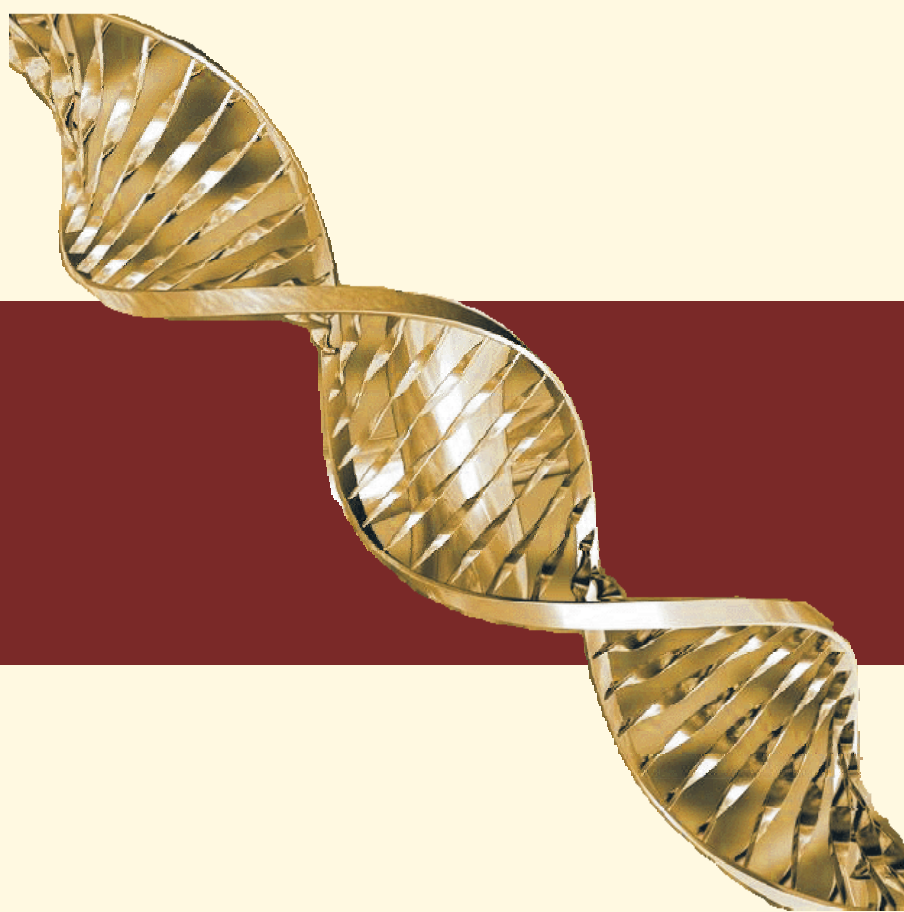




VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDiCiNA



**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA
EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES SOMETIDOS A
TRASPLANTE ALOGENICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS**

Miguel Alcoceba Sánchez
2010

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGIA



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN
LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES
SOMETIDOS A TRASPLANTE ALOGENICO DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**

Miguel Alcoceba Sánchez

2010

D. Marcos González Díaz, profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, Doctor en Medicina y Cirugía y Médico Adjunto de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca

y

D. Ramón García Sanz, profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, Doctor en Medicina y Cirugía y Médico Adjunto de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“Evaluación de polimorfismos genéticos en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos”** ha sido realizado bajo nuestra dirección por el grado Miguel Alcoceba Sánchez en el departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación
Salamanca, a 3 de Marzo de 2010.

Fdo. Dr. Marcos González Díaz

Fdo. Dr. Ramón García Sanz

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 – Estructura del ADN y polimorfismos genéticos	4
1.1 – Organización del ADN	4
1.2 – Polimorfismos genéticos	6
1.3 – Polimorfismos de nucleótido simple - SNP.....	8
1.4 – ADN repetitivo en tándem.....	9
1.5 – Sistema de histocompatibilidad	12
Generalidades	12
Estructura, organización genética y función del complejo HLA.....	14
Presentación de antígenos.....	17
Nomenclatura.....	18
2 – Trasplante de progenitores hematopoyéticos	22
2.1 – Generalidades	22
2.2. – Rechazo de injerto	24
2.3 – Enfermedad injerto contra huésped	24
2.4 – Enfermedad injerto contra tumor.....	31
3 – Polimorfismos genéticos en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos	33
3.1 – Sistema HLA	33
HLA y Trasplante	33
Registros de donantes voluntarios	34
HLA y Enfermedad	36
3.2 – Microsatélites	38
3.3 – Otros polimorfismos	39
Antígenos menores de histocompatibilidad.....	40
Polimorfismos de citocinas pro- y antiinflamatorias.....	41
Genes de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (complejo KIR, de Killer Immunoglobulin-like Receptor)	41
Enzimas implicadas en el metabolismo de drogas	42
Proteínas relacionadas con el sistema inmune innato.....	42

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo	47
Objetivos	49

MATERIAL Y MÉTODOS

1 – Sujetos del estudio	53
2 – Métodos	55
2.1 – Obtención de ácidos nucleicos	55
2.2 – Tipaje de HLA Clase I y Clase II	55
2.3 – Amplificación y detección de regiones microsatélite.....	58
2.4 - Detección de polimorfismos en PECAM-1 (CD31) e ICAM-1 (CD54).	59
2.5 – Análisis estadístico	60
Genética de poblaciones	60
Parámetros forenses.....	61
HLA y asociación	62
Parámetros clínicos.....	62

RESULTADOS..... 65

BLOQUE 1 – HLA

1 – Frecuencias alélicas y haplotípicas de los polimorfismos HLA-A, -B y -DRB1 en la población de Castilla y León: Comparación con otras poblaciones de la península Ibérica	69
2 – Influencia de polimorfismos HLA en pacientes con mieloma múltiple candidatos a trasplante alogénico emparentado HLA idéntico	85
3 – La presencia del alelo DRB1*01 en pacientes con mieloma múltiple se asocia con una enfermedad más indolente	87

BLOQUE 2 –Microsatélites

4 – Frecuencias alélicas de 15 regiones STR analizadas mediante PowerPlex16 en la población de Castilla y León: Comparación con otras poblaciones de la península Ibérica.....	93
5 – Valor de la evolución de quimerismo en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida.....	99

6 – Valor clínico-pronóstico de las discrepancias en regiones de ADN microsatélite entre receptor y donante en el contexto de trasplante alogénico HLA idéntico	107
BLOQUE 3 –Otros polimorfismos	
7 – El genotipo de CD31 (PECAM-1) del donante se asocia con la severidad de la enfermedad injerto contra huésped aguda tras trasplante alogénico emparentado HLA idéntico de progenitores hematopoyéticos.....	117
DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	147
ANEXOS	159
I – Genes situados en la región del sistema HLA (6p21.31).....	I
II – Historia del trasplante de progenitores hematopoyéticos	III
III – Indicaciones del trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	XV
SUMMARY (Resumen y conclusiones de la tesis doctoral en inglés).....	185

ABREVIATURAS

-ADN	Ácido Desoxirribonucleico
-AIR	Acondicionamiento de intensidad reducida
-alo-TPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
-APC	(<i>Antigen Presenting Cells</i>) – Células presentadoras de antígeno
-A-QM	Quimerismo mixto ascendente
-ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
-β₂M	Beta-2-Microglobulina
-BMDW	(Bone Marrow Donors Worldwide) – Registro mundial de donantes de médula ósea
-CU	Cordón Umbilical
-DC	Células dendríticas
-D-QM	Quimerismo mixto descendente
-EA	Espondilitis anquilosante
-EC	Enfermedad celíaca
-GI	Gastrointestinal
-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
-IFN_γ	Interferón gamma
-IL	Interleucina
-ILD	Infusión de linfocitos del donante
-KIR	(Killer immunoglobulin receptors) – Receptores tipo inmunoglobulina de las células NK
-LINE	(Long Interspersed Elements) – Elementos largos intercalados
-LPS	Lipopolisacárido
-LTR	(Long terminal repeat) – Repetición terminal larga
-mHLA	Antígenos menores de histocompatibilidad
-MHC	(Major Histocompatibility Complex) – Complejo mayor de histocompatibilidad
-MIR	(Mammalian-wide interspersed repeat) – Repeticiones dispersas ampliamente distribuidas en mamíferos
-MM	Mieloma Múltiple

-MO	Médula Ósea
-MSC	(Mesenchymal stem cells) – Células mesenquimales
-NB-QM	Quimerismo mixto a niveles bajos
-NK	Célula Natural Killer
-NKT	Célula Natural Killer T
-NO	Óxido nítrico
-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
-pD	(Power of discrimination) – Poder de discriminación
-pE	(Power of exclusion) – Poder de exclusión
-PIC	(Polymorphism information content) – Contenido de información de un polimorfismo
-pM	(Probability of Match) – Probabilidad de identidad
-QC	Quimerismo completo
-QM	Quimerismo mixto
-REDMO	Red Española de Donantes de Médula Ósea
-SG	Supervivencia global
-SINE	(Short Interspersed Elements) – Elementos dispersos de corta longitud
-SLR	Supervivencia libre de recaída
-SNP	(Single nucleotide polymorphism) – Polimorfismo de un único nucleótido
-SP	Sangre periférica
-STR	(Short Tandem Repeats) – Repeticiones cortas en tándem
-Th	Linfocitos T helper
-TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
-TPI	(Typical paternity index) – Índice típico de paternidad
-Treg	Linfocitos T reguladores
-TCR	(T-cell receptor) – Receptor de células T
-TNFα	(Tumor necrosis factor) – Factor de necrosis tumoral alfa
-VDR	Receptor de vitamina D
-VNTR	(Variable Number of Tandem Repeats) – Número variable de secuencias repetidas en tándem

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la estructura del ADN en 1953¹ supuso un cambio radical en el planteamiento de la genética moderna, influyendo en la dirección de muchas otras disciplinas e impulsando un gran avance tecnológico en investigación biomédica. Recientemente se ha llegado a completar la secuencia del genoma humano^{2;3}, facilitando a su vez un conocimiento más completo de las bases de la diversidad genómica entre individuos.

Estas diferencias en las secuencias de ADN, estimadas en un 0,1%, están constituidas por los denominados polimorfismos genéticos y son los responsables de la variabilidad genética entre individuos. La mayoría de estas diferencias son neutras, sin efecto alguno sobre la información hereditaria, ya que afectan a secuencias no codificantes o no funcionales del ADN, o bien afectan a secuencias codificantes que no modifican la estructura de la proteína. El resto pueden ser responsables de gran parte de las variaciones de los rasgos fenotípicos, bien sean diferencias hereditarias entre individuos o bien determinando diferentes respuestas ante factores ambientales y farmacológicos, lo que puede dar lugar a individuos más susceptibles que otros a desarrollar una determinada enfermedad o bien responder de forma variable a determinados fármacos.

Dentro del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, determinados polimorfismos pueden dar lugar a un comportamiento diferente en la evolución del trasplante así como a una mayor predisposición a complicaciones derivadas del mismo. Por ejemplo, dentro de los sistemas polimórficos, uno básico y el de mayor importancia en el trasplante hematopoyético es el sistema HLA (de *Human Leukocyte Antigen*), implicado en el reconocimiento y presentación de antígenos extraños a los linfocitos T y

punto de partida de la respuesta inmunitaria. La ausencia de identidad HLA entre donante y receptor puede favorecer el rechazo o fracaso del injerto, o el contribuir a la recaída de la enfermedad de base o al desarrollo de la principal complicación derivada del trasplante alogénico, la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Por otra parte, ya que los polimorfismos muestran diferencias entre individuos podemos emplearlos para determinar el origen de las células hematopoyéticas (donante o receptor). Con ello se puede evaluar la eficacia del prendimiento del injerto así como su monitorización, lo que nos permite predecir eventuales recaídas. Sin embargo, una de las principales dificultades para determinar el verdadero valor de cada polimorfismo en la evolución del trasplante reside en las diferentes condiciones en que se efectúa cada trasplante, ya que variables clínicas como la enfermedad de base, el estado de la enfermedad, el régimen de acondicionamiento, la edad o el sexo de paciente y donante, el tipo de donante o la fuente de células progenitoras que se infunden influyen en la respuesta y evolución del trasplante.

En el presente trabajo de tesis doctoral hemos analizado el valor de algunos sistemas polimórficos (sistema HLA, regiones microsatélite y polimorfismos en dos genes codificantes de moléculas de adhesión) en un grupo de pacientes receptores de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica de un donante emparentado HLA idéntico. Igualmente se analizará la influencia del sistema HLA en el desarrollo y evolución clínica de pacientes con mieloma múltiple sometido a diferentes esquemas terapéuticos incluido el trasplante alogénico.

En la introducción repasaremos brevemente la organización del ADN para conocer los distintos tipos de polimorfismos genéticos, centrándonos en aquellos que

presentan mayor variabilidad e importancia clínica, revisando su estructura y funciones. A continuación resumiremos las bases biológicas del trasplante, incidiendo en la principal complicación post-trasplante, la enfermedad injerto contra huésped. Finalmente, comentaremos la importancia y aplicaciones de distintos grupos de polimorfismos genéticos con el comportamiento del trasplante.

1. Estructura del ADN y polimorfismos genéticos

1.1. Organización del ADN

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética del individuo. El conjunto de esta información presente en las células es el denominado genoma y, según su localización, podemos identificar un genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple.

El genoma humano haploide está constituido por aproximadamente 3.3×10^9 pares de bases (pb)². Se pueden distinguir dos tipos de ADN, según la función biológica que desempeñen (Figura 1, modificado de Fowler *et al* ^{2;4}):

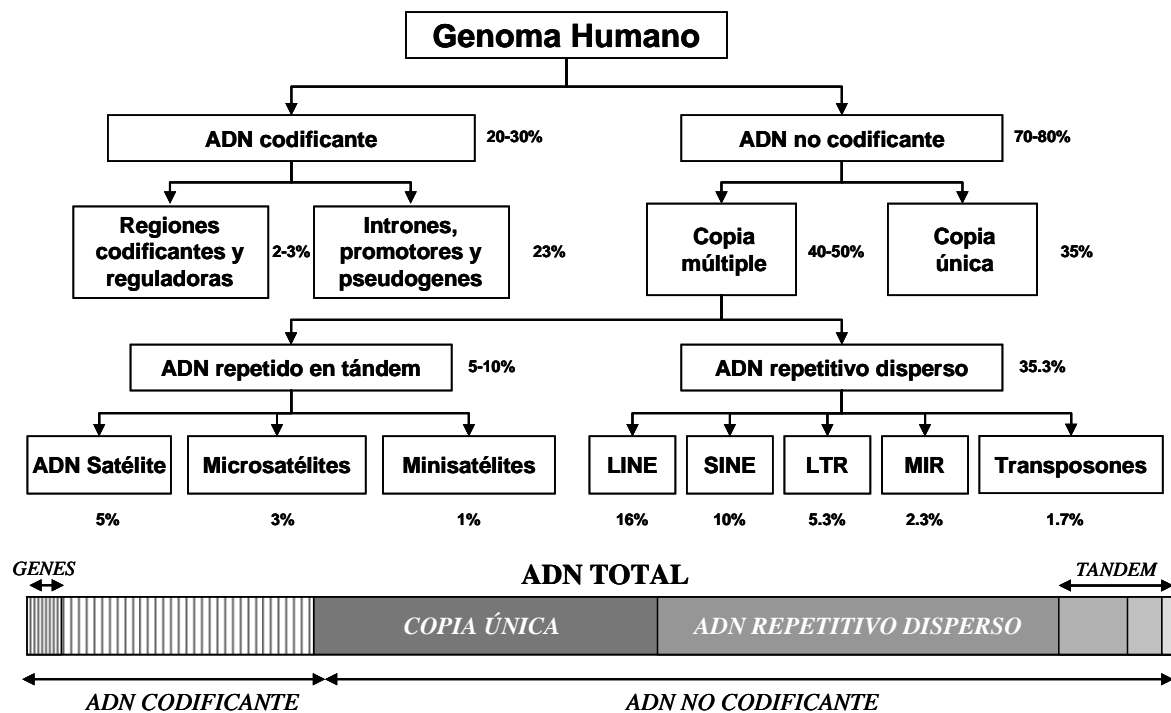


Figura 1. Organización del genoma humano según su estructura y función.

A- ADN codificante (30%). Tiene una función conocida, comúnmente la expresión de un gen, cuyo producto final es una proteína. Soporta gran presión selectiva, lo que se traduce en una variabilidad de regiones limitada.

