secuencia de ADN biotinilado denominada amplicón.

Este proceso se repite durante 35 ciclos, duplicándose en cada uno de ellos la cantidad de ADN a amplificar lo que en teoría daría lugar a una amplificación superior a mil millones de veces.

El programa tarda aproximadamente 1,6 horas en ejecutarse. Cuando el programa ha terminado se retiran las muestras del termociclador y se retiran las tapas con cuidado para evitar la formación de aerosoles. Se añade con una pipeta 30 µl de la solución de desnaturalización en cada reacción y se incuban al menos durante 10 minutos a temperatura ambiente para que se complete la

MATERIAL Y MÉTODOS

desnaturalización. El amplicón desnaturalizado puede guardarse a 2-8°C hasta 1 semana.

2.3.1.3. Hibridación y detección

El procedimiento de hibridación de la sonda y detección en tira se realiza en el área de postamplificación/detección que debe estar aislada físicamente del área de preamplificación. Es un ensayo automatizado que precisa de un equipo AutoRELITM 48 y una bandeja de 48 pocillos aunque el protocolo también se puede poner en práctica manualmente.

Se etiqueta el número adecuado de tiras de tipificación con un lápiz al final de la tira, en el extremo opuesto a la línea negra. Se deslizan las tiras hasta su posición asegurándonos de que las líneas de la sonda están orientadas hacia arriba.

Se carga la bandeja en el equipo AutoRELITM 48, y se siguen las instrucciones de configuración desde el teclado. Posteriormente se procede a cargar los reactivos.

Los tampones de trabajo para hibridación, lavado y citrato se deben guardar a temperatura ambiente (18-23°C) y son estables durante 3 meses. Si hubiera sólidos precipitados presentes en los tampones de hibridación y lavado se calientan al baño maría a 50°C. El conjugado de trabajo y la solución de sustrato deben prepararse para cada nueva tanda. El volumen mínimo por tira de los reactivos usados con el AutoRELITM 48 puede prepararse siguiendo la siguiente tabla:

MATERIAL Y MÉTODOS

Número tiras	Tampón hibridación (ml)	Tampón citrato (ml)	Conjugado		Sustrato		Tampón lavado (ml)	Agua (ml)
			Tampón lavado (ml)	Estreptavidina -HRP (ul)	Sustrato A (ml)	Sustrato B (ml)		
2	60	50	74,2	224	61,6	15,4	200	270
4	60	60	74,2	224	61,6	15,4	200	270
6	70	100	74,2	224	61,6	15,4	200	290
8	80	110	74,2	224	61,6	15,4	200	290
10	90	125	74,2	224	61,6	15,4	200	320
20	140	210	127,2	384	105,6	26,4	400	360
30	210	280	180,2	544	149,6	37,4	600	410
40	260	390	233,2	704	193,6	48,4	800	440
48	300	450	275,6	832	228,8	57,2	960	470

Cuando se solicita, se añaden 60 µl de amplicón desnaturalizado al pocillo correspondiente y se inicia el ensayo. El programa dura 2 horas 30 min aproximadamente.

Una vez iniciado el proceso, los amplicones marcados con biotina se unen (hibridan) a las sondas SSO que contienen la secuencia a amplificar complementaria y de este modo quedan “atrapados” en la membrana (este proceso se desarrolla a 48°C). Tras la hibridación, un paso de lavado exhaustivo garantiza la especificidad de la reacción y elimina todos los amplicones que no se han unido.

Posteriormente tiene lugar la reacción de detección: el complejo amplicón-sonda se visualiza mediante una reacción colorimétrica. A la membrana se añade un conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) que se une a los amplicones marcados con biotina que han quedado atrapados por la sonda SSO.

La adición de agua oxigenada (H₂O₂) y tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato, da lugar a la formación de un complejo de color azul en presencia de SA-HRP. Las señales resultantes de la sonda se comparan con la intensidad

MATERIAL Y MÉTODOS

de la sonda control, registrándose el patrón de manchas de la muestra para su interpretación. Al terminar se lava el AUTORELI con Etanol al 70% y posteriormente con agua.

2.3.1.4 Material y reactivos necesarios

Reactivos suministrados:

- Solución Tris-HCL 20 mM que contiene: glicerol al 30%, KCL 100 mM, 400 μ M dATP, dCTP, dGTP, 800 μ M dUTP, cebadores biotinilados (0,5 μ M), AmpliTaq 100 u/ml y azida sódica al 0,05% como conservante
- Solución de MgCl₂ 6.0 mM con ProClin®300 al 1% como conservante
- ADN control
- Solución desnaturalización que contiene EDTA 3%, hidróxido de sodio 1,6% y azul de timol
- 50 tiras específicas con desecante
- Concentrado SSPE: solución de fosfato sódico con NaCl, EDTA y ProClin 150 al 1,0%.
- Concentrado SDS: Solución de dodecil-sulfato sódico al 20% con ProClin 150 al 1,0%.
- Conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano
- Sustrato A: solución de citrato que contiene H₂O₂ al 0,01% y ProClin 150 al 0,1%.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Sustrato B: contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) al 0,1% en dimetilformamida (DMF) al 40%
- Concentrado de citrato: solución de citrato de sodio
- AutoRELI™ 48 Equipo para procesamiento automatizado de las tiras
- Bandeja AutoRELI™ – Formato para dos tiras Bandeja de 48 pocillos con separadores en cada uno de ellos para colocar 2 tiras por pocillo
- Hoja de resultados, plantilla de referencia y tabla de interpretación específica, programa SSO Pattern Matching

2.3.1.5 Preparación de soluciones de trabajo

- Tampón de hibridación: Se mezclan los distintos elementos en el siguiente orden:

213 ML 55 ML 7 ML	AGUA DESIONIZADA CONCENTRADO SSPE CONCENTRADO SDS
----------------------------	--

La solución puede calentarse a 50°C para asegurarse de que todos los componentes están disueltos y tras el uso guardarse a temperatura ambiente durante 3 meses. Preparación de tampón de lavado: se mezclan los distintos elementos en el siguiente orden:

1228.5 ML 65 ML 6.5 ML	AGUA DESIONIZADA CONCENTRADO SSPE CONCENTRADO SDS
------------------------------	--

MATERIAL Y MÉTODOS

Se distribuye el tampón de lavado en 2 recipientes diferentes. 275 ml para el tampón de lavado exhaustivo y 1025 ml para el tampón de lavado ambiente. Pueden guardarse a temperatura ambiente durante 3 meses.

Preparación de tampón de citrato:

570 ML 30 ML	AGUA DESIONIZADA CONCENTRADO CITRATO
--------------------	---

El tampón de lavado preparado puede guardarse a temperatura ambiente durante 3 meses.

Materiales no suministrados

- Consumibles (consumibles para la PCR incluidos los tubos para reacción, tapones/hojas de plástico adhesivo para sellar, base, bandeja y soporte).
- Micropipetas con puntas cerradas (barrera de aerosol) (100 µl, 200 µl y 1000 µl).
- Etanol al 70%

2.3.1.6 Análisis de resultados

Los resultados se han analizado mediante el programa SSO Pattern Matching. Se pueden escanear las tiras automáticamente o leerlas con la plantilla suministrada

Una vez las bandas positivas se han introducido manualmente o por el escaner, el programa hace una interpretación inicial de las mismas. El revisor puede modificar las bandas hasta confirmar el tipaje definitivo.

2.3.2 Tipaje HLA clase I alta resolución

Se ha realizado mediante AllSet+™ Gold SSP y SSP UniTray® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU) que proporciona alta resolución o genotipificación a nivel alélico.

El método SSP es una técnica basada en PCR que utiliza cebadores específicos de secuencia (Sequence Specific Primers, SSP) para la tipificación de tejidos basada en ADN. La asignación de los alelos se realiza determinando si la amplificación se ha producido o no, es decir, mediante la visualización y la detección de la amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa.

En la técnica PCR-SSP, cada par de cebadores identifica dos loci polimórficos cis y enlazados.

Las muestras de sangre se han recogido en tubos anticoagulantes de ACD. La concentración final del ADN antes de la PCR-SSP debe ser aproximadamente 50 ng/ml y OD_{260/280} entre 1,7 y 1,9. Al comprobarse con electroforesis en gel de agarosa, la mayor parte del ADN avanza más lentamente que la franja de 9,4 kb del marcador de Lambda ADN digerido con Hind III.

2.3.2.1 Preparación de la PCR

Seleccionamos qué queremos amplificar e iniciamos la preparación previa a la amplificación (realizada en la zona pre-PCR).

La mezcla de PCR depende del número de reacciones PCR por prueba ya que hay bandejas para tipar todas las especificidades de un locus y otras específicas para cada grupo y se prepara según la tabla siguiente:

MATERIAL Y MÉTODOS

Pocillos	Tampón PCR (µl)	Agua (µl)	ADN	Taq (µl)
96	460	608	125	7
48	230	304	62,5	3,5
32	153	203	42	2,3
24	115	152	31,3	1,8
16	80	105,8	21,7	1,2
8	66	87	18	1

Se añade agua y Taq polimerasa (5U/µl) al tampón de PCR prealiquotado y se mezcla bien. Se añaden 10 µl de mezcla maestra al tubo de control de contaminación que tiene el tinte azul. Se añade ADN de muestra (50 ng/µl) a la mezcla maestra restante y se mezcla bien de nuevo. Por último se dispensan 10 µl de la mezcla de PCR en los pocillos restantes de la bandeja AllSet+™ Gold SSP. Se cubre la bandeja con un sello y se cierra bien.

De esta manera ya están las muestras preparadas para la amplificación con un volumen total de cada pocillo 23 µl.

2.3.2.2 Amplificación

La preparación de la amplificación por PCR es realizada en la zona post-PCR. Se coloca la muestra en el termociclador y se procede conforme a los parámetros programados:

PASO	CICLOS	TEMPERATURA	DURACIÓN
Desnaturalización	1	96°C	60s
Ciclo	5	96°C	25s
		70°C	50s
		72°C	45s
Ciclo	21	96°C	25s

MATERIAL Y MÉTODOS

		65°C	50s
		72°C	45s
Ciclo	4	96°C	25s
		55°C	60s
		72°C	120s
	1	4°C	ilimitada

2.3.2.3 Detección

Una vez que el programa haya finalizado, se retiran las muestras del termociclador. A continuación, se prepara un gel de agarosa al 2% (p/v) en un tampón TBE 0,5x para lo que se disuelve la agarosa (2 g/100 ml de tampón TBE 0,5x) hirviéndola en un horno microondas hasta su total disolución. Luego, se enfría a 60 °C y se añade bromuro de etidio a una concentración final en el gel de 0,5 µg/ml. Se crea un molde de gel con un grosor de 3-4 mm con pocillos de 3 mm de anchura y dejamos que polimerice durante al menos 30 minutos.

Se coloca el gel de agarosa en una unidad de electroforesis. El gel debe quedar cubierto 1-2 mm por el tampón TBE 0,5x desde la superficie del gel. Se retira el peine con cuidado y se cargan 8µl del producto PCR sobre el gel. Se corre el gel con el tampón TBE 0,5x durante 10-15 min a 100-120 V

Posteriormente se examina el gel con luz ultravioleta y se guarda la imagen mediante un sistema de documentación de geles.

2.3.2.4 Material y reactivos necesarios

- Bandejas de prueba de 96 pocillos: Cada pocillo en el tubo de PCR contiene una solución de cebador SSP seca que consiste en cebadores de alelos y/o de grupos específicos así como un par de cebadores de control que se corresponden con secuencias no alélicas. El par de

MATERIAL Y MÉTODOS

cebadores de control amplifica un fragmento de un gen conservado que está presente en todas las muestras. Se debe almacenar a 2 – 8 °C

- Alícuotas de tampón de PCR optimizado: tampón de PCR con dNTP y tampón de carga del gel. Se debe almacenar a 2 – 8°C

- Hojas de sellado de PCR: Hojas de plástico autoadhesivas para bandejas de prueba de sellado

- CD ROM: instrucciones de uso y documento de interpretación específica del lote

Materiales, reactivos y equipo no suministrado:

- Taq ADN polimerasa, 5 unidades/ μ l
- Pipetas y puntas de filtro desechables: 1-10, 10-200 y 100-1000 μ l
- Pipetas electrónicas: Capacidad de 100-250 μ l, capaces de dispensar alícuotas de 8 μ l
- Termociclador
- Tampón de electroforesis TBE (con una concentración de 0,5X)
- Marcadores de peso molecular de ADN (rango de 50–2.000 pb)
- Agarosa para ADN de Invitrogen™, código de producto 75000500
- Bromuro de etidio (10 mg/ml)
- Fuente de alimentación para la electroforesis
- Sistema de electroforesis Electro-Fast®: 96 líneas para muestras más líneas de carga de marcadores por separado.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Sistema de documentación del gel: Cámara polaroid y filtro para documentación del gel
- Transiluminador UV

2.3.2.5 Análisis de resultados

Primero se examina la fotografía del gel con detenimiento y se determinan las líneas positivas. Cada línea del gel que contenga una muestra cargada debe ofrecer una banda de control exceptuando la línea que contenga el pocillo de control de contaminación. La banda de control puede o no amplificarse eficientemente cuando haya un producto específico presente debido a la competencia por el sustrato ya que los cebadores de control tienen una concentración más baja para favorecer la reacción específica del alelo.

La ausencia de bandas de control sin amplificación específica es indicador de que algunas reacciones fallaron.

Sí se pueden determinar los alelos en presencia de una falta de reacción de PCR y dicha falta no cambia la asignación del alelo.

Sin embargo, si hay un resultado que indica un homocigoto aparente, o la falta de reacción pudiese cambiar la asignación del alelo, se repite la tipificación.

Bandas débiles de tamaño de producto incorrecto, no se tienen en cuenta si la concentración global y la claridad de la amplificación son buenas. Los cebadores no utilizados formarán una banda difusa debajo de los 50 pares de bases.

MATERIAL Y MÉTODOS

El pocillo de control de contaminación contiene pares de cebadores que amplifican el ADN producido tanto por amplificaciones por PCR como el ADN genómico. Cualquier banda en esa línea es una prueba de contaminación y los resultados de la prueba no serán válidos.

Es posible que aparezca una banda de dímero de cebadores de <80 pares de bases. Esto no invalidará la prueba. Los dímeros de cebadores aparecen de manera ocasional. Se puede conocer el tamaño de producto aproximado usando la hoja de trabajo.

Para terminar se analizan los resultados en el programa UniMatch®Plus 4.0 diseñado para los formatos AllSet+™ Gold SSP y SSP UniTray®.

2.3.3 Tipaje HLA clase II alta resolución

El tipaje HLA clase II de alta resolución se hizo por el procedimiento de INNO-LIPA, de Innogenetics (Gante, Bélgica), que se basa en el principio de PCR-SSO reversa.

El material genético (ADN) biotinilado y amplificado es hibridado con sondas oligonucleóticas específicas, las cuales han sido inmovilizadas como líneas paralelas sobre una membrana de nitrocelulosa. Después de la hibridación, la estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina es adicionada y se une a los productos híbridos biotinilados formados previamente. La incubación con cromógenos BCIP/NBT da como resultado un precipitado púrpura/marrón.

Para el tipaje de DRB1, DQB1 y DPB1 se realiza una tipificación del exón 2 de estos loci. Para conseguir una óptima resolución a nivel de HLA-

MATERIAL Y MÉTODOS

DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 se pueden realizar diferentes amplificaciones específicas incluyendo: DRB1, 86G, 86V y DRB1,3,4,5

2.3.3.1 Preparación de la PCR

La mezcla de PCR para DRB se prepara siguiendo el patrón siguiente:

DRB1 Y 86G		86V Y DRB1,3,4,5	
Amplificación Buffer	10 μ l	Amplificación Buffer	10 μ l
Primer solución	10 μ l	Primer solución	10 μ l
Lipa Taq	1 μ l	Lipa Taq	0.5 μ l
H2O	25 μ l	H2O	25.5 μ l

Posteriormente, 4 μ l de ADN se añaden a 46 μ l de cada una de estas mezclas para un volumen total de 50 μ l

Para HLA DQB1 y DPB1 existe una sólo mezcla de amplificación:

DQB1		DPB1	
Amplificación Buffer	10 μ l	Amplificación Buffer	10 μ l
Primer solución	10 μ l	Primer solución	10 μ l
Lipa Taq	1 μ l	Solución CIMg2	
H2O	19 μ l	10 μ l	
		Lipa Taq	0.5 μ l
		H2O	25.5 μ l

Posteriormente, 10 μ l de ADN se añaden a 40 μ l de la mezclas de DQB1 y 4 μ l de ADN se añaden a 46 μ l de la de DP1 para un volumen total de 50 μ l.

2.3.3.2 Amplificación

A continuación se llevan los conillos de PCR al Termociclador. DQB1 y DRB (86G, 86V, DRB1 y DRB1,3,4,5) tienen el mismo programa:

MATERIAL Y MÉTODOS

PASO	CICLOS	TEMPERATURA	DURACIÓN
Desnaturalización	1	95°C	5 min
Ciclo	35	95°C	20s.
		58°C	20s.
		72°C	20s.
Extensión	1	72°C	10 min.
	1	15°C	ilimitada

Sin embargo, DPB1 tiene un perfil de amplificación diferente:

PASO	CICLOS	TEMPERATURA	DURACIÓN
Desnaturalización	1	96°C	5 min
Ciclo	30	96°C	15s.
		55°C	20s.
		72°C	20s.
Extensión	1	72°C	10 min.
	1	15°C	ilimitada

La identificación de las bandas de amplificación se visualizan en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5x. 3 ul de buffer de carga se añaden a 10ul de las muestras amplificadas y debe aparecer una banda sencilla con una longitud de 255 pb.

2.3.3.3 Hibridación y detección

Ambas se realizan de forma automática en el AUTO-LiPA 48 INNO-LiPA HLA, en el que se debe proceder con la siguiente secuencia:

Al conectar el aparato aparecerá "Main FW Run". Se pulsa enter. Cuando aparece "Run program se vuelve a pulsar YES. Aparecerá "Waste bottle OK?". En este momento, se comprueba que la botella de desecho está vacía y los tubos de desecho se han colocado correctamente. Si es así se pulsa YES. Luego aparecerá "Check sieves!!" . Pulsar la tecla YES.

Seleccionar con los botones +/- el programa HLA56V3. Pulsar YES. Aparecerá Temp 55°C. Pulsar YES. Aparecerá "Preparing in progress", esperamos que el

MATERIAL Y MÉTODOS

AUTOLiPA alcance la temperatura de trabajo y emita una señal acústica. En este momento preparamos y colocamos los reactivos:

- Bomba 1 (verde): Solución de Hibridación (HS, lista para usar)
- Bomba 2 (azul): Tampón de lavado astringente (SW, listo para usar)
- Bomba 3 (naranja): Tampón de aclarado (RS, diluido 1:5 en H₂O dest.)
- Bomba 4 (roja): Conjugado diluido (C diluido 1:100 en CD). Se preparan 2 ml por muestra + 8 ml en exceso.
- Bomba 5 (blanca): Diluyente de sustrato (SB, listo para usar),
- Bomba 6 (amarilla): Sustrato diluido (S diluido 1:100 en SB). Se preparan 2 ml por muestra + 8 ml en exceso.

Una vez que aparece "INSERT TRAY!", se coloca la bandeja y las tiras necesarias (pueden ensayarse tiras de todos los equipos INNOLiPA HLA a la vez, aunque es necesario ensayar siempre una tira para el control de cada uno de los equipos).

Se añaden 10 µl de solución de desnaturalización (DS) a 10 µl de la muestra amplificada, del control negativo y del positivo. La mezcla se pipetea sobre cada canal de la bandeja sin tocar la tira. Luego se pulsar cualquier tecla y aparecerá "Stpos Strip:01". Con la ayuda de las teclas +/-, se indica la posición de la primera tira a procesar (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28).

Se pulsa YES y aparecerá "Nr of Strips: 48". Con ayuda de las teclas +/-, se indica el número total de tiras que se van a procesar y se pulsa YES. Aparecerá Last aspiration? Pulsar NO. □ Luego, aparecerá Proc. 1 Inc. Pulsar

MATERIAL Y MÉTODOS

YES y A partir de este momento el proceso es automático hasta finalizar el ensayo.

2.3.3.4 Análisis de resultados

La interpretación de resultados: se realiza mediante el programa “LIRAS para LiPA HLA”. Primero procedemos a preparar las hojas de lectura. Se Pegan las tiras en una hoja de lectura “LiPA-Scan Reading Template”, alineando la línea de control de conjugado de la tira con la línea negra que hay en la hoja. Luego se despegan las pestañas de la hoja y se pega en cada recuadro una tira. Una vez pegadas, hay que escanear la hoja con el programa “LiRAS for HLA” para poder obtener la interpretación.

Primero seleccionamos New test → Scanning y luego el tipo de hoja de trabajo que se quiera usar en función de las muestras a interpretar: una hoja de muestras ya predefinida o una hoja vacía (Empty LiPA Scan Template), que se rellenará según las muestras que se vayan a procesar

Una vez rellenada toda la hoja de lectura se procede a escanear las tiras, interpretar el resultado y generar los informes. Todas las tiras interpretadas con el programa y los informes generados quedaran almacenados en la base de datos. En cualquier momento los informes se pueden volver a abrir, para modificar una muestra añadiendo o eliminando sondas hasta que consideremos que está correcto.

3. ANALISIS ESTADISTICO

En primer lugar se ha procedido al análisis de las frecuencias alélicas de cada uno de los loci (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 y DPB1).

MATERIAL Y MÉTODOS

La frecuencia alélica (FA): Se calcula en porcentajes. La estimación de este parámetro se hace contando el número de veces que un alelo dado aparece en una muestra, dividido por el número total de alelos encontrados en esa misma muestra y multiplicando por 100.

$$FA = \frac{a}{n} \times 100$$

a = Numero de veces que aparece un determinado alelo en la muestra.

n = Numero total de alelos en la muestra en estudio.

