

Frecuencia génica de antígenos menores de histocompatibilidad en la población chilena y estimación de sus efectos inmunológicos en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

CLAUDIO PÉREZ N.^a, RAMÓN RABANALES T.,
MILTON LARRONDO L., JORGE ALFARO L.

Frequency of minor histocompatibility antigens among Chilean blood donors

Background: Minor histocompatibility antigens (mHAg) play a critical role in the immune responses associated with allogeneic stem cell transplantation, such as graft versus host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT). **Aim:** To determine the gene frequencies of the mHAg HA-1, HA-2 and HA-8 in Chilean Blood Bank donors. **Material and Methods:** Blood from 192 blood donors was analyzed. The presence of haplotype HLA-A*02 was determined by flow cytometry. The frequency of mHAg was determined by allele specific polymerase chain reaction in genomic DNA. **Results:** Sixty one participants were carriers of the haplotype HLA-A*02. The relative allele frequency HA-1^H was 45%, HA-1^R 55%, HA-2^V 80.6%, HA-2^M 19.4%, HA-8^R 49.8% and HA-8^P was 50.2%. Based on mHAg disparity between HA-1, HA-2 or HA-8, the probability to generate a GVT response in HLA-A*02 individuals was 40%. **Conclusions:** The mHAg frequency in Chilean population is under Hardy-Weinberg equilibrium and they are similar to those of other ethnic populations in the world.

(Rev Med Chile 2012; 140: 555-560).

Key words: Blood donors; Haplotypes; HLA antigens.

Los antígenos menores de histocompatibilidad (mHAg), son péptidos inmunogénicos producto de polimorfismo entre individuos, que se encuentran fuera del sistema HLA. Estos antígenos tienen un rol en el prendimiento del injerto, la inducción de enfermedad injerto contra huésped (EICH) y el desarrollo de actividad de injerto contra tumor (ICT) luego del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH) entre dos individuos HLA compatibles^{1,2}.

La distribución génica de los mHAg en la población chilena es desconocida. Conocer las frecuencias génicas relativas de mHAg relevantes

permite estimar los eventos inmunológicos relacionados al TAPH³, con una clara repercusión en la implementación de terapias celulares.

Actualmente, se han descrito alrededor de 30 mHAg, estableciéndose la frecuencia alélica, genotípica e inmunofenotípica en diversas etnias^{5,6}. Específicamente, las variantes alélicas HA-1^H, HA-2^V y HA-8^R de mHAg son considerados inmunodominantes, expresándose en precursores hematopoyéticos y sus células diferenciadas, por lo que son blancos inmunológicos relevantes en la actividad ICT. Estos mHAg son presentados a linfocitos T mediante la molécula de restricción HLA-A02⁷⁻⁹. Estas características de mHAg los

Laboratorio de Terapia Celular- Banco de Sangre Hospital Clínico Universidad de Chile.

^aBioquímico.

Trabajo Financiado por Proyecto OAIC N° 262/07 (2007). Hospital Clínico Universidad de Chile.

Recibido el 23 de mayo de 2011, aceptado el 26 de diciembre de 2011.

Correspondencia a:
Dr. Jorge Alfaro Lucero
Terapia Celular- Banco de Sangre.
Hospital Clínico Universidad de Chile.
Santos Dumont 999
Independencia-Santiago.
Fono: 9788067
E-mail: jalvaro@redclinicauchile.cl

BQ. Claudio Pérez
Terapia Celular- Banco de Sangre.
Hospital Clínico Universidad de Chile.
Santos Dumont 999.
Independencia-Santiago.
Fono: 9788067
E-mail: cperez@redclinicauchile.cl

hace candidatos ideales para inducir una respuesta inmune específica, independizando el efecto ICT de la EICH en el paciente alotrasplantado.

En este trabajo, establecimos las frecuencias alélicas y genotípicas relativas de los antígenos menores de histocompatibilidad HA-1, HA-2 y HA-8 en individuos sanos no emparentados donantes de banco de sangre y estimamos su impacto inmunogénico teórico en pacientes trasplantados.