B- ADN no codificante (70%). Comprende secuencias de ADN transcripcionalmente inactivas de funciones diversas (como por ejemplo, promotores de genes o reguladores de transcripción) y, en otros muchos casos, de función desconocida o sin función aparente. Este tipo de ADN, por ser altamente polimórfico, tiene un gran interés de cara a la identificación de individuos. A su vez, se puede dividir en:

- **B.1 - ADN de copia única (40-50% del genoma).** Está compuesto por secuencias que se encuentran representadas una o muy pocas veces en el genoma. Se cree que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de ADN.

- **B.2 ADN de copia múltiple (35% del genoma).** Las secuencias de este tipo de ADN, también denominado ADN repetitivo, pueden ser altamente, moderadamente o poco repetitivas. Podemos clasificarlas en base a sus dos características más importantes: su disposición a lo largo del genoma y el tamaño de la unidad de repetición. Se pueden reconocer dos grupos principales:
 - **B.2.1 ADN repetido en tándem (5-10% del genoma).** Se compone de bloques de secuencias repetitivas agrupadas de manera

consecutiva (tándem). Se distinguen tres tipos: ADN satélite (5%), ADN minisatélite (1%) y ADN microsatélite (3%).

- **B.2.2 ADN repetitivo disperso** (35.3% del genoma). Las unidades de repetición no se agrupan, sino que aparecen dispersas a lo largo del genoma. Comprende los LINEs (16%), SINEs (10%), secuencias LTR (5.3%), MIR (2.3%) y transposones de ADN (1.7%).

1.2. Polimorfismos genéticos

Dentro de la semejanza entre los individuos de una misma especie, estimada en un 99,9% del genoma humano, existen variaciones individuales en la secuencia del ADN, muchas de ellas neutras, es decir, sin efecto alguno sobre la información genética, ya que afectan a secuencias no codificantes ni funcionales del ADN. Este 0,1% de variaciones de secuencias de ADN entre individuos es lo que se conoce como polimorfismos genéticos. Los polimorfismos consisten, por tanto, en variaciones en la secuencia del ADN, tengan o no consecuencia biológica selectiva alguna, que se detectan en al menos el 1% de los individuos de una población. En la práctica, para que un locus sea considerado polimórfico el alelo más común de dicho locus debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, al menos un 2% de la población debe ser heterocigota para ese locus.

Desde hace casi un siglo se utilizan los polimorfismos genéticos para estudiar las variaciones entre individuos. Son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie.

Las primeras variaciones genéticamente determinadas se hallaron en proteínas, los antígenos encontrados en los eritrocitos, denominados por ello antígenos de grupos sanguíneos. Hace pocos años los análisis forenses estaban basados fundamentalmente en el estudio de marcadores genéticos convencionales (antígenos eritrocitarios y leucocitarios, proteínas séricas y enzimas eritrocitarias). En la década de los 80 se consigue un avance espectacular en el campo de la genética forense a raíz del descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN⁵. A partir de este momento, la utilidad de los polimorfismos clásicos va disminuyendo conforme se generaliza el estudio de estos nuevos marcadores, mucho más informativos, debido principalmente a la gran variabilidad y estabilidad química del ADN, así como a la alta sensibilidad de las técnicas que lo analizan. Los polimorfismos de ADN hipervariables poseen tal capacidad de identificación que son considerados hoy en día un instrumento de elección en múltiples disciplinas científicas⁶⁻¹⁵.

En el ADN codificante existe poca variabilidad individual, exceptuando la región HLA. El margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. Por ejemplo, si se producen diferentes formas de una proteína se puede condicionar su función o actividad, bien de forma intrínseca, bien por influencia ambiental. El ADN no codificante, por el contrario, al no estar sujeto a presión selectiva intensa, puede soportar grandes niveles de variabilidad sin que se produzca una repercusión fenotípica. Esta característica ha convertido a este tipo de ADN en la mayor fuente de investigación de polimorfismos.

Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición. Podríamos denominarlos en función del tipo de cambio que se produce:

- **Polimorfismos de secuencia.** Se producen por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia del ADN, sin modificación de tamaño. Suelen ser poco polimórficos y son típicos del ADN codificante, como por ejemplo el sistema HLA.
- **Polimorfismos de longitud.** Se producen por la inserción o delección de uno o más nucleótidos. Este tipo es el más abundante en el ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini- y microsatélite.

Se puede hacer otra denominación en base al número de alelos que presentan:

- **Polimorfismos bialélicos.** Aquellos que se presentan únicamente con dos variantes posibles. Ejemplo de ellos son los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), alelos nulos y polimorfismos de inserción / delección.
- **Polimorfismos multialélicos.** Aquellos que presentan más de dos variantes para el mismo locus. Algunos ejemplos son el ADN repetitivo (minisatélites, microsatélites) o el sistema HLA.

A continuación describiremos con mayor detalle los polimorfismos más variables y de mayor aplicación clínica en la actualidad.

1.3 Polimorfismos de nucleótido simple – SNP

Los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) consisten en la sustitución de un nucleótido por otro y pueden dar lugar a variaciones en la secuencia del ADN. Se

localizan por todo el genoma. Son típicamente bialélicos, si bien cabe mencionar que muy raramente pueden observarse SNP tri- y tetraalélicos. No obstante, algunos SNP que al principio se consideraban bialélicos posteriormente han demostrado ser trialélicos, como el SNP G2677/T/A en el gen de resistencia a drogas MDR1 (*Multi drug resistance 1*)¹⁶. En conjunto, constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genéticas humanas, estimándose que uno de cada 200-300 nucleótidos varía entre los distintos individuos. Actualmente están identificados más de 9 millones¹⁷. Aunque la mayoría de los SNP se encuentran en regiones no funcionales del ADN o son sinónimos (*se produce un cambio de nucleótido que genera el mismo aminoácido, sin alterar por tanto la cadena de ADN*), careciendo de efecto biológico, también los hay que afectan a regiones codificantes o funcionales del genoma, pudiendo modificar el sentido de un codón o alterar la expresión de un gen. Se ha propuesto la hipótesis de que estos últimos polimorfismos son los responsables de gran parte de las diferencias hereditarias entre individuos, pudiendo determinar la respuesta individual a factores ambientales y farmacológicos y la predisposición genética a muchas enfermedades, especialmente complejas. Además de su creciente interés y utilización para los estudios de asociación entre factores genéticos y enfermedad¹⁸⁻²¹, los SNP también son de gran interés en genética de poblaciones y evolutiva^{10;22}.

1.4 ADN repetitivo en tándem

Entre los polimorfismos que presentan gran variedad de alelos se encuentran las secuencias satélite, los minisatélites o número variable de repeticiones en tándem (VNTR, *variable number of tandem repeats*) y los microsatélites o repeticiones cortas en tándem (STR, *short tandem repeats*). La tabla 1 resume sus principales características.

Estos tres componentes del ADN repetitivo adoptan un patrón de distribución cromosómica diferente: el ADN satélite se sitúa en la región centromérica, el ADN minisatélite en los telómeros o en sus proximidades, y el ADN microsatélite aparece disperso por todo el cromosoma.

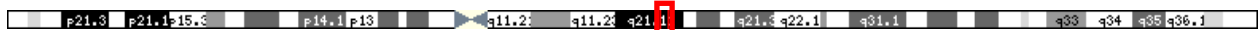
Las secuencias satélite son secuencias poco polimórficas entre poblaciones, a diferencia de mini- y microsatélites. Las unidades de repetición pueden tener una longitud similar a las de mini- y microsatélites, 5-10pb, o ser mucho mayores, >200pb, y se organizan típicamente en grandes clusters (más de 100 Mb) en las regiones heterocromáticas de los cromosomas. No tienen transcripción a ARN²³.

Tabla 1 – Tipos de ADN repetido en tándem

- ADN SATELITE – Repeticiones de 5 a >200 pb, longitud final de 10^5 - 10^8 pb, la menos polimórfica de las tres.
- MINISATÉLITES – Repeticiones de 7-100 pb, longitud final de 500-30.000 pb, localizada en eucromatina, en genomas de vertebrados, hongos y plantas.
- MICROSATÉLITES – Repeticiones de 2-6 pb, longitud final de 100-500 pb, localizada en eucromatina, en genoma de insectos, vertebrados y plantas.

Tanto los mini- como microsatélites consisten en repeticiones consecutivas de un número determinado de nucleótidos, diferenciándose tanto por el tamaño de la secuencia como por el número de nucleótidos que constituyen el núcleo repetitivo. No existe una delimitación consenso en cuanto al tamaño del núcleo repetitivo o la longitud final del segmento para que un polimorfismo sea considerado mini- o microsatélite. Debido a la ausencia de una definición precisa, los datos apuntados se refieren a los valores extremos encontrados en la literatura.

El número de veces que se repite este núcleo en un mini- o microsatélite particular constituye los distintos alelos del *locus*, y puede diferir entre los dos cromosomas homólogos de un individuo y de un individuo a otro. Estos marcadores son altamente informativos, ya que presentan gran número de alelos, siendo muy elevada la probabilidad de encontrar dos alelos diferentes (heterocigosidad) en el mismo individuo.



```

1   aatTTTTgta ttttttttag agacgggggt tcaccatggt ggtcaggctg actatggagt
61  tattttaagg ttaatatata taaagggtat gatagaacac ttgtcatagt ttagaacgaa
121 ctaacgatag atagatagat agatagatag atagatagat agatagatag atagacagat
181 tgatagtttt tttttatctc actaaatagt ctatagtaaa catttaatta ccaatatttg
241 gtgcaattct gtcaatgagg ataaatgtgg aatcgttata attcttaaga atatatattc
301 cctctgagtt tttgatacct cagattttaa ggcc
    
```

Figura 2. Ejemplo de secuencia de uno de los alelos del microsatélite D7S820, en posición 7q21.11, en la que se aprecian 15 repeticiones del motivo “GATA”, subrayadas.

En los minisatélites el núcleo repetitivo presenta entre 7 y 100 nucleótidos, llegando a alcanzar una longitud total de 500 a 30.000 nucleótidos. Por su parte, los microsatélites presentan un núcleo repetitivo entre 1 y 6 nucleótidos y la longitud final puede variar entre 100-500 pb (*Figura 2*). Podemos observar una comparativa de los tamaños de fragmentos de mini- y microsatélites en la figura 3 (Modificado de Butler *et al*²⁴).

Los minisatélites se localizan mayoritariamente en las regiones

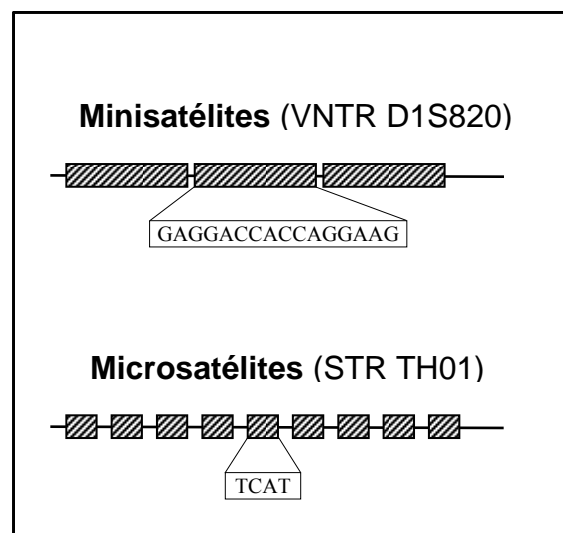


Figura 3. Esquema del ADN repetido en tándem. En el esquema superior está representado un minisatélite, con un núcleo de repetición de 16 pb repetido en 3 bloques. En la parte inferior, un microsatélite, con un núcleo de 4 pb repetido 9 veces consecutivas.

subteloméricas de los cromosomas, y suelen estar implicadas en la replicación de esta región terminal. A diferencia de los minisatélites y el ADN satélite, los microsatélites se encuentran ampliamente repartidos por todo el genoma, pero no se localizan en los genes sino en regiones intergénicas o en intrones. Aquellos que se encuentran en intrones se transcriben en ARNm, si bien no se traducen a ningún tipo de proteína, mientras que los de regiones intergénicas no llegan siquiera a transcribirse^{25;26}. Su función se desconoce, aunque algunos autores sugieren que algunos microsatélites concretos pueden tener algún papel en la regulación de la expresión génica e incluso participar en la patogenia de algunas enfermedades²⁶⁻²⁹.

Los *loci* microsatélite tienen muchos alelos presentes en las poblaciones, teniendo por tanto una elevada variabilidad entre individuos y haciendo que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto para un *locus* dado normalmente sea superior al 70%. Esta variabilidad permite a los microsatélites ser la base de la mayoría de sistemas de tipificación de ADN utilizados en la metodología científica

1.5 Sistema de Histocompatibilidad

Generalidades

El sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) constituye el complejo principal de histocompatibilidad humano. Está compuesto por un conjunto de proteínas denominadas antígenos de histocompatibilidad presentes en la membrana celular, que se caracteriza por su extraordinario grado de variabilidad de unos individuos a otros. Esta variabilidad depende de dos factores: 1) poligenia (diversos antígenos codificados por distintos genes) y 2) polimorfismo (cada uno de los genes presenta múltiples alelos). La

combinación de ambos hace del sistema HLA el sistema genético más complejo del ser humano.

En realidad, el término “antígenos de histocompatibilidad” no es del todo correcto ya que en realidad son presentadores de antígenos. Sin embargo, antes de que se conociera su verdadera función fisiológica se observó que, en animales de experimentación, la supervivencia de los trasplantes era mayor cuanto mayor fuese la similitud entre donante y receptor en relación con estos antígenos, y de ahí su nombre. En el ser humano se descubrieron en los leucocitos y por eso se denominaron antígenos leucocitarios humanos. En general, el sistema genético que codifica a este tipo de antígenos, observado en casi todos los vertebrados, se conoce como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de *major histocompatibility complex*). Las moléculas HLA juegan un papel central en la respuesta inmunitaria frente a antígenos extraños así como en la selección positiva y negativa de los linfocitos T inmaduros frente a péptidos propios (autoantígenos); los linfocitos T sólo reconocen y pueden responder frente a antígenos peptídicos que se han generado en el interior de las células. Estos antígenos derivan de patógenos que se replican dentro de las células o de patógenos externos que luego las células internalizan. En todos los casos, y por mecanismos distintos, los patógenos sufren en el interior de la célula un proceso de degradación del que derivan fragmentos peptídicos. A medida que se van formando, estos péptidos extraños se combinan en el citoplasma con los antígenos de histocompatibilidad formando complejos que se transportan a la superficie celular para su presentación y reconocimiento por los linfocitos T, lo que constituye el punto de partida de la respuesta inmune.

Estructura, organización genética y función del complejo HLA

Todos los genes del sistema HLA se hallan situados en una región cercana al centrómero en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31-6p21.32). La región abarca una distancia de unos 4.1 Mb y contiene más de 200 *loci*. Los *loci* están agrupados físicamente en tres regiones, llamadas clase I, clase II y clase III (Figura 4). Los *loci* de clase I se hallan más cerca de la zona telomérica que los de clase II.

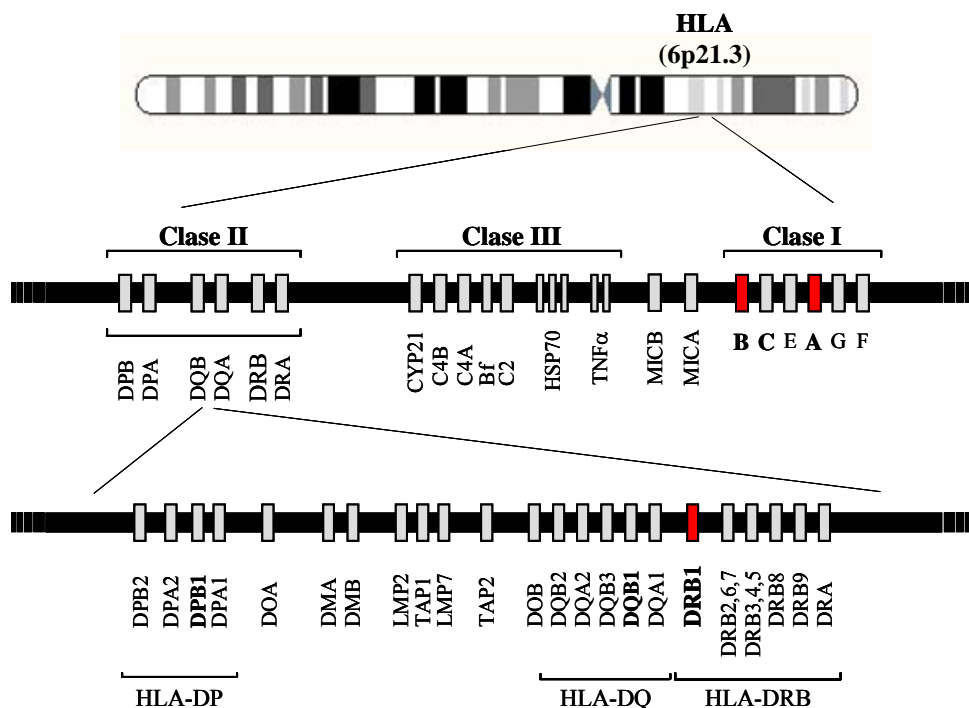


Figura 4. Representación de los distintos genes situados en la región 6p21.3. Se muestran en negrita los genes empleados en el trasplante alogénico (-A, -B, -DRB1, DQB1 y DPB1), resaltándose en rojo los tres empleados en el emparentado.