También se calcularon las frecuencias relativas de la distribución de cada alelo (FD) dentro de su grupo alélico respectivo. Se calculan en porcentajes. La estimación de este parámetro se hace contando el número de veces que un alelo dado aparece en una muestra, dividido por el número total de alelos de su grupo encontrados en esa misma muestra y multiplicado por 100.

$$FD = \frac{a}{g} \times 100$$

a = Numero de veces que aparece un determinado alelo en la muestra.

g = Numero total de alelos en ese grupo alélico en estudio

Por último se calcularon las frecuencias haplotípicas (FH): Se calculan en porcentajes. La estimación de este parámetro se hace contando el número

MATERIAL Y MÉTODOS

de veces que un haplotipo dado aparece en una muestra, dividido por el número total de haplotipos encontrados en esa misma muestra y multiplicando por 100.

Se han calculado las frecuencias haplotípicas de las asociaciones de alelos: HLA-A/B/C, HLA-A/B/DRB1, HLA-B/C/DRB1, HLA-B/C, HLA-DRB1/DQB1 y HLA-A/B/C/DRB1.

$$FH = \frac{h}{t} \times 100$$

h = Numero de veces que aparece un determinado haplotipo en la muestra en estudio.

t = Numero total de haplotipos en la muestra en estudio.

Resultados

RESULTADOS

Un total de 192 familias de pacientes hematológicos de las provincias de Córdoba y Jaén se han estudiado en el presente estudio. Se han tipado por PCR-SSO y PCR-SSP para HLA de clase I (-A,-B, y -C) y clase II (-DRB1, -DQB1 y -DPB1) con resolución de cuatro dígitos. Las familias fueron incluidas en el análisis sólo cuando al menos dos haplotipos de los cuatro pudieron ser asignados por segregación familiar. Un total de 548 haplotipos (HLA-A, -C, -B, -DRB1) fueron analizados. Los loci HLA-DQB1 y HLA-DPB1 no fueron incluidos para el estudio de haplotipos, sin embargo las asociaciones HLA-DRB1-DQB1 sí fueron notificadas de forma independiente.

Las frecuencias de los alelos de clase I HLA-A,-B,-C y de clase II HLA-DRB1, DQB1 y DPB1 se muestran de forma separada. También se han estudiado grupos de tres alelos así, los haplotipos de clase I (HLA-A,-B, y C) y HLA-C, -B y -DRB1. De forma separada ya que son las dos asociaciones con mayor desequilibrio de ligamiento conocidas se han estudiado HLA-B,-C y HLA-DRB1, -DQB1).

La muestra incluida en el presente estudio, mostró en general frecuencias HLA similares a la reportadas para controles sanos de diferentes poblaciones del Mediterráneo español tales como Barcelona [(n = 941), Murcia (n = 173), Valencia (n = 577), Mallorca (n = 407) y Madrid (n = 504). Sin embargo se encontraron diversas peculiaridades de interés que individualizan nuestra población y serán analizadas a continuación de forma pormenorizada.

Aunque los datos de este trabajo se refieren a resolución de 4 dígitos, la mayoría de los estudios que estudian las frecuencias para la población sana española sólo alcanzan dos dígitos. Por lo tanto, la comparación en la mayoría de los casos se realizó en un nivel de baja resolución.

1. ALELOS HLA CLASE I

Se han analizado de forma separada los alelos de HLA clase I, incluyendo HLA-A, B y C. También se ha estudiado la distribución de cada especificidad dentro de cada grupo.

1.1 Alelos HLA-A

Un total de 26 HLA-A, se han encontrado en nuestra población que representan aproximadamente el 3,38%, de las 769 variantes reconocidas en la nomenclatura para factores del sistema HLA humano. En la tabla 1 se hace una descripción pormenorizada de las frecuencias de cada uno.

Seis alelos mostraron una frecuencia superior al 5% (A* 0101*, 0201, *0301, *1101, *2402, *2902), que representan el 69,72% de todos los alelos definidos para HLA-A en esta población.

En contraste, 9 alelos HLA-A de los encontrados mostraron una frecuencia inferior al 1% (*0202, *0222, *0302, *2403, *2608, *3004, *3402, *6601, *7401), por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra. De los alelos HLA-A descritos, no fueron tipados en ningún caso en nuestra población 743.

Ninguno de los grupos alélicos que no tenían ningún representante con frecuencia superior al 5%, alcanzaron este porcentaje cuando todas las especificidades del mismo grupo fueron analizadas de forma conjunta. Sin embargo ahora sólo los grupos A*34, A*66 y A*74 tenían una frecuencia inferior al 1%.

Además cabe resaltar que ninguno de alelos de los grupos pertenecientes a A*36, A*43, A*69 y A*80 estuvieron representados.

RESULTADOS

Tabla 1. Listado de los alelos HLA-A que se encuentran en la población estudiada

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A	FRECUENCIA (%) ^B
A0101	64	11.68	
A01			11.68
A0201	123	22.45	
A0202	1	0.18	
A0205	12	2.19	
A0222	1	0.18	
A02			25
A0301	43	7.85	
A0302	3	0.55	
A03			8.4
A1101	37	6.75	
A11			6.75
A2301	19	3.47	
A23			3.47
A2402	60	10.95	
A2403	1	0.18	
A24			11,13
A2501	11	2.01	
A25			2.01
A2601	23	4.20	
A2608	1	0.18	
A26			4.38
A2902	55	10.04	
A29			10.04
A3001	7	1.28	
A3002	11	2.01	
A3004	1	0.18	
A30			3.47
A3101	8	1.46	
A31			1.46
A3201	20	3.65	
A32			3.65
A3301	20	3.65	
A33			3.65
A3402	1	0.18	
A34			0.18
A36	0		--
A43	0		--
A6601	2	0.36	
A66			0.36
A6801	12	2.19	
A6802	11	2.01	
A68			4.20
A69	0		--
A7401	1	0.18	
A74			0.18
A80	0		--

^a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo apareció dividido por el número total de alelos.

^b Para la frecuencia de los grupos de alelos, se dividió el número de alelos (N) de ese grupo encontrados entre el total de alelos.

RESULTADOS

1.2 Variabilidad interalélica HLA-A

El grupo con más especificidades representadas fue A*02 con 4 seguido de A*30 con 3. En otros 3 grupos tipamos 2 alelos diferentes.

Tabla 2. Listado de alelos HLA-A de la población estudiada y su representación dentro de cada grupo

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A
A0101	64	100
A1		
A0201	123	89.78
A0202	1	0.73
A0205	12	8.76
A0222	1	0.73
A2		
A0301	43	93.48
A0302	3	6.52
A3		
A1101	37	100
A11		
A2301	19	100
A23		
A2402	60	98.36
A2403	1	1.64
A24		
A2501	11	100
A25		
A2601	23	95.83
A2608	1	4.17
A26		
A2902	55	100
A29		
A3001	7	36.84
A3002	11	57.89
A3004	1	5.26
A30		
A3101	8	100
A31		
A3201	20	100
A32		
A3301	20	100
A33		
A3402	1	100
A34		
A6601	2	100
A66		
A6801	12	52.17
A6802	11	47.83
A68		
A7401	1	100
A74		

RESULTADOS

^a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo de un grupo apareció dividido por el número total de alelos de ese grupo.

Los alelos predominantes para los diferentes grupos han sido: A*0101, *0201, *0301, *1101, *2301, *2402, *2501, *2601, *2902, *3002, *3101, *3201, *3301, *3402, *6601, *6801, *7401. En todos los casos excepto por una parte A*3001 (36,84) y A*3002 (57,89) y por otra A*6801 (52,17%) y A*6802 (47,83) las diferencia de frecuencia entre el alelo predominante y el resto de alelos del mismo grupo eran muy evidentes.

1.3 Alelos HLA-B

Un total de 47 HLA-B, se han encontrado en nuestra población que representan aproximadamente el 3,69%, de las 1272 variantes reconocidas en la nomenclatura para factores del sistema HLA.

Seis alelos mostraron una frecuencia superior al 5% (A* 0702*, 0801, *1801, *4402, *4403, *5101, *1402), que representan el 51,08% de todos los alelos definidos para HLA-B en esta población. En contraste, 18 alelos HLA-B de los encontrados mostraron una frecuencia inferior al 1% (*2702, *2703, *3505, *3906, *3914, *4101, *4102, *4701, *4801, *5108, *5601, *5702, *4002, *4006, *1510, *1516, *1517, *1518), por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra.

Cuando se analizan las frecuencias HLA de los grupos alélicos, se observa que B35 y B15 que no tenían ninguna especificidad por encima del 5%, ahora considerando sus variantes alélicas de forma conjunta, ambos superan este límite (8.04% y 5.65% respectivamente).

RESULTADOS

Tabla 3. Listado de los alelos HLA-B de la población estudiada

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A	FRECUENCIA (%) ^B
B0702	38	6.93	
B0705	7	1.28	
B7			8.21
B0801	37	6.75	
B8			6.75
B1302	8	1.46	
B13			1.46
B1801	38	6.93	
B18			6.93
B2702	1	0.18	
B2703	1	0.18	
B2705	11	2.01	
B27			2.37
B3501	19	3.47	
B3502	7	1.28	
B3503	11	2.01	
B3505	1	0.18	
B3508	6	1.10	
B35			8.04
B3701	7	1.28	
B37			1.28
B3801	18	3.28	
B38			3.28
B3901	8	1.46	
B3906	4	0.73	
B3914	1	0.18	
B39			2.37
B4101	5	0.91	
B4102	2	0.36	
B41			1.27
B42	0		---
B4402	36	6.57	
B4403	58	10.58	
B44			17.15
B4501	7	1.28	
B45			1.28
B46	0		--
B4701	1	0.18	
B47			0.18
B4801	1	0.18	
B48			0.18
B4901	18	3.28	
B49			3.28
B5001	11	2.01	
B50			2.01
B5101	39	7.12	
B5108	1	0.18	
B51			7.30
B5201	10	1.82	
B52			1.82
B5301	6	1.10	
B53			1.10

RESULTADOS

B5501	10	1.82	
B55			1.82
B5601	1	0.18	
B56			0.18
B5701	15	2.74	
B5702	1	0.18	
B57			2.92
B5801	9	1.64	
B58			1.64
B4001	13	2.37	
B4002	5	0.91	
B4006	3	0.55	
B40			3.83
B1501	18	3.28	
B1503	6	1.10	
B1510	1	0.18	
B1516	1	0.18	
B1517	3	0.55	
B1518	2	0.36	
B15			5.65
B1401	7	1.28	
B1402	34	6.20	
B14			7.48

a La frecuencia se define como el número de veces que un alelo apareció dividido por el número total de alelos.

b Para la frecuencia de los grupos de alelos, se dividió el número de alelos de ese grupo encontrados entre el total de alelos.

Sólo los grupos B*47, B*48 y B*56 seguían teniendo una frecuencia inferior al 1%. De todos los alelos HLA-B descritos no fueron tipados en ningún caso 1225, resaltando que ninguno de alelos de los grupos pertenecientes a B*42 y B*46 estuvieron representados. Los resultados aparecen en la tabla 3.

1.4 Variabilidad interalélica HLA-B

El grupo de alelos con más especificidades encontradas fue B*15 con seis alelos diferentes tipados seguido de B*35 con cinco. Con tres variantes estaban B*27, B*39 y B40. Los alelos predominantes para los diferentes grupos han sido: B*0702, *0801, *1302, *1801, *2705, *3501, *3701, *3801, *3901,

RESULTADOS

*4101, *4403, *4501, *4701, *4801, *4901, *5001, *5101, *5201, *5301, *5501, *5601, *5701, *5801, *4001, *1501, *1402.

A diferencia de HLA-A, aquí tenemos un considerable grupo de alelos en que ninguno de los representantes se encuentra representado en más de un 80% sobre el total del grupo. Así por ejemplo B*35, B*39, B*41, B*44, B*40 y B*15. En concreto dentro de B*35 ningún alelo representaba más del 50% en relación al resto.

Tabla 4. Listado de los alelos HLA-B que se encuentran en la población estudiada y su representación dentro de cada grupo

ALELOS	N	FRECUENCIA (%)A
B0702	38	84.44
B0705	7	15.56
B7		
B0801	37	100
B8		
B1302	8	100
B13		
B1801	38	100
B18		
B2702	1	7.69
B2703	1	7.69
B2705	11	84.62
B27		
B3501	19	43.18
B3502	7	15.91
B3503	11	25
B3505	1	2.27
B3508	6	13.64
B35		
B3701	7	100
B37		
B3801	18	100
B38		
B3901	8	61.54
B3906	4	30.77
B3914	1	7.69
B39		
B4101	5	71.43
B4102	2	28.57
B41		
B4402	36	38.30
B4403	58	61.70
B44		
B4501	7	100
B45		100
B4701	1	100

RESULTADOS

B47		
B4801	1	100
B48		
B4901	18	100
B49		
B5001	11	100
B50		
B5101	39	97.50
B5108	1	2.50
B51		
B5201	10	100
B52		
B5301	6	100
B53		
B5501	10	100
B55		
B5601	1	100
B56		
B5701	15	93.75
B5702	1	6.25
B57		
B5801	9	100
B58		
B4001	13	61.90
B4002	5	23.81
B4006	3	14.29
B40		
B1501	18	58.06
B1503	6	19.35
B1510	1	3.23
B1516	1	3.23
B1517	3	9.68
B1518	2	6.45
B15		
B1401	7	17.07
B1402	34	82.93
B14		

^a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo de un grupo apareció dividido por el número total de alelos de ese grupo.

1.5 Alelos HLA-C

Un total de 25 alelos HLA-C se encuentran en nuestra población que representan aproximadamente el 3,38%, del total de alelos HLA-C que son 475 (Marsh 2010). Por tanto no hemos encontrado representación de 450 especificidades.

RESULTADOS

Las variantes de HLA-C con una frecuencia superior al 5% en nuestra población representan el 73,9% de todas las variantes definidas HLA-C y son Cw * 04:01, *05:01, *0602, *07:01, *0702, *0802, *1203 y *1601.

Para el locus HLA-C, los alelos raros han sido C *0210, *0302, * 0712, * 0718, *0808, *1602, *1701 y *1802 (tabla 5).

En este caso todos los grupos alélicos han sido representados siendo el más frecuente C07 (24.08) y C18 el menos frecuente seguido de C17 que presentan un porcentaje inferior a 1%

Tabla 5: Listado de los alelos HLA-C que se encuentran en la población estudiada

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A	FRECUENCIA (%) ^B
C0102	13	2.37	
C01			2.37
C0202	26	4.74	
C0210	2	0.36	
C02			5.10
C0302	2	0.36	
C0303	19	3.47	
C0304	17	3.10	
C03			6.93
C0401	58	10.58	
C04			10.58
C0501	52	9.49	
C05			9.49
C0602	37	6.75	
C06			6.75
C0701	78	14.23	
C0702	45	8.21	
C0704	6	1.10	
C0712	1	0.18	
C0718	2	0.36	
C07			24.08
C0802	40	7.30	
C0808	1	0.18	
C08			7.48
C1202	8	1.46	
C1203	40	7.30	
C12			8.76
C1402	13	2.37	
C14			2.37
C1502	15	2.74	
C1505	7	1.28	
C15			4.02
C1601	55	10.04	

RESULTADOS

C1602	5	0.91	
C16			10.95
C1701	5	0.91	
C17			0.91
C1802	1	0.18	
C18			0.18

a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo apareció dividido por el número total de alelos.

b Para la frecuencia de los grupos de alelos, se dividió el número de alelos de ese grupo encontrados entre el total de alelos.

1.6 Variabilidad interalélica HLA-C

El grupo con más especificidades tipadas fue C*07 con 5 alelos (*0701, *0702, *0704, *0712 y *0718) diferentes seguido de C*03 con tres.

Los alelos predominantes para los diferentes grupos han sido: C*0102, *0202, *0303, *0401, *0501, *0602, *0701, *0802, *1203, *1402, *1502, *1601, *1701 y *1802.

Las menores diferencias se han observado entre C*0303 (50.00%) y *0304(44.34%) y algo más diferenciados C*0701 (59.10%) y C*0702 (34.10%) por una parte y C*1502 (68.20%) y C*1505 (31.82%) por otra (tabla 6).

Tabla 6: Listado de los alelos HLA-C que se encuentran en la población estudiada y su representación dentro de cada grupo

ALELOS	N	FRECUENCIA (%)A
C0102	13	100.00
C01		
C0202	26	92.86
C0210	2	7.14
C02		
C0302	2	5.26
C0303	19	50.00
C0304	17	44.74
C03		
C0401	58	100.00
C04		
C0501	52	100.00
C05		
C0602	37	100.00
C06		
C0701	78	59.10
C0702	45	34.10

RESULTADOS

C0704	6	4.55
C0712	1	0.76
C0718	2	1.52
C07		
C0801	1	2.44
C0802	40	97.60
C08		
C1202	8	16.70
C1203	40	83.33
C12		
C1402	13	100.00
C14		
C1502	15	68.20
C1505	7	31.82
C15		
C1601	55	91.67
C1602	5	8.33
C16		
C1701	5	100.00
C17		
C1802	1	100.00
C18		

a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo de un grupo apareció dividido por el número total de alelos de ese grupo.

2. ALELOS HLA CLASE II

Se han analizado de forma separada los alelos de HLA clase II, incluyendo HLA-DRB1, DQB1 y DPB1. También se ha estudiado la distribución de cada especificidad dentro de cada grupo.

2.1 Alelos HLA-DRB1

Se han notificado del gen HLA-DRB1* 31 alelos de los 597 descritos, por tanto están representados sólo el 5,19%. Los alelos DRB1 más prevalentes fueron DRB1 *07:01, *03.01 * 15.01, *13.01 *0101, *1104, todas ellos con una frecuencia superior al 5% y representan el 57,48% de los alelos DRB1 encontrados. Dos alelos adicionales (DRB1 * 0102 y *1101) mostraron una frecuencia superior al 4% y 7 alelos DRB1 (*0406, *0407, *0803, *0810, *1201,

RESULTADOS

*1305 y *1404) mostraron una frecuencia inferior al 1%, por lo que son considerados como alelos DRB1 poco frecuentes (tabla 7).

Por grupos de alelos el más frecuente seguía siendo DRB1*07, otros también tenían una frecuencia superior a 10 (DRB1*01, *03, *04, *11 y *13) mientras que sólo DRB1*12 bajaba del 1%

Tabla 7: Listado de los alelos HLA-DRB1 que se encuentran en la población estudiada

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A	FRECUENCIA (%) ^B
DRB1*0101	42	7.66	
DRB1*0102	24	4.38	
DRB1*0103	9	1.64	
DR*01			13.68
DRB1*0301	60	10.95	
DR*03			10.95
DRB1*0401	8	1.46	
DRB1*0402	10	1.82	
DRB1*0403	12	2.19	
DRB1*0404	11	2.01	
DRB1*0405	11	2.01	
DRB1*0406	2	0.36	
DRB1*0407	4	0.73	
DRB1*04			10.58
DRB1*0701	90	16.42	
DRB1*07			16.42
DRB1*0801	13	2.37	
DRB1*0803	3	0.55	
DRB1*0810	1	0.18	
DRB1*08			3.10
DRB1*0901	8	1.46	
DRB1*09			1.46
DRB1*1001	8	1.46	
DRB1*10			1.46
DRB1*1101	25	4.56	
DRB1*1102	14	2.55	
DRB1*1103	6	1.10	
DRB1*1104	31	5.66	
DRB1*11			13.87
DRB1*1201	5	0.91	
DRB1*12			0.91
DRB1*1301	45	8.21	
DRB1*1302	15	2.74	
DRB1*1303	6	1.10	
DRB1*1305	3	0.55	
DRB1*13			12.60
DRB1*1401	19	3.47	
DRB1*1404	3	0.55	
DRB1*14			4.02
DRB1*1501	47	8.58	
DRB1*1502	6	1.10	

RESULTADOS

DRB1*15			9.68
DRB1*1601	7	1.28	
DRB1*16			1.28

a La frecuencia se define como el número de veces que un alelo apareció (N) dividido por el número total de alelos.

b Para la distribución de los alelos de los grupos de alelos, el número total de alelos para cada grupo fue considerado.

2.2 Variabilidad interalélica HLA-DRB1

Los alelos más frecuentes en cada grupo fueron: DRB1*0101, *0301, *0403, *0701, *0801, *0901, *1001, *1104, *1201, *1301, *1401, *1501 y *1601.

En algunos casos estos alelos significaron la única especificidad del grupo encontrada (DRB1*0301, *0701, *0901, *1001, *1201, *1601), en otros existió una considerable diferencia entre la frecuencia del mismo y la de otros representantes del grupo (DRB1*0801, *1301, *1401, 1501), mientras que en tres casos ninguna especificidad representaba al menos el doble de otro del grupo (DRB1*0101&*0102, DRB1*0401&0402&0403&0404&0405, DRB1*1104&1101) . En cuanto a las diferentes especificidades encontradas en cada grupo de alelos destaca DRB1*04 con 7 (*0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407) y DRB1*11 y *13 ambos con cuatro.