Individuos y Métodos

Selección de individuos

Se enrolaron 192 individuos, donantes sanos de sangre del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Previo a la extracción de sangre, los individuos firmaron un consentimiento informado. El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Determinación del haplotipo HLA-A2 mediante citometría de flujo

Se procesó 1 ml de sangre periférica para determinar la presencia del alelo HLA-A2. En breve, se agregó 5 ml de Tampón ACK para lisis los glóbulos rojos de la muestra, se incubó 10 minutos a T° ambiente y luego se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a 4° C. Se repitió el procedimiento hasta obtener un pellet blanco. Se lavó con 5 ml de Tampón PBS y luego las células se incubaron con 30 ml de anticuerpo monoclonal anti- HLA A2 durante 15 minutos a 4° C. Luego, las células fueron lavadas dos veces con 5 ml de PBS e incubadas con 50 ml de anticuerpo anti ratón FITC-conjugado durante 15 minutos a 4° C. Nuevamente se lavaron las células con PBS y, por último, fueron fijadas con PBS/1 % PFA. Las muestras fueron leídas en un citómetro de flujo FACSort (Beckton-Dickinson, USA), siendo analizados los datos mediante el programa WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>)

Extracción de ADN

El ADN genómico de sangre periférica fue extraído mediante el *kit* comercial "JETQUICK" (GENOMED, Alemania). En breve, 200 µL de sangre periférica fueron mezcladas con 200 µL de *buffer* de lisis, conteniendo 2 mg / ml de proteinasa K. Se incubó a 70°C durante diez minutos y luego

se adicionó 200 µL de etanol absoluto. Se agregó a una columna de sílica y se centrifugó a 10.600 g x 2 minutos. La columna se lavó dos veces con soluciones de etanol, y posteriormente se eluyó el ADN de la columna adicionando 100 µL de agua precalentada a 70°C. El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría.

PCR Alelo específico

Para llevar a cabo el procedimiento, se utilizó la técnica de PCR-SSP, descrita previamente para la tipificación de los mHAgS HA-1, HA-2 y HA-8¹⁰. Para tal efecto, en un tubo de PCR, se mezcló: 100 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,5 mM de partidores, 50 mM KCl, 10 mM, Tris HCl (pH 8,3) y 2,0 U Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Para incrementar el producto de PCR del gen HA-1, se duplicó la concentración de partidores. El programa de termociclado consistió en 1 ciclo a 94° C por 2 m, 10 ciclos de 94° C por 30 s y 65° C por 60 s; y finalmente 20 ciclos a 94° C por 30 s, 65° C por 50 s y 72° C por 30 s. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2% a 100 V durante 30 minutos y luego teñidos con 50 mg/ mL de bromuro de etidio.

Cálculo de la aplicación clínica de mHAgS

Para calcular la probabilidad de encontrar un efecto de ICT (pICT) en individuos HLA-A*02 se utilizó la fórmula $pICT = [(pNI + pII) \times pNN] \times 100$, donde pNI es la frecuencia del genotipo heterocigoto, pII es la frecuencia del genotipo inmunogénico y pNN es la frecuencia del genotipo no inmunogénico. La probabilidad del uso combinado de los tres mHAgS, para pICT se calcula con la siguiente fórmula:

$$P(fHA-1 U fHA-2 U fHA-8) = P(fHA-1) + P(fHA-2) + P(fHA-8) - P(fHA-1 \times fHA-2) - P(fHA-1 \times fHA-8) - P(fHA-2 \times fHA-8) - P(fHA-1 \times fHA-2 \times fHA-8)$$

Donde P(fHA-1), P(fHA-2) y P(fHA-8) corresponden a la probabilidad de ICT del gen HA-1, HA-2 y HA-8, respectivamente.

Comparación de frecuencias génicas de la población chilena con otras poblaciones

Para el análisis estadístico de las frecuencias genotípicas se realizó el test de ANOVA de dos colas, 95% IC, con una prueba de Bonferroni.

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de mHAgS HA-1, HA-2 y HA-8 en la población estudiada

Gen	Frecuencia alélica relativa (%)	Frecuencia genotípica relativa (%)	Frecuencia genotípica de alelos inmunogénicos (%)	Frecuencia genotípica de alelos inmunogénicos corregida para la molécula HLA-A*02
HA-1	H 0,452 (45,2) R 0,548 (54,8)	HH 0,244 (24,4) HR 0,417 (41,7) RR 0,339 (33,9)	HH + HR 0,661 (66,1)	0,212 (21%)
HA-2	V 0,792 (79,2) M 0,208 (20,8)	VV 0,609 (60,9) VM 0,365 (36,5) MM 0,026 (2,6)	VV + VM 0,974 (97,4)	0,312 (31%)
HA-8	R 0,492 (49,2) P 0,508 (50,8)	RR 0,287 (28,7) RP 0,411 (41,1) PP 0,302 (30,2)	RR + RP 0,698 (69,8)	0,226 (22%)