La región de clase I codifica genes de la cadena pesada de las moléculas clásicas de trasplante, HLA-A, -B, -C, los genes no clásicos HLA-E, -F, -G, MICA, MICB, un número largo de pseudogenes de clase I y otros genes, algunos de los cuales tienen una función desconocida (IMGT/HLA^{30;31}, más detalles en el anexo I). La región de clase II contiene los genes que codifican las cadenas α y β de los cinco tipos de moléculas de clase II: HLA-DR, DQ, DP, DP y DM. En esta región hay también otros 4 genes que

intervienen en el procesamiento de antígenos; PSMB8 y PSMB9 codifican componentes del proteosoma responsables de transformar proteínas en péptidos; TAP1 y TAP2 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. 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*). 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.

Este grupo de genes tiene herencia mendeliana 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 (*Figura 5*).

Todas las proteínas del sistema HLA se localizan en la membrana plasmática en forma de dímeros, presentando su mayor parte al exterior de la

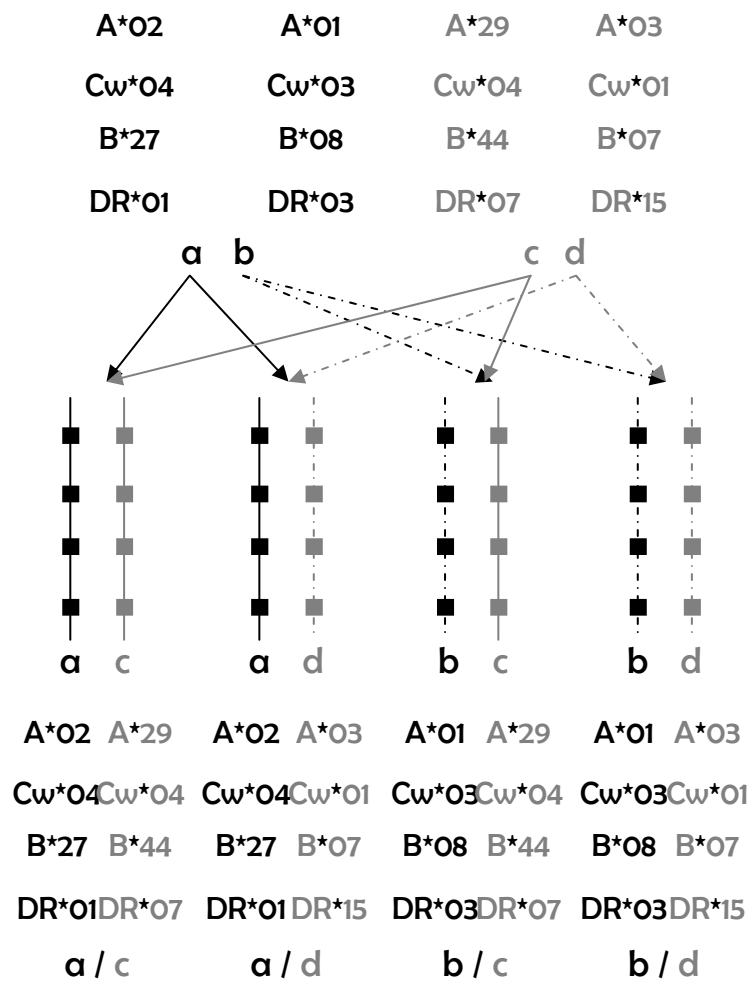


Figura 5. Herencia de haplotipos HLA.

covalentemente en el surco entre las dos cadenas alfa. La cadena ligera, constituida por la molécula β -2-microglobulina, se une mediante interacciones no covalentes al dominio α 3. Este dominio contiene una región conservada de unión a la molécula CD8 del linfocito T. Un esquema de esta estructura puede observarse en la Figura 6A³².

Las moléculas de clase II, a diferencia de las de clase I, están constituidas por dos polipéptidos transmembrana, cada una con dos dominios extramembrana (α 1 y α 2, β 1 y β 2) unidos mediante enlaces no covalentes. Interactúan para formar un surco a la cara exterior (formado por los dominios α 1 y β 1) que, al igual que en las moléculas de clase I, es el lugar de unión del péptido, si bien estos son de mayor tamaño (12-24 aa). Asimismo, el dominio β 2 contiene una región conservada de unión a la molécula CD4 del linfocito T (Figura 6B). Al contrario del origen endógeno de los péptidos unidos a moléculas de clase I, los fragmentos antigénicos (péptidos) unidos a moléculas de clase II derivan de antígenos de origen exógeno. Las moléculas extracelulares son internalizadas por endocitosis. Los endosomas se fusionan con lisosomas y su contenido es digerido parcialmente. Los fragmentos resultantes se colocan en moléculas de clase II y retornan a la superficie celular.

Presentación de antígenos

Las moléculas HLA de clase I se encuentran en casi todas, si no en todas, las células nucleadas. Por el contrario, las moléculas de clase II sólo se expresan en ciertos tipos de células especializadas en el procesamiento y presentación extracelular de antígenos a los linfocitos T, tales como macrófagos y linfocitos B. Además, los fragmentos de antígenos mostrados por las moléculas de clase I se generan por

macromoléculas sintetizadas dentro de la célula, mientras que las de clase II son moléculas adquiridas en el exterior de la célula.

Las moléculas HLA presentan fragmentos de antígenos a diferentes subpoblaciones de linfocitos T, la mayoría de los cuales pertenecen a uno de los dos subtipos CD4+ ó CD8+. Ambos subtipos de linfocitos tienen un receptor de antígenos (TCR) que reconoce un epítipo del antígeno presentado. Además de la interacción de la molécula de HLA con el TCR, es necesaria la participación de las moléculas CD4 y CD8. Así, las moléculas CD8 de los linfocitos T CD8+ se unen a un sitio localizado únicamente en las moléculas de histocompatibilidad de clase I (dominio $\alpha 3$), mientras

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

Tabla 2. Breve descripción de las moléculas clásicas del sistema HLA.

que las moléculas CD4 de los linfocitos T CD4+ se unen al dominio $\beta 2$, exclusivo de las moléculas de histocompatibilidad de clase II. Un resumen de las principales características de las moléculas clásicas de clase I y II que intervienen en el reconocimiento y respuesta inmune se encuentra en la tabla 2.

Nomenclatura

En la actualidad hay en uso dos formas de nomenclatura HLA: Serológica: establecida en 1975 y modificada en 1984, se basa en las especificidades (epítopos) de los productos de los genes HLA definidos por técnicas inmunológicas serológicas o

celulares. 2) Molecular: establecida en 1987 y se basa en alelos definidos por secuenciación.

Las técnicas serológicas y celulares son técnicas inmunológicas que detectan determinantes o epítomos de los productos genéticos del HLA. Cuando un epítomo se da en más de un producto genético HLA se definen grupos de alelos más que alelos individuales. Este fenómeno creó al principio un proceso denominado “*splitting*”.

Por ejemplo, el HLA-A10, reconocido como nueva especificidad en 1970, fue considerado como un producto genético distinto. De hecho, el antisuero que definía el HLA-A10 en realidad reconocía un epítomo público o con reactividad cruzada, común a varias especificidades más concretas. Después se vio que el suero reaccionaba con varias subpoblaciones específicas de células A10 que se podían distinguir unas de otras con otros antisueros (A25, A26, A34 Y A66). Estas subpoblaciones fueron denominadas “*splits*” o especificidades “subtípicas” que quedaban incluidas en la especificidad A10, más amplia (Figura 7). Los *splits* en realidad son productos genéticos HLA concretos que parecen compartir epítomos comunes definidos serológicamente.

Así, podemos definir al *splitting* como el descubrimiento de productos genéticos que previamente se creían eran únicos que en realidad son múltiples mediante el empleo de procedimientos moleculares genéticos o bioquímicos con mayor poder de

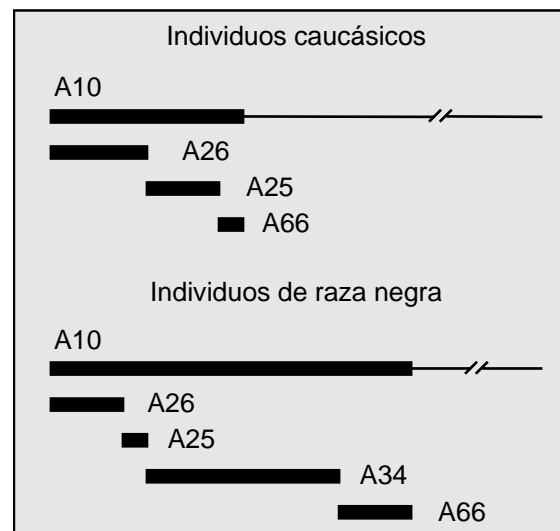


Figura 7. Splits definidos serológicamente para el HLA-A10. Las líneas gruesas representan la frecuencia relativa del A10 y de sus splits en poblaciones norteamericanas. La frecuencia del antígeno A10 en blancos y negros norteamericanos es del 15% y 28%, respectivamente.

discriminación. Este proceso todavía continúa.

En la nomenclatura molecular los alelos específicos son designados mediante un asterisco seguido de un número de hasta 7 dígitos (*Tabla 3*). Los dos primeros dígitos indican la especificidad serológica más estrechamente relacionada, si bien recientemente se utilizan para indicar la similitud estructural de nuevos alelos con los miembros de un grupo ya definido, incluso aunque estos puedan no ser serológicamente similares o la serología no esté clara. Los dígitos tres y cuatro definen la especificidad alélica. Por ejemplo, la especificidad serológica HLA-A1 en realidad comprende más de 45 alelos distintos³¹, que se denominarían desde HLA-A*0101 hasta HLA-A*0145. Hay que destacar que estas variantes alélicas diversas, definidas por secuenciación, son análogas al proceso de “splitting” previamente descrito para las especificidades descritas por serología. La nomenclatura de ciertos alelos contienen un 5º y 6º dígito, como el HLA-Cw*020201 y *020202, en la que dichos dígitos indican que hay dos o más variantes por una sustitución nucleotídica silente, en la que se cambia una base sin que tenga repercusión en la secuencia aminoacídica. La nomenclatura de algunos alelos puede tener un 7º y un 8º dígito para indicar que hay polimorfismos en una región no codificante del alelo. Cuando se encuentra una variante alélica por alteración de la secuencia en una región nucleotídica no codificante los dígitos 02 se añaden a la designación, quedando la 01 como la normal y la 02 como la polimórfica. Por último, se pueden añadir una N o una L de forma opcional en algunos alelos, en los que la N indica que el producto no es expresado (N) o es expresado con un nivel muy bajo (L). En la tabla 3 se puede ver un ejemplo de esta nomenclatura.

Nomenclatura	Indica
HLA	Región HLA y prefijo para un gen HLA
HLA-DRB1	Un <i>locus</i> particular de HLA, por ejemplo, DRB1
HLA-DRB1*13	Un grupo de alelos que codifican el antígeno DR13
HLA-DRB1*1301	Un alelo específico HLA.
HLA-DRB1*1301N	Un alelo nulo
HLA-DRB1*130102	Un alelo que difiere por una mutación sinónima
HLA-DRB1*13010102	Un alelo que contiene una mutación fuera de la región codificante
HLA-DRB1*13010102N	Un alelo nulo que contiene una mutación fuera de la región codificante

Tabla 3. Ejemplos de especificidad en función del número de dígitos en la nomenclatura.

Cuando se lleva a cabo un tipaje HLA molecular en ADN, la nomenclatura molecular debería asignarse de acuerdo con el nivel de discriminación del procedimiento empleado. Si el procedimiento no es capaz de discriminar entre variantes moleculares del HLA-A2, por ejemplo, lo apropiado es asignar al resultado la nomenclatura HLA-A*02. El estudio con los dos primeros dígitos se denomina baja resolución, ya que no llegan a discriminar entre alelos, pero permite definir entidades de similitud estructural. Los estudios de alta resolución permiten discriminar entre alelos, y se identifican con el tercer y cuarto dígito.

Molécula	Locus	Especificades serológicas	Alelos (ADN)
HLA-A	A	28	893
HLA-B	B	59	1431
HLA-C	C	10	569
HLADR	DRA+DRB1	21	3 + 814
HLA-DP	DPA1+DPB1	6	28 + 136
HLA-DQ	DQA1+DQB1	9	35 + 106

Tabla 4. Número de alelos descritos y validados a Octubre de 2009 de las moléculas clásicas de HLA de Clase I y Clase II (datos de IMGT/HLA)

El sistema HLA es probablemente el sistema genético más polimórfico del ser humano, y prueba de ello son los más de 3.000 alelos descritos hasta la fecha (*Tabla 4^{30;33}*).

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 los distintos alelos HLA se heredan en haplotipos, por lo que los alelos de diferentes *loci* no se asocian al azar. Así, se observa una asociación más frecuente de ciertos alelos con otros en comparación con la frecuencia que cabría esperar si la asociación fuera aleatoria en base a sus frecuencias alélicas, lo que se conoce como desequilibrio de unión. Este hecho permite la presencia de haplotipos más frecuentes. Además, la frecuencia de los distintos alelos varía entre poblaciones.

2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

2.1. Generalidades

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es una modalidad terapéutica útil que permite potencialmente curar enfermedades neoplásicas, así como enfermedades no malignas de células sanguíneas tanto hereditarias como adquiridas³⁴ (*ver Anexo II*).

El TPH ha revolucionado el tratamiento de las hemopatías malignas ya que constituye la mejor opción terapéutica para numerosos pacientes con estas enfermedades³⁵ (*ver Anexo III*). Su eficacia se basa en la erradicación de las células tumorales mediante la administración de altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia previa a la infusión de progenitores hematopoyéticos sanos obtenidos de médula ósea (MO), sangre periférica (CPSP) ó cordón umbilical (CU) procedentes bien del mismo

paciente (trasplante autólogo)³⁶, o bien de un donante familiar o no emparentado (trasplante alogénico)³⁷⁻³⁹, que a su vez, ejercen un efecto inmunomodulador sobre las células neoplásicas residuales.

La base para la realización del TPH procede del laboratorio y de las observaciones clínicas de que la mayoría de las neoplasias hematológicas presentan una sensibilidad relacionada con la dosis de quimioterápicos o de radioterapia⁴⁰. La toxicidad medular es el limitante de dosis para la mayoría de estos tratamientos, lo que hace que la infusión de células hematopoyéticas pluripotenciales de la MO, de SP o del CU permita la administración de dosis muy altas de quimioterapia o radioterapia, que en otras circunstancias no sería posible. 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 quimioterapia³⁴, si bien estas reacciones inmunológicas son recíprocas, del injerto contra su nuevo huésped y las propias del huésped frente al injerto⁴⁰. En el caso del TPH alogénico, la ausencia de identidad inmunológica entre donante y receptor tiene tres consecuencias fundamentales en el uso del trasplante alogénico como inmunoterapia:

1. Tras el trasplante, el receptor genera un ataque inmunológico contra el injerto, lo que puede conllevar su rechazo.
2. Las células inmunocompetentes en el injerto reaccionan contra las células normales de los tejidos del receptor, lo que puede desencadenar la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Para la aplicación segura del trasplante alogénico

esta reacción tiene que ser controlada y por ello son imprescindibles las medidas que lo garanticen (inmunosupresores).

3. Las células del injerto atacan a las células tumorales residuales, el denominado efecto injerto contra tumor (EICT).

Por último, se van a producir otros dos fenómenos alorreactivos: el establecimiento de quimerismo, al existir en el receptor del injerto células provenientes de dos individuos distintos, y la tolerancia post-trasplante.

2.2 Rechazo de injerto

El rechazo está mediado primordialmente por células T residuales del receptor con especificidad antidonante (anti-injerto). Estas células residuales del receptor son a su vez diana de las células T del donante. Así, al eliminar las células T residuales del receptor se favorece el injerto (*Figura 8a*). En el caso de TPH alogénico (alo-TPH) con depleción de células T del donante o con regímenes no mieloablativos, el rechazo puede prevenirse mediante acondicionamientos que incluyan terapias específicas linfotóxicas (p.ej. anticuerpos específicos antilinfocíticos, ciclosporina, prednisona, anti-CD52 o fludarabina).