Tabla 8: Listado de los alelos HLA-DRB1 que se encuentran en la población estudiada y su representación dentro de cada grupo

ALELOS	N	FRECUENCIA (%)A
DRB1*0101	42	56.00
DRB1*0102	24	32.00
DRB1*0103	9	12.00
DR*01		
DRB1*0301	60	100.00
DR*03		
DRB1*0401	8	13.80
DRB1*0402	10	17.24
DRB1*0403	12	20.69
DRB1*0404	11	18.97
DRB1*0405	11	18.97
DRB1*0406	2	3.45

RESULTADOS

DRB1*0407	4	6.90
DRB1*04		
DRB1*0701	90	100.00
DRB1*07		
DRB1*0801	13	76.47
DRB1*0803	3	17.65
DRB1*0810	1	5.88
DRB1*08		
DRB1*0901	8	100.00
DRB1*09		
DRB1*1001	8	100.00
DRB1*10		
DRB1*1101	25	32.90
DRB1*1102	14	18.42
DRB1*1103	6	7.89
DRB1*1104	31	40.79
DRB1*11		
DRB1*1201	5	100.00
DRB1*12		
DRB1*1301	45	65.22
DRB1*1302	15	21.74
DRB1*1303	6	8.70
DRB1*1305	3	4.35
DRB1*13		
DRB1*1401	19	86.36
DRB1*1404	3	13.64
DRB1*14		
DRB1*1501	47	88.68
DRB1*1502	6	11.32
DRB1*15		
DRB1*1601	7	100.00
DRB1*16		

a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo de un grupo apareció dividido por el número total de alelos de ese grupo.

2.3 Alelos HLA-DQB1

El estudio del locus HLA-DQB1 reveló la presencia de 14 alelos de un total de 79. Por tanto hemos encontrado representación de un 17.72%. La asignación DQB1 más frecuente fue la *0301, seguido por *0202, *0501 y *0201.

Tres alelos DQB1 adicionales mostraron frecuencias superiores a 5%: DQB1 *0302, *0602 y *0603. En total estas 7 especificidades constituyen el 80,12% de todos los alelos DQB1 definido en esta población.

RESULTADOS

El alelo DQB1 *0604 alcanzaba casi el 5% (4,64%) Sólo el alelo DQB1 *0609 tenía una frecuencia inferior al 1%.

Por otra parte, el grupo de alelos más frecuente fue *02 (29.14%), por encima de DQB1 *03 ya que tanto *0201 como *0202 son relativamente frecuentes (Las diferencias en estos dos alelos se encuentran fuera del exón 2, por lo que para diferenciarlos el sistema de tipaje empleado lleva incorporado unos iniciadores para amplificar esa zona y unas sondas específicas inmovilizadas en la membrana).

Ningún grupo de alelos de este locus presentó una frecuencia inferior al 1% (tabla 9).

Tabla 9: Listado de los alelos HLA-DQB1 que se encuentran en la población estudiada

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A	FRECUENCIA (%) ^B
DQB1*02:01	19	12.58	
DQB1*02:02	25	16.56	
DQ*02			29.14
DQB1*03:01	24	15.89	
DQB1*03:02	8	5.30	
DQB1*03:03	6	3.97	
DQB1*03:05	1	0.66	
DQ*03			25.82
DQB1*04:02	3	1.99	
DQ*04			1.99
DQB1*05:01	22	14.57	
DQB1*05:02	3	1.99	
DQB1*05:03	5	3.31	
DQ*05			19.87
DQB1*06:01	5	3.31	
DQB1*06:02	11	7.28	
DQB1*06:03	12	7.95	
DQB1*06:04	6	3.97	
DQB1*06:09	1	0.66	
DQ*06			23.17

a La frecuencia se define como el número de veces que un alelo apareció (N) dividido por el número total de alelos.

b Para la distribución de los alelos de los grupos de alelos, el número total de alelos para cada grupo fue considerado.

RESULTADOS

2.4 Variabilidad interalélica HLA-DQB1

El grupo de alelos que más variabilidad presentó fue DQB1*06 con cinco especificidades. En *03 encontramos cuatro, en *05 hay 3 alelos diferentes, dos en *02 y uno sólo en *04.

Los alelos más frecuentes en cada grupo fueron DQB1*0202, *0301, *0402, *0501 y por último *0602 y *0603 con igual frecuencia.

DQB1*0301 y *0501 presentaron más del doble de la frecuencia del siguiente alelo de su grupo mientras que en DQB1*02 y *06 no había diferencias acusadas.

Sin embargo en DQB1 *04 sólo encontramos representación de DQB1*0402.

Tabla 10: Listado de los alelos HLA-DRQ1 que se encuentran en la población estudiada y su representación dentro de cada grupo

ALELOS	N	FRECUENCIA (%A)
DQB1*0201	19	43.18
DQB1*0202	25	56.82
DQB1*02		
DQB1*0301	24	61.54
DQB1*0302	8	20.51
DQB1*0303	6	15.38
DQB1*0305	1	2.56
DQB1*03		
DQB1*0402	3	100
DQB1*04		
DQB1*0501	22	73.33
DQB1*0502	3	10
	5	16.67

RESULTADOS

DQB1*0503		
DQB1*05		
DQB1*0601	5	14.28
DQB1*0602	11	31.43
DQB1*0603	12	34.29
DQB1*0604	6	17.14
DQB1*0609	1	2.86
DQB1*06		

a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo de un grupo apareció dividido por el número total de alelos de ese grupo.

2.5 Alelos HLA-DPB1

Un total de 15 HLA-DPB1, se han encontrado en nuestra población que representan aproximadamente el 12,20%, de las 123 variantes reconocidas en la nomenclatura para factores del sistema HLA (Marsh 2010)

Cuatro alelos mostraron una frecuencia superior al 5% (DPB1*0201*, 0301, *0401 y *0402), que representan el 75,4% de todos los alelos definidos para HLA-DPB1 en esta población.

Cabe destacar que entre los dos alelos DPB1 *04, es decir DPB1 *0401 y *0402 representan más del 50% (51,59). También el grupo de alelos formados por DPB1*02, presentaban una alta frecuencia. Así DPB1*0201 y DPB1*0202 sumaban entre ambos 19.05% del total de alelos encontrados.

En contraste, 3 alelos HLA-DPB1 mostraron una frecuencia inferior al 1% (*0601, *1501 y *1601) por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra.

RESULTADOS

Tabla 11: Lista de los alelos HLA-DPB1 que se encuentran en la población estudiada

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A	FRECUENCIA (%) ^B
DPB1*0101	2	1.59	
DP*01			1.59
DPB1*0201	21	16.67	
DPB1*0202	3	2.38	
DP*02			19.05
DPB1*0301	9	7.14	
DP*03			7.14
DPB1*0401	51	40.48	
DPB1*0402	14	11.11	
DP*04			51.59
DPB1*0501	2	1.59	
DP*05			1.59
DPB1*0601	1	0.79	
DP*06			0.79
DPB1*1001	4	3.17	
DP*10			3.17
DPB1*1101	5	3.97	
DP*11			3.97
DPB1*1301	4	3.17	
DP*13			3.17
DPB1*1401	2	1.59	
DP*14			1.59
DPB1*1501	1	0.79	
DP*15			0.79
DPB1*1601	1	0.79	
DP*16			0.79
DPB1*1701	6	4.76	
DP*17			4.76

a La frecuencia se define como el número de veces que un alelo apareció (N) dividido por el número total de alelos.

b Para la distribución de los alelos de los grupos de alelos, el número total de alelos para cada grupo fue considerado.

2.6 Variabilidad interalélica HLA-DPB1

En casi todos los grupos tan sólo hay representación de un alelo, excepto en DPB1 *02 y 04 que encontramos dos (0201 y 0202 por una parte y 0401 y 0402 por otra).

RESULTADOS

Siempre el primer alelo del orden (dígito tercero y cuarto: 01) fue el más frecuente bien como hemos dicho como único representante o cuando había otro del grupo.

En los casos que encontramos dos alelos en un grupo la diferencia de frecuencia entre ambos fue considerable: DPB1*0201 (87.50%) & DPB1*0202 (12.50%) y DPB1*0401 (78.46%) & DPB1*0402 (21.54%). Estos dos grupos de alelos son los más representados en nuestra muestra con bastante diferencia.

Tabla 12: Listado de alelos HLA-DPB1 de la muestra estudiada y su representación dentro de cada grupo.

ALELOS	N	FRECUENCIA (%) ^A
DPB1*0101	2	100
DP*01		
DPB1*0201	21	87.50
DPB1*0202	3	12.50
DP*02		
DPB1*0301	9	100
DP*03		
DPB1*0401	51	78.46
DPB1*0402	14	21.54
DP*04		
DPB1*0501	2	100
DP*05		
DPB1*0601	1	100
DP*06		
DPB1*1001	4	100
DP*10		
DPB1*1101	5	100
DP*11		
DPB1*1301	4	100
DP*13		
DPB1*1401	2	100
DP*14		
DPB1*1501	1	100
DP*15		
DPB1*1601	1	100
DP*16		
DPB1*1701	6	100
DP*17		

a La frecuencia se define como el número de veces (N) que un alelo de un grupo apareció dividido por el total de los de ese grupo.

3. HAPLOTIPOS HLA

Se describirán las asociaciones HLA-A-B-C-DRB1, HLA-A-B-DRB1, HLA-B-C-DRB1 y HLA-A-B-C.

También se tratarán las uniones de HLA-B con HLA-C, por una parte y las de DRB1 con DQB1 por otra de forma separada ya que al ser genes muy próximos sus desequilibrios de ligamiento son muy potentes. Por otra parte, serán notificados diferentes grados de fidelidad de estos haplotipos a otros loci.

3.1 Haplotipos HLA clase I

En nuestra muestra tenemos 254 haplotipos diferentes de HLA clase I. El más frecuente fue A*2902, B*4403, C*1601, con un 6,20% (34/548). La mayor parte de estos haplotipos estaban asociados a DRB1*0701 (27/34), aunque también podían asociarse a DRB1*1301 (2/34), *0101 (2/34), *1103 (2/34) y 0407 (1/34).

Con una frecuencia mayor al 3% también hemos encontrado otros dos haplotipos: A*0101, C*0701, B*0801 (3.83%) y A*0201, C*0501, B*4402 (3.47%). En el primer caso estaba asociado a DRB1* 0301 en su mayor parte (15/21), sin embargo en el segundo caso observamos junto a estos alelos ocho diferentes especificidades DRB1, siendo la más frecuente DRB1*1301 pero sólo estaba presente en 5 de las 19 veces que encontramos el haplotipo.

En total 13 haplotipos presentaban una frecuencia superior al 1% (Tabla 13).

Tabla 13. Haplotipos HLA clase I

Haplotipos HLA-A, B, C	Nº	^A Frecuencia %
------------------------	----	---------------------------

RESULTADOS

A*2902, C*1601, B*4403	34	6.20
A*0101, C*0701, B*0801	21	3.83
A*0201, C*0501, B*4402	19	3.47
A*3301, C*0802, B*1402	15	2.76
A*0301, C*0702, B*0702	13	2.37
A*2601, C*1203, B*3801	9	1.64
A*0201, C*0702, B*0702	8	1.46
A*1101, C*0401, B*3501	7	1.28
A*3002, C*0501, B*1801	7	1.28
A*2402, C*0702, B*0702	7	1.28
A*2301, C*0401, B*4403	7	1.28
A*0101, C*0701, B*5701	6	1.10
A*0201, C*0701, B*0801	6	1.10
A*0201, C*1402, B*5101	5	0.91
A*0101, C*1202, B*5201	5	0.91
A*1101, C*0304, B*4001	5	0.91
A*0201, C*0701, B*4901	5	0.91
A*0201, C*0304, B*4001	5	0.91
A*0201, C*1502, B*5101	5	0.91
A*0301, C*0802, B*1402	5	0.91
A*1101, C*0102, B*2705	5	0.91
A*0101, C*1202, B*5201	5	0.91
A*2402, C*1601, B*4501	5	0.91
A*2402, C*1203, B*1801	5	0.91

^a La frecuencia haplotípica se define como el número de veces (N) que un haplotipo apareció dividido por el total de los haplotipos de la muestra

Hay un significativo número de haplotipos HLA clase I que no son frecuentes formando parte de haplotipos completos A, B, C y DRB1 porque se asocian a diferentes HLA-DRB1. Entre ellos destacan A*2301, C*0401, B*4403 (1.28%) y A*0201, C*0304, B*4001, A*0201, C*1502, B*5101, A*0301, C*0802, B*1402, A*1101, C*0102, B*2705, A*0101, C*1202, B*5201, A*2402, C*1601, B*4501, A*2402, C*1203, B*1801 (0.91).

En el caso contrario nos encontramos con A*3002, C*0501, B*1801 (1.28) ya que en los 7 casos en que lo hemos encontrado aparece con DRB1*0301 no asociándose a ningún otro HLA DRB1.

RESULTADOS

La relación de fidelidad de los haplotipos HLA clase I con diferentes alelos DRB1 podemos observarla en la tabla 14. Se han analizado los 6 haplotipos más frecuentes.

Tabla 14: Haplotipos HLA clase I más frecuentes y asociación a DRB1 predominante

Haplotipos HLA-A, B, C	Nº	DRB1 predominante/ Frecuencia en %	DRB1 diferentes Asociados
A*2902,C*1601,B*4403	34	0701/79.41	5
A*0101,C*0701,B*0801	21	0301/71.43	5
A*0201,C*0501,B*4402	19	1301/ 26.32	8
A*3301,C*0802,B*1402	15	0102/80.00	4
A*0301,C*0702,B*0702	13	1501/38.46	8
A*2601,C*1203,B*3801	9	1301/44.44	6

En la mayoría de los casos podemos observar como los diferentes haplotipos HLA-clase I se asocian a diferentes alelos DRB1 (excepto el caso comentado anteriormente).

Incluso en algunos casos tampoco existe una especificidad DRB1 que predomine ostensiblemente sobre el resto.

Así tenemos A*0201, C*0501, B*4402 con DRB1*1301, A*0301, C*0702, B*0702 con DRB1*1501 y A*2601, C*1203, B*3801 con DRB1*1301 donde el alelo DRB1 más frecuente en ellos sólo lo encontramos en el 26.32%, 38.46% y 44.44% de los casos respectivamente.

3.2 Haplotipos HLA-B, C

Se han encontrado un total de 89 asociaciones HLA-B, C diferentes en el total de los 548 haplotipos estudiados. Las 29 asociaciones HLA-B y-C con una frecuencia superior al 1% se ilustran en la Tabla 15.

RESULTADOS

Como se puede observar la frecuencia superior fue para B*4403-C*1601 (8.39%) seguida de B*0702-C*0702 y B*0801-C*0701 ambas del 6.57%. Tan sólo cinco asociaciones presentan una frecuencia superior al 5% y treinta y una están por encima del 1%.

Tabla 15: Asociaciones frecuentes HLA-B/C

Haplotipos B-C	Nº	FRECUENCIA (%)
B*4403-C*1601	46	8.39
B*0702-C*0702	36	6.57
B*0801-C*0701	36	6.57
B*1402-C*0802	33	6.02
B*4402-C*0501	30	5.47
B*3501-C*0401	19	3.47
B*1801-C*0501	18	3.28
B*3801-C*1203	18	3.28
B*5101-C*1502	17	3.10
B*4901-C*0701	15	2.74
B*1501-C*0303	13	2.37
B*4001-C*0304	12	2.19
B*5001-C*0602	10	1.82
B*1801-C*1203	10	1.82
B*2705-C*0102	9	1.64
B*5701-C*0701	9	1.64
B*5801-C*0701	9	1.64
B*4403-C*0401	8	1.46
B*1302-C*0602	8	1.46
B*3503-C*0401	8	1.46
B*5101-C*1402	8	1.46
B*5201-C*1202	8	1.46
B*3701-C*0602	7	1.28
B*3901-C*1203	7	1.28
B*1801-C*0701	7	1.28
B*4002-C*0202	7	1.28
B*0705-C*1505	7	1.28
B*3502-C*0401	7	1.28
B*5101-C*0202	6	1.10
B*1401-C*0802	6	1.10
B*5301-C*0401	6	1.10
B*5701-C*0602	6	1.10
B*3508-C*0401	6	1.10

RESULTADOS

La mayoría de los alelos HLA-B, tienden a asociarse específicamente a pocos alotipos HLA-C.

Se han encontrado 27 asociaciones únicas aunque en un número considerable de casos parecen depender de la poca frecuencia de algunos alelos HLA-B.

A continuación en la tabla 16 se observan aquellos alelos HLA B que se asocian a una sólo especificidad HLA-C, reseñando tan sólo aquellos casos en que al menos encontramos juntos estos alelos dos veces.

En algunas ocasiones se demuestra una fuerte asociación: entre éstas destacan B*3801-C*1203, B*4001-C*0304 y B*1302-C*0602.

Las tres siguientes asociaciones en frecuencia tienen el interés de estar formadas por especificidades HLA-B (HLA-B*0705, HLA-B*3502 y HLA-B*4002 que no han resultado ser los más representados en sus respectivos grupos alélicos.

Tabla 16: Asociaciones HLA-B/C únicas más frecuentes

Haplotipos B-C	Nº	FRECUENCIA (%)
B*3801-C*1203	18	3.28
B*4001-C*0304	12	2.19
B*1302-C*0602	8	1.46
B*3502-C*0401	7	1.28
B*0705-C*1505	7	1.28
B*4002-C*0202	7	1.28
B*3701-C*0602	7	1.28
B*5301-C*0401	6	1.10
B*1401-C*0802	6	1.10
B*3508-C*0401	6	1.10
B*4006-C*1502	3	0.55
B*1517-C*0701	3	0.55
B*4102-C*1701	2	0.36

RESULTADOS

La asociación B*3801-C*1203 perdió fuerza al considerar todo el haplotipo HLA clase I en su conjunto de manera que principalmente la encontramos con A*2601 pero esto sólo ocurre en la mitad de los casos (9/18).

Si además consideramos DRB1 todavía pierde más fuerza ya que el haplotipo completo A*2601-B*3801-C*1203-DRB1*1301 sólo aparece en 4 ocasiones.

El resto de asociaciones únicas B-C y que no aparecen en la tabla 16, pueden observarse en la tabla 17 y corresponden a aquellos alelos HLA-B que sólo han aparecido una vez en nuestra muestra. Será necesario confirmar en un futuro ampliando la muestra si ésta es o no la asociación predominante o única en nuestra población.

Tabla 17: Asociaciones HLA-B/C únicas poco frecuentes

Haplotipos B-C	Nº	FRECUENCIA (%)
B*1510-C*0304	1	0.18
B*1516-B*1402	1	0.18
B*2702-C*0202	1	0.18
B*2703-C*0202	1	0.18
B*3505-C*0401	1	0.18
B*3914-C*0702	1	0.18
B*4701-C*0602	1	0.18
B*4801-C*0801	1	0.18
B*5108-C*0602	1	0.18
B*5601-C*0602	1	0.18
B*5702-C*1802	1	0.18

En contraste con lo anteriormente reseñado, B *5101 se encuentra asociado con 9 diferentes alelos HLA-C. Otros alelos HLA-B que se asocian a diferentes especificidades HLA-C se muestran en la tabla 18.

La asociación más potente de B *5101 fue con C*1502 (41,46%) pero otras 3 asociaciones tenían también frecuencias superiores al 5% (C*0202, *1402 y *1602 y otras 2 casi alcanzaban este porcentaje con 4.88% (C*0102 y

RESULTADOS

*1601). También B *1501, 1801 y 4403 tenían cada uno 5 asociaciones diferentes.

Tabla 18. Asociaciones HLA-B/C y frecuencias relativas por cada alelo HLA-B.

Asociaciones B-C	Nº	F. absoluta (%)	F. relativa %
B*0702			
B*0702-C*0701	1	0.18	2.63
B*0702-C*0702	36	6.57	94.74
B*0702-C*1203	1	0.18	2.63
B*0801			
B*0801-C*0701	36	6.57	97.30
B*0801-C*0702	1	0.18	2.70
B*1402			
B*1402-C*0202	1	0.18	2.86
B*1402-C*0501	1	0.18	2.86
B*1402-C*0802	33	6.02	94.28
B*1501			
B*1501-C*0202	1	0.18	5.56
B*1501-C*0303	13	2.37	72.22
B*1501-C*0304	1	0.18	5.56
B*1501-C*0401	2	0.36	11.11
B*1501-C*0704	1	0.18	5.56
B*1503			
B*1503-C*0202	4	0.73	66.67
B*1503-C*0210	2	0.36	33.33
B*1518			
B*1518-C*0704	1	0.18	50
B*1518-C*0712	1	0.18	50
B*1801			
B*1801-C*0501	18	3.28	48.65
B*1801-C*0701	7	1.28	18.92
B*1801-C*0704	1	0.18	2.70
B*1801-C*1203	10	1.82	27.03
B*1801-C*1601	1	0.18	2.70
B*2705			
B*2705-C*0102	9	1.64	81.82
B*2705-C*0202	2	0.36	18.18
B*3501			
B*3501-C*0202	1	0.18	5
B*3501-C*0401	19	3.47	95
B*3503			
B*3503-C*0401	8	1.46	72.73
B*3503-C*1203	3	0.55	27.27
B*3901			
B*3901-C*0702	1	0.18	12.5

RESULTADOS

B*3901-C*1203	7	1.28	87.5
B*3906			
B*3906-C*0702	3	0.55	75
B*3906-C*1203	1	0.18	25
B*4101			
B*4101-C*0701	2	0.36	50
B*4101-C*1701	2	0.36	50
B*4402			
B*4402-C*0501	30	5.47	90.91
B*4402-C*0303	1	0.18	3.03
B*4402-C*0704	2	0.36	6.06
B*4403			
B*4403-C*0202	1	0.18	1.75
B*4403-C*0401	8	1.46	14.04
B*4403-C*1402	1	0.18	1.75
B*4403-C*1601	46	8.39	80.70
B*4403-C*1602	1	0.18	1.75
B*4501			
B*4501-C*0602	2	0.36	33.33
B*4501-C*1601	4	0.73	66.67
B*4901			
B*4901-C*0602	1	0.18	6.25
B*4901-C*0701	15	0.18	93.75
B*5001			
B*5001-C*0501	2	0.36	16.67
B*5001-C*0602	10	1.82	83.33
B*5101			
B*5101-C*0102	2	0.36	4.88
B*5101-C*0202	6	1.10	14.63
B*5101-C*0401	1	0.18	2.44
B*5101-C*0702	1	0.18	2.44
B*5101-C*0704	1	0.18	2.44
B*5101-C*1402	8	1.46	19.51
B*5101-C*1502	17	3.10	41.46
B*5101-C*1601	2	0.36	4.88
B*5101-C*1602	3	0.55	7.32
B*5201			
B*5201-C*1202	8	1.46	80
B*5201-C*1402	2	0.36	20
B*5501			
B*5501-C*0102	2	0.36	20
B*5501-C*0303	5	0.91	50
B*5501-C*0304	2	0.36	20
B*5501-C*1402	1	0.18	10
B*5701			
B*5701-C*0602	6	1.10	40
B*5701-C*0701	9	1.64	60

RESULTADOS

B*5801			
B*5801-C*0302	2	0.36	15.38
B*5801-C*0701	9	1.64	69.23
B*5801-C*0718	2	0.36	15.38

F. Absoluta: Se ha considerado como frecuencia absoluta el cociente entre una asociación B/C determinada y el número total de asociaciones por 100

F. Relativa: Se ha considerado como frecuencia relativa el cociente entre una asociación B/C determinada y el número total de asociaciones que el alelo HLA-B involucrado ha tenido por 100

A pesar de que diferentes alelos HLA-B se asocian a distintos HLA-C, en la mayoría de los casos podemos definir uno como predominante (su porcentaje respecto al resto del grupo es del 90% o más).