Resultados

*Frecuencias alélicas y genotípicas de cada mHAgS y de la molécula HLA-A*02 en la población estudiada*

Las frecuencias de cada gen estudiado se muestran en la Tabla 1. Cada mHAgS se mantiene en equilibrio genético cumpliendo con la ley de Hardy-Weinberg que establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor que introduzca alguna mutación (dato no mostrado). Además, 23 combinaciones de 27 genotipos posibles estuvieron representadas en la población con una frecuencia esperada (dato no mostrado). En 190 individuos se encontró al menos una variante inmunogénica (Forma HA-1^H, HA-2^V o HA-8^R), 77 individuos portaron combinaciones de dos mHAgS y en 86 individuos se evidenció presencia de los tres alelos inmunogénicos de mHAgS. Por otra parte, la frecuencia encontrada de la molécula de HLA-A*02, a la cual se restringen los mHAgS estudiados, fue de 32% (61 de 192) en la población en estudio.

Aplicación clínica de polimorfismos de mHAgS

La probabilidad de utilizar la disparidad de mHAgS como blanco inmunológico, puede calcularse sobre la base de frecuencias alélicas para las variantes inmuno y no inmunogénicas de los tres mHAgS estudiados. Para esta predicción, el paciente debe poseer la molécula de restricción HLA-A*02 y al menos 1 alelo que codifique la variante inmunogénica. En contraste, el donante debe ser homocigoto para el alelo no inmunogénico.

En síntesis, nuestros resultados muestran que la posibilidad de que en un total de 100 trasplantados HLA-A*02, el máximo de pacientes con probabilidad de presentar actividad ICT será de 22% para HA-1; 2% para HA-2 y 21% para HA-8, mientras que la posibilidad combinada alcanzará el 40%.

Frecuencias alélicas de mHAgS otras poblaciones

Conocer las frecuencias alélicas de los mHAgS, es un paso previo a establecer la relevancia epidemiológica en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. En la Figura 1 se compara las frecuencias alélicas y genotípicas de la población obtenida de este estudio con poblaciones caucásicas, negroides, de Asia Pacífico, mestizos mexicanos y tunecinos. El resultado indica que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la población chilena y los demás grupos étnicos.

Discusión

La respuesta inmunológica observada en un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH) *full match*, está gatillada por diferencias en el polimorfismo de mHAgS. Si el péptido inmunogénico se encuentra en las células normales del receptor, se desarrollará un EICH, si el péptido se distribuye en las células tumorales, habrá una reacción de ICT. En el presente trabajo establecimos las frecuencias alélicas de mHAgS en una población normal de donantes de banco de sangre, y extrapolamos nuestros resultados a con-