2.3. Enfermedad Injerto Contra Huésped

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) constituye la principal complicación del trasplante alogénico y es la responsable de la elevada morbilidad y mortalidad que se observa tras este procedimiento.

Las poblaciones de células T del donante en el injerto contienen células T alorreactivas que se activan y proliferan al reconocer antígenos menores o mayores de histocompatibilidad específicos en las células del receptor, produciendo una actividad citolítica que contribuye al desarrollo de EICH (*Figura 8b⁴¹*).

Hay dos principios fundamentales para situar la EICH en el contexto clínico en el que se produce:

- i) La EICH no es una enfermedad *per se* sino que es la consecuencia de los exagerados, aunque normales, mecanismos inflamatorios fisiológicos que ocurren en un marco en el que no son deseables. Los linfocitos que han sido infundidos en el receptor se comportan de forma apropiada al ambiente en el que han sido situados.
- ii) En el alo-TPH, los linfocitos del donante son infundidos en un huésped que previamente ha sufrido un daño intenso: los efectos de la enfermedad de base, las infecciones previas y los regímenes de acondicionamiento dan lugar a cambios proinflamatorios sustanciales en las células endoteliales y epiteliales.

Así pues, las células de los donantes encuentran no sólo un ambiente extraño sino que además ha sido alterado debido al acondicionamiento, que favorece la activación y proliferación de células inflamatorias mediante sobreexpresión de HLA, moléculas de adhesión, citocinas y moléculas de reconocimiento de la membrana celular.

Los órganos diana de la EICH apoyan la íntima relación entre infección y EICH. La piel, el intestino delgado y el hígado comparten una importante exposición a endotoxinas y otros productos bacterianos que inician y aumentan la inflamación local.

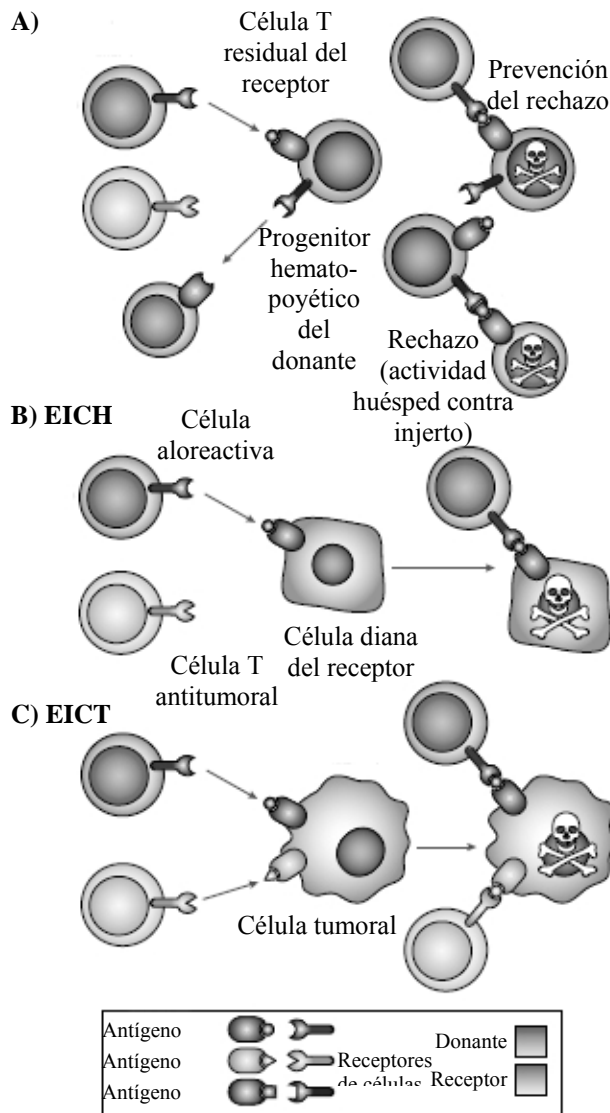


Figura 8. Actividad específica de antígeno de las células T de receptor y donante en A) Rechazo de injerto B) EICH C) EICT (Modificado de van den Brink. 2002).

Esta exposición los distingue de otros órganos como corazón o riñones que no son diana de la EICH. El pulmón en cambio es un órgano en controversia; aunque no es una diana clásica de la EICH, hay muchas evidencias de que comparte con piel, intestino e hígado cierta susceptibilidad a este proceso. Estos órganos, por su situación como primera barrera ante las infecciones, tienen numerosas poblaciones de células presentadoras de antígenos, como macrófagos y células dendríticas, que pueden realzar la EICH.

Enfermedad injerto contra huésped aguda y crónica

Según la secuencia temporal de aparición hay dos formas de EICH: enfermedad injerto contra huésped aguda (EICHa) y crónica (EICHc). La primera sería aquella que ocurre en la fase precoz postrasplante alogénico, clásicamente antes del día +90 postrasplante, y la EICHc aquella que se desarrolla a partir del día +90. Sin embargo, no es sólo el momento lo que distingue a estos dos procesos sino que las manifestaciones

son diferentes en una y otra, aunque afecten a los mismos órganos. Así, los órganos diana fundamentales de la EICHa son el intestino, donde se manifiesta en forma de diarrea, náuseas y vómitos, la piel, donde se produce eritema y otras lesiones que pueden abarcar casi toda la superficie cutánea, y el hígado, con ictericia obstructiva, identificable por un aumento importante de bilirrubina y discreto de transaminasas. La afectación mucosa y pulmonar en esta fase es muy rara. En la EICHc la piel se afecta de manera similar a lo que ocurre en los procesos crónicos como la esclerodermia o el vitíligo. Además se afecta el tejido subcutáneo en forma de tenosinovitis crónica, la mucosa ocular en forma de queratoconjuntivitis sicca y la mucosa bucal en forma de liquen. A nivel pulmonar se puede producir bronquiolitis obliterante.

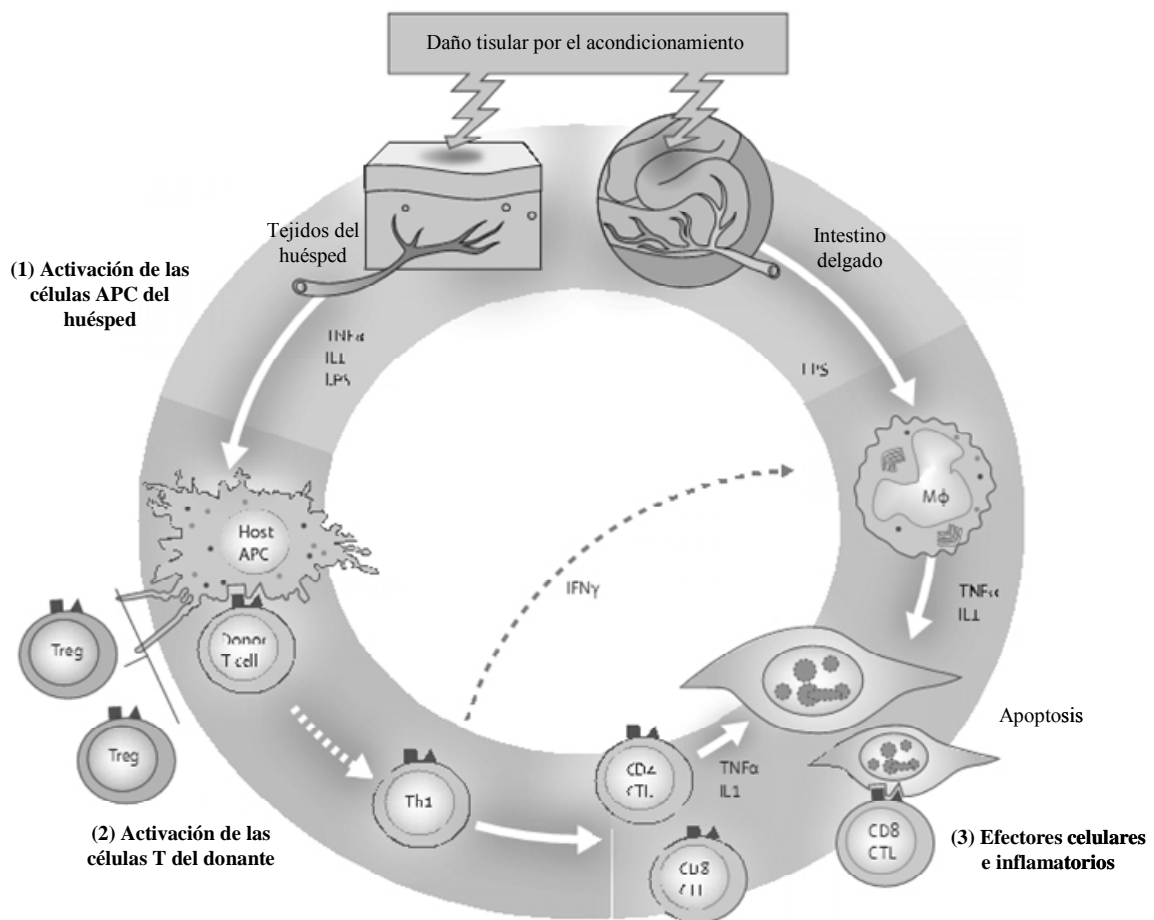


Figura 9. Representación esquemática de los mecanismos moleculares implicados en la producción de la EICHa (Modificado de Ferrara, 2009)

Las moléculas efectoras que intervienen en la EICHa y en la EICHc son distintas. En la EICHa se conoce el papel fundamental del TNF α como citocina inflamatoria, la interleucina 1 (IL-1), la IL-6 y la IL-8. Por el contrario, en el desarrollo de la EICHc se producen aumentos inusuales de citocinas como IL-4 e interferón gamma (IFN γ), en ausencia de IL-2, y todo a través de linfocitos T autorreactivos más que células T que reconozcan aloantígenos como ocurriría en la EICHa.

Fisiopatología de la EICH aguda – Puede dividirse en tres fases consecutivas, según el modelo de Ferrara⁴² (*Figura 9*):

I. Activación de las células presentadoras de antígeno (APC) – La infusión se realiza en un receptor que ha sido dañado profundamente por la enfermedad de base, por infecciones previas y por el régimen de acondicionamiento, que provocan cambios proinflamatorios sustanciales en células endoteliales y epiteliales. En particular, el daño tisular derivado del régimen de acondicionamiento permite liberar citocinas tales como el TNF α , IL-1, IL-6 y factores de crecimiento como el GM-CSF que aumentan la expresión de moléculas de adhesión, antígenos del sistema HLA y moléculas coestimuladoras en células APC del huésped. Ello promueve el reconocimiento del HLA del receptor o antígenos menores de histocompatibilidad (mHA) en los tejidos del huésped por parte de los linfocitos T del donante. Además, el daño ejercido en la mucosa intestinal provoca el paso a la circulación sistémica de productos microbianos como lipopolisacárido (LPS), que favorecen la activación de las APC del huésped, aparte de actuar como potentes activadores de la liberación de citocinas (ya en la fase efectora). El tejido linfático secundario del tracto gastrointestinal (GI) parece ser el sitio inicial de interacción entre las células APC activadas y los linfocitos T del donante.

II. **Activación de los linfocitos T del donante** – Incluye la presentación de antígenos por las APC del huésped y el reconocimiento por las células T del donante, con la consiguiente activación, proliferación, diferenciación y migración de las células T. En esta fase juegan un papel fundamental las APC del huésped y la activación de la transcripción de múltiples citocinas y moléculas efectoras (la denominada tormenta de citocinas), entre las que se encuentran IL-2, IL-12, IFN γ , LFA, MIP α , CD44, B7-CD28, protein kinasa C y tirosin kinasas. La migración de los linfocitos T y otros leucocitos se ve favorecida por el aumento de expresión de moléculas de adhesión por la liberación de quimiocinas producida por el daño tisular de la primera fase⁴³.

III. **Fase efectora** – Efecto citolítico de células citotóxicas (natural killer (NK) y linfocitos T citotóxicos) y de efectores inflamatorios como TNF α e IL-1, mediado por 3 mecanismos efectoras: ruta Fas/Fas ligando, ruta perforina/granzima B y daño directo mediado por citocinas:

- *Ruta Fas/Fas ligando* - La interacción del ligando Fas expresado en la superficie de los linfocitos T citotóxicos con el receptor Fas en la membrana de la célula diana da lugar a la activación de la cascada de las caspasas que implica la muerte de la célula por apoptosis.
- *Ruta perforina/granzima B* - La perforina forma poros en la membrana de la célula que permiten el paso de la granzima B que provoca la muerte celular.
- *Daño directo mediado por citocinas* - Por último, citocinas como TNF α , IL-1, IFN γ y TRAIL pueden considerarse los mediadores finales de los fenómenos de citotoxicidad.

Por su parte, el LPS que liberan los microorganismos en la fase I promueve a los tejidos del receptor y al sistema macrofágico previamente estimulado por $\text{IFN}\gamma$ a secretar citocinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ ó IL-1. El tracto GI es particularmente susceptible al daño mediado por $\text{TNF}\alpha$, que actúa a tres niveles: activando las APC favoreciendo la presentación de aloantígenos, induciendo al sistema macrofágico a la liberación de quimioquinas que activan neutrófilos, lo que aumenta la inflamación, y causando necrosis tisular directa.

Avances recientes indican que existen otras células que pueden intervenir y modular la fisiopatología de la EICH⁴⁴⁻⁵⁰. Así, se ha descrito que distintos subtipos de linfocitos T reguladores (T_{reg}) del donante ejercerían una función supresora de la EICH por un mecanismo aún no bien definido, en el que inhibirían la proliferación de linfocitos T aloreactivos y la producción de citocinas⁴⁷. Asimismo, estos T_{reg} modularían la función de las células dendríticas (DC) deteniendo de forma directa su maduración⁴⁶. Igualmente, se ha observado un efecto inmunosupresor de las células mesenquimales (MSC) infundidas como tratamiento para la EICH. Al interactuar con los linfocitos T activados, las MSC aumentarían la expresión de óxido nítrico (ON) que inhibe la proliferación de linfocitos T tipo Th1 via inhibición de la fosforilación de STAT5, sin causar los efectos adversos del ON al producirse este de manera local y tener un tiempo de vida reducido⁴⁴. Finalmente, las células *natural killer T* (NKT) tipo 1 (invariante o iNKT) tanto del receptor como del donante parecen proteger de la EICH mediante secreción de citocinas que induce la proliferación de linfocitos T tipo Th2^{49;50}.

Fisiopatología de la EICH crónica – La fisiopatología de la EICHc se conoce peor que la de la EICHa. La EICHa se presenta como un síndrome inflamatorio que afecta básicamente a piel, tubo digestivo e hígado de forma restringida. Por el contrario,

la EICHc tiene características clínicas que se parecen o imitan a las observadas en las enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia y artritis reumatoide. La formación de anticuerpos es un fenómeno común, lo que proporciona evidencia de que la EICHc se puede atribuir, al menos en parte, a las células autorreactivas del donante. Aunque en la mayoría de los pacientes la EICHc se desarrolla en el contexto de una EICHa preexistente, una cuestión aún por resolver es cómo la EICHa que está desencadenada por las células T autorreactivas del donante evoluciona a la EICHc, donde se especula que son las células T autorreactivas del donante las que juegan el papel protagonista en la fisiopatología de este síndrome. Así, se cree que las células T CD4+ postmíticas tienen un papel importante en la EICHc y la activación de distintos subgrupos de células T “helper” (Th1 vs Th2) podría ser responsable de las distintas manifestaciones de la EICHc.

2.4 Efecto injerto contra tumor

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 antígenos específicos del tumor. Los dos grupos, al reconocer las células tumorales ejercen una actividad citolítica mediando el EICT (*Figura 8c*).

El EICT está íntimamente asociado al desarrollo de la EICH. Dado que se desea controlar ésta última y potenciar el EICT, es necesario desarrollar estrategias que desunen los dos efectos^{40;42}. La separación de los efectos letales ocasionados por la EICH de los efectos beneficiosos y deseables del EICT representa el mayor desafío para ampliar la utilidad del alo-TPH como tratamiento de las neoplasias hematológicas.

Existen numerosos estudios que intentan caracterizar y separar la EICH del EICT, bien abordando la identificación de antígenos específicos de una y otro, bien explorando posibles diferencias en las vías efectoras de la citotoxicidad. Hasta ahora los experimentos en modelos animales se han basado en el diseño de ratones con deficiencias en los mecanismos de vigilancia inmune más relevantes en el desarrollo de la EICH/EICT, a los que se trasplanta y posteriormente se manipula con múltiples citocinas. Así, se conocen diferentes moléculas cuya inhibición o incentivación conseguiría una disminución de la EICH sin dañar o perjudicar el EICT. No obstante, la aplicación de resultados de modelos animales, diseñados para estudiar fenómenos concretos, al modelo humano entraña una gran dificultad para interpretar en conjunto la estrecha interrelación de todos los fenómenos inflamatorios, citotóxicos y de apoptosis que participan en la EICH/EICT^{37;40}.