Así tenemos B*0702 con C*0702 que representa el 94.74% de las asociaciones de B*0702, B*0801 con C*0701 (97.30%), B*1402 con C*0802 (94.28%), B*3501 con C*0401 (95%), B*4901 con C*0701 (93.75%) y B*4402 con C*0501 (90.91%). Para otros cinco alelos HLA-B (*2705, *3901, *4403, *5001 y *5201) su asociación con un C concreto representó al menos el 80% en relación a sus otras asociaciones.

En otros casos ninguno de los haplotipos representó el 50% o más. En este apartado podemos incluir B*1518, B*1801, B*4101, B*5101, B*5501.

3.3 Asociaciones DRB1-DQB1

Los loci DR y DQ están relativamente próximos, por lo que suelen tener un elevado desequilibrio de ligamiento, presentándose un gran número de asociaciones únicas DRB1-DQB1.

Las dos asociaciones con mayor frecuencia fueron DQB1*0202-DRB1*0701 (15.89%) y DQB1*0201-DRB1*0301 (12.58%). Otros tres

RESULTADOS

haplotipos superaban el 5%: DQB1*0603-DRB1*1301, DQB1*0602-DRB1*1501 y DQB1*0501-DRB1*0101 y en total 22, el 1% (tabla 19).

Sin embargo algunos alelos DRB1 se asocian comúnmente a diferentes especificidades DQB1 e incluso no se deben descartar asociaciones raras o poco comunes.

En la tabla 19 están plasmadas las asociaciones encontradas en nuestra muestra con frecuencia superior al 1%.

Tabla 19. Asociaciones HLA-DRB1/DQB1 más frecuentes

Haplotipos DRB1/DQB1	N	F. absoluta %
DQB1*0202-DRB1*0701	24	15.89
DQB1*0201-DRB1*0301	19	12.58
DQB1*0603-DRB1*1301	12	7.95
DQB1*0602-DRB1*1501	11	7.28
DQB1*0501-DRB1*0101	10	6.62
DQB1*0301-DRB1*1101	6	3.97
DQB1*0301-DRB1*1104	6	3.97
DQB1*0501-DRB1*0102	6	3.97
DQB1*0604-DRB1*1302	6	3.97
DQB1*0303-DRB1*0701	5	3.31
DQB1*0501-DRB1*0103	4	2.65
DQB1*0503-DRB1*1401	4	2.65
DQB1*0601-DRB1*1502	4	2.65
DQB1*0301-DRB1*1303	3	1.99
DQB1*0302-DRB1*0404	3	1.99
DQB1*0502-DRB1*1601	3	1.99
DQB1*0301-DRB1*1102	2	1.32
DQB1*0402-DRB1*0801	2	1.32
DQB1*0301-DRB1*1201	2	1.32
DQB1*0302-DRB1*0402	2	1.32
DQB1*0302-DRB1*0403	2	1.32
DQB1*0501-DRB1*1001	2	1.32

F. Absoluta: Se ha considerado como frecuencia absoluta el cociente entre cada asociación y el número total de asociaciones por 100

RESULTADOS

La fidelidad de las asociaciones DRB1-DQB1, podemos observarlas en la tabla 20. El alelo DRB1 más frecuente, DRB1*0701, fue encontrado en la mayoría de las veces relacionado con el alelo DQB1*0202 alelos (82,76), y con un haplotipo DQB1*030302 en los individuos restantes (17,24%).

Diferentes asociaciones de haplotipos estaban muy conservadas como DQB1*0201 con DRB1*0301, DQB1*0202 con DRB1*0701, DQB1*0502 con DRB1*1601, DQB1*0503 con DRB1*14 (En cuatro casos con *1401 y uno *1404), DQB1*0601 con DRB1*1502 (4 con 1502 y uno con 1501), DQB1*0602 con DRB1*1501, DQB1*0603 con DRB1*1301, DQB1*0604 y *0609 con DRB1*1302.

Otros alelos DQB1 sin embargo estuvieron asociados a diferentes especificidades DRB1 e incluso en algunos casos sin ninguna predominancia (0301, 0302, 0501).

También hubo un considerable número de casos que por la poca frecuencia o bien del alelo DRB1 o de DQB1 tan sólo encontramos una asociación.

Tabla 20. Asociaciones HLA-DRB1/DQB1 y frecuencias relativas por cada alelo HLA-DRB1

HAPLOTIPOS DRB1/DQB1	N	F ABSOLUTA %	F RELATIVA %
DQB1*0201			
DQB1*0201-DRB1*0301	19	12.58	100
DQB1*0202			
DQB1*0202-DRB1*0701	24	15.89	96
DQB1*0202-DRB1*0301	1	0.66	4
DQB1*0301			
DQB1*0301-DRB1*1101	6	3.97	25
DQB1*0301-DRB1*1104	6	3.97	25
DQB1*0301-DRB1*1102	2	1.32	8.33
DQB1*0301-DRB1*1303	3	1.99	12.5
DQB1*0301-DRB1*1305	1	0.66	4.17
DQB1*0301-DRB1*1201	2	1.32	8.33

RESULTADOS

DQB1*0301-DRB1*0401	1	0.66	4.17
DQB1*0301-DRB1*0403	1	0.66	4.17
DQB1*0301-DRB1*0701	1	0.66	4.17
DQB1*0301-DRB1*0803	1	0.66	4.17
DQB1*0302			
DQB1*0302-DRB1*0402	2	1.32	25
DQB1*0302-DRB1*0403	2	1.32	25
DQB1*0302-DRB1*0404	3	1.99	37.5
DQB1*0302-DRB1*0405	1	0.66	12.5
DQB1*0303			
DQB1*0303-DRB1*0701	5	3.31	83.33
DQB1*0303-DRB1*0901	1	0.66	16.67
DQB1*0305			
DQB1*0305-DRB1*0403	1	0.66	100
DQB1*0402			
DQB1*0402-DRB1*0406	1	0.66	66.67
DQB1*0402-DRB1*0801	2	1.32	33.33
DQB1*0501			
DQB1*0501-DRB1*0101	10	6.62	45.45
DQB1*0501-DRB1*0102	6	3.97	27.27
DQB1*0501-DRB1*0103	4	2.65	18.18
DQB1*0501-DRB1*1001	2	1.32	9.09
DQB1*0502			
DQB1*0502-DRB1*1601	3	1.99	100
DQB1*0503			
DQB1*0503-DRB1*1401	4	2.65	80
DQB1*0503-DRB1*1404	1	0.66	20
DQB1*0601			
DQB1*0601-DRB1*1502	4	2.65	80
DQB1*0601-DRB1*1501	1	0.66	20
DQB1*0602			
DQB1*0602-DRB1*1501	11	7.28	100
DQB1*0603			
DQB1*0603-DRB1*1301	12	7.95	100
DQB1*0604			
DQB1*0604-DRB1*1302	6	3.97	100
DQB1*0609			
DQB1*0609-DRB1*1302	1	0.66	100

F. Absoluta: Se ha considerado como frecuencia absoluta el cociente entre una asociación B/C determinada y el número total de asociaciones por 100

F. Relativa: Se ha considerado como frecuencia relativa el cociente entre una asociación B/C determinada y el número total de asociaciones que el alelo HLA-B involucrado ha tenido por 100

3.4 Haplotipos C-B-DRB1

Hemos encontrado 294 haplotipos diferentes de los cuales los más frecuentes podemos observarlos en la tabla 21

Tabla 21. Haplotipos B-C-DRB1 más frecuentes

Haplotipos B-C-DRB1	N	FRECUENCIA %
B*4403-C*1601-DRB1*0701	38	6.93
B*0801-C*0701-DRB1*0301	26	4.74
B*0702-C*0702-DRB1*1501	22	4.01
B*1402-C*0802-DRB1*0102	19	3.47
B*1801-C*0501-DRB1*0301	15	2.74
B*4402-C*0501-DRB1*1301	10	1.82
B*3801-C*1203-DRB1*1301	8	1.46
B*4901-C*0701-DRB1*0405	6	1.10
B*5701-C*0701-DRB1*0701	6	1.10
B*5201-C*1202-DRB1*1502	6	1.10
B*3502-C*0401-DRB1*1104	6	1.10
B*3501-C*0401-DRB1*0101	6	1.10
B*2705-C*0102-DRB1*0101	5	0.91
B*4001-C*0304-DRB1*0404	4	0.73
B*5301-C*0401-DRB1*1302	4	0.73
B*0801-C*0701-DRB1*1401	4	0.73
B*1501-C*0303-DRB1*1101	4	0.73

Los haplotipos B-C-DRB1 más frecuentemente encontrados fueron: B*4403-C*1601-DRB1*0701 (en consonancia con las asociaciones B-C y haplotipos A-B-C-DRB1 más frecuentes) B*0801-C*0701-DRB1*0301 y B*0702-C*0702-DRB1*1501. Sólo cinco haplotipos tenían una frecuencia superior al 2% y 12 superior al 1%.

Las asociaciones B-C mostradas en las tablas 16, 17 y 18 que mostraban en la mayoría de los casos una relación estrecha entre ambos loci, al incorporar otro locus (DRB1) algo más distante dentro del mapa genético del

RESULTADOS

HLA sigue manteniendo en algunos casos esta relación pero en otros hemos encontrado asociaciones a múltiples DRB1.

En la tabla 22 podemos ver cada una de las asociaciones HLA-B/C a qué alelo se asocia prioritariamente y el número total de alelos DRB1 a los que se asocia.

Tabla 22. Alelos HLA-DRB1 en las asociaciones HLA-B/C

HAPLOTIPOS B-C-DRB1	ALELO DRB1 PREDOMINANTE %	DRB1 DIFERENTES
B*4403-C*1601 (46)	DRB1*0701 (38)	6
B*0801-C*0701 (36)	DRB1*0301 (26)	6
B*0702-C*0702 (36)	DRB1*1501 (22)	13
B*1402-C*0802 (33)	DRB1*0102 (19)	9
B*1801-C*0501 (18)	DRB1*0301 (15)	4
B*4402-C*0501 (30)	DRB1*1301 (10)	11
B*3801-C*1203 (18)	DRB1*1301 (8)	9
B*4901-C*0701 (15)	DRB1*0405 (6)	10
B*5701-C*0701 (9)	DRB1*0701 (6)	4
B*5201-C*1202 (8)	DRB1*1502 (6)	3
B*3502-C*0401 (7)	DRB1*1104 (6)	2
B*3501-C*0401 (19)	DRB1*0101 (6)	10
B*2705-C*0102 (9)	DRB1*0101 (5)	4
B*4001-C*0304 (12)	DRB1*0404 (4)	6
B*5301-C*0401 (6)	DRB1*1302 (4)	3
B*1501-C*0303 (13)	DRB1*1101 (4)	9

Respecto a HLA-A hay que considerar el caso del haplotipo B*0702-C*0702-DRB1*1501 y su asociación con alta frecuencia a tres diferentes alelos de este locus (A*0201, A*0301 y A*2402) que es la causa de la alta probabilidad de encontrar B*0702-C*0702-DRB1*1501 y en cambio esta combinación no es tan frecuente cuando consideramos también HLA-A.

En la tabla 22 podemos observar hasta cuatro haplotipos B-C (B*0702-C*0702, B*4402-C*0501, B*4901-C*0701 y B*3501-C*0401) que se asocian a diez o más alelos DRB1 diferentes.

RESULTADOS

Aunque no aparecen en la tabla debemos resaltar que en las siete asociaciones B*0705-C*1505 hemos encontrado siete alelos DRB1 diferentes y sobre todo que el alelo B*5101 formaba parte de veintiocho combinaciones B-C-DRB1 distintas.

3.5 Haplotipos HLA-A/B/C/DRB1

En nuestra población hemos estudiado 401 haplotipos diferentes de los que 59 se han repetido al menos dos veces. El haplotipo más encontrado en nuestra muestra, incluyendo los cuatro loci ya mencionados ha sido: A*2902-B*4403-C*1601-DRB1* 0701 (4.93%). Haplotipo éste más frecuente también en la mayoría de las poblaciones españolas.

La Tabla 23 resume los haplotipos más frecuentes HLA-A, B ,C y DRB1 encontrados. Los haplotipos fueron ordenados por su frecuencia.

Tabla 23. Frecuencias haplotipos HLA-A/B/C/DRB1

A	B	C	DRB1	N	Frecuencia
2902	4403	1601	0701	27	(4.93%)
0101	0801	0701	0301	15	(2.74%)
3301	1402	0802	0102	12	(2.19%)
0201	0702	0702	1501	8	(1.46%)
3002	1801	0501	0301	7	(1.28%)
0201	4402	0501	1301	5	(0.91%)
0201	0801	0701	0301	5	(0.91%)
0301	0702	0702	1501	5	(0.91%)
2601	3801	1203	1301	4	(0.73%)
0201	4402	0501	0101	4	(0.73%)
0101	5701	0701	0701	4	(0.73%)
0101	5201	1202	1502	4	(0.73%)
1101	2705	0102	0101	4	(0.73%)
0201	4403	1601	0701	3	(0.55%)
2402	0702	0702	1501	3	(0.55%)
0201	4402	0501	0403	3	(0.55%)
0201	1801	0501	0301	3	(0.55%)
0301	0801	0701	0301	3	(0.55%)
0201	4901	0701	0405	3	(0.55%)
1101	3501	0401	0101	3	(0.55%)
0101	0801	0701	1401	3	(0.55%)
0201	5701	0602	0701	3	(0.55%)

RESULTADOS

6802	5301	0401	1302	3	(0.55%)
1101	4001	0304	0404	3	(0.55%)
0201	5101	1402	1301	3	(0.55%)
0201	4402	0501	0901	3	(0.55%)
2402	4402	0501	1301	2	(0.36%)
0301	0702	0702	0301	2	(0.36%)
0301	1402	0802	0701	2	(0.36%)
0101	3502	0401	1104	2	(0.36%)
0101	3701	0602	1001	2	(0.36%)
2301	4901	0701	1101	2	(0.36%)
2402	4403	1601	0701	2	(0.36%)
2402	1402	0802	1303	2	(0.36%)
0301	3501	0401	0101	2	(0.36%)
3001	1302	0602	0701	2	(0.36%)
3201	4402	0501	0401	2	(0.36%)
3201	4402	0501	1301	2	(0.36%)
3201	4002	0202	0101	2	(0.36%)
2402	4501	1601	1001	2	(0.36%)
2402	3502	0401	1104	2	(0.36%)
0101	0702	0702	1501	2	(0.36%)
2402	3801	1203	1401	2	(0.36%)
2301	5101	1601	1102	2	(0.36%)
2301	4403	0401	1301	2	(0.36%)
0201	5101	1502	1301	2	(0.36%)
0201	4001	0304	0404	2	(0.36%)
2902	4403	1601	1301	2	(0.36%)
0101	4006	1502	1404	2	(0.36%)
0201	5501	0304	1104	2	(0.36%)
0201	5101	1602	1104	2	(0.36%)
1101	3501	0401	0103	2	(0.36%)
2902	4403	1601	1103	2	(0.36%)
3002	1302	0602	1303	2	(0.36%)
0201	1801	0701	1104	2	(0.36%)
2301	4403	0401	1501	2	(0.36%)
0201	5101	0202	0101	2	(0.36%)
3201	1401	0802	0701	2	(0.36%)
2902	4403	1601	0101	2	(0.36%)

Frecuencia: la frecuencia haplotípica se consideró como el cociente entre las veces (N) que se ha encontrado un haplotipo entre el número de haplotipos por 100

Otras dos asociaciones adicionales con una frecuencia de más de 2% se encuentra en esta población: A*0101-C*0701-B*0801-DRB1*0301 (2,74%) y A*3301-C*0802-B* 1402-DRB1*0102 (2,19%).

RESULTADOS

Otros dos haplotipos tenían una frecuencia superior a 1 A*3002-C*0501-B*1801-DRB1*0301 (1.28%) y A*0201-C*0702-B*0702-DRB1*1501 (1,46%) mientras que tres estaban cerca de este porcentaje A*0201-C*0501-B*4402-DRB1*1301 (0.91%) y A*0201-C*0701-B*0801-DRB1*0301 y A*0301-C*0702-B*0702-DRB1*1501 con el 0.91%

Gran parte de los haplotipos de clase I incluidos en la Tabla 13 muestran una relación conservada con los alelos HLA-DRB1. Curiosamente, el haplotipo A*3002-C*0501-B*1801, con frecuencia de 1.28%, en todos los casos estuvo asociado con DRB1*0301 (y DQB1*0201). Este hecho sugiere claramente una asociación muy fuerte para estos alelos.

En contraste, el haplotipo A*0201-B*4402-C*0501 mostró una variabilidad muy alta cuando se analizaron los haplotipos asociados de clase II. Así la especificidad más frecuente en clase II (1301) presente en este haplotipo tan sólo fue encontrado en 5/19 casos. De manera similar DRB1 1301 que es el alelo que más frecuentemente acompaña a A*2601-C*1203-B*3801 tan sólo estaba presente en 4/9 casos.

3.6 Haplotipos HLA-A/B/DRB1

Un total de 6 haplotipos en nuestra muestra, superaron la cifra del 1%, mientras que otros cuatro se encontraban próximos a la misma (0.91%). En la tabla 24 podemos observar las diez asociaciones predominantes en nuestro estudio.

El haplotipo más frecuente ha sido A*2902/B*4403/DRB1*0701 con una frecuencia del 4.93%. Siempre estuvo asociado a C*1601. Sí solo se tienen en

RESULTADOS

cuenta dos dígitos, la frecuencia permanece igual excepto A2/B51/DR13 que ganó una unidad.

Tabla 24. Frecuencias haplotipos HLA-A/B/DRB1

A/B/DRB1	N	FRECUENCIA
2902/4403/0701	27	4.93
0101/0801/0301	16	2.92
3301/1402/0102	12	2.19
0201/0702/1501	9	1.64
3002/1801/0301	7	1.28
0201/5101/1301	6	1.09
0201/4402/1301	5	0.91
0201/0801/0301	5	0.91
0101/5701/0701	5	0.91
0301/0702/1501	5	0.91

Frecuencia: la frecuencia haplotípica se consideró como el cociente entre las veces (N) que se ha encontrado un haplotipo entre el número de haplotipos por 100.

Los haplotipos A/B/DRB1 coinciden con los haplotipos completos A/B/C/DRB1 en la mayoría de los casos. La principal excepción se produce con 0201/5101/1301 cuyo principal haplotipo con todos los alelos, que se asoció a C*1502, tan sólo tuvo una frecuencia del 0.36%, que representa un tercio de si sólo tenemos en cuenta tres alelos.

Los haplotipos A*0101-B*0801-DRB1*0301, A*0201-B*0702-DRB1*1501 y A*0101-B*5701-DRB1*0701 se asociaron en todas las ocasiones al mismo alelo C* excepto en una. En los demás casos la correlación con HLA-C fue absoluta.

Cuando consideramos esta combinación A/B/DRB1 sólo por baja resolución tampoco se observan muchos cambios (tabla 25). Se incluye un

RESULTADOS

nuevo haplotipo A*02/B*44/DRB1*04 con un frecuencia superior al 1% y otros dos A*24/B*35/DRB1*11 y A*11/B*35/DRB1*01 que alcanzan el 0.91%.

Tabla 25. Frecuencias haplotipos HLA-A/B/DRB1 baja resolución

A/B/DRB1*	N	Frecuencia
29/44/07	27	4.93
01/08/03	16	2.92
33/14/01	12	2.19
02/07/15	9	1.64
30/18/03	7	1.28
02/44/04	7	1.28
02/51/13	6	1.09
02/51/11	6	1.09
02/44/13	5	0.91
02/08/03	5	0.91
01/57/07	5	0.91
03/07/15	5	0.91
24/35/11	5	0.91
11/35/01	5	0.91
26/38/13	5	0.91

Frecuencia: la frecuencia haplotípica se consideró como el cociente entre las veces (N) que se ha encontrado un haplotipo entre el número de haplotipos por 100.

Diez de estas asociaciones estaban presentes en las recomendaciones de REDMO de haplotipos frecuentes para búsqueda familiar ampliada. Cinco de los haplotipos más frecuentes de nuestra muestra, sin embargo no estaban presentes en este listado y a la inversa, nueve de REDMO, no son comunes en nuestra muestra.

Discusión

DISCUSIÓN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es un tratamiento bien establecido que puede curar neoplasias hematológicas y algunas enfermedades no malignas, tanto hereditarias como adquiridas (1). En este contexto se produce una interacción de las células inmunocompetentes del receptor con las del donante, produciéndose una serie de fenómenos alorreactivos que condicionan el éxito o fracaso del trasplante.