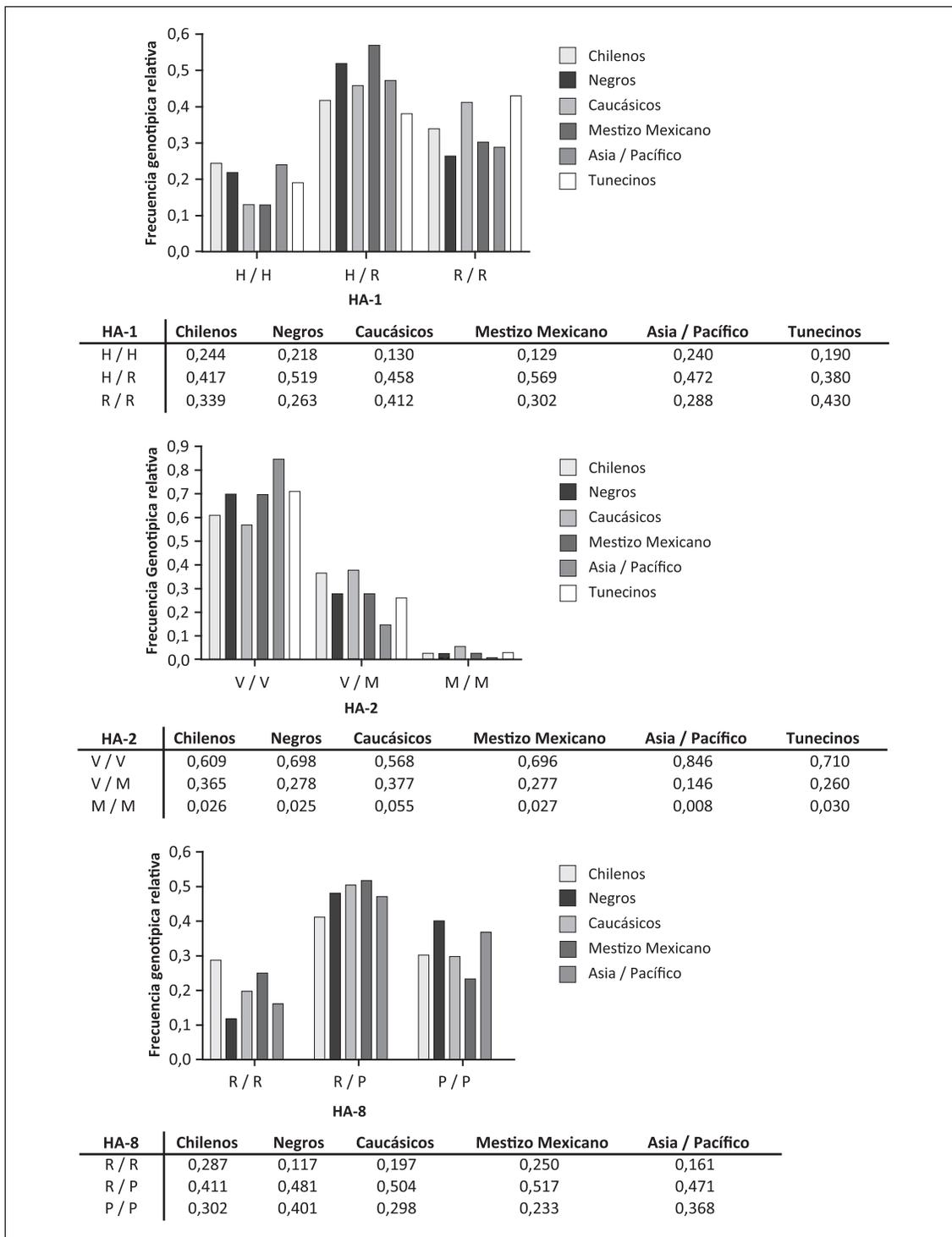


Figura 1. Comparación de las frecuencias genóticas de la población chilena con diferentes grupos étnicos. El análisis estadístico concluyó que no existen diferencias significativas en la frecuencia genotípica entre la población chilena y otros grupos poblacionales.

diciones de trasplante. Los antígenos estudiados, HA-1, HA-2 y HA-8 se encuentran distribuidos en células hematopoyéticas y neoplasias hematológicas. Por esta razón, las conclusiones están relacionadas principalmente con el ICT. Lo anterior fundamenta las bases teóricas para separar los efectos ICT de EICH, constituyéndose en una meta a alcanzar el conocer detalladamente las diferencias en mHAg en todo paciente alotrasplantado. Nuestro trabajo es un aporte en esa dirección¹².

En el presente estudio, la frecuencia genotípica de alelos inmunogénicos corregidos para la molécula HLA-A*02 son 21, 31 y 23%, correspondiente a los inmunogenotipos HA-1, HA-2 y HA-8 respectivamente (Tabla 1). Los alelos inmunogénicos son relevantes cuando el donante HLA compatible no posee la variante inmunogénica y, activa la respuesta inmune contra estos antígenos. Determinamos que 40% de los individuos HLA-A*02 podrían desencadenar respuesta contra los alelos HA-1^H, HA-2^V o HA-8^R, que son los inmunogénicos.