El centro del problema radica en si es posible favorecer una remisión completa de larga duración para una enfermedad mortal aminorando los efectos de la EICH aguda y crónica. Desgraciadamente, la separación “limpia” del EICT y de la EICH ocurre en una minoría de los casos, e incluso en los casos con separación clínica, muchos autores piensan que la respuesta anti-tumor procede de una “reacción” EICH subclínica. Todo ello contribuye a la necesidad de conocer mejor las moléculas y los mecanismos celulares implicados en la producción de la EICH y del EICT.

3. Polimorfismos genéticos en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos

3.1 Sistema HLA

HLA y trasplante

Debido a su papel relevante en la presentación antigénica, la principal aplicación del conocimiento del sistema HLA desde su descubrimiento ha sido la selección de donantes adecuados para trasplante tanto de progenitores hematopoyéticos como de órganos sólidos y para transfusión.

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. En caso de compatibilidad HLA, las células T alorreactivas del donante presentan una menor actividad frente a las células del receptor, y por tanto el riesgo de desarrollar EICH es más reducido que cuando existe incompatibilidad cruzada. Pero también el EICT es menos acusado y por tanto aumenta el riesgo de recaída respecto a la incompatibilidad HLA (*si bien todo ello depende de la intensidad de los vectores injerto contra huésped, o huésped contra injerto*)^{51;52}. Además, los familiares directos presentarán mayor similitud genética que individuos no emparentados, por lo que portarán menor número de incompatibilidades en antígenos menores de histocompatibilidad (mHLA, ver sección 3.3 Otros polimorfismos) y reduciendo por tanto el riesgo de desencadenar la EICH.

La probabilidad teórica de tener un hermano HLA idéntico es de $1-0.75^n$, siendo n el número de hermanos. Aunque en el cálculo no se consideran factores tales como posibles mutaciones y/o entrecruzamientos, en la práctica estos son escasos (<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. 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. Sin embargo, 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*). Para aumentar la probabilidad de localizar un donante compatible no emparentado se hace fundamental la implantación de registros *de donantes voluntarios de progenitores hematopoyéticos*.

Registros de donantes voluntarios

Durante poco más de una década, la mayoría de los tipajes HLA se han

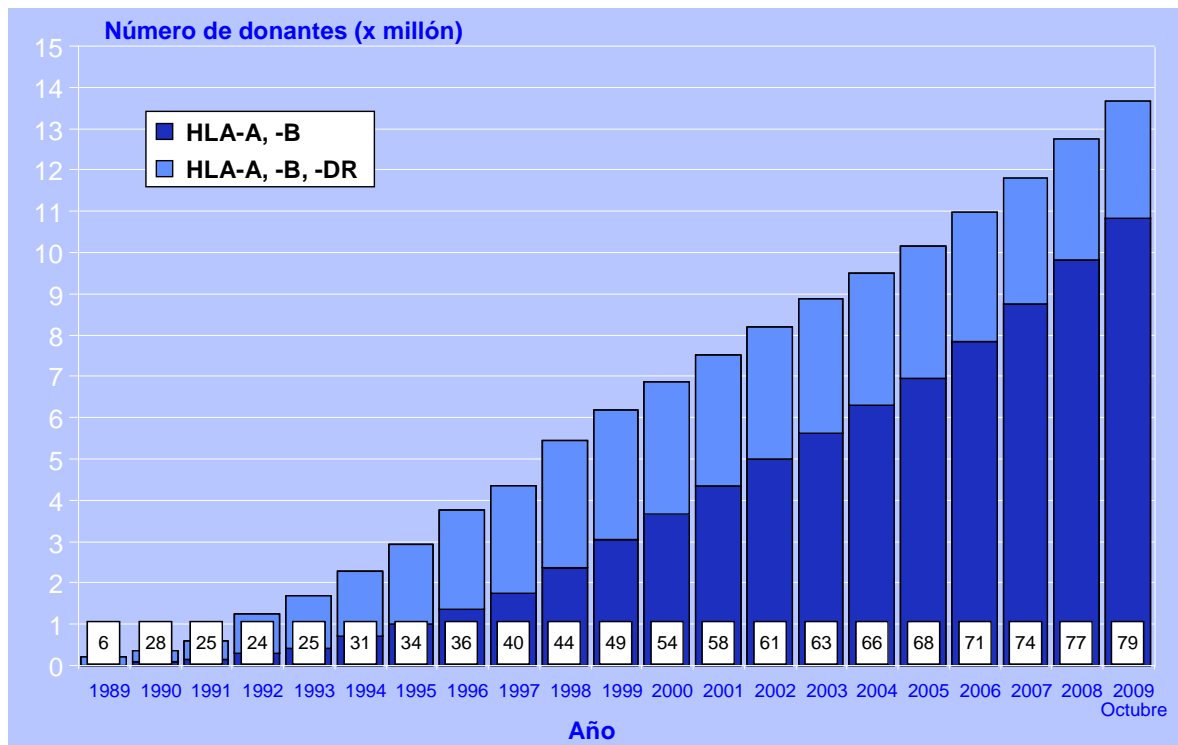


Figura 10. Evolución del número de donantes y tipajes realizados a nivel mundial de los polimorfismos HLA-A y HLA-B (azul oscuro) y los que también tienen -DR tipado (azul claro). En los cuadros a pie de columna, porcentaje de donantes con el tipaje HLA-A, -B y -DR realizados respecto del total (modificado de BMDW, <http://www.bmdw.org>).

desarrollado dentro del contexto de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos con el doble objetivo de construir registros de donantes voluntarios y desarrollar la búsqueda de pacientes que precisaran un donante compatible⁵³. Así, se creó la Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW)⁵⁴, que recopila la información de todos los registros nacionales y coordina la búsqueda de donantes a nivel internacional, siendo la red española de donantes de médula ósea (REDMO)⁵⁵ la que ejerce estas funciones a nivel nacional.

Hoy en día están tipados 13.981.906 donantes válidos para HLA-A y HLA-B, provenientes de 63 registros de células stem y 43 bancos de cordón en todo el mundo, 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, datos actualizados a 22 de Diciembre de 2009), habiéndose realizado por tanto más de 10 millones de test HLA para las clases I y II en un periodo corto de años únicamente para este propósito⁵³ (*Figura 10*).

Algunos registros reclutan sus donantes de una única población bastante homogénea, mientras que otros están compuestos de contribuciones de distinto origen étnico. En cualquier caso, el conocimiento de las frecuencias de haplotipos y de parámetros genéticos relacionados con la población son relevantes tanto para el planteamiento estratégico de los registros de donantes⁵⁶, como para tomar decisiones en el proceso de búsqueda de donante para pacientes individuales en los que haya un impacto potencial en su tratamiento. De esta manera, la descripción de los haplotipos más frecuentes de cada región (frecuencia igual o superior al 1% en la población) es fundamental en la búsqueda de donantes HLA compatibles, ya que cuando se prevén dificultades para localizar un donante no emparentado compatible y el paciente presenta un haplotipo frecuente, está indicado realizar de forma simultánea a 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 (red española de donantes de médula ósea, REDMO). Una vez disponibles, estos parámetros pueden ser también utilizados para otros propósitos prácticos y científicos, como estudios de genética de poblaciones entre otras aplicaciones⁵⁷.

Las recomendaciones del 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 la alta resolución también en uno o varios loci. Esto ocurre cuando uno de los padres es homocigoto para un *locus* o bien si no se dispone de los haplotipos de los padres, ya que hay que comprobar la posibilidad de una recombinación (ver figura 11).

Padre	$\frac{A^*0201 / B^*2701/DRB1^*0101}{A^*0204 / B^*0701/DRB1^*1401}$	$\frac{A^*0201/B^*2701/DRB1^*0101}{A^*0102/B^*4401/DRB1^*1301}$	Paciente
Madre	$\frac{A^*0102/B^*4401/DRB1^*1301}{A^*1801/B^*0801/DRB1^*0301}$	$\frac{A^*0204/B^*2701/DRB1^*0101}{A^*0102/B^*4401/DRB1^*1301}$	Hermano

Figura 11. Ejemplo de un caso con aparente compatibilidad a nivel de baja resolución (tanto del paciente como del hermano se obtendría un tipaje A*02,B*27,DRB1*01) que resultan ser incompatibles en el *locus* A (A*0201 vs. A*0204) por una recombinación de los haplotipos paternos.

HLA y enfermedad

Además de su empleo en la selección de donantes apropiados para alo-TPH, se ha demostrado que el sistema HLA desempeña un papel importante en la susceptibilidad a diversas enfermedades, particularmente aquellas que cuentan con una base inmunológica o autoinmune.

Podemos utilizar como modelo la enfermedad celíaca (EC), ya que el desarrollo de la misma está estrechamente relacionado con genes específicos del sistema HLA. Se cree que la causa de la enfermedad es una respuesta inmune anormal al gluten, muy probablemente iniciada por la activación de células T en la mucosa intestinal por péptidos derivados del gluten. En este caso, los alelos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 presentarían eficientemente el péptido dando lugar a la reacción de las células T. Así, el 90-95% de los pacientes con enfermedad celíaca tienen el alelo HLA-DQ2, y la mayoría de los restantes el HLA-DQ8. Sin embargo, en la población general el 30-40% de los individuos presentan uno de estos alelos, por lo que la presencia de estos alelos por sí misma no es suficiente para desarrollar la enfermedad, y por tanto existen otros factores implicados aún desconocidos. Sin embargo, la ausencia de ambos alelos sí es útil por su elevado valor predictivo negativo⁵⁸.

Otro ejemplo contrastado es la asociación observada entre el alelo HLA-B27 y el desarrollo de espondilitis anquilosante (EA), siendo la asociación más fuerte descrita hasta la fecha para cualquier locus HLA. El 90-95% de los pacientes con EA presentan al menos un alelo HLA-B27, cuya presencia en población sana tiene una frecuencia inferior al 1%. Hay que añadir que la enfermedad puede darse aún en ausencia del HLA-B27, incluso otros alelos HLA pueden predisponer al desarrollo de la enfermedad de manera independiente o conjunta con HLA-B27 (por ejemplo, HLA-B60). Así, existen otros genes fuera del HLA que confieren susceptibilidad a la enfermedad⁵⁹.

Del mismo modo, el sistema HLA podría intervenir en el desarrollo o control de enfermedades neoplásicas, bien por una presentación más eficiente o defectuosa de los antígenos tumorales por determinados alelos HLA. En este sentido, existen datos preliminares que asocian la presencia de un determinado alelo de HLA y la

predisposición a padecer un determinado tumor así como con la mayor o menor agresividad clínica y el pronóstico del tumor⁶⁰⁻⁶³.

3.2 *Microsatélites*

Los STR son esenciales en la ciencia forense, siendo los marcadores aplicados en la identificación de individuos tanto en estudios de paternidad, como en casos delictivos, desastres en masa o genética de poblaciones, entre otras aplicaciones. En medicina, la principal utilidad de los microsatélites estriba en la monitorización de trasplantes mediante el análisis del quimerismo hematopoyético, mostrándose útil tanto para estimar el correcto injerto de las células del donante como para evaluar una potencial recaída.

Como hemos visto, el trasplante conlleva la interacción de los sistemas inmunológicos de donante y receptor, y del resultado de la interacción (grado de quimerismo hematopoyético) depende en gran medida el éxito del mismo. Por una parte, los linfocitos T del donante pueden reconocer como extrañas las células del receptor, pudiendo atacar los tejidos sanos del receptor desencadenando la EICH. Pero el ataque también se puede producir sobre las células tumorales residuales que puedan permanecer, produciendo el EICT. Por otra parte, la coexistencia de células de donante y receptor favorece la tolerancia inmunitaria recíproca donante/receptor y disminuye la incidencia de la EICH. Sin embargo, la persistencia de células del receptor puede provocar el rechazo del injerto. De la misma manera, un quimerismo inestable, con porcentajes crecientes de células del receptor y/o la presencia de enfermedad mínima residual (EMR) se asocia a recaída hematológica.

El seguimiento cuantitativo del quimerismo hematopoyético se ha mostrado útil para evaluar tanto el buen prendimiento del injerto como para la predicción de recaída de la enfermedad de base. Esto le confiere gran importancia para el correcto manejo clínico del paciente transplantado, ya que permite el diagnóstico precoz de fenómenos que condicionan la morbi-mortalidad post-trasplante, favoreciendo una actuación terapéutica precoz y, por tanto, más efectiva.

El grado de quimerismo hematopoyético depende de diversos factores, como la intensidad del régimen de acondicionamiento, el empleo de estrategias de depleción celular, el número de células stem infundidas, la enfermedad de base, el momento en el que se realiza el estudio, el tipo celular analizado o la sensibilidad de la técnica. Por todo ello, la presencia de quimerismo mixto (*denominado de esta manera cuando coexisten células hematopoyéticas tanto del donante como del receptor*) debe interpretarse en relación al contexto de cada paciente.

3.3 Otros polimorfismos

Los genes del sistema HLA son los principales genes polimórficos implicados en el desarrollo de EICH. Sin embargo, aún en el contexto de una identidad HLA completa, existen otros factores genéticos que pueden contribuir o favorecer la aparición de EICH. Dentro de estos factores genéticos podemos encontrar antígenos menores de histocompatibilidad, citocinas proinflamatorias, enzimas implicadas en el metabolismo de drogas, genes de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (complejo KIR) y proteínas relacionadas con el sistema inmune innato⁶⁴⁻⁶⁸.

Antígenos menores de histocompatibilidad (mHLA)

Los mHLA son péptidos procedentes de la degradación natural de proteínas endógenas del proteosoma que son capaces de generar respuestas inmunitarias en caso de disparidad^{69;70}. Suelen tener dos alelos, uno de los cuales será capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria cuando es presentado a los linfocitos del donante de forma restringida por una molécula de HLA, siempre y cuando el donante no tenga este alelo en su dotación genética.

Tenemos el ejemplo del péptido HA-1, expresado en células presentadoras de antígeno (células dendríticas, de Kupffer en el hígado, de Langerhans en la piel o macrófagos en el intestino delgado), presentado restrictivamente por las moléculas de HLA-A*0201 y -A*0206⁷¹. Un polimorfismo situado en la posición 504 del gen *HA-1* modifica la estructura del péptido, codificando bien una histidina (HA-1^H) o bien una arginina (HA-1^R). Así, la presencia de HA-1^H en el receptor sin que esté presente en el donante produce EICHa moderada (grados II-IV) sin que desencadene EICHc, siendo la presencia de EICHa previa el principal factor de riesgo para desarrollar EICHc⁷². Una explicación a este hecho podría ser la respuesta de linfocitos T citotóxicos que reconocerían como extraño el complejo HLA-A*0201-06/HA-1^H, produciendo una respuesta inflamatoria mediante citotoxicidad directa y liberación de citocinas proinflamatorias (Th1), favoreciendo por tanto el desarrollo y la severidad de la EICHa sin inducir una respuesta Th2, característica de la EICHc⁷².

Se han descrito otros antígenos mHLA que podrían estar implicados en el desarrollo de EICH, aunque la información disponible es escasa y aún no está contrastada⁶⁹.

Polimorfismos de citocinas pro- y antiinflamatorias

La liberación de citocinas es un factor decisivo en el desarrollo de la EICH. En la actualidad se sabe que una vez producido el fenómeno de alorreconocimiento, la reacción que da lugar a la EICH aguda está mediada por la secreción de citocinas, tanto pro- como antiinflamatorias, como IL-1, IL-2, IL-6, IL10, TNF α , factor de crecimiento tisular (TGF β) o IFN γ . En este sentido, se han descrito determinados polimorfismos en los genes que codifican estas citocinas en el donante y/o en el receptor que pueden dar lugar a un aumento o descenso en la secreción de las mismas⁷³, influyendo en el desarrollo de la EICH^{74;75}.

Un ejemplo lo podemos ver en los polimorfismos localizados en la región promotora del gen de la citocina antiinflamatoria IL-10, que es una potente supresora de TNF α , IL-1, IL-1 β , IL-6, IL12 e IFN γ , por lo que favorecería la inducción de tolerancia tras trasplante alogénico⁶⁶. Así, la presencia en el receptor del alelo A en el SNP-592 que identifica al haplotipo T-C-A-T-A⁶⁶, se ha relacionado con una menor severidad de EICH aguda y menor riesgo de mortalidad no relacionada con el trasplante tras alo-TPH⁶⁶.