El de mayor importancia es el reconocimiento aloinmune, que puede dar lugar a EICH, EICL, rechazo del injerto o recaída. Estos fenómenos se correlacionan a su vez con el establecimiento de quimerismo y de tolerancia post-trasplante, todo ello condicionado por factores genéticos y clínicos.

Considerando los factores genéticos, el sistema HLA es el que mayor influencia tiene en estos procesos debido a su elevado polimorfismo y su capacidad antigénica 109. Sin embargo, aún existiendo identidad HLA entre receptor y donante la EICHa sigue presentándose en aproximadamente un 40% de los pacientes (25, 141).

Esto supone una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, limitando por tanto el empleo de este procedimiento (25, 142). Además de las moléculas HLA clásicas intervienen otros polimorfismos genéticos: los denominados antígenos menores de histocompatibilidad (mHLA) (143, 144), citocinas (145), proteínas implicadas en la inmunidad innata (146, 147), enzimas y otros aún no suficientemente estudiados (148, 149).

En este sentido, al compartir un haplotipo idéntico con el receptor en los genes HLA y otros, los resultados son mejores con donantes familiares que con

DISCUSIÓN

donantes no relacionados porque se asegura una mayor compatibilidad incluso en genes no estudiados.

Sin embargo, para poner en marcha de forma rutinaria un plan de búsquedas familiares ampliadas, es necesario un mayor conocimiento de los polimorfismos genéticos en el área de referencia de cada hospital trasplantador, principalmente aquellos de más trascendencia como el HLA. Este hecho nos permitiría establecer la estrategia de selección de donante más adecuada prestando especial interés en las indicaciones de donantes emparentados

1. BÚSQUEDA DONANTE

En el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) disponer de un donante emparentado con identidad HLA es la opción idónea por existir menor riesgo de complicaciones derivadas de la enfermedad y del trasplante, principalmente EICH y recaída. En primer lugar, un hermano, pero si no es posible deberíamos plantearnos como una opción prioritaria la búsqueda de un familiar cercano compatible.

La descripción de los alelos y haplotipos más frecuentes de cada región es fundamental para este propósito, pues permite identificar aquellos pacientes que se beneficiarían de la búsqueda de donantes entre sus familiares inmediatos.

Hasta la fecha no existe ningún estudio que comprenda a la población de Córdoba y Jaén, razón por la que en nuestro centro se emplea el listado de haplotipos frecuentes proporcionados por el REDMO. Éstos están extraídos de

DISCUSIÓN

publicaciones que en la actualidad no incluyen todas las regiones, pudiendo existir, por tanto, ausencias en el listado de haplotipos frecuentes de determinadas zonas. De este modo, aquellos pacientes que tengan estos haplotipos frecuentes no presentes en el listado, no se verían beneficiados por la ampliación de búsqueda de donante compatible entre los familiares de segundo grado.

De cualquier manera, el conocimiento del sistema HLA es fundamental en trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) en todos los casos, ya que la ausencia de identidad entre donante y receptor puede provocar el fallo o rechazo del injerto o bien desencadenar enfermedad injerto contra huésped (EICH). Así, la principal aplicación del HLA desde su descubrimiento, es la selección de donantes adecuados para trasplante tanto de órganos sólidos como hematopoyéticos, creándose con este objetivo los registros de donantes de médula ósea.

Al iniciar una búsqueda, si el paciente presenta un haplotipo frecuente, está recomendado realizar simultáneamente con la búsqueda internacional un estudio ampliado a los familiares de segundo grado (tíos y primos) en la rama correspondiente al progenitor que ha aportado el haplotipo menos frecuente. Debido a la restricción étnica y geográfica de los alelos y haplotipos HLA, es de especial utilidad disponer de la descripción de los haplotipos más frecuentes de cada región, ya que permite determinar qué pacientes pueden beneficiarse de la ampliación del estudio HLA (111).

2. DONANTES EMPARENTADOS

Hasta la fecha no existe ningún estudio que comprenda a la población de Córdoba y Jaén. Para abordar este objetivo, en nuestro centro se emplea el listado de haplotipos frecuentes proporcionados por el REDMO, que como hemos comentado tiene sus inconvenientes. De este modo, aquellos pacientes que tengan estos haplotipos frecuentes ausentes del listado no se verían beneficiados por la ampliación de búsqueda de donante compatible entre los familiares de segundo grado

Los donantes emparentados son preferibles a los donantes no relacionados porque éstos, en principio, podrían compartir tan sólo los loci estudiados mientras que en el resto podrían tener diferencias. Sin embargo, un donante relacionado comparte haplotipos completos con el paciente incluyendo por tanto otros polimorfismos genéticos.

Un haplotipo que es compartido por una familia es completamente idéntico para la región HLA, mientras que los haplotipos extendidos también lo serían con mucha probabilidad. Así, los donantes familiares pueden ser también más compatibles respecto otros factores que rutinariamente no son testados como los antígenos menores de histocompatibilidad. Adicionalmente, también debemos considerar que la motivación de los miembros de la familia para actuar como donantes es por lo general alta, por lo que la disponibilidad de los donantes familiares es mayor que la de los no relacionados.

La búsqueda de donantes no emparentados es un procedimiento que habitualmente se inicia cuando no se ha encontrado ningún miembro idéntico en el núcleo familiar de primer grado. Sin embargo, cuando las indicaciones de una búsqueda familiar están suficientemente establecidas, este procedimiento

DISCUSIÓN

puede ser de gran utilidad a la hora de decidir la mejor estrategia. Por tanto habría que plantearse si iniciar este procedimiento de forma única o paralela a la búsqueda en registros. Para dilucidar este aspecto es necesario, como hemos comentado, un conocimiento pormenorizado de las frecuencias de los alelos y haplotipos HLA localmente, en el área de influencia de cada hospital.

Aunque la probabilidad de encontrar donantes relacionados idénticos depende en gran medida de las frecuencias de los haplotipos implicados debemos también considerar que cuanto mayor sea el tamaño de la familia, más útil será la búsqueda en ella,

En diferentes situaciones clínicas, la supervivencia de los pacientes que recibieron el trasplante de un donante familiar con una sola incompatibilidad, puede ser igual a la de los que recibieron médula ósea de un hermano o de un donante no emparentado con HLA idéntico. Por tanto, como un paciente puede ser trasplantado con algún grado de incompatibilidad, es necesario conocer la probabilidad de que un miembro en la familia extendida pueda ser donante aunque no coincida con el paciente en uno de los loci HLA. Ésta se puede calcular mediante la sustitución de la frecuencia de uno de los haplotipos por la frecuencia del haplotipo correspondiente con un locus menos, dejando de lado el lugar para el que se permite un desajuste (106).

El número total de incompatibilidades HLA ha sido reportado como un factor de riesgo significativo para la supervivencia del paciente. Sin embargo, la tolerabilidad de un determinado HLA diferente depende del estadio de la enfermedad, del acondicionamiento y de los protocolos de inmunosupresión post-injerto. Para los pacientes de bajo riesgo con leucemia mieloide crónica (LMC), la probabilidad de supervivencia global a los 5 años con donante URD

DISCUSIÓN

compatible 08/08 fue significativamente mayor que la observada para 7/8 identidades. Los resultados fueron progresivamente peor con mayores grados de incompatibilidad (130). Por el contrario, una sola diferencia en un alelo HLA no se asoció con una mayor mortalidad para los pacientes con enfermedad maligna más avanzada (133). Para los pacientes con leucemia mieloide aguda en primera remisión completa sometidos HCT (trasplante de células hematopoyéticas) mieloablativo, la mortalidad global entre los trasplantados URD con 10/10 ó 10/09 fue similar (150).

Para los pacientes con baja probabilidad de identificar un donante completamente compatible, dependiendo de la enfermedad subyacente, puede ser preferible un trasplante temprano con un donante incompatible parcialmente a una búsqueda prolongada y que el trasplante se retarde (151).

Una situación especial sería la del trasplante con donante haploidéntico. Este trasplante con células T o CD3/CD19-depleccionadas y acondicionamiento de intensidad reducida podría ser una opción para tratar a niños y adultos que carecen de un donante HLA compatible (135, 136). Este protocolo de trasplante haploidéntico es factible, lo que resulta en una menor mortalidad relacionada con el trasplante, prendimiento más rápido del injerto y reconstitución inmune que los basados en la selección positiva de células CD34 + y acondicionamiento a dosis altas (152).

Encontrar un donante haploidéntico familiar extendido no supone ningún problema. De hecho sólo sería necesario buscarlo cuando los padres no pueden ser aceptados como donantes o no hay hermanos disponibles bien porque es hijo único o los que tiene no comparten ningún haplotipo (La probabilidad de que dos hermanos no compartan ningún haplotipo es del 25%).

DISCUSIÓN

Partiendo además de la base de poder tener un donante haploidéntico asegurado, podemos plantearnos aumentar la compatibilidad en 1, 2, 3 ó 4 alelos más mediante una búsqueda familiar ampliada. Es imperativo que las estimaciones de las frecuencias de haplotipos sean realizadas en la misma población que la familia a la que el paciente pertenece, es decir: al menos, grupo, etnia y lugar (153).

Debido a que muchos pacientes que necesitan un trasplante no tienen un donante no relacionado idéntico disponible 10/10, un donante no coincidente (09/10) podría ser aceptado, en función de factores pretrasplante y directrices locales.

En la muestra de Balas et al si los donantes con compatibilidad 9/10 son considerados como aceptables, un total del 71,5% de los pacientes que recibieron al menos una URD para la tipificación confirmatoria podrían beneficiarse de un donante. Para este grupo, las incompatibilidades se han centrado en el locus HLA-C (23/37, 62%). A falta de donantes 10/10 o 09/10 compatibles, diferentes protocolos pueden seleccionarse como trasplante de sangre del cordón umbilical único (138) o dobles (139).

Han sido también reportados diferentes acondicionamientos (137, 140) y la posibilidad de coinfusión (154), para apoyar la utilización de sangre del cordón umbilical como primera opción en pacientes adultos que carecen de URD disponibles.

3. ALELOS Y HAPLOTIPOS EN NUESTRA MUESTRA.

Este estudio describe por primera vez las frecuencias HLA de alelos y haplotipos en una población de pacientes hematopoyéticos en Córdoba y Jaén

DISCUSIÓN

que puede ayudar a predecir la probabilidad de que otros pacientes consigan un donante emparentado adecuado, así como mejorar las estrategias de búsqueda. Se ha estudiado los alelos, haplotipos completos y otros sin algún locus porque como hemos visto en algunos casos hasta el trasplante haploidéntico puede ser una opción.

Asimismo, establecemos una población control representativa de nuestra región como base para estudios de asociación a enfermedad. El sistema HLA, con función de reconocimiento y presentación de fragmentos de antígenos extraños a subpoblaciones de linfocitos T, juega un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades, como la enfermedad celíaca o la espondilitis anquilosante (119, 120).

De igual manera será empleado para los cálculos de probabilidad en los estudios de filiación familiar realizados en nuestro Hospital. Por otro lado, el análisis de la diversidad de frecuencias alélicas y haplotípicas puede emplearse para inferir relaciones entre poblaciones.

Por estos aspectos nos planteamos como objetivo en primer lugar describir las frecuencias alélicas y haplotípicas de los polimorfismos HLA-A, B, C y DRB1 en nuestra población.

3.1 Alelos comunes HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1,-DPB1

En 184 familias de pacientes en espera de TPH, el paciente y padres, además de todos los miembros disponibles de la familia fueron tipados para HLA-A,-B,-C,-DRB1, DQB1 y DPB1 por alta resolución (4 dígitos). Las familias fueron incluidas en el análisis sólo cuando al menos dos haplotipos de los cuatro pudieron ser asignados por segregación familiar. También se tuvieron en

DISCUSIÓN

cuenta los especificidades de cada locus presentes en cada haplotipo para establecer las frecuencias individuales de cada alelo.

Se consideraron en todos los casos las frecuencias alélicas (cociente entre el número de veces que aparece un alelo por el número total de alelos). En nuestra muestra tan sólo encontramos una mínima representación de las especificidades alélicas reconocidas, mientras que la representación era muy elevada, alcanzando en algunos loci el 100% cuando se consideraron las especificidades antigénicas definidas (24)

En el presente estudio se ha tipado por PCR-SSO y PCR-SSP los HLA de clase I (-A,-B, y -C) y clase II (-DRB1, -DQB1 y -DPB1) con resolución de cuatro dígitos lo que supone el primer estudio de estas características que se realiza en esta zona geográfica.

Una vez seleccionados los haplotipos (HLA-A, -C, -B, -DRB1) se establecieron separadamente las frecuencias de los alelos HLA-A, B, C y DRB1. El estudio de HLA DQB1 y DPB1 tan sólo pudo realizarse con los datos de los haplotipos en que estos loci estaban recogidos.

Como informó Tiercy et al. (118), es esencial conocer la distribución HLA de cada población a nivel de alelos con el fin de definir si un paciente tiene una probabilidad alta o baja para encontrar un donante compatible.

En este sentido, Balas et al compararon dos grupos de pacientes que recibieron o no un donante compatible. Estos hallazgos permitieron definir algunos factores de histocompatibilidad que afectan negativamente para encontrar un donante compatible en esta población (entre ellos pacientes con alelos raros).

DISCUSIÓN

La presencia de al menos uno de estos factores, combinados con el número de posibles donantes compatibles AB-DR (obtenido en el BMDW) podría predecir si un paciente presenta una probabilidad alta o baja para recibir un donante compatible 10/10. La compatibilidad general de los 172 pacientes que recibieron al menos una URD mostró que un donante compatible 10/10 se identificó en el 49,4% de los pacientes. Un 9/10, 8/10 y \leq 7/10 donantes no compatible se recibieron en el 22.1, 16.3 y 12.2% de los pacientes, respectivamente (111).

En el presente trabajo se han descrito de forma pormenorizada todos los alelos raros de cada locus. Haciendo dos diferencias: alelos raros en nuestra población que son aquellos encontrados pero con baja frecuencia ($< 1\%$) y otros alelos raros que no han sido tipados en ninguna ocasión. En este último apartado, según el locus, se encuentran hasta un 95% de las especificidades.

Este perfil está de acuerdo con las conclusiones de estudios en otras poblaciones que indican que los alelos comunes son relativamente escasos en la gran mayoría de los distintos grupos étnicos (155, 156).

Los alelos comunes que se describen en nuestra población ($< 5\%$) habían sido comunicados en su mayoría en caucásicos, como se esperaba por el origen geográfico de las familias estudiadas (157-160).

Más importante aún, la distribución de los alelos predominantes en nuestra muestra estudiada revela grandes semejanzas con los de Europa occidental, Norte de África y USA (véase <http://www.allelefreqencies.net>). En particular, los mismos alelos predominantes (A0101, A0201... en la Tabla 1) o las frecuencias de alelos semejantes (A3001/3002, A6801/6802) también suelen coincidir con las poblaciones reseñadas (157-160). Similares resultados

DISCUSIÓN

se obtuvieron para los alelos de clase II. Todos los alelos frecuentes HLA-DRB1, DQB1 y DPB1 que figuran en el presente estudio son alelos frecuentes en caucásicos (ver <http://www.allelefreqencies.net>).

3.1.1 HLA-A

En nuestra muestra hemos hallado un total de 26 alelos HLA-A (3.38% del total de alelos). A pesar de este relativo bajo número, el polimorfismo total del sistema es muy elevado, teniendo una enorme trascendencia en la búsqueda de donantes.

Los seis alelos más frecuentes (A* 0101*, 0201, *0301, *1101, *2402, *2902), representaban por sí solos el 69,72% de todos los alelos definidos para HLA-A en esta población. Similares porcentajes fueron notificados por estudios realizados en poblaciones próximas o aquellas en que los registros tienen mayor número de donantes (158, 161, 162).

En la mayoría de estas poblaciones el alelo más frecuente fue A*0201 como en la nuestra. Respecto al alelo A*2902, que fue el segundo más presente, parece observarse más frecuentemente en nuestra población que en Portugal, Europa y Estados Unidos.

En contraste, 9 alelos HLA-A de los encontrados mostraron una frecuencia inferior al 1% (*0202, *0222, *0302, *2403, *2608, *3004, *3402, *6601, *7401), por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra. A estos alelos se les deben añadir todos aquellos que no fueron tipados ni una sola vez (96.62% del total de alelos definidos) que también deben ser considerados en este apartado de raros. Estos alelos deben ser considerados de mal pronóstico a la hora de realizar búsquedas. A diferencia de los alelos comunes que siguen una distribución relativamente homogénea en todos los

DISCUSIÓN

estudios, los alelos raros sin tener en cuenta los nunca tipados dependen de cada muestra estudiada. Cada población incluida la nuestra, tiene características diferenciales que dependen de los alelos raros que presenta cada una.

Los alelos predominantes para los diferentes grupos han sido: A*0101, *0201, *0301, *1101, *2301, *2402, *2501, *2601, *2902, *3002, *3101, *3201, *3301, *3402, *6601, *6801, *7401. En todos los casos excepto por una parte A*3001 (36,84) y A*3002 (57,89) y por otra A*6801 (52,17%) y A*6802 (47,83) las diferencias de frecuencia entre el alelo predominante y el resto de alelos del mismo grupo eran muy evidentes. En estadounidenses de origen caucásico las diferencias entre 3001 y 3002 se estrechan todavía más y en muestras de Italia en cambio parece que 3002 es claramente predominante (ver <http://www.allelefrequencies.net>).

3.1.2 HLA-B

Hemos encontrado 47 HLA-B en nuestra población que sólo representan el 3,69%, de las 1272 variantes reconocidas (24). Este es el locus en el cual existe más polimorfismo. Así, a diferencia de HLA-A, cuando se escogen los seis alelos más frecuentes (A* 0702*, 0801, *1801, *4402, *4403, *5101, *1402), no se alcanza el 50% de la población (por casi el 70% en A).

A diferencia de la población española en general, tanto el alelo *4402 como el *1402 tenían una frecuencia superior al 5% en nuestra muestra, siendo uno de los alelos comunes, sin embargo B*3501 no superaba este porcentaje. Este dato podría explicarse porque en nuestra muestra no hay ningún alelo de la especificidad B35 que destaque sobre el resto, dato éste que

DISCUSIÓN

no se observa tan claramente en otras poblaciones (ver <http://www.allelefrequencias.net>).

De mayor interés, resultan los 18 alelos HLA-B que mostraron una frecuencia inferior al 1% (*2702, *2703, *3505, *3906, *3914, *4101, *4102, *4701, *4801, *5108, *5601, *5702, *4002, *4006, *1510, *1516, *1517, *1518), por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra. Estos alelos junto con los que no aparecieron en ninguna ocasión, deben ser considerados como indicación de inicio de búsqueda familiar ampliada. Ya que su presencia sin necesidad de otros factores dificultan la búsqueda de donante

En nuestra muestra y en la mayoría de los estudios realizados, los alelos más representados de cada especificidad suelen coincidir. De nuevo parece ser un factor más decisivo a la hora de discriminar aspectos diferenciales de una población. En nuestra población es relativamente frecuente B*5301, al igual que en poblaciones de España y Francia, siendo muy raro en países europeos más orientales como Alemania (111, 161, 162)

3.1.3 HLA-C

Un total de 25 alelos HLA-C se encuentran en nuestra población que representan aproximadamente el 3,38%, del total de alelos HLA-C que son 475 (24). En nuestra muestra se encuentra representada una pequeña proporción de alelos HLA-C (9.1%) en comparación con otros estudios que incluyen la población española (111).

Las variantes de HLA-C con una frecuencia superior al 5% en nuestra población representan el 73,9% de todas las variantes definidas HLA-C y son Cw * 04:01, *05:01, *0602, *07:01, *0702, *0802, *1203 y *1601. Para el locus

DISCUSIÓN

HLA-C, los alelos raros han sido C*0210, *0302, *0712, *0718, *0808, *1602, *1701 y *1802. Uno de estos alelos raros C*0808, fue tipado en el contexto del haplotipo A*0222, B*4801, C*0808, fue descrito por primera vez en un mestizo colombiano (163).

La presencia en una zona determinada de alelos raros procedentes de otras regiones parece un fenómeno cada vez más común y deberá tenerse en cuenta ya que es más fácil encontrar donante, si éste y el receptor, coinciden en su origen.

Al igual que en los otros loci de clase I, los alelos más comunes son extensivos a otras poblaciones mientras que en los alelos raros existen rasgos que individualizan cada estudio.

3.1.4 HLA-DRB1

Se han notificado del gen HLA-DRB1* 31 alelos de los 597 descritos, (32 Balas et al y 41 Pedron et al). Por tanto están representados sólo el 5,19%. Con los seis alelos DRB1 más prevalentes DRB1 *07:01, *03:01 *15:01, *13:01 *01:01, *11:04, llegamos a una representación del 57,48% de los alelos DRB1 encontrados. El grado de polimorfismo, parece por tanto semejante al encontrado en otras poblaciones relativamente cercanas (111, 162).

Por otra parte, 7 alelos DRB1 (*0406, *0407, *0803, *0810, *1201, *1305 y *1404) mostraron una frecuencia inferior al 1%, por lo que son considerados como alelos DRB1 poco frecuentes (tabla 7). Por grupos de alelos sólo DRB1*12 bajaba del 1% de igual manera que en otros estudios realizados en España (111, <http://www.allelefrequencies.net>).