Rezvani y col¹³ encontraron una respuesta inmune específica contra mHAg en el paciente alotrasplantado, la cual puede ser optimizada para su uso terapéutico. En ese sentido, la fabricación de vacunas específicas contra mHAg específicos favorecería el efecto de ICT minimizando los riesgos de EICH en el paciente alotrasplantado. Warren y col¹⁴ trataron a 7 pacientes en recaída después de un trasplante *full match* con linfocitos T específicos contra mHAg, logrando una remisión completa en 5 pacientes. Aunque esto fue transitorio, fue realizado en pacientes intensamente tratados y de mal pronóstico. El mHAg HA-8 se expresa además en células no hematológicas pudiendo originar eventos inmunes nocivos como la EICH hasta en 20% en los individuos HLA-A*02 trasplantados. Alternativamente, el uso de una terapia celular con acción reguladora dirigida hacia mHAg, expresados en órganos o tejidos, podría ser una alternativa para prevenir la aparición de EICH o de disminuir sus efectos deletéreos.

La utilización de donantes HLA idénticos no emparentados para realizar un TAPH es un recurso cada día más utilizado¹⁵⁻¹⁷, esta estrategia aumenta la probabilidad de diferencias de mHAg entre el receptor y donante, independientemente de que hayamos demostrado que las frecuencias genéticas de mHAg en nuestra población son similares a otras etnias descritas.

En síntesis, nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de mHAg al comparar la población chilena con otras etnias. A partir de las frecuencias genotípicas encontradas, la estimación de efecto ICT en tres mHAg estudiados, en población HLA-A*02, alcanza 40%. Una visión más completa se obtendrá al incluir el análisis de los mHAg relacionados a otros alelos HLA. Las frecuencias génicas de mHAg en nuestra población son de vital importancia en la implementación de terapias celulares que requieren estimar la eficacia teórica del proceso. Por esta razón, el estudio de polimorfismos de mHAg entre donante y receptor se encuentra en pleno desarrollo a nivel científico y clínico, lo cual hace de esta aproximación teórica un proceso en plena evolución.

Referencias

1. Falkenburg JH, Van Der Corput L, Marijt EW, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003; 31: 743-51.
2. Spierings E, Wieles B, Goulmy E. Minor histocompatibility antigens-big in tumour therapy. *Trends Immunol* 2004; 25: 56-60.
3. Di Terlizzi S, Zino E, Mazzi B, Magnani C, Tresoldi C, Perna SK, et al. Therapeutic and Diagnostic applications of minor Histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 disparities in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A survey of different populations. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 95-101.
4. Mullally A, Ritz J. Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2007; 109: 1355-62.
5. Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, Crowley J, et al. Phenotype Frequencies of Autosomal Minor Histocompatibility Antigens display Significant Differences among Populations. *PLoS Genet* 2007; 3: e103. Disponible en: www.plosgenetics.org [Consultado el 5 de agosto de 2010].
6. Sellami MH, Ben Ahmed A, Kaabi H, Jridi A, Dridi A, Hmida S. HA-1 and HA-2 minor histocompatibility antigens in Tunisians. *Tissue Antigens* 2010; 75: 720-3.
7. Den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995; 268: 1476-80.
8. Den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, et al. The minor histocompatibility an-

- tigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science* 1998; 279: 1054-7.
9. Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akatsuka Y, Golovina TN, Zarlino AL, et al. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J Exp Med* 2001; 193: 195-206.
 10. Spierings E, Drabbel J, Hendriks M, Pool J, Spruyt-Gerritse M, Claas F, et al. A Uniform Genomic Minor Histocompatibility Antigen Typing Methodology and Database Designed to Facilitate Clinical Applications. *PLoS One* 2006; 1: e42. Disponible en: www.plosone.org [Consultado el 20 de agosto de 2010].
 11. Wilke M, Dolstra H, Maas F, Pool J, Brouwer R, Falkenburg JH, et al. Quantification of the HA-1 gene product at the RNA level; relevance for immunotherapy of hematological malignancies. *Hematol J* 2003; 4: 315-20.
 12. Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. Minor histocompatibility antigens-targets of graft versus leukemia responses. *Int J Hematol* 2002; 76: 155-61.
 13. Rezvani K, Barrett AJ. Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21: 437-53.
 14. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 2010; 115: 3869-78.
 15. Welte K, Foeken L, Gluckman E, Navarrete C. International exchange of cord blood units: the registry aspects. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 825-31.
 16. Petersdorf EW. The World Marrow Donor Association: 20 years of international collaboration for the support of unrelated donor and cord blood hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 807-10.
 17. Foeken LM, Green A, Hurley CK, Marry E, Wiegand T, Oudshoorn M. Monitoring the international use of unrelated donors for transplantation: the WMDA annual reports. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 811-8.