Genes de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (complejo KIR, de *Killer Immunoglobulin-like Receptor*)

Los genes del complejo KIR pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y codifican proteínas de membrana que se expresan en células NK. Son receptores de alelos concretos de HLA I (básicamente HLA-B y HLA-C) y dan lugar a una señal de regulación (inhibición o activación) de las células NK⁷⁶. Así, la célula NK se activará si una célula presenta un alelo HLA de distinto grupo o bien carece de HLA de superficie (mecanismo de escape tumoral a respuesta de linfocitos T). En alo-TPH con disparidad

HLA (básicamente HLA-C, en no emparentados) puede producirse una ausencia de reconocimiento de las células del receptor por las células NK del donante. Esto activa las células NK destruyendo las células del receptor, lo que favorece por tanto el desarrollo de EICH como la eliminación de EMR y reduciendo la probabilidad de recaída tras el trasplante⁷⁷.

Enzimas implicadas en el metabolismo de drogas

Dentro del campo de la inmunofarmacogenética se han estudiado polimorfismos en drogas empleadas tanto en la profilaxis de EICH como en los regímenes de acondicionamiento. Así, SNPs dentro de la enzima 5,10-metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), una enzima central del metabolismo del ácido fólico, afectan a la sensibilidad de los pacientes a drogas inhibitoras del metabolismo del ácido fólico como el metotrexato. Ello puede modificar la respuesta a estrategias de profilaxis y por ellos estos polimorfismos han sido relacionados con una mayor incidencia de EICH^{78;79}. Otros polimorfismos, como los de los genes de la familia del citocromo P450 (como *CYP2B6*, que altera el metabolismo de la ciclofosfamida,) o en el gen de resistencia a drogas *MDR-1* (que puede alterar la farmacocinética de la ciclosporina) se asocian a una mayor toxicidad relacionada con el trasplante⁷⁹ o a una peor supervivencia⁸⁰.

Proteínas relacionadas con el sistema inmune innato

Los componentes de la pared celular de bacterias se han identificado como ligandos activadores de macrófagos y APCs, aumentando fuertemente la tormenta de citocinas de la EICH. Se ha descrito un grupo de receptores de estos componentes, formado principalmente por los receptores Toll-like y los NOD-like. Se han asociado polimorfismos dentro de estos receptores con una alteración de la función y con una

desregulación de la inflamación, y parecen tener un papel principal en muchas enfermedades inflamatorias⁸¹. Recientemente se ha observado la relación entre tres SNP del complejo CARD15/NOD2 (receptor NOD-like, relacionado previamente con la presencia de enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn⁸²) en el receptor o en el donante con el desarrollo de EICH aguda, EICH intestinal y mortalidad no relacionada con la enfermedad^{67;83}. Se especula que la inflamación producida por la alteración de CARD15/NOD2 podría afectar directamente a la reacción alogénica via APCs, o bien tener un efecto indirecto alterando la defensa epitelial contra bacterias.

Por otra parte, dentro de la superfamilia de hormonas esteroideas se incluyen el receptor de la vitamina D (VDR) y el receptor de estrógenos, que tienen marcados efectos sobre el desarrollo del sistema inmune⁸⁴⁻⁸⁶. Específicamente VDR se ha asociado con enfermedades autoinmunes⁸⁷. Se han descrito polimorfismos en el intrón 8 del gen del receptor de la vitamina D y en el intrón 1 del receptor α de estrógenos que se asocian a una mayor incidencia y severidad de EICH aguda y a una peor supervivencia tras alo-TPH^{88;89}.

Además, la migración de las células efectoras a través del endotelio vascular a los distintos tejidos diana, un paso fundamental para el desarrollo de EICH, se debe a las interacciones entre distintas moléculas de adhesión presentes en linfocitos y células endoteliales. Se ha observado que polimorfismos en moléculas de adhesión como LECAM-1 (CD62L ó L-Selectina) o PECAM-1 (CD31) podrían aumentar el riesgo de EICH aguda^{90;91}.

Por último, la activación de los linfocitos T requiere de la unión de moléculas coestimuladoras de APCs como B7 (CD80 ó CD86), con moléculas de linfocitos T como CD28 (estimulando la activación de linfocitos T) o CTLA-4 (inhibiéndola). Además, existe una forma soluble de CTLA-4 (sCTLA-4) que parece unirse a B7 y

bloquear por tanto la interacción B7-CTLA-4, impidiendo la inhibición de los linfocitos T. Se ha observado una expresión diferente de sCTLA-4 en función del genotipo del polimorfismo CT60 del gen *CTLA-4*. Así, el genotipo AA produciría mayor expresión de sCTLA-4, mientras que las combinaciones GA ó GG mantendrían una expresión más reducida. Recientemente se ha observado en pacientes sometidos a alo-TPH que la presencia del genotipo AA aumenta la severidad de EICHa. Por el contrario, el alelo G aumenta las tasas de recaída y mortalidad. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el sCTLA-4 bloquearía la interacción B7-CTLA-4, impidiendo la inhibición de los linfocitos T, promoviendo su activación y favoreciendo por tanto el desarrollo de EICH⁶⁸.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) constituye hoy día una estrategia terapéutica clave para la curación de numerosas hemopatías malignas. El desarrollo de acondicionamientos con menor toxicidad y el mejor control de la enfermedad injerto contra huésped (EICH), junto al desarrollo de herramientas efectivas para monitorizar el trasplante y el conocimiento cada vez más exhaustivo tanto de la EICH como del efecto injerto contra tumor (EICT), están permitiendo mejorar los resultados del alo-TPH, ampliando notablemente el número de indicaciones y de pacientes que pueden beneficiarse de este procedimiento. Sin embargo, a pesar de los avances en este terreno, cerca del 20-30% de los pacientes que reciben un alo-TPH fallecen de complicaciones derivadas del procedimiento, principalmente EICH. Incluso en el contexto del trasplante emparentado HLA idéntico, con una tasa de recividas no especialmente elevada (en torno al 20%), hasta un 80% de pacientes desarrollan EICH aguda y/o crónica.

El éxito del trasplante se basa en intentar obtener la mayor tasa de curaciones posibles a la vez que se intenta minimizar la toxicidad y complicaciones del procedimiento. Depende por tanto de la optimización de todos y cada uno de los factores que se pueden manipular antes, durante y después del trasplante.

Si bien la ausencia de identidad HLA es el principal factor de riesgo para el desarrollo de EICH, en el contexto de identidad HLA se incluyen factores clínicos de riesgo tales como la fuente de progenitores hematopoyéticos, la edad del receptor o del donante, donante mujer si el receptor es un varón, o el tipo de acondicionamiento (mieloablativo vs no mieloablativo), entre otros. Estos factores clínicos de riesgo junto con la inmunogenética podrían conducir al desarrollo de un índice clínico-pronóstico que ayude a la selección de los candidatos más idóneos como donantes, así como a

modificar los regímenes de acondicionamiento y a desarrollar tratamientos individualizados.

Además, un conocimiento más exhaustivo del papel del genotipo de receptor y donante en la aparición y severidad de la EICH puede ayudar en la selección del donante idóneo así como en el desarrollo de ensayos clínicos con nuevas drogas. Un ejemplo es Etanercept, una molécula recombinante que se une a TNF α soluble inhibiendo su acción, y que se muestra útil para el tratamiento de EICH y complicaciones pulmonares⁹². La presencia del genotipo GG del gen TNF α parece determinar una mayor efectividad del fármaco^{93,94}, si bien se precisan estudios más completos que certifiquen este efecto⁹⁵. Por otra parte, el sistema HLA como sistema de presentación antigénica, podría tener importancia en el desarrollo y/o control de ciertas neoplasias, por lo que se investigará su papel en los pacientes con mieloma múltiple, una de las neoplasias más representativas de nuestro centro.

A través del estudio que constituye el presente trabajo de Tesis doctoral, hemos pretendido contribuir a mejorar el conocimiento y optimización del trasplante alogénico emparentado HLA idéntico, y para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

1. SISTEMA HLA

- 1.1 Describir las frecuencias genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos HLA de clase I y clase II en la población de Castilla y León a nivel de baja resolución (dos dígitos). Este estudio permitirá disponer de i) los haplotipos más frecuentes de nuestra región, de utilidad en la búsqueda de donante HLA compatible entre los familiares de segundo grado y ii) una población control de referencia para estudios de asociación.
- 1.2 Comparar la distribución de los polimorfismos HLA en la población de Castilla y León con las de otras regiones de la Península Ibérica, así como con las de otras poblaciones mediterráneas y europeas.
- 1.3 Analizar la influencia del sistema HLA en la predisposición y pronóstico de la enfermedad en pacientes con Mieloma Múltiple sometidos a distintos esquemas de tratamiento incluyendo el alo-TPH.

2. MICROSATÉLITES (STRs)

- 2.1 Describir las frecuencias genotípicas de los polimorfismos STR en la población de Castilla y León. Este estudio permitirá disponer de una población control de referencia para estudios de asociación.
- 2.2 Comparar la distribución de los polimorfismos STR en la población de Castilla y León con las de otras regiones de la Península Ibérica, así como con las de otras poblaciones mediterráneas y europeas.

- 2.3** Evaluar el valor de la monitorización del quimerismo hematopoyético analizado mediante polimorfismos STR en pacientes sometidos a alo-TPH emparentado HLA idéntico con acondicionamiento no mieloablativo.
- 2.4** Analizar el valor de la disparidad de microsatélites entre donante y receptor y su relación con la evolución de los pacientes sometidos a alo-TPH emparentado HLA idéntico.

3. OTROS POLIMORFISMOS

- 3.1** Analizar el papel de polimorfismos en las moléculas de adhesión PECAM1 (CD31) e ICAM1 (CD54) en pacientes sometidos a alo-TPH emparentado HLA idéntico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SUJETOS DEL ESTUDIO

La descripción de los pacientes y controles incluidos en este proyecto doctoral se realizará de forma separada de acuerdo con el tipo de estudio realizado.

1. SISTEMA HLA

- **POBLACIÓN 1: Donantes sanos**

Grupo de 1818 individuos caucásicos sanos provenientes del registro de donantes de médula ósea de Castilla y León. Estas muestras se emplearon para el estudio de frecuencias de los genotipos y haplotipos HLA en la población de Castilla y León, así como para las comparaciones con otras regiones de la Península Ibérica, mediterráneas y europeas (objetivos 1.1 y 1.2).

- **POBLACIÓN 2: Pacientes con Mieloma Múltiple (MM)**

Esta población incluye un grupo de 181 enfermos con dos formas clínicas evolutivas de MM: 128 MM sintomáticos homogéneamente tratados según el protocolo GEM-2000 del grupo español de mieloma (GEM/PETHEMA) y 53 MM quiescentes que no reciben tratamiento. Como grupo control se tomará la población 1 perviamente descrita. En estos pacientes se analizó la distribución y la influencia pronóstica del *loci* de clase II en estos dos grupos de enfermos con MM. Además, específicamente en el grupo de 34 MM sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) se analizó el papel del HLA de clase I y clase II en su evolución clínica-pronóstica (objetivo 1.3).

2. MICROSATÉLITES (STRs)

- **POBLACIÓN 3: Donantes sanos**

Formada por 277 sujetos caucásicos sanos con nacimiento confirmado en alguna de las provincias de la comunidad. Estas muestras se utilizaron en el estudio de frecuencias de microsatélites en la población de Castilla y León, así como para las comparaciones con otras regiones de la Península Ibérica, mediterráneas y europeas (objetivos 2.1 y 2.2).

- **POBLACIÓN 4: Pacientes sometidos a alo-TPH de SP HLA idéntico con régimen no mieloablatoivo**

Constituida por 100 parejas donante/receptor, de pacientes sometidos a alo-TPH de sangre periférica con acondicionamiento no mieloablatoivo de donante emparentado HLA idéntico. Las muestras posttrasplante de estos pacientes fueron destinadas a evaluar el valor clínico-pronóstico de la monitorización del quimerismo hematopoyético analizado mediante polimorfismos STR (objetivo 2.3).

- **POBLACIÓN 5: Pacientes sometidos a alo-TPH de SP HLA idéntico**

Un total de 298 muestras provenientes de 149 receptores de trasplante alogénico emparentado HLA idéntico de progenitores hematopoyéticos y sus respectivos donantes conforman esta población. En estos pacientes se analizó si la disparidad de microsatélites entre donante y receptor se relaciona con su evolución clínica (objetivo 2.5).

3. OTROS POLIMORFISMOS

- **POBLACIÓN 6: Pacientes sometidos a alo-TPH de SP HLA idéntico**

Serie de pacientes alemanes analizados en el Hospital Clínico-Pediátrico de Frankfurt-am-Main (Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Klinik III). Se incluyen

muestras de 132 pacientes pediátricos receptores de trasplante alogénico emparentado HLA idéntico de progenitores hematopoyéticos y sus respectivos donantes, empleadas para el estudio de los polimorfismos de *PECAMI (CD31)*. Asimismo, un total de 90 pacientes pediátricos sometidos a alo-TPH y sus respectivos donantes se incluyeron para la evaluación de los polimorfismos de *ICAMI (CD54)* (objetivo 3.1). Este trabajo fue realizado por el doctorando durante su estancia en el mencionado hospital alemán como parte del programa del doctorado europeo.

2. MÉTODOS

2.1 – Obtención de ácidos nucleicos

La obtención de ADN se llevó a cabo a partir de muestra total de sangre periférica, médula ósea o en su caso de fracciones celulares purificadas. La purificación de las poblaciones celulares se realizó mediante separación celular por métodos inmunomagnéticos con el separador automatizado de partículas magnéticas AUTOMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). El posterior control de la pureza de las diferentes poblaciones celulares separadas se llevó a cabo mediante estudio de citometría de flujo. Esta metodología es práctica habitual de nuestro laboratorio y ha sido descrito extensamente previamente⁹⁶. Para extraer el ADN se utilizó DNAzol[®] (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

2.2 – Tipaje de HLA clase I y clase II

El estudio de antígenos de HLA clase I y II por baja resolución se realizó de acuerdo a los estándares de la “European Federation of Immunogenetics”⁹⁷, organismo que acredita a nuestra unidad.

La especificidad antigénica HLA-A y HLA-B se determinó utilizando la técnica estándar de microlinfocitotoxicidad, con antisueros monoclonales comerciales bien definidos (One- λ , Los Angeles, CA, USA). Los resultados son visibles tras lectura en microscopio de fluorescencia.

A su vez, los antígenos de HLA-DRB1 se determinaron por técnicas moleculares a partir de ADN mediante amplificación por PCR-rSSO (PCR inversa con sondas específicas de oligonucleótidos) empleando el *Lifecodes HLA-DRB1 Typing Kit*[®] (Tepnel Lifecodes Corporation, Stamford, CT, USA), según instrucciones del fabricante. El producto de PCR de los *loci* HLA amplificados se hibridó con microesferas que contienen las sondas de interés, revelándose la reacción con estreptavidina. Finalmente se realizó la lectura en el citómetro Luminex[®] XYP[®] (Tepnel Lifecodes Corporation) y se interpretaron los resultados mediante el programa informático Quick Type 2.4.2 (Tepnel Lifecodes Corporation).