DISCUSIÓN

En diferentes muestras de Portugal, Francia, Alemania y Estados Unidos, encontramos siempre una frecuencia de este alelo por encima del 1%. En este sentido sí podría ser recomendable realizar prioritariamente la búsqueda en otros registros donde la frecuencia sea mayor, en vez de iniciar una búsqueda ampliada. También podríamos valorar el caso contrario, pacientes de Alemania donde la frecuencia de DR9 y DR10 es inferior al 1% podrían beneficiarse de búsquedas en nuestro registro ya que en nuestra población la frecuencia de ambos era del 1.46% (161, <http://www.allelefreqencies.net>)

En los casos que un alelo ha representado la única especificidad del grupo encontrada (DRB1*0301, *0701, *0901, *1001, *1201, *1601), podríamos considerar no confirmar el tipaje por PCR-SSP que supondría una sobrecarga de trabajo y económica que seguramente podría ser evitada.

Sin embargo en otras tres especificidades (DRB1*0101&*0102, DRB1*1104&1101, DRB1*0401&0402&0403&0404&0405,) se hace inevitable ampliar el tipaje. Con las otras especificidades (DRB1*08, 13...) también sería aconsejable tomar esta medida.

En cuanto a las diferentes especificidades encontradas en cada grupo de alelos destaca DRB1*04 con 7 (*0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407), pero, sin embargo, en nuestra muestra no encontramos ningún DRB1*0408, que sí está presente en otras poblaciones (111).

3.1.5 DQB1

El estudio del locus HLA-DQB1 reveló la presencia de 14 alelos de un total de 79 (24). Por tanto hemos encontrado representación de un 17.72%. En

DISCUSIÓN

este alelo es en el que nos hemos encontrado con una mayor representación del polimorfismo total.

Las asociaciones DRB1-DQB1 son bastante estrictas por lo que un elevado número de parejas donante/receptor compatibles en DRB1 también lo serán en DQB1 (111). Quizás por este motivo, DQB1 no se incluye entre los alelos de obligado tipaje en la selección del donante.

Sin embargo, en nuestra muestra hemos encontrado diferentes alelos DRB1 asociados a diferentes DQB1 y cuatro asociaciones poco comunes. Por tanto debemos considerar que aunque quizás no fuera necesario estudiar DQB1 de forma rutinaria, sí al menos se debería establecer en qué situaciones y alelos DRB1 harían necesario ampliar el tipaje.

También parece evidente que se debería estudiar cuando un paciente tenga más de un posible donante

3.1.6 DPB1

Un total de 15 HLA-DPB1, se han encontrado en nuestra población que representan aproximadamente el 12,20%, de las 123 variantes reconocidas en la nomenclatura para factores del sistema HLA (24). Cuatro alelos (DPB1*0201*, 0301, *0401 y *0402) representan más de $\frac{3}{4}$ de todos los alelos definidos para HLA-DPB1 en esta muestra y entre los dos alelos DPB1*04, es decir, DPB1 *0401 y *0402, representan más de la mitad.

Este locus no es considerado en la mayoría de estudios del sistema HLA y tampoco en los relacionados con el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo no debemos olvidar que de los 6 loci clásicos (A, B, C, DR, DQ y DP) los que se encuentran situados en los extremos del MHC son A y DP (41, 42).

DISCUSIÓN

Por tanto para asegurar que dos hermanos son genotípicamente idénticos, sería necesario tipar DPB1 y descartar sobrecruzamientos. También podría considerarse su tipaje en caso de existir varios posibles donantes con identidad en los otros loci .

3.2 Haplotipos

Un total de 548 haplotipos (HLA-A, -C, -B, -DRB1) fueron analizados tras el tipaje por alta resolución por técnicas de PCR-SSO y PCR-SSP de los diferentes loci. HLA-DQB1 y HLA-DPB1 no se incluyeron en los haplotipos porque no es obligatoria su tipaje para las búsquedas de donantes.

Sin embargo las asociaciones HLA-DRB1-DQB1 sí fueron notificadas separadamente al igual que las de B-C ya que son las asociaciones con mayor desequilibrio de ligamiento conocidas dentro del sistema HLA. También se estudiaron grupos de tres alelos así, los haplotipos de clase I (A-B-C), C-B-DRB1 y A-B-DRB1 y los haplotipos completos A-B-C-DRB1. Las frecuencias haplotípicas se estimaron contando el número de cualquier haplotipo entre el número total de haplotipos.

Se informó anteriormente en estudios con otras poblaciones, que una limitada diversidad de alelos HLA puede dar lugar a una gran diversidad haplotípica (151).

De hecho, un total de 254 haplotipos HLA diferentes de clase I, 294 C-B-DRB1, 89 asociaciones B-C y 401 A-B-C-DRB1 se describen en nuestra muestra. Estos resultados pueden afectar los resultados de las búsquedas y aumentar la dificultad de este proceso

3.2.1 Asociaciones B-C

La mayoría de los alelos del locus B tienen asociaciones predominantes o únicas con sólo un alelo del locus C. Las más habituales han sido previamente reportados en poblaciones caucásicas (111, 162, 164, <http://www.allelefrequencies.net>). Sin embargo otros alelos B están presentes en los haplotipos con más de un alelo C (B*5101, B*1801, B*1501, B*2705, B*4403, etc.).

Este aspecto sin embargo parece algo más complicado ya que una asociación predominante de estos alelos HLA-B con un alelo C a veces sólo se puede identificar cuando un análisis preciso tiene en cuenta otros alelos expresados en el mismo haplotipo. A modo de ejemplo, B *1501 se asocia preferentemente con C*0304 en DRB1*0302, pero con C*0303 en los restantes. El papel que pueden desempeñar estas diferentes asociaciones está todavía sin aclarar.

Debido al elevado número de asociaciones a HLA-C encontradas con B51 también se ha tenido en cuenta los haplotipos completos de los que ha formado parte. En este estudio se presenta un elevado número de haplotipos HLA-A/B/C/DRB1/ dentro del serotipo B51. El alelo HLA-B51 mostraba en nuestra muestra una frecuencia del 7.30% y formaba parte de 9 asociaciones B-C y de 33 haplotipos (32 con B*5101 y 1 con B*5108) diferentes sobre un total de 548 haplotipos lo que representa el 6.02% del total de haplotipos. Tan sólo encontramos 2 alelos B*51 diferentes, con una frecuencia relativa de B*5101 del 96%.

La diversidad de los haplotipos B51 no parece depender de la variabilidad del locus B, sino de la extrema diversidad de las asociaciones B-C,

DISCUSIÓN

frente a otros serotipos como el B35 ó B39. Junto con el HLA-B*1501 (165), B*5101 es de los alelos HLA-B el que muestra la mayor diversidad de asociaciones con HLA-C con 9 alelos diferentes reportados en nuestro grupo de estudio.

Evidentemente, la extrema diversidad de las asociaciones haplotípicas de B51 lo convierten en una herramienta de gran interés para los estudios de genética de poblaciones.

La mayoría de las asociaciones B-C son dependientes de los haplotipos A-B-DRB1-DRB3 obtenidos por tipaje con resolución de cuatro dígitos. Un estimable número de haplotipos mostraron fuerte vinculación con los alelos C, así A2-B51-Cw*1402- DRB1*0801, A11-B51-C*1502-DRB1*1501, o A31-B51-Cw*1502-DRX.

Resulta de interés que el haplotipo más frecuente A*02-B*51-DRB1*11, que corresponde al haplotipo ancestral B51.1, reveló una alta variabilidad en las asociaciones preferenciales de HLA-C con cuatro alelos involucrados (C*1402, 1502, 1601 y 1602). Sin embargo, cuando se han buscado donantes en BMDW para dos pacientes con los fenotipos: A1-B8-DR3/A2-B51-DRB1*1101 y otro A3-B7-DR15/A2-B51-DRB1*1101, la mayor parte de los sujetos encontrados eran C*02, seguido de C*14 y C*15. Estas diferencias podrían ser relacionadas con diferente etnia o localización geográfica de los individuos testados (164).

El punto de recombinación entre los loci HLA-B y C, podría haber sido más eficiente en haplotipos con B51 en comparación con otros haplotipos ancestrales tales como A*0201-B*4402-Cw*0501-DRB1*0401(166).

DISCUSIÓN

Mediante el análisis de 75 búsquedas de donantes no relacionados para pacientes B51 positivos y teniendo en cuenta los 140 genotipos y los 145 presuntas asociaciones haplotípicas en las que estaba involucrado B51, Bettens et al fueron capaces de discriminar 21 haplotipos extendidos ABCDR con alta y 30 haplotipos con baja probabilidad de coincidencia en HLA-C (164).

El perfil de distribución de alelos HLA-C en pacientes con una alta probabilidad (50-100%) de encontrar un donante HLA-C compatible era claramente diferente de la de los pacientes en los que se observó una probabilidad del 75-100% de que HLA-C sea incompatible. En este último grupo, el perfil era más heterogéneo con C*1502 representado en sólo el 17,6% de los pacientes frente al 61,5% de los pacientes con una alta probabilidad de compatibilidad HLA-C (164).

En el grupo de alta probabilidad, cuatro alelos (Cw*0102, *0202, *1402, y *1502) representaron el 96% de los alelos C encontrados frente a un 50% en el grupo de baja probabilidad ($P < 0,00001$). Curiosamente, todas las búsquedas realizadas por estos autores para los pacientes con el haplotipo A3-B51-DRx no tuvieron éxito en términos de compatibilidad HLA-C (164).

Sería necesario un análisis más detallado de la medida en que los diferentes orígenes de los pacientes y los donantes influyen en las asociaciones B51-C, y por lo tanto en la posibilidad de encontrar un donante idéntico.

En vista de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, deberíamos considerar que hay que tener también en cuenta que la posible incompatibilidad HLA-C depende en gran medida del segundo haplotipo presentado por el

DISCUSIÓN

paciente debido a las diferentes posibles combinaciones haplotípicas ABDRB1(167).

De forma similar, parece quedar documentado por Bettens et al al realizar una búsqueda para un paciente con el genotipo siguiente: A1-B63-Cw*0701-DRB1*1302/A31-B51-Cw1502-DRB1*1101. A pesar del potente desequilibrio de ligamiento en A31-B51-Cw*1502, cuatro de los cinco posibles donantes presentaron Cw*02 y Cw*14, justo como cabría esperar si el haplotipo B51 del donante fuera A1-B51-DR11 o A1- B51-DR13 en lugar de A31-B51-DR11 (164).

En nuestro trabajo se han descrito diferentes desequilibrios de ligamiento HLA-B-C. Entre éstos hemos observado que algunos alelos B se asociaban a uno o muy pocos alelos HLA-C mientras que otros como: B*5101, *1801, *1501, *4403 y *5501 principalmente, podían ser encontrados en diferentes uniones B-C. En este sentido se ha demostrado que B*5101, B*1801, o B*1501 poseen un desequilibrio de unión inferior en comparación con haplotipos en los que se encuentren B*0801, B*0702, o B* 1302 (168).

Otro estudio relacionado, informó de un estado de mayor compatibilidad paciente/donante en situaciones con haplotipos comunes (169).

Se puede predecir por tanto, que los haplotipos que presentan una mayor diversidad de las asociaciones B-C, como los que expresan B51, B15, B44, B55 ó B18 pueden presentar una mayor variabilidad genética en los loci ligados a MHC no HLA que puede dar lugar a una mayor tasa de disparidad por algún determinante del trasplante aún desconocido

3.2.2 Asociaciones DRB1-DQB1

De forma similar a lo comentado para las asociaciones B-C ocurre con las de DRB1 con DQB1. Una vez más, las asociaciones DRB1/DQB1 más comunes que hemos encontrado son bien conocidas en las poblaciones caucásicas (111, <http://www.allelefrequencias.net>).

Sin embargo, diferentes alelos DRB1 no presentan una asociación tan estrecha, entre ellos: *1302, *0701, *08 y *04. Además debemos considerar asociaciones raras por posibles sobrecruzamientos a este nivel. Al menos 4 asociaciones no esperadas se han encontrado en nuestra muestra

Aquí también debemos analizar otros locus si queremos concretar las asociaciones de forma más específica. En este sentido, podríamos afirmar que DRB1*0701 se asocia con DQB1* 0303 en las personas con el alelo B*5701, como también ha sido observado por Pedron et al, pero con DQB1*0202 en los individuos restantes(162). Además, DRB1*0401 se asociaría sobre todo con DQB1*0302 en B*1501 y las diferentes especificidades B*35, pero con DQB1*0301 en los individuos restantes (111).

3.2.3 Asociaciones 3 alelos

Las frecuencias de las asociaciones de tres alelos resultan de un gran interés ante la perspectiva de tener que buscar un donante con alguna incompatibilidad cuando las posibilidades de encontrar alguno totalmente idéntico se han difuminado.

Por tanto además de aquellas asociaciones siguiendo el orden de los loci HLA en el genoma (A/B/C), B/C/DRB1) también se ha estudiado AB/DRB1 por su interés práctico ante una búsqueda.

3.2.3.1 Haplotipos HLA clase I (A/B/C)

En el estudio de Cao et al, aparece una lista de 31 haplotipos con tres alelos (HLA-A/B/C) estudiados que presentaban una frecuencia de > 0.06 en los caucásicos que residen en América del Norte (158). La comparación entre los resultados de este trabajo y el nuestro pone de manifiesto que la mayoría de los haplotipos aparecen como haplotipos frecuentes en ambos estudios.

Entre las excepciones cabe destacar A*3301/B*1402/C*0802, que está presente en diversas poblaciones europeas (160). A partir de estas comparaciones, se puede concluir que a pesar de algunas variaciones conocidas en las frecuencias de haplotipos entre las dos poblaciones, existe cierta similitud entre las mismas.

3.2.3.2 Asociaciones B/CDRB1

En nuestra muestra, hemos encontrado 294 haplotipos diferentes B/C/DRB1. Los haplotipos B-C-DRB1 más frecuentemente encontrados fueron: B*4403-C*1601-DRB1*0701 (en consonancia con las asociaciones B-C y los haplotipos A-B-C-DRB1 más frecuentes) B*0801-C*0701-DRB1*0301, B*0702-C*0702-DRB1*1501, B*1402-C*0802-DRB1*0102 y B*1801-C*0501-DRB1*0301. Sólo cinco haplotipos tenían una frecuencia superior al 2% y 12 superior al 1%.

Las asociaciones B-C nos mostraban en la mayoría de los casos una relación estrecha entre ambos loci. Al incorporar otro locus (DRB1) algo más distante dentro del mapa genético del HLA sigue manteniendo en algunos casos esta relación pero en otros hemos encontrado asociaciones a múltiples DRB1. Entre éstas, las más llamativas son cuatro haplotipos B-C (B*0702-

DISCUSIÓN

C*0702, B*4402-C*0501, B*4901-C*0701 y B*3501-C*0401) que se asocian a diez o más alelos DRB1 diferentes, las siete asociaciones B*0705-C*1505 muestran siete alelos DRB1 diferentes y sobre todo que el alelo B*5101 formaba parte de veintiocho combinaciones B-C-DRB1 distintas.

Los haplotipos A/B/C/DRB1 son complementarios en parte de las asociaciones B/C/DRB1 de las que derivan. Sin embargo hay algunas consideraciones de interés: el haplotipo B*0702-C*0702-DRB1*1501 y su asociación con alta frecuencia a tres diferentes alelos del locus A (A*0201, A*0301 y A*2402) explica la alta probabilidad de encontrar B*0702-C*0702-DRB1*1501 y en cambio esta combinación no es tan frecuente cuando buscamos haplotipos completos. Sería casi cuatro veces más probable encontrar un sujeto B*0702-C*0702-DRB1*1501 que uno con el tipaje A*0201-B*0702-C*0702-DRB1*1501.

En otros casos parece existir más fidelidad al locus A, como en el caso de B*4403-C*1601-DRB1*0701, que en un 71.05 de los casos son A*2902

3.2.3.3 Asociaciones A-B-DRB1

Se observaron ocho haplotipos (A-B-DRB1) frecuentes (>1%) y otros seis con 0.91%. Al examinar la relación genética entre Córdoba y Jaén y las diferentes poblaciones de la Península Ibérica, se observa que las poblaciones aisladas (Cabuérnigo, Chuetas, Pasiegos y Valle de Arrieta) se muestran claramente separadas del resto de poblaciones (170, 171).

Por el contrario, éstas se encuentran estrechamente relacionadas entre sí, formando un mismo grupo, dentro del cual, Córdoba y Jaén se situaría entre poblaciones portuguesas y otras españolas.

DISCUSIÓN

Los haplotipos frecuentes hallados en nuestra población se han descrito previamente en otras poblaciones de la Península Ibérica. Varios de estos haplotipos asimismo son comunes en otras poblaciones europeas, mediterráneas y/o del norte de África.

En resumen, Córdoba y Jaén parecen exhibir un origen común con otras poblaciones de la Península Ibérica, en la que se observan componentes europeos, mediterráneos y norteafricanos, hechos que concuerdan con la historia y el componente genético de la población.

Un número amplio de nuestros haplotipos, estaban incluidos dentro de los 320 haplotipos más frecuentes que figuran en el reciente estudio de Muller et al, realizado con población alemana (161). Sin embargo, sólo los datos de A/B/DR están disponibles en los haplotipos del estudio de Muller et al, lo que limita la comparación exacta entre los dos estudios. Estas similitudes probablemente se basan en una estrecha relación genética entre las poblaciones de países de Europa Occidental.

Así, en nuestra población encontramos haplotipos descritos principalmente en el oeste Europeo: Así tenemos A*29,B*44,DRB1*07 (4.93% en Córdoba y Jaén) que es el que hemos encontrado más frecuentemente, generalmente también lo es en la Península Ibérica y otras poblaciones europeas; así otros grupos de población española (2,2 a 6,7%), Portugal (1 a 3,8%), Irlanda del Norte (2,1%), Francia (1,96%), País de Gales (1,5%) e Italia (1.3-1,5%). Además, también se encuentra en americanos de ascendencia europea, como Cuba (3,8%), Brasil (1,4-1,6%) y México (1,1%) (172-174).

DISCUSIÓN

Del mismo modo, otros haplotipos comunes han sido descritos previamente en la Península Ibérica. Los haplotipos A*33, B*14, DRB1*01 (2.19%) de origen Mediterráneo y A*02, B*07, DRB1*15 (1.64%) del Norte de África y Europa Occidental, y también son comunes en otros españoles (1.1 a 3.8%) y Portugal (1-4,3%) (172, 175-178).

El haplotipo A*02, B *44, DRB1*04 (1.28) también está presente en las poblaciones ibéricas y europeas, como Alemania (1,4%), País de Gales (5%), Irlanda del Norte (4,1%), Irlanda (3 - 4%), Portugal (1,1 a 3,1%), resto de España (1,1-4%) e Italia (0,9%) (161, 172, 173).

Sin embargo, este haplotipo, cuando es considerado en el contexto de los cuatro alelos A/B/C/DRB1 definidos por alta resolución, tiene una frecuencia baja. Por tanto en casos de necesitar una alta compatibilidad no debería ser considerado en nuestra población.

A pesar de que el origen de este haplotipo se ha definido como de Europa occidental, está también presente en algunas poblaciones del Mediterráneo como Túnez (1,8%), mientras que en Argelia se presenta con una frecuencia de 0,9% (172), lo que sugiere un posible origen conjunto Mediterráneo y de Europa Occidental.

El descrito previamente como un antiguo haplotipo de origen Paneuropeo (origen indoeuropeo-celta), A*01, B*08, DRB1*03, es el segundo más común de nuestra muestra (2,92%) y está también presente en los europeos del norte, Europa central y oriental (172, 173).

Se encontró con muy alta frecuencia en Gales (10%), Irlanda del Norte (9% Finlandia (6,3%) y Alemania (6,2%) y algo menor en el resto de España (1,1-6,1%), Hungría (3,1- 5,9%), Macedonia (4,9%), Croacia (4,3%), Suiza

DISCUSIÓN

(4,3%), Francia (2,5%), Grecia (1.1 a 3.3%), Italia (1-3,1%), Portugal (1,5 a 3%) y Georgia (1,3%). También se encuentra en los americanos de ascendencia europea, tales como EE.UU. (4,9%), Cuba (3,2%) y Brasil (1,6 a 2,5%) (161, 172, 179, 180).

Otros dos haplotipos presentes en nuestra población se pueden considerar de origen en el norte de África: A*30, B*18, DRB1*03 (1,28%) es poco frecuente en otras poblaciones europeas, excepto en los sardos (10,2%), donde aparece con una frecuencia muy alta, pero es común en la Península Ibérica: resto de España (3,1 a 3,6%), Portugal (2,6 a 4,1%), y está presente en las poblaciones del norte de África, tales como Túnez (2%), Argelia (1,5%) y Marruecos (1,5%), así como en otras poblaciones de ascendencia europea como Cabo Verde (1,6-2,4%) (172).

El otro es el haplotipo A*03, B* 07, DRB1*15 (0.91%), que está presente en las poblaciones europeas y del norte de África: Argelia (1,5%), Croacia (2,4%), Francia (1,66%), Alemania (3,4%), Irlanda del Norte (4,9%), Italia (1,1-1,5%), Portugal (1,3 a 1.8%), Rusia (4,9%), España (1,4-6,5%), Suiza (4,5%), Túnez (1,8%), País de Gales (3%) y EE.UU. (1,9%) (161, 172, 173, 178, 179).

El haplotipo A*02, B*51, DRB1*11 frecuente en Portugal y algunas poblaciones españolas (marcos), no suele encontrarse en otros estudios realizados en España. Este haplotipo estuvo presente en nuestra población con una frecuencia superior al 1%.

También resulta de interés el haplotipo A*02, B*44, DRB1*07 que es raro en nuestra muestra (0.55%), mientras que sí es frecuente en Portugal (1,8-5,4%), resto de España (1.5 a 3.5%), Suiza (2,9%), Túnez (2,4 a 3%), País de Gales (1,8%), Italia (1,5%) y Georgia (1,3%) (172, 173).

DISCUSIÓN

También hemos encontrado otros haplotipos sin un origen claro asignado. A*23, B*44, DRB1*07 (0.36%) se propone como Mediterráneo europeo ya que está presente en Hungría (1,8%), Palestina (1,2%), Polonia (1%) y Portugal (1,3%) (172, 173). A*02, B*51, DRB1*11 (1,10%) está presente en Bulgaria (2,7%), Croacia (1,2%), Georgia (1,3%), Grecia (1,6 a 2,5%), Italia (1,2 a 2,7%), Turquía, Portugal (1 a 3,3%), (5,5%) (172, 173). A la luz de su presencia en estas poblaciones, podría ser asumido como origen mediterráneo-oriental europeo.

Aunque no existe un origen atribuido a los haplotipos A*02, B*44, DRB1*13 (0.91%), presente en Georgia (3.1%), Italia (1,1%), Marruecos (2,5%) y Portugal (1 a 1.6 %) y EE.UU. (1,8%) (172, 173, 179) y A*02, B*18, DRB1*03 (1,2%) presente en Italia (1-2,2%) y Portugal (2-4,1%), (172, 173) se propone un posible origen mediterráneo para ambos haplotipos.

Los haplotipos A*24, B*35, DRB1*11 (0.91%) de origen europeo y A*26, B*38, DRB1*13 (origen ibérico atribuido), con una frecuencia de 0,91% en nuestra población, se describe como frecuente en algunos estudios españoles (1.1-2.6%) y Portugal (1-1,5%) (172, 173, 175, 177, 178). Por último el haplotipo A*02, B*51, DRB1*04 (origen sugerido portugués) (0,36%) sólo es común en Portugal (1-1,2%) (172, 173).

En conclusión, y con estas premisas, la población de Córdoba y Jaén parece tener una base genética sur-oeste Europea, Mediterránea y Norteafricana y podría tener un mismo origen común con otras poblaciones Ibéricas y del norte de África como ha sido sugerido con muestras de diferentes localizaciones de España y norte de África por Arnáiz-Villena et al, debido

DISCUSIÓN

especialmente al importante flujo de genes de las poblaciones Paleo-Norte africanas a Iberia (181).

Sin embargo, los pequeños tamaños relativos de la muestra en algunos estudios han hecho complicadas las comparaciones.

3.2.4 Haplotipos A-B-C-DRB1

La distribución de estos haplotipos de Córdoba y Jaén también muestra coincidencias con la de otras poblaciones de la Península Ibérica y parece concordar con el contexto histórico y el componente genético de nuestra muestra.

En este trabajo se describen gran parte de los haplotipos que ya estaban previamente descritos en otras poblaciones españolas e incluidos por tanto en el listado de haplotipos frecuentes del REDMO.

La comparación con la clasificación de haplotipos descritos en Balas y Pedron, que representan respectivamente a una población de España y Francia y que en ambos casos alcanza una resolución de cuatro dígitos, nos muestran que los cinco haplotipos más frecuentes presentes en nuestra muestra también estaban presentes en las dos ciudades (111, 162).

Sin embargo existen más coincidencias con el estudio de Balas. Así, esta población y la nuestra coinciden en el haplotipo más frecuente A*2902-C*1601-B*4403-DRB1*0701 y los otros cuatro haplotipos son frecuentes en ambos estudios aunque el número de orden y las frecuencias no coincidan.

En la muestra de Pedron et al, el haplotipo notificado en primer lugar resultó ser A*0101-C*0701-B*0801-DRB1*0301 y de los cinco haplotipos más

DISCUSIÓN

frecuentes de nuestra población sólo 3 de ellos estaban considerados entre los 15 más representados en la suya.

Nuestras asociaciones: A*3301-C*0802-B*1402-DRB1*0102 y A*3002-C*0501-B*1801-DRB1*0301 situados en el lugar 3 y 4 respectivamente están situados por debajo del 15 en la población francesa.

Nuestros 2 haplotipos más frecuentes A*2902-C*1601-B*4403-DRB1*0701 y A*0101-C*0701-B*0801-DRB1*0301 son frecuentes para los registros de haplotipos europeos y norteamericanos. También A*0301-C*0702-B*0702-DRB1*1501 entre los 10 más frecuentes en nuestra población (4º más frecuente en España) está muy representado en los registros europeos y norteamericanos (118, 161, 162, 182).

Por el contrario, algunos otros haplotipos con una importante presencia en nuestra muestra tenían una distribución restringida en la mayoría de los registros de donantes. Esto ocurre con el cuarto haplotipo más frecuente en nuestra muestra (segundo en españoles): A*3002-C*0501-B*1801-DRB1*0301 que sólo aparece entre los 20 haplotipos más frecuentes para los registros de Italia, Francia y Portugal (www.bmdw.org).

En consecuencia, la mitad de los pacientes con el haplotipo A*3002-C*0501-B*1801-DRB1*0301 fueron trasplantados con donantes no relacionados españoles. Este hecho pone de relieve la importancia de los estudios locales de frecuencias HLA que cubren diferentes fondos genéticos.

Una distribución más restringida se logró con los haplotipos A*0101-C*1601-B*4403-DRB1*0701 y A*2501-C*1203-B*1801-DRB1*1501 notificados por Balas et al, que no fueron descritas como asociaciones frecuentes en nuestra muestra ni en ninguno de los registros principales de donantes. Sin

DISCUSIÓN

embargo, estos dos haplotipos han sido identificados en muestras procedentes de Portugal, Irlanda, Polonia y Rusia (182).

En general a medida que descendemos en el número de orden de los haplotipos, más diferencias se observan con otras poblaciones. Así de los situados entre el puesto 13 y 36 de la población estudiada por Pedron et al, sólo ocho (8/24) fueron descritos entre los 59 que al menos se encontraron 2 veces en nuestra muestra.

Algo parecido ocurre cuando comparamos estos datos con Balas et al y descartamos de esta comparación los haplotipos más frecuentes anteriormente comentados, aunque no se observa tanta desviación como en Pedron et al. Hay que resaltar que en la población de España tan sólo aparecen reflejados datos de 10 asociaciones.

Los resultados presentados en el presente trabajo muestran que las frecuencias alélicas y de los haplotipos HLA de Córdoba y Jaén están relacionadas con las observadas en otras poblaciones de la península ibérica. También muestra cierta similitud con estudios realizados en países próximos. Sin embargo también se conoce que pueden existir marcadas diferencias entre dos poblaciones distintas (183, 184), y que en algunas ocasiones podemos encontrar asociaciones entre diferentes especificidades de loci distintos, incluso encontrar haplotipos con una alta frecuencia. En este sentido hemos encontrado 59 haplotipos en nuestra muestra que al menos se han encontrado en dos ocasiones. Estos haplotipos muestran nuestro parecido con otras poblaciones de España, Francia, Portugal, norte de África y Norteamérica (caucasianos) (182).

DISCUSIÓN

Sin embargo, ciertos haplotipos nos permitirían diferenciar nuestra población de las anteriormente mencionadas. Así, deberíamos tener en cuenta que existe un rango de haplotipos (descartando los más frecuentes) con significativa presencia en nuestra población o en otras estudiadas que representarían rasgos diferenciales específicos de cada localidad. Por tanto se podría definir un amplio número de haplotipos relativamente frecuentes en cada área geográfica, no representados en otros lugares y que dificultarían de manera importante la búsqueda en registros internacionales. Estas asociaciones específicas serían una indicación de búsqueda familiar ampliada al tratarse de haplotipos sólo frecuentes localmente

Podemos concluir, por tanto, que éste es el primer informe sobre las frecuencias de los alelos HLA y haplotipos en Córdoba y Jaén y que representa uno de los pocos por el tamaño de la muestra y la resolución hasta la fecha, en los estudios de la Península Ibérica.

Córdoba y Jaén reflejan un origen común con otras poblaciones ibéricas, de Europa, Mediterráneo y norte de África de acuerdo con los datos históricos conocidos

Estos datos de los haplotipos comunes encontrados pueden ser utilizados para estimar la probabilidad de encontrar un donante compatible y para establecer las estrategias de búsqueda de donantes de nuestro hospital. Datos básicos sobre las frecuencias de alelos y haplotipos han sido utilizados para los estudios antropológicos, estudios de asociación a enfermedades y el trasplante. En el TPH, los datos de HLA de la población pueden ser útiles para estimar la probabilidad de encontrar donantes HLA compatibles en el inicio de la búsqueda y para establecer las estrategias de búsqueda de un donante.

DISCUSIÓN

Habitualmente en las etapas iniciales de la búsqueda, el primer paso es consultar el registro de donantes de médula ósea en todo el mundo, que da información en la mayoría de los casos sobre el número de donantes A-B-DRB1-compatibles disponibles ya que no siempre tenemos los datos de todos los alelos disponibles.

En general, la posibilidad de encontrar un donante totalmente compatible (A, B, C, DRB1) a nivel alélico, se correlaciona con el número de donantes del registro A/B/DRB1 idénticos. Sin embargo, la existencia de muchos donantes potenciales no garantiza que se identifique un donante compatible.

Sobre la base de diferentes estudios realizados, cabe esperar una búsqueda con éxito para aquellos pacientes que presentan dos haplotipos A/B/C/DRB1 comunes. En cambio, en una alta proporción de individuos con un haplotipo común y otro raro es probable que no encuentren un donante compatible. Los pacientes con asociaciones A/B/C/DRB1 raras suelen pertenecer a grupos étnicos minoritarios y se hace necesario el estudio de las frecuencias de alelos y haplotipos en sus poblaciones (185-187). Estos trabajos son útiles para la selección de donantes en pacientes que difícilmente lo encontrarán en los registros internacionales haciéndose necesario buscarlo entre los familiares.

Los datos sobre las frecuencias de alelos y haplotipos son también de importancia crucial para establecer estrategias de búsqueda de donantes en situaciones clínicas que hacen aceptable una incompatibilidad entre el paciente y el donante (188). Así en un paciente que expresa un alelo raro dentro de un haplotipo común, se recomienda la selección de donantes con esa incompatibilidad.

DISCUSIÓN

Por tanto, los datos que se presentan aquí, de los alelos y haplotipos comunes puede ayudar a predecir la probabilidad de conseguir un donante adecuado y también sugieren estrategias para mejorar el éxito en la búsqueda. La precisión de estas predicciones se limitaría a los pacientes con estrecha relación genética con una población estudiada.

Conclusiones

1- Los alelos HLA frecuentes (>5%) que indican una búsqueda familiar ampliada son: HLA-A*01:01, *02:01, *03:01, *11:01, *24:02, *29:02, HLA-B*07:02, 08:01, *18:01, *44:02, *44:03, *51:01, *14:02, HLA-C*04:01, *05:01, *06:02, *07:01, *07:02, *08:02, *12:03 y *16:01 y HLA-DRB1*07:01, *03:01 *15:01, *13:01 *01:01, *11:04.

2- Los haplotipos HLA frecuentes (>1%) que indican una búsqueda familiar ampliada son: A*29:02-B*44:03-C*16:01-DRB1*07:01, A*01:01-C*07:01-B*08:01-DRB1*03:01, A*33:01-C*08:02-B*14:02-DRB1*01:02, A*30:02-C*05:01-B*18:01-DRB1*03:01 y A*02:01-C*07:02-B*07:02-DRB1*15:01.

3- En las situaciones clínicas en que se permiten donantes con una incompatibilidad, las asociaciones indicadas de búsqueda (>2%) fueron: A*29:02-C*16:01-B*44:03, A*01:01-C*07:01-B*08:01, A*02:01-C*05:01-*44:02, A*33:01-C*08:02-B*14:02, A*03:01-C*07:02-B*07:02, B*44:03-C*07:01-DRB1*07:01, B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02, B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01, B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01, B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01, A*29:02-B**44:03-DRB1*07:01, A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02.

4- En nuestra muestra hemos encontrado sólo una pequeña representación de los alelos HLA reconocidos, pero su combinación resulta en un amplio polimorfismo final.

5- Los alelos poco frecuentes y que no indican una búsqueda familiar ampliada representan el 97.79% en HLA-A, el 97.72% en B, 96,42% en C y 95.98% en DRB1 entre las especificidades reconocidas para cada uno.

6- Los alelos HLA-B con múltiples asociaciones a especificidades HLA-C son B*51:01, B*15:01, B*18:01 y B*44:03 representando por sí mismos un factor de mal pronóstico en una búsqueda.

7- En caso de más de un donante idéntico se recomienda el tipaje de HLA-DQB1 sobre todo si el paciente tiene las especificidades DRB1*07:01, *04:XX, *08:XX, *13:02, *15:01 que son las que se han encontrado más frecuentemente en asociaciones DQB1 raras.

8- El estudio realizado representa un grupo control a nivel de tipaje HLA alta resolución para establecer las indicaciones de búsqueda familiar ampliada, en estudios de asociación HLA-enfermedad y de filiación de paternidad en nuestra área geográfica.

9- Las frecuencias HLA alélicas y haplotípicas en la muestra referencia de Córdoba y Jaén, se sitúan en consonancia con las de otras regiones de la Península Ibérica, Europa Occidental, Norte de África y América (caucasianos), con peculiaridades propias.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1813-1826.
2. Ljungman P, Bregni M, Brune M et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Feb;45(2):219-34
3. Saba N, Abraham R, Keating A. Overview of autologous stem cell transplantation. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2000;36:27-48.
4. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone marrow transplantation (first of two parts). *N.Engl.J.Med.* 1975;292:832-843.
5. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone marrow transplantation (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 1975;292:895-902.
6. de Lima M, Champlin R. Unrelated donor hematopoietic transplantation. *Rev.Clin.Exp.Hematol.* 2001;5:100-134.
7. Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu.Rev.Med.* 2003;54:491-512.
- 8- Afzali, B., Lechler, R. I. and Hernandez-Fuentes, M. P. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens:* 2007; 69: 545–556.
- 9- Bleakley M, Riddell SR. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol Cell Biol.* 2011 Mar;89(3):396-407.

BIBLIOGRAFÍA

- 10- Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982;155:31–41.
- 11 Dalchau R, Fangmann J, Fabre JW. Allorecognition of isolated, denatured chains of class I and class II major histocompatibility complex molecules. Evidence for an important role for indirect allorecognition in transplantation. *Eur J Immunol* 1992; 22: 669–77.
- 12- Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173: 4828–37
- 13- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285: 412–5.
- 14- Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, Serody JS. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3268-76.
- 15- Friedman TM, Jones SC, Statton D, Murphy GF, Korngold R. Evolution of responding CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during the development of graft-versus-host disease directed to minor histocompatibility antigens. *Biol Blood Marrow Transplant*; 2004;10:224–35.
- 16- Hirayama M, Azuma E. Major and minor histocompatibility antigens to NIMA: Prediction of a tolerogenic NIMA effect. *Chimerism*. 2011 Jan;2(1):23-24.
- 17- Lee SJ. Have we made progress in the management of chronic graft-vs-host disease? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Dec;23(4):529-35.
- 18- Smith DM, Agura E, Netto G et al. Liver transplant-associated graft-versus-host disease. *Transplantation* 2003; 75: 118–26.

BIBLIOGRAFÍA

- 19- Mazariegos GV, Bu-Elmagd K, Jaffe R et al. Graft versus host disease in intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1459–65.
- 20- Smith DM, Agura ED, Ausloos K, Ring WS, Domiati-Saad R, Klintmalm GB. Graft-vs-host disease as a complication of lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1175–7.
- 21- Weinstein A, Dexter D, KuKuruga DL, Philosophe B, Hess J, Klassen D. Acute graft-versus-host disease in pancreas transplantation: a comparison of two case presentations and a review of the literature. *Transplantation* 2006; 82: 127–31.
- 22- Smith DM, Agura ED, Levy MF, Melton LB, Domiati-Saad R, Klintmalm G. Graft vs host disease following kidney transplantation using an '0 HLA antigen mismatched' donor. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2656–9.
23. Robinson J, Waller MJ, Fail SC et al. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D1013-D1017.
24. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Mayr WR, Maiers M, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* 2010 75:291-455
25. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
26. Edinger M, Powrie F, Chakraverty R. Regulatory mechanisms in graft-versus host responses. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2009;15:2-6.

BIBLIOGRAFÍA

- 27- Trento C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. *Swiss Med Wkly*. 2010 Nov 26;140-5
- 28- Semple K, Yu Y, Wang D, Anasetti C, Yu XZ. Efficient and selective prevention of GVHD by antigen-specific induced Tregs via linked-suppression in mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar; 17(3):309-18.
- 29- Jerud ES, Bricard G, Porcelli SA. CD1d- Restricted Natural Killer T Cells: Roles in Tumor Immunosurveillance and Tolerance. *Transfus Med Hemother* 2006;33:18-36.
- 30- Flajnik MF, Ohta Y, Namikawa-Yamada C, Nonaka M. Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunol Rev*: 1999; 167: 59-67.
- 31- Zinkernagel RM. Associations between major histocompatibility antigens and susceptibility to disease. *Annu Rev Micro*: 1979; 33: 201-213.
- 32- Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol*: 1979; 27: 51-177.
- 33- Baeten D, De Keyser F. The histopathology of spondyloarthritis. *Curr Mol Med*. 2004;4(1):1-12
- 34- Dausset J, Nenna A. Presence d'une leuco-agglutinine dans le serum d'un cas d'agranulocytose chronique. *Soc Biol*: 1952; 146: 1539.
- 35- Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*: 1958; 156-66.
- 36- Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest*: 1958; 37: 1756-1763.

BIBLIOGRAFÍA

- 37- van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*: 1958;181: 1735.
- 38- Klein J. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. J. Willey and Sons, New York. 1986
- 39- Janeway CA, Travers P, Walport, Shlomchik. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science, New York. 2005
- 40- Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today*: 1993; 14: 349-352.
- 41- Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*: 2003; 425: 805-811.
- 42- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*: 2004; 5: 889-899.
- 43- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*: 1987; 329: 506-512.
- 44- Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology*. 2011 Jun;133(2):143-164. doi
- 45 Axelsson-Robertson R, Ahmed RK, Weichold FF, Ehlers MM, Kock MM, Sizemore D, Sadoff J, Maeurer M. Human leukocyte antigens A*3001 and A*3002 show distinct peptide-binding patterns of the Mycobacterium tuberculosis protein TB10.4: consequences for immune recognition. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Jan;18(1):125-34.

BIBLIOGRAFÍA

- 46- Beck S, Trowsdale J. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genom Hum Genet*: 2000; 1: 117-137.
47. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG et al. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2009;73:95-170.
- 48- Hedrick PW. Balancing selection and MHC. *Genética* 1999;104:207-214
- 49- Hedrick PW. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* 2002;56:1902-1908
- 50- Hedrick PW. The major Histocompatibility complex (MHC) in declining populations an example of adaptativa radiation. In: Holt WV, Pickard AR, Rodger JC, Wildt DE (eds). *Reproduction science and integrated conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, 2003.
- 51- Hedrick PW. Balancing selection. *Curr Biol* 2007;17;104:230-231
- 52- Garrigan D, Hedrick PW. Detecting adaptative molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution*: 2003; 57: 1707-1722.
- 53- Parham P, Adams EJ, Arnett KL. The origins of HLA-A, B, C polymorphism. *ImmunolRev*: 1995; 143: 141-181.
- 54- Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science*: 1996; 272: 67-74.
- 55- Cserti-Gazdewich CM, Mayr WR, Dzik WH. *Plasmodium falciparum* malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV). *Vox Sang*. 2011 Jan;100(1):99-111

BIBLIOGRAFÍA

- 56- Allsopp CEM, Hill AVS, Kwiakowski D, Hughes M, Bunce CJ, Taylor L et al. Sequence analysis of Bw53, a common West African allele, suggests an origin by gene conversion of HLA-B*35. *Hum Immunol*: 1991; 30: 104-109.
- 57- Blanco-Gelaz MA, Lopez-Vazquez A, Garcia-Fernandez SM-BJ, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. Genetic variability, molecular evolution and geographic diversity of HLA-B27. *Hum Immunol* 62: 1042-1050. *Acta Haematol*: 2001; 20: 156-166.
- 58- Martinez-Laso JM, Moscoso J, Zamora J, Martin-Villa JM, Lowy E, Vargas-Alarcon G, Serrano-Vela JI, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A. Different evolutionary pathway of B*570101 and B*5801 (B17 group) alleles based on intron sequences. *Immunogenetics*: 2004; 55: 866-872.
- 59- Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A. Generation of the B*41 group of alleles as indicated by intron sequences. *Tissue Antigens*: 2006; 67: 70-74.
- 60- Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcon G, Granados J, Gomez-Casado E, Longas J, Gonzalez-Hevilla M et al. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens*: 2000; 56: 405-416.
- 61- Parham P, Arnett KL, Adams EJ, Little AM, Tees K, Barber LD et al. Episodic evolution and turnover of HLA-B alleles in the indigenous population of the new world. *Tissue Antigens*: 1997; 50: 219-232.
- 62- Zangenberg G, Huang MM, Arnheim N, Erlich H. New HLA-DPB1 alleles generated by interallelic gene conversion detected by analysis of sperm. *Nat Genet*: 1995; 10: 407-414.

BIBLIOGRAFÍA

- 63- Hogstrand K, Bohme J. A determination of the frequency of gene conversion in nonmanipulated mouse sperm. *Proc Natl Acad Sci*: 1994; 91: 9921-9925.
- 64- Lewontin RC, Hubby JL. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and the degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophilapseudoobscura*. *Genetics*: 1966; 54: 595-609.
- 65- Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology*. 2011 Jun;133(2):143-164.
- 66- Bamshad MJ, Mummidi S, Gonzalez E, Ahuja SS, Dunn DM, Watkins WS et al. A strong signature of balancing selection in the 5' cis-regulatory region of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA*: 2002; 99: 10539-10544.
- 67- Loerger TR, Clark AG, Kao TH. Polymorphism at the self-histocompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proc Natl Acad Sci USA*: 1990; 87: 9732-9735.
- 68- Akgunes A, Coban AY, Durupinar B. Human leucocyte antigens and cytokine gene polymorphisms and tuberculosis. *Indian J Med Microbiol*. 2011 Jan-Mar;29(1):28-32.
- 69- Bodmer W. Evolutionary significance of the HLA system. *Nature*: 1972 237: 139-145.
- 70- Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunologic surveillance in mice heterozygous at the H2 complex. *Nature*: 1975; 256: 50-52.
- 71- Black FL, Salzano FM. Evidence for heterosis in the HLA system. *Am J Hum Genet*: 1981; 33: 894-899.