Este mismo método fue el utilizado para la detección de especificidades poco comunes e imprecisiones serológicas para los loci HLA-A y HLA-B, empleando los kits comerciales *Lifecodes Class I Typing Kit*[®], según las indicaciones del fabricante. Se resumen los reactivos (A), las características de la reacción de PCR empleada (B) y el programa de hibridación (C) en los siguientes recuadros:

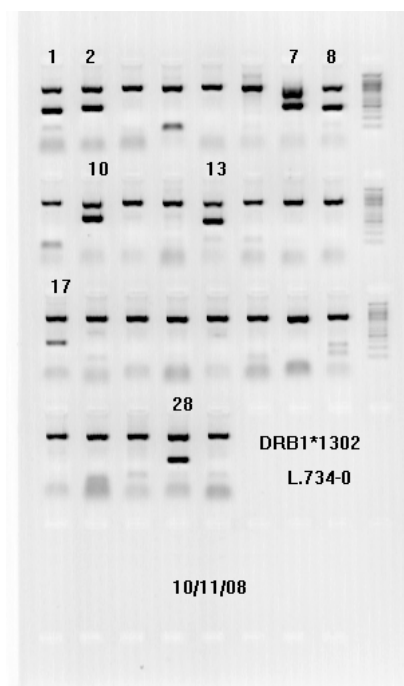
Lifecodes Class I/II Typing Kit										
A	<table border="0"> <tr> <td>Master Mix</td> <td>7.5 μl</td> </tr> <tr> <td>Taq Polimerasa</td> <td>1.5 Unidades</td> </tr> <tr> <td>ADN</td> <td>300-350 ng</td> </tr> <tr> <td>Volumen final</td> <td>25 μl</td> </tr> </table>	Master Mix	7.5 μ l	Taq Polimerasa	1.5 Unidades	ADN	300-350 ng	Volumen final	25 μ l	B
Master Mix	7.5 μ l									
Taq Polimerasa	1.5 Unidades									
ADN	300-350 ng									
Volumen final	25 μ l									
		<ul style="list-style-type: none"> ○ Desnaturalización inicial 95°C 5 minutos ○ 9 ciclos en tres etapas: <ul style="list-style-type: none"> ● Desnaturalización: 95°C 30 seg ● Hibridación: 60°C (1 ciclo) 63° (8 ciclos), 45 seg ● Extensión: 72°C, 45 seg ○ Extensión final de 15 minutos a 72°C 								
		C								
		<ul style="list-style-type: none"> ● Desnaturalización: 94°C 1 min, ● Hibridación: 47°C, 30 min, ● Extensión: 56°C, 45 min 								

En los casos de ambigüedades de HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1, estas pudieron resolverse por medio de una PCR-SSP de baja resolución, empleando el kit comercial *Dynal AllSett*[®] según las recomendaciones del fabricante (Dynal, Oslo, Norway). Se resumen los reactivos (A) y las características de la reacción de PCR empleada (B) en los siguientes recuadros:

PCR-SSP – Dynal AllSett [®]	
<i>Buffer</i>	1x
<i>Primers (HLA-X)</i>	1x
Taq Polimerasa (Lipa-Taq)	2.5 Unidades
ADN	50-500 ng
Volumen final	50 µl

- Desnaturalización inicial 96°C 2 minutos
- 10 ciclos en tres etapas:
 - Desnaturalización: 96°C 15 seg
 - Hibridación y extensión: 65°C, 60 seg
- 20 ciclos en tres etapas:
 - Desnaturalización: 96°C 10 seg
 - Hibridación: 61°C, 50 seg
 - Extensión: 72°C, 30 seg
- Extensión final de 10 minutos a 72°C

El producto de PCR es visible tras electroforesis en gel de agarosa (al 2% para HLA-A y -B o 3% para HLA-DRB1) tras tinción con bromuro de etidio. Cada locus amplificado tiene un tamaño específico: HLA-A: 1050 pb, HLA-B: 960 pb, y HLA-DRB1: 280 pb. En la imagen puede verse un ejemplo de resolución del locus HLA-DRB1.



2.3 – Amplificación y detección de regiones microsatélite

La amplificación de las regiones STR se llevó a cabo mediante PCR empleando el kit *PowerPlex[®]16*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, USA), con pequeñas modificaciones establecidas dentro del proyecto cooperativo europeo de Euroquimerismo en el que participó nuestro grupo (EUROCHIMERISM. Research Programme: QOL-2001. Concerted Action, Coordinador, Prof. T.Lion):

Gold STAR Buffer	1x
PowerPlex [®] 16 Primer Pair Mix	1x
TaqGold Polimerasa (Applied Biosystems)	2 Unidades
ADN	1-10 ng
Volumen final	10 µl

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático (Veriti Thermal Cycler / GeneAmp PCR System 9700 / 9600 [Applied Biosystems, Foster City, CA, USA]) según el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial 95°C 11 minutos
- 10 ciclos en tres etapas:
 - Desnaturalización: 94°C 30 seg
 - Hibridación: 60°C, 30 seg
 - Extensión: 70°C, 45 seg
- 20 ciclos en tres etapas:
 - Desnaturalización: 90°C 30 seg
 - Hibridación: 60°C, 30 seg
 - Extensión: 70°C, 45 seg
- Extensión final de 30 minutos a 60°C

La detección del producto de PCR obtenido se realizó mediante electroforesis en el secuenciador automático ABI Prism[®] 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), previo procesado del producto de PCR según las siguientes condiciones:

Formamida	9.7 µl
Internal Line Standard 600	0.3 µl
Producto de PCR	1 µl

El análisis de los STR se realizó mediante el programa informático GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

2.4 – Detección de polimorfismos en PECAM-1 (CD31) e ICAM-1 (CD54)

La detección de los polimorfismos SNP de CD31 y de CD54 se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Maas et al (Leukemia 2003), con pequeñas modificaciones, siendo las condiciones de la PCR las siguientes:

Primer Fw	600 nM	<ul style="list-style-type: none">○ Activación de la Taq 50°C 2 minutos○ Desnaturalización inicial 95°C 10 minutos○ 50 ciclos en dos etapas:<ul style="list-style-type: none">● Desnaturalización: 95°C 15 seg● Hibridación y extensión: 63°C, 60 seg○ Extensión final de 15 minutos a 72°C
Primer Rv	600 nM	
Probe	200 nM	
TaqMan Universal Master Mix	9 µl	
ADN	25 ng	
Volumen final	15 µl	

Los productos amplificados se analizaron mediante SDS software tras PCR en tiempo real en ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

2.5 – Análisis estadístico

Genética de Poblaciones

Las frecuencias alélicas y en su caso haplotípicas de los polimorfismos HLA y STR de la población de Castilla y León se estimaron mediante el algoritmo EM (expectation-maximization algorithm), empleando el programa informático Arlequin 3.0 (Excoffier, 2005). La desviación estándar de las frecuencias alélicas y haplotípicas se obtuvo mediante el procedimiento de bootstrap con 100 iteraciones. El equilibrio de Hardy-Weinberg (*principio que establece una distribución aleatoria de genotipos y por tanto un equilibrio genético de una población en ausencia de selección, mutación y/o migración*) se evaluó aplicando una cadena oculta de Markov modificada con una aproximación de 100.000 pasos, incluida en el programa Arlequin. Igualmente, se empleó el programa para estimar la máxima verosimilitud del análisis *multilocus*. Los dendrogramas se construyeron a partir de las frecuencias alélicas utilizando el método de Neighbor-joining para obtener las distancias genéticas entre poblaciones, mediante el programa informático *Genetic Distance and Phylogenetic Analysis*® (DISPAN; Pennsylvania State University, Philadelphia, PA, USA), que contiene los programas *GNKDST* y *TREEVIEW*. Además, este método fue empleado también para realizar los test bootstrap de los árboles filogenéticos y hallar la heterocigosidad media. El análisis y la representación en dos y tres dimensiones fueron llevados a cabo utilizando el programa informático Visuals Statistic System (VISTA), versión 5.05⁹⁸. El análisis provee una visión global de las relaciones entre poblaciones, y se basa en los cálculos de las variaciones de frecuencias alélicas entre poblaciones.

Parámetros forenses

En el estudio de las frecuencias de STR se incluyeron los parámetros de heterocigosidad observada y esperada, contenido en información de un polimorfismo, poder de discriminación, probabilidad de coincidencia, capacidad de exclusión y el índice típico de paternidad⁹⁹. Todos los parámetros son de interés en medicina legal y forense y con esta intención se incluyen en el estudio. El análisis estadístico se realizó con el programa informático Cervus 3.0¹⁰⁰. A continuación, describimos brevemente los parámetros analizados (para mayor información, consultar Lee *et al*, 1998¹⁰¹):

La heterocigosidad observada refleja la frecuencia de individuos heterocigotos encontrados en la población de estudio, mientras que la heterocigosidad esperada, estimación más precisa de la heterocigosidad en la población, se puede calcular a partir de las frecuencias alélicas observadas.

El contenido de información de un polimorfismo (PIC) se define como la probabilidad de que un genotipo de un marcador de un linaje dado permita la deducción, en ausencia de entrecruzamiento, del genotipo para ese marcador del pariente afectado.

El poder de discriminación (pD) de un polimorfismo nos da información de la capacidad del polimorfismo para diferenciar entre dos individuos distintos. La idea opuesta, es decir, la probabilidad de que dos individuos genotipados compartan el mismo genotipo para un marcador dado es lo que se denomina probabilidad de identidad (pM) o, visto de otro modo, nos da un valor acerca de cuántos individuos podrían genotiparse hasta obtener dos patrones de alelos idénticos. El único caso excluible a estos valores es el de los hermanos gemelos monozigotos, ya que comparten el mismo material genético y por tanto no pueden ser discriminados por ninguna prueba genética. Igualmente, el pD y la pM pueden calcularse para una combinación de marcadores.

El *poder de exclusión (PE)* es la capacidad que tiene un polimorfismo o un grupo de polimorfismos para excluir de manera efectiva a un padre alegado falsamente implicado en una prueba de paternidad.

Finalmente, el *índice de paternidad* muestra cuan probable es que el padre alegado sea el verdadero padre biológico comparado con un individuo seleccionado al azar. El *índice típico de paternidad (TPI)* es el aplicado a un determinado *locus*.

HLA y asociación

En el estudio de asociación, se empleó el test exacto de Fisher o el test de χ^2 para la comparación de frecuencias alélicas y fenotípicas entre poblaciones, por medio de los programas *GraphPad Prism 4.0*® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) o *Statistical Package for the Social Sciences Software*® (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA), corrigiendo la significación obtenida mediante la prueba de Bonferroni. La fortaleza de las asociaciones se estimó por medio de la Odds Ratio, y los intervalos de confianza al 95% se calcularon por el método de Cornfield, ambos análisis incluidos en el programa *GraphPad*.

Parámetros clínicos

El análisis estadístico de los parámetros clínicos de los diferentes estudios se llevó a cabo mediante el paquete estadístico *SPSS Software 15.0*. Así, la evaluación de variables de modo univariante se realizó mediante la comparación de curvas de supervivencia de acuerdo al método de Kaplan-Meier, usando el test de Log-Rank para estimar la significación estadística de las diferencias. Todas las variables que pudieran tener influencia en los parámetros en estudio de manera significativa ($p < 0.05$) o marginal ($p < 0.1$) se incluyeron en un análisis multivariante empleando el modelo de regresión de Cox.

RESULTADOS

RESULTADOS

En este apartado se presentarán las publicaciones a que ha dado lugar el presente trabajo de tesis doctoral como secciones independientes en tres bloques. Cumpliendo con la normativa de la Universidad de Salamanca, cada uno de ellos irá precedido de un resumen en castellano que contendrá tanto la introducción como el material y métodos empleados, los resultados obtenidos y la discusión de dichos resultados.

El orden de presentación de estos capítulos atiende a la aplicación de los polimorfismos en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), según se recoge en la introducción, es decir, 1) HLA, 2) Microsatélites, 3) Otros polimorfismos: Moléculas de Adhesión.

BLOQUE 1: ESTUDIOS DE HLA

El primer bloque recoge los estudios de HLA desarrollados en tres capítulos:

El primero de ellos describe la distribución de las frecuencias alélicas y haplotípicas de los polimorfismos HLA-A, -B y -DRB1 en nuestra población así como la comparación con otras poblaciones de la península ibérica: *HLA-A, -B and -DRB1 allele and haplotype frequencies in Castilla y León (northwest-central Spain) population: Comparison with other Iberian populations* (Sometido a publicación en Human Immunology).

En el segundo capítulo se evalúa el papel de los polimorfismos HLA en pacientes diagnosticados de Mieloma Múltiple (MM) candidatos a alo-TPH, analizando la posible asociación de un determinado alelo HLA con las formas clínicas evolutivas de los pacientes con MM

Finalmente (capítulo 3), en un grupo de pacientes con MM tratados homogéneamente se establece la asociación de la presencia del alelo DRB1*01 con una forma más indolente de la enfermedad, publicándose el trabajo en la revista *Tissue Antigens: The presence of DRB1*01 allele in multiple myeloma patients is associated with an indolent disease* *Tissue Antigens*. 2008 Jun;71(6):548-51

BLOQUE 2: MICROSATÉLITES

El segundo bloque recoge el análisis de regiones microsatélite, y está distribuido también en tres capítulos:

En el primero se describen las frecuencias alélicas de 15 STR en nuestra población así como la comparación con otras regiones y poblaciones cercanas. Este trabajo, *Allelic frequencies on 15 STR loci in Castilla y León (Northwest-Central Spain) population sample using Powerplex 16 system kit*, está sometido a publicación en *Forensic Science International: Genetics*.

En el segundo capítulo se describe la aplicación de los STR en el estudio de quimerismo hematopoyético, estableciendo un grupo de pacientes con alto riesgo de recidiva que les convierte en candidatos a un tratamiento inmunosupresor precoz. Los datos obtenidos han sido publicados: “*Valor de la evolución de quimerismo y de la discordancia en regiones STR en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida*”, que ha sido publicado en *Method. Find. Exp. Clin.*, 2008; 30 (supl. 1) 19-22”

Finalmente, en el tercer capítulo se describe la aplicación de la disparidad de STR entre donante y receptor observando la correlación entre un mayor número de disparidades con una peor evolución clínica de los pacientes. Este trabajo dio lugar a la publicación: *Clinical and prognostic value of discrepancies in microsatellite DNA*

regions between recipient and donor in HLA identical allogeneic transplantation setting
Transplantation, 2008 Oct;86(7):983-990.

BLOQUE 3: OTROS POLIMORFISMOS

En el tercer bloque se detallan los resultados obtenidos al analizar dos SNP en las moléculas de adhesión PECAM1 e ICAM1 en pacientes pediátricos sometidos a alo-TPH, sugiriendo que el genotipo del donante en PECAM1 podría estar asociado a una mayor severidad de EICH aguda. El manuscrito correspondiente a este trabajo (*CD31 (PECAM-1) donor genotype is associated with severity of acute graft-versus host disease after HLA identical sibling allogeneic transplantation*) está en preparación.

1. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y HAPLOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS HLA-A, -B y -DRB1 EN LA POBLACIÓN DE CASTILLA Y LEÓN: COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

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. Igualmente es fundamental en trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), 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. Además, cuando en la búsqueda de donantes para alo-TPH 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. Hasta la fecha no existe ningún estudio que comprenda a la población de Castilla y León. Para abordar este objetivo, en nuestro centro se emplea el listado de haplotipos frecuentes proporcionados por el REDMO, extraídos y recopilados de publicaciones de diversas regiones de España. Así, no se ha realizado un estudio sistemático para tal fin, habiendo regiones pendientes de analizar y pudiendo haber por tanto ausencias en el listado de haplotipos frecuentes de algunas regiones. 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.

Por otro lado, el análisis de la diversidad de frecuencias alélicas y haplotípicas puede emplearse para inferir relaciones entre poblaciones. En este sentido, en la Península Ibérica se han estudiado algunas regiones como Baleares, Cataluña, Madrid, Murcia, País Vasco o Portugal, así como algunas poblaciones aisladas (Valle del Pas, Valle de Arrieta y Cabuérnigo) o determinados grupos étnicos, como los Chuetas, (descendientes de la población judía de Mallorca), pero no hay datos de la región de Castilla y León.

En este trabajo se describen las frecuencias alélicas y haplotípicas de los polimorfismos HLA-A, -B y -DRB1 en la población de Castilla y León, comparando la distribución en la región con las de otras poblaciones de la Península Ibérica, mediterráneas y europeas, con un triple objetivo: 1) contribuir al conocimiento de la estructura genética de la Península Ibérica 2) establecer un listado de haplotipos frecuentes en nuestra población que nos permita definir en que caso sería necesario ampliar los estudios genéticos a los familiares de segundo grado para la selección de un donante emparentado y 3) disponer de una población control sana como base para estudios de asociación de polimorfismos HLA y enfermedad.

Para ello, se incluyeron un total de 1818 muestras de sangre periférica provenientes de donantes potenciales de médula ósea o donantes de órganos sólidos. Se incluyó un único miembro por familia para evitar sesgos genéticos por asociación familiar. La determinación de los alelos HLA se realizó a nivel de baja resolución (dos dígitos).

Se identificaron 21, 31 y 13 alelos distintos respectivamente para los genes HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1, mostrando las mayores frecuencias los alelos A*02, A*01, A*03, A*24, B*44, B*35, DRB1*07, DRB1*13 y DRB1*04. Además, se observaron diez haplotipos extendidos (A-B-DRB1) frecuentes.

Al examinar la relación genética entre Castilla y León 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. Por el contrario, éstas se encuentran estrechamente relacionadas entre sí, formando un mismo grupo, dentro del cual, Castilla y León se sitúa entre poblaciones portuguesas y otras poblaciones españolas. Los 10 haplotipos frecuentes hallados en nuestra población se han descrito previamente en otras poblaciones de la Península Ibérica, si bien dos de ellos sólo en poblaciones portuguesas. Varios de estos haplotipos asimismo son comunes en otras poblaciones europeas, mediterráneas y/o del norte de África.

En resumen, Castilla y León muestra una distancia genética intermedia entre poblaciones portuguesas y poblaciones de otras regiones españolas. Además, exhibe un origen común con otras poblaciones de la península Ibérica, en la que se observan componentes europeos, mediterráneos y norafricanos, hechos que concuerdan con la historia y el componente genético de la población.

Los dos haplotipos comunes descritos en nuestra población (*A*02,B*51,DRB1*11* y *A*02,B*18,DRB1*03*) que no se incluyen en las recomendaciones del REDMO se han incorporado y aplicado de manera inmediata en la selección de pacientes de nuestra región que puedan beneficiarse de la ampliación del tipaje a los familiares de segundo grado.