BIBLIOGRAFÍA

- 72- Hedrick PW, Ginevan M, Ewing E. Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annu Rev Ecol Syst* 1976; 7: 1-32
- 73- Gillespie JH. A general model to account for enzyme variation in natural populations. V. The SAS-CFF model. *Theor Popul Genet*: 1978; 14: 1-45.
- 74- Hughes AL, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*:1988; 335: 167-170.
- 75- Hughes AL, Nei M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci USA*: 1989; 86: 958-962.
- 76- Ober C, Elias S, Kostyu DD, Hauck WW. Decreased fecundability in Hutterite couples sharing HLA-DR. *Am J Hum Genet*: 1992; 50: 6-14.
- 77- Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med*: 1976; 144: 1324-1335.
- 78- Egid K, Brown JL. The major histocompatibility complex and female mating preference in mice. *Anim Behav*: 1989; 38: 548-560.
- 79- Potts WK, Manning CJ, Wake land EK. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature*: 1991; 352:619-621.
- 80- Landry C, Garant D, Duchesne P, Bernatchez L. "Good genes as heterozygosity": the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo solar*). *Proc R SocB*: 2001; 268: 1279-1285.

BIBLIOGRAFÍA

- 81- Reusch TBH, Haberli MA, Aeschlimann B, Milinski E. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature*: 2001; 414: 300-302.
- 82- Bonneaud C, Chastel O, Federici P, Westerdahl H, Sorci G. Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proc Biol Sci*: 2006; 273: 1111-1116.
- 83- Hedrick PW, Black FL. HLA and mate selection in humans: no evidence in south Amerindians. *Am J Hum Genet* 1997; 61:505-511
- 84- Paterson SKW, Pemberton JM. No evidence for major histocompatibility complex-dependent mating patterns in a free-living ruminant population. *Proc R Soc Lond B*: 1998; 264: 1813-1819.
- 85- Thomas ML, Harger JH, Wagener DK, Rabin BS, Gill TJ. HLA sharing and spontaneous abortion in humans. *Amer J Obstet Gynec*: 1985; 151: 1053-1058.
- 86- Alberts SC, Ober C. Genetic variability in the major histocompatibility complex: a review of non-pathogen-mediated selective mechanisms. *Yrbk Phy Anthropol*: 1993; 36: 71-89.
87. WHO IUIS-Terminology Committee. Nomenclature for Factors of the HLA System. *Bull Wld Hlth Org*. 1975: 52: 261.
88. WHO Nomenclature Committee. Nomenclature for factors of the HLA system 1984. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR, eds. *Histocompatibility Testing*, 1984. Berlin: Springer-Verlag, 1985: 4–8.
89. Bodmer WF, Albert E, Bodmer JG, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. In: Dupont B, ed. *Immunobiology of HLA*. New York: Springer-Verlag, 1989:72–9.

BIBLIOGRAFÍA

90. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens*. 2002; 60:407–64.
91. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Mayr WR, Maiers M, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. An Update to HLA Nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplantation* 2010 **45**:846-8
92. Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE. IMGT/HLA database—a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*. 2000; 55: 280–7.
93. Robinson J, Waller MJ, Fail SC, et al. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: D1013–7.
94. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004;104:1923-1930.
95. 95 Ghorbani F, Khoddami-Vishteh HR, Ghobadi O, Shafaghi S, Rostami Louyeh A, Najafizadeh K. Causes of family refusal for organ donation. *Transplant Proc*. 2011 Mar;43(2):405-6
- 96- Similar Survival Following HLA-Identical Sibling Transplantation for Standard Indication in Children with Haematologic Malignancies: A Single Center Comparison of Mobilized Peripheral Blood Stem Cell with Bone Marrow Transplantation. Meisel R, Enczmann J, Balzer S, Bernbeck B, Kramm C, Schonberger S, Sinha K, Troger A, Wernet P, Gobel U, Laws HJ, Dilloo D. *Klin Padiatr*. 2005 May-Jun;217(3):135-41

BIBLIOGRAFÍA

- 97- Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):755-63
- 98- Cyclosporine alone vs cyclosporine plus methotrexate for post-transplant immunosuppression after HLA-identical sibling bone marrow transplantation: a randomized prospective study. Lee KH, Choi SJ, Lee JH, Kim S, Seol M, Lee YS, Kim WK, Lee JS, Lee JH. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Oct;34(7):627-36
- 99- Petersdorf E.W. et al. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Current Opinion in Hematology* 2004, 11:386.
- 100- Ottinger H.D. et al. Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations of HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors and HLA-matched unrelated donors. *Blood* 2003; 102: 1131.
- 101- Weissinger EM, Dickinson AM. Immunogenomics and proteomics in hematopoietic stem cell transplantation: predicting post-hematopoietic stem cell transplant complications. *Cancer Treat Res*. 2009;144:95-129.
- 102- Successful non-T-cell-depleted HLA-haploidentical 3-loci mismatched bone marrow transplantation. Yagyu S, Kuroda H, Fujiki A, Tamura S, Iehara T, Morimoto A, Hosoi H, Sugimoto T, Imashuku S. *Eur J Haematol*. 2005 Jun;74(6):529-32
- 103- Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem-cell transplantation. Pavletic SZ, Smith LM, Bishop MR, Lynch JC, Tarantolo SR, Vose JM, Bierman PJ, Hadi A, Armitage JO, Kessinger A. *Am J Hematol*. 2005 Apr;78(4):265-74.
- 104- Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. Tiercy JM. *Transpl Immunol*. 2002 May;9(2-4):173-80

BIBLIOGRAFÍA

- 105- Kanda Y. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 2003; 102: 1541.
106. Schipper RF, D'Amaro J, Oudshoorn M. The probability of finding a suitable related donor for bone marrow transplantation in extended families. *Blood* 1996;87:800-804.
107. Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). <http://www.bmdw.org/> . 2009. 22-12-2009. Ref Type: Electronic Citation
108. van Rood JJ, Oudshoorn M. Eleven million donors in Bone Marrow Donors Worldwide! Time for reassessment? *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:1-9.
109. Red Española de Donantes de Médula Ósea (REDMO). <https://fcarreras.org/redmo.php> . 2009. Ref Type: Electronic Citation
110. Sonnenberg FA, Eckman MH, Pauker SG. Bone marrow donor registries: the relation between registry size and probability of finding complete and partial matches. *Blood* 1989;74:2569-2578.
- 111- Balas A, García-Sánchez F. Vicario J. L.. Allelic and haplotypic HLA frequency distribution in Spanish hematopoietic patients. Implications for unrelated donor searching, *Tissue Antigens* 2011;77:45–53,
- 112- Shaw BE, Gooley TA, Malkki M et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2007; **110**: 4560–66.
- 113- Shaw BE, Mayor NP, Russell NH et al. Diverging effects of HLA-DPB1 matching status on outcome following unrelated donor transplantation depending on disease stage and the degree of matching for other HLA alleles. *Leukemia* 2010; **24**: 58–65.

BIBLIOGRAFÍA

- 114- Flomenberg N. et al. (NMDP) Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation : HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004; 104: 1923.
- 115- Petersdorf EW. (FHCRC) Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004; 104:2976.
- 116-Tiercy JM, Bujan-Lose M, Chapuis B et al. Bone marrow transplantation with unrelated donors: what is the probability of identifying an HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1 matched donor? *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 437–441.
- 117- Beatty PG, Mori M, Milford E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation* 1995; 60: 778–783.
- 118- Tiercy JM, Nicoloso G, Passweg J et al. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor in highly predictable. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 515–22.
119. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N.Engl.J.Med.* 2007;357:1731-1743.
120. Brionez TF, Reveille JD. The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2008;20:384-391.
- 121- Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OP, Doumbo OK, Koech D, Lancaster A, Nelson M, Meyer D, Single R, Hartzman RJ, Plowe CV, Kazura J, Mann DL, Sztein MB, Thomson G, Fernandez-Vina MA. *Tissue Antigens.* 2004 Apr;63(4):293-325.

BIBLIOGRAFÍA

122- HLA alleles in isolated populations from North Spain: origin of the Basques and the ancient Iberians. Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Lowy E, Silvera C, Cemborain A, Leyva-Cobian F, Arnaiz-Villena A. *Tissue Antigens*. 2003 May;61(5):384-92.

123- HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): in the cradle of the archaeological Iberians. Muro M, Marin L, Torio A, Moya-Quiles MR, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis MJ, Garcia-Calatayud MC, Garcia-Alonso AM, Alvarez-Lopez MR. *Hum Immunol*. 2001 Sep;62(9):910-21.

124- Flomenberg N. et al. (NMDP) Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation : HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004; 104: 1923.

125- Stein S, Forman SJ. Allogeneic transplantation for ALL in adults. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 439-446.

126- Kanda Y, Chiba S, Hirai H et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 2003;102:1541-1547.

127- Goussetis E, Varela I, Peristeri I, Kitra V, Spanou K, Moraloglou O, Paisiou A, Karatasaki S, Soldatou A, Constantinidou N, Graphakos S. Cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease in children after matched sibling hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. *Cell Mol Immunol*. 2011 May;8(3):276-80

128. Rocha V, Franco RF, Porcher R et al. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:3908-3918.

BIBLIOGRAFÍA

- 129- Loiseau P, Busson M, Balere ML et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2007;13:965-974.
- 130- Arora M, Weisdorf DJ, Spellman SR et al. HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 1644–52.
- 131- Sasazuki R, Juji T, Morishima Y et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1177–85.
- 132- Shaw BE, Marsh SG, Mayor NP, Russell NH, Madrigal JA. HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplantation. *Blood* 2006; **107**: 1220–26.
- 133- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004; **104**: 2976–80.
- 134- Kawase T, Morishima Y, Matsuo K et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft versus host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood* 2007; **110**: 2235–41.
- 135- Bethge WA, Haegele M, Faul C et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp Hematol* 2006; **34**: 1746–52.
- 136- Klingebiel T, Cornish J, Labopin M et al. Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukaemia: impact of center

BIBLIOGRAFÍA

size: and analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and marrow Transplant group. *Blood* 2010; **29**: 3437–46.

137- Majhail NS, Brunstein CG, Tomblyn M et al. Reduced-intensity allogeneic transplant in patients older than 55 years: unrelated umbilical cord blood is safe and effective for patients without a matched related donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; **14**: 282–89.

138- Long GD, Laughlin M, Madan B et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; **9**: 772–80.

139- Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; **13**: 82–9.

140- Sanz J, Sanz MA, Saavedra S et al. Cord blood transplantation from unrelated donors in adultst with high-risk acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 86–94.

141. Dickinson AM. Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT. *Int.J.Immunogenet.* 2008;35:375-380.

142. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* 2007;25:139-170.

143. Laurin D, Hannani D, Pernollet M, Moine A, Plumas J, Bensa JC, Cahn JY, Garban F. Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft. *Transfusion.* 2010 Feb;50(2):418-28

.

BIBLIOGRAFÍA

144. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007;20:171-187.
145. Lin MT, Storer B, Martin PJ et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 2003;349:2201-2210.
146. Holler E, Rogler G, Herfarth H et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:889-894.
147. Perez-Garcia A, De la CR, Roman-Gomez J et al. CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood* 2007;110:461-467.
148. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-796.
149. Hinrichs AL, Larkin EK, Suarez BK. Population stratification and patterns of linkage disequilibrium. *Genet.Epidemiol.* 2009;33:S88-S92.
150. Walter RB, Pagel JM, Gooley TA et al. Comparison of matched unrelated and matched related donor myeloablative haematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia in first remission. *Leukemia* 2010; **24**: 1276–82.
- 151- Hurley CK, Fernandez-Viña M, Hildebrand WH et al. A high degree of HLA disparity arises from limited allelic diversity: analysis of 1775 unrelated bone marrow transplant donor-recipient pairs. *Human Immunol* 2007; **68**: 30–40.

BIBLIOGRAFÍA

- 152- Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001; **27**: 777–83.
- 153- Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. Ahmad T, Neville M, Marshall SE, Armuzzi A, Mulcahy-Hawes K, Crawshaw J, Sato H, Ling KL, Barnardo M, Goldthorpe S, Walton R, Bunce M, Jewell DP, Welsh KI. *Hum Mol Genet.* 2003 Mar 15;12(6):647-56.
- 154- Bautista G, Cabrera JR, Regidor C et al. Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cells from a third-party donor. *Bone Marrow Transplant* 2009; **43**: 365–73.
- 155- D. Middleton, F. Williams, A. Meenagh, A.S. Daar, C. Gorodezki, M. Hammond, M. Nascimento, E. Nascimento, I. Briceno and M.P. Perez, Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents, *Hum Immunol* **61** (2000), p. 1048.
- 156- P. Parham, D.A. Lawlor, C.E. Lomen and P.D. Ennis, Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles, *J Immunol* 142 (1989), p. 3937.
- 157- F. Williams, A. Meenagh, C. Darke, A. Acosta, A.S. Daar, C. Gorodezky, M. Hammond, E. Nascimento and D. Middleton, Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents, *Hum Immunol* 62: 2001; p. 645
- 158- K. Cao, J. Hollenbach, X. Shi, M. Chopek and M.A. Fernandez-Vina, Analysis of the frequencies of HLA-A, B and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these

BIBLIOGRAFÍA

loci and contrasting distribution patterns in these populations, *Hum Immunol*: 2001, 62, p. 1009.

159- T.L. Bugawan, W. Klitz, A. Blair and H.A. Erlich, High-resolution HLA class I typing in the CEPH families: analysis of linkage disequilibrium among HLA loci, *Tissue Antigens*: 2000; 56, p. 392.

160- R.F. Schipper, J. D'Amaro, J.T. Bakker, J. Bakker, J.J. Van Rood and M. Oudshoorn, HLA gene haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries, *Hum Immunol*: 1997, 52p. 54.

161- Müller CH, Ehninger G, Goldman SF. Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A, HLA-B and HLA-DR based on over 13000 German blood donors. *Hum Immunol*: 2003: 64: 137–51.

162- Pedron B, Yakouben K, Adjaoud D et al. Listing of common HLA alleles and haplotypes based on the study of 356 families residing in the Paris, France, area: implications for unrelated hematopoietic stem cell donor selection. *Hum Immunol* 2005: 66: 721–31.

163- Silvera-Redondo C, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Egea E, Garavito G, Varela P, Pacho A, Moscoso J, Rubio I and Arnaiz-Villena A. A new HLA-Cw allele (Cw*0808) found in a Colombian Mestizo individual possibly generated by an intralocus/interloci gene conversión. *Immunogenetics*: 2000;51,12,1053-1057,

164- Bettens F, Nicoloso de Faveri G, Tiercy JM. HLA-B51 and haplotypic diversity of B-Cw associations: implications for matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens*. 2009 Apr;73(4):316-25.

BIBLIOGRAFÍA

- 165- Little A-M, Madrigal JA, Petersdorf E, Malkki M. 13th IHWS transplantation of hematopoietic stem cells joint report. K4. HLA-B15 haematopoietic stem cell transplant group analysis. In: Hansen J, Dupont B, eds. Immunobiology of the Human MHC, Vol. I. Seattle: IHWG Press, 2006, 1351–3.
- 166- Miretti MM, Walsh EC, Ke X et al. A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 634–46.
- 167- Prasad VK, Heller G, Kernan NA, O'Reilly RJ, Yang SY. The probability of HLA-C matching between patient and unrelated donor at the molecular level: estimations based on the linkage disequilibrium between DNA typed HLA-B and HLA-C alleles. *Transplantation* 1999; 68: 1044–50.
- 168- Ahmad T, Neville M, Marshall SE et al. Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 647–56.
- 169 Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med* 2007; 4: 59–68.
- 170- Comas D, Mateu E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Bosch E, Martinez-Arias R, et al. HLA class I and class II DNA typing and the origin of Basques. *Tissue Antigens* 1998 Jan;51(1):30-40.
- 171- Martinez-Laso J, De Juan D, Martinez-Quiles N, Gomez-Casado E, Cuadrado E, Arnaiz-Villena A. The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques. *Tissue Antigens* 1995;(45):237-45.

BIBLIOGRAFÍA

172- Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens* 2003 May; 61(5): 403-7.

173- Clayton J, Lonjou C, Whittle D. Allele and Haplotype frequencies for HLA loci in various ethnic groups. In: Charron D, editor. *Genetic diversity of HLA: Functional and Medical Implications*. Paris: EDK; 1997.

174- Barquera R, Zuniga J, Hernandez-Diaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* 2008 Feb;45(4):1171-8.

175- Crespi C, Mila J, Martinez-Pomar N, Etxagibel A, Munoz-Saa I, Priego D, et al. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens* 2002 Oct;60(4):282-91.

176- Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Lowy E, et al. HLA alleles in isolated populations from North Spain: origin of the Basques and the ancient Iberians. *Tissue Antigens* 2003 May;61(5):384-92.

177- Muro M, Marin L, Torio A, Moya-Quiles MR, Minguela A, Rosique-Roman J, et al. HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): in the cradle of the archaeological Iberians. *Hum Immunol* 2001 Sep;62(9):910-21.

178- Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Gomez-Casado E, Diaz-Campos N, Santos P, Martinho A, et al. Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics* 1997;47(1):37-43.

BIBLIOGRAFÍA

- 179- Carreon JD, Martin MP, Hildesheim A, Gao X, Schiffman M, Herrero R, et al. Human leukocyte antigen class I and II haplotypes and risk of cervical cancer. *Tissue Antigens* 2005 Oct;66(4):321-4.
- 180- Martinetti M, Degioanni A, D'Aronzo AM, Benazzi E, Carpanelli R, Castellani L, et al. An immunogenetic map of Lombardy (Northern Italy). *Ann Hum Genet* 2002 Jan;66(Pt 1):37-48.
- 181- Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Alonso-Garcia J. Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics. *Hum Biol* 1999 Oct;71(5):725-43
- 182- Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens* 2003; 61: 403–7.
- 183- Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 2008 Jul;69(7):443-64.
- 184- Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens* 2009 Jan;73(1):17-32.
- 185- A.M. Little, I. Scott, S. Pessoa, S.G. Marsh, R. Arguello, S.T. Cox, D. Ramon, C. Vullo and J.A. Madrigal, HLA class I diversity in Kolla Amerindians, *Hum Immunol*: 2001; 62p. 170.
- 186- S. Saito, S. Ota, E. Yamada, H. Inoko and M. Ota, Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population, *Tissue Antigens*: 2000; 56p. 522

BIBLIOGRAFÍA

- 187- K. Cao, A.M. Moormann, K.E. Lyke, C. Masaberg, O.P. Sumba, O.K. Dumbo, D. Koech, A. Lancaster, M. Nelson, D. Meyer, R. Single, R.J. Hartzman, C.V. Plowe, J. Kazura, D.L. Mann, M.B. Sztein, G. Thomson and M.A. Fernandez-Vina, Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci, *Tissue Antigens*: 2004, 63p. 293
- 188- B. Pedron, M. Duval, O.M. Elbou, M. Moskwa, M. Jambou, E. Vilmer and G. Sterkers, Common genomic HLA haplotypes contributing to successful donor search in unrelated hematopoietic transplantation, *Bone Marrow Transplant*: 2003, 31 p. 423.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **Alo-TPH:** Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
- **APC:** (*Antigen Presenting Cells*) - Células presentadoras de antígeno
- **ARS:** (Antigen recognition site) - sitio de reconocimiento antigénico
- **β2M:** Beta-2-Microglobulina
- **BMDW:** (Bone Marrow Donors Worldwide) - Registro mundial de donantes de médula ósea
- **CU:** Cordón umbilical
- **DC:** Células dendríticas
- **EA:** Espondilitis anquilopoyética
- **EC:** Enfermedad celíaca
- **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- **EICH:** Enfermedad injerto contra huésped
- **EICHa:** Enfermedad injerto contra huésped aguda
- **EICHc:** Enfermedad injerto contra huésped crónica
- **EICT:** Enfermedad injerto contra tumor
- **HLA:** (Human Leukocyte Antigen) - Antígenos de los leucocitos humanos
- **IFNγ:** Interferón gamma
- **IL:** Interleucina
- **ILD:** Infusión de linfocitos del donante
- **mHLA:** Antígenos menores de histocompatibilidad
- **MHC:** (Major Histocompatibility Complex) - Complejo mayor de Histocompatibilidad
- **ml:** mililitro
- **μl:** microlitro

ABREVIATURAS

- **MO:** Médula Ósea
- **MSC:** (Mesenchymal stem cells) - Células mesenquimales
- **pb:** (Pair bases) - Pares de bases
- **PCR:** (Polymerase Chain Reaction) - Reacción en cadena de la polimerasa
- **PCR-rSSO:** (PCR reverse Sequence Specific Oligonucleotide) - PCR inversa con sondas específicas de oligonucleótidos
- **PCR-SSP:** (PCR Sequence Specific Primers) - PCR con cebadores específicos de secuencia
- **REDMO:** Red Española de Donantes de Médula Ósea
- **SCU:** sangre del cordón umbilical
- **SI:** (self incompatibility) - sistema de incompatibilidad de plantas
- **SP** Sangre periférica
- **Tc:** Linfocitos T citotóxicos
- **Th:** Linfocitos T helper
- **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos
- **Treg:** Linfocitos T reguladores
- **TCR:** (T-cell receptor) - Receptor de células T
- **TNF α :** (Tumor necrosis factor) - Factor de necrosis tumoral alfa
- **VDR:** Receptor de vitamina D
- **xMHC:** (Extended MHC) - MHC extendido

ABREVIATURAS