HLA-A, -B and -DRB1 allele and haplotype frequencies in Castilla y León (northwest-central Spain) population: Comparison with other Iberian populations

M. Alcoceba, L. Marín, A. Balanzategui, M.E. Sarasquete, M. C.Chillón, R. Corral, C. Santamaría. R. García-Sanz. J.F. San Miquel. M. González

Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

Key words

Human leukocyte antigen; population genetics; Castilla y León; Spain

Correspondence

Marcos González Díaz, MD, PhD
Servicio de Hematología
Hospital Clínico Universitario
Paseo de San Vicente 58-182
37007 Salamanca
Spain
Tel: +34 923 291629
Fax: +34 923 264743
e-mail: margondi@usal.es

Submitted for publication in Human Immunology

Abstract

HLA class I and class II allele and haplotype frequencies in 1818 Caucasian donors from Castilla y León population were determined and compared with other Iberian, Mediterranean and European populations. In the analysis 21, 31 and 13 alleles were found for HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1, respectively, with HLA-A*02, A*01, B*44, B*35, DRB1*07 and DRB1*13 showing the highest frequencies. Ten common extended haplotypes (>1%) were observed. Taking together haplotype distribution, dendrograms and component analysis, Castilla y León region is equidistant from Portuguese and other Spaniards and shares a common origin with other Iberian populations, in which European, Mediterranean and North-African genetic components are present, in agreement with the historical and genetic composition of the population. The present data contribute to the understanding of the genetic structure in the Iberian Peninsula.

Introduction

The human leukocyte antigen (HLA) system contains a large number of genes encoding cell membrane antigen-presenting proteins. It is located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3) and shows a very high degree of variability between individuals, being the most polymorphic loci in the human genome. Their function is the recognition and presentation of foreign antigens to T lymphocytes, the starting-point of immune response, and constitutes the major histocompatibility complex in humans.

The HLA system plays an important role in susceptibility of some diseases, such as ankylosing spondylitis or celiac disease(1;2), including haematological disorders like chronic lymphocytic leukaemia or multiple myeloma(3;4). On the other hand, it has a crucial role in transplantation, since the lack of HLA identity between recipient and donor can potentially cause

engraftment failure or rejection in the transplantation setting and, in case of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft-versus-host disease triggering(5). Thus, the main HLA application since its discovery is the proper donor selection for solid organ and haematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) (5), and with this aim world stem-cell donor registries were created (World Marrow Donor Association (WMDA)). Furthermore, in those patients with a frequent HLA-A,-B,-DRB1 haplotype, recommendations from the WMDA in the search for HSCT compatible HLA donors include the HLA typing in second-grade familiar in the branch who supports the less frequent haplotype.

Since HLA alleles and multilocus haplotypes are racially and geographically restricted and distributed in populations around the globe(6), the analysis of allele and haplotype frequency diversity can be used both to make inferences

about population relationships(6;7) and to facilitate the search for matched donors(8). There are several studies inferring populations relationships from comparisons of HLA allele and haplotype frequency distributions(9). Specifically, in the Iberian Peninsula previous studies have been carried out focusing on the areas of Basque Country, Catalonia, Madrid, Murcia, Portugal and on certain ethnic groups, such as Spanish Jews(12-18). However, this is the first time that HLA frequencies are studied in Castilla y León region, a natural bridge between Spanish Mediterranean region and Portugal.

Castilla y León region is located in the Spanish central plateau surrounded by three mountain ranges; at the north with the Cantabrian mountain range, the Central system at the southeast and the Iberian system at the east. The situation of this region within the Iberian Peninsula is illustrated in Figure 1. It covers an area of 94,223 km² with an official population of 2,557,330 according to the Statistical National Institute (INE 2008).

The first known settlements in modern-day Castilla y León region were established during Bronze Age and include a Ligur stratum and Celtic populations (mainly Arevaci, Astures, Vaccaei and Vettons, but also Turmodigi and Pelendones), with Lusitans and Carpetani as closer neighbours(10). Romans conquered this area during IInd century b.C. and it remained under Roman domain until the Germanic invasions at the end of the Western Roman Empire in Vth a.C.; firstly Alans and Suevs, who were then invaded by Visigoths. This group settled in the area until VIIIth a.C., when Arab invasion started. Many Berbers mercenaries came as soldiers, conquering all but the north of the Peninsula. Berbers were settled, between other places, in the poor territories of the Meseta.

The claims of discrimination toward Arabs, together with religious discrepancies, propitiated a Berber rebellion against Arabs leading to the depopulation of the territory. Between the VIIIth and IXth centuries the kings of Asturias took advantage of these circumstances and the lack of interest of Muslim rulers in northern territories to advance their borders to the south, taking some ancient but depopulated cities. They repopulated these newly acquired lands with settlers from their kingdom (Hispano-Romans and Visigoths) and Mozarab immigrants (arabized Hispano-Roman Christians from Muslim territories). By the XIth century, their successors, the kings of Castilla and of León, ruled over the entire modern day region of Castilla y León. In these centuries the migration from northern and southern Spain continued and a new population of "Francos" (Frenchmen, mainly from southern France, but also people from other European regions) was attracted by the concession of lands and privileges to settlers by Spanish kings(11).

The aim of the present study is to describe the allele frequencies on HLA class I and class II as well as the common extended haplotypes in Castilla y León population. These data will allow us to determine their genetic relationships with other Iberian, Mediterranean and European populations previously published, comparing the genetic data and its historical evolution. This type of study may help to increase the knowledge on the origin of Iberian populations based on the use of molecular techniques.



Figure 1 Castilla y Leon region location in Spain. Samples distribution within Castilla y León.

Table 1. Iberian populations included in the present study

Id.	Country	Population	n	Reference
1	Spain	Balearic Islands (Ibiza)	88	Crespí, 2002(12)
2		Balearic Islands (Majorca)	407	Crespí, 2002(12)
3		Balearic Islands (Menorca)	94	Crespí, 2002(12)
4		Basque C. (Arratia Valley)	83	Sánchez-Velasco, 2003(13)
5		Basque C. (Guipuzcoa)	101	Comas, 1998(14)
6		Basque C. (San Sebastián)	82	Martínez-Laso, 1995(15)
7		Cantabria (Cabuernigo)	95	Sánchez-Velasco, 2003(13)
8		Cantabria (North Spain)	83	Sánchez-Velasco, 2003(13)
9		Cantabria (Pas Valley)	88	Sánchez-Velasco, 2003(13)
10		Castilla y León	1818	Alcoceba, Present study
11		Catalonia (North Girona)	88	Comas, 1998(14)
12		Chuetas (Jewish-Spanish)	103	Crespí, 2002(12)
13		Madrid	176	Martínez-Laso, 1995(15)
14		Murcia	173	Muro, 2001(16)
15	Portugal	Azores (Oriental and Central Islands)	231	Spínola, 2005(17)
16		Madeira	185	Spínola, 2002(18)
17		Portugal Centre	50	Spínola, 2002(18)
18		Portugal North	46	Spínola, 2002(18)
19		Portugal South	49	Spínola, 2002(18)

Material and methods

Population Samples

Peripheral blood samples from 1818 consecutive Caucasian bone marrow potential donors and cadaver donors representative of the different provinces of the Castilla y León Region were collected. Only one representative member per family was included to avoid bias. The distributions per province were as follows: Avila (n=90 donors), Burgos (n=155), León (n=255), Palencia (n=101), Salamanca (n=570), Segovia (n=80), Soria (n=17), Valladolid (n=454) and Zamora (n=96) (Figure 1).

In addition, Iberian populations previously published (12-18) as well as other Mediterranean and European populations (19-30) were taken into account for genetic comparisons. The origin of all described populations used in the present study is detailed in Tables 1 and 2.

HLA Typing

Genomic DNA was isolated from whole peripheral blood leukocytes collected in EDTA using DNAzol method (MRC Inc., Cincinnati, OH, USA), as previously described(31).

HLA-class I (-A, -B) specificities were determined using the standard microlymphocytotoxicity method (One Lambda Inc., CA, USA) according to manufacturer instructions. In order to be able to detect the rare specificities and to confirm serologic blanks, polymerase chain reaction-reverse sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSOr; Inno-Lipa HLA, Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) and/or polymerase chain reaction sequence-specific primer (PCR-SSP, Dynal Biotech, Oslo, Norway) methods were also used as requested for HLA-A and -B loci. HLA-class II (-DRB1) typing was performed by PCR-SSOr and/or PCR-SSP methods. Homozygosity was confirmed by familial studies or by two alternative methods.

Table 2. Other Mediterranean and Western-European populations used for the present study

Id.	Country	Population	Ethnic	n	Reference
1	Albania	Tirana	Caucasian	160	Sulcebe, 2009(19)
2	Algeria	Algier	Arab	106	Arnáiz-Villena, 1997(20)
3	Austria	Austrian	Caucasian	200	Faé, 2007(21)
4	Belgium	Belgian	Caucasian	99	Andrien, 1997(21)
5	Croatia	Croatia	Caucasian	100	Zunec, 2005(21)
6	Czech Republic	Czech Republic	Caucasian	106	Zahlavova, 2002(21)
7	France	Grenoble + Nantes + Rennes	Caucasian (mainly)	6094	Alizadeh, 2008(21)
8	Germany	Germany	Caucasian	8904	Schmidt, 2009(22)
9	Greece	Crete	Caucasian	135	Arnáiz-Villena, 1999(23)
10	-	Thessaloniki	Caucasian	500	Lazidou, 2002(21)
11	Israel	Israel	Jews	23000	MHSHD, 2005(21)
12	Italy	Italy	Caucasian	159311	Rendine, 1998(24)
13	Jordan	Jordan	Arab	1798	Sánchez-Velasco, 2001(25)
14	Macedonia	Skopje	Caucasian	172	Arnáiz-Villena, 2001(26)
15	Morocco	El-Jadida	Berbers	96	Gómez-Casado, 2000(27)
16	Serbia	Serbian	Caucasian	386	Andric, 2007(21)
17	Tunisia	Tunisia	Arabs	104	Hajjej, 2006(28)
18	-	Tunisia	Berbers + Arabs	100	Ayed, 2004(29)
19	Turkey	Anatolia	Caucasian	228	Arnáiz-Villena, 2001(30)

Statistical analysis

Allele and haplotype frequencies were estimated by an expectation-maximization algorithm leading to maximum likelihood estimates of gene frequencies, using the Arlequin software package version 3.0(20). The standard deviations of allelic and haplotypic frequencies were obtained by a 100 bootstrap iterations procedure. Hardy-Weinberg equilibrium was tested applying a modified hidden Markov chain with 100,000 steps approach, as implemented in the Arlequin program. This software was also employed to estimate maximum multilocus likelihood, incomplete and extended haplotypic frequencies from genotypic data.

Dendrograms were constructed with the allelic frequencies by using the Neighbour-joining method to obtain the genetic distances between populations, and using the Genetic Distance and

Phylogenetic Analysis (DISPAN) software (<http://mep.bio.psu.edu/readme.html>, Pennsylvania State University, Philadelphia, PA, USA), which contains the GNKDST and TREEVIEW programs. This software was also used to obtain bootstrap tests from phylogenetic trees and average heterozygosity. The correspondence analysis and the three-dimensional representation were carried out by using the Visuals Statistic System (VISTA) computer program, version 6.4 (<http://homes.bio.psu.edu/people/Faculty/Nei/Lab/dispan2.htm>)(33) and the SigmaPlot 2000 v6.0 (Systat Software Inc, CA, USA), respectively. This analysis provides a global view of the relationships among populations, and is based on the calculation of the allelic frequency variance among populations

Results

The expected and observed genotype frequency values for all the loci studied were not significantly different and the population samples were in Hardy–Weinberg equilibrium, except for HLA-A and -DRB1 locus, and using Markov chain method ($p = 0.004$ and 0.015 respectively), but this significance was lost after Bonferroni correction. Thus, the significance found for HLA-A locus, may be due to random fluctuations in the multiple tests performed. The observed genotypes for the remaining HLA-B loci were found to obey the Hardy-Weinberg random mating principle, being p value: 0.77 for HLA-B. The estimated heterozygosity in Castilian-Leonese for HLA-A, -B, and -DRB1 loci was, respectively, 87.88% , 92.43% and 88.13% , similar to those observed in other European populations(34). Average heterozygosity was of 89.48% in Castilian-Leonese while 89.20% in Iberian populations (range $85.39-90.77\%$) and 89.04% in the other analyzed populations (range $86.68-91.24\%$)).

HLA class I (A and B) allelic frequencies in the Castilla y León population

Twenty-one different HLA-A alleles were detected, which distribution is on Table 3. In decreasing order, the most frequent HLA-A alleles were HLA-A*02 (26.6%), HLA-A*01 (10.7%), HLA-A*03 (9.9%) and HLA-A*24 (9.1%). The lowest frequencies ($<1\%$) were found in HLA-A*69, HLA-A*34, HLA-A*36, HLA-A*74, HLA-A*80. Finally, HLA-A*43 was totally absent in our population.

Thirty-one alleles were found for HLA-B (Table 3). The most frequent alleles were HLA-B*44 (17%) and HLA-B*35 (9.7%). The lowest frequencies ($<1\%$) were found in HLA-B*56, HLA-B*47, HLA-B*42, HLA-B*73, HLA-B*78, HLA-B*46, HLA-B*59 and HLA-B*48. HLA-B*54, HLA-B*67, HLA-B*81, HLA-B*82 and HLA-B*83 were not found in the study.

HLA class II (DRB1) allelic frequencies in the Castilla y León population

For DRB1 locus, 13 alleles were found, with HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*11 and HLA-DRB1*01 showing the highest frequencies ($>12\%$, Table 3). The lowest frequencies ($<2\%$) were found, in decreasing order, for HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*16, HLA-DRB1*12 and HLA-DRB1*09 alleles.

HLA partial and extended Haplotype frequencies in Castilla y León

The most frequent partial haplotypes ($>1\%$) obtained through HLA haplotype frequency analysis of the Castilla y León population are summarized in Table 4. The combinations for HLA-A and HLA-B with higher frequency were A*02,B*44, A*29,B*44, A*01,B*08 and A*02,B*51, and for HLA-B,DRB1 loci, the B*44,DRB1*07, B*08,DRB1*03 and B*18, DRB1*03 haplotypes.

Finally, Table 5 summarizes the ten most frequently extended haplotypes ($>1\%$) observed in Castilla y León population, where three of them, A*29,B*44,DRB1*07, A*01,B*08,DRB1*03, and A*30,B*18,DRB1*03 were clearly predominant.

Genetic distances and correspondence analysis

Phylogenetic trees were constructed and the corresponding genetic distances calculated with HLA–A, –B, and –DRB1 allele frequencies from Castilian-Leonese and 1) other Iberian populations (Figure 2), and 2) other Mediterranean and Western European populations (Figure 4). Allele frequency data of the populations used in the comparisons are those previously illustrated in Tables 1 and 2. The genetic distances (DA) between Castilian-Leonese and other populations are illustrated in Tables 6 and 7.

Regarding the comparison with other Iberian populations, taking together both DA and the resulting tree, it can be observed that: Balearic, Basque, Cantabria, Catalan, Madrid, Murcia and Portuguese populations are clustered together with Castilla y León population, whereas isolated populations (Cabuernigo, Chuetas, Pas Valley and Basques from Arratia) are clearly separated from the rest of the groups (Figure 2). In order to examine the genetic relations between Castilian-Leonese and other Iberian populations, in a way that could allow us to visualize which populations are nearest, correspondence analysis was performed. The 19 Iberian populations were included in the analysis, which illustrates that the isolated populations (Cabuernigo, Chuetas, Pas Valley and Arratia Basques) are clearly separated from the rest of the groups. The rest of Iberians constitutes a group of populations closer to each other, inside of which Castilian-Leonese are situated between Portuguese and other Spaniards (Figure 3).

Table 3. HLA-A, -B and -DRB1 allele frequencies estimated by maximum likelihood

Allele	Castilla y León (2n=3636)		Allele	Castilla y León (2n=3636)	
	Frequency	SD		Frequency	SD
A*01	0.10699	0.00465	B*07	0.07426	0.00443
A*02	0.26595	0.00695	B*08	0.06161	0.00381
A*03	0.09873	0.00527	B*13	0.01128	0.00193
A*11	0.07178	0.00453	B*14	0.06601	0.00435
A*23	0.04098	0.00338	B*15	0.04428	0.00299
A*24	0.09076	0.00469	B*18	0.08636	0.00500
A*25	0.01733	0.00210	B*27	0.02806	0.00278
A*26	0.04098	0.00336	B*35	0.09708	0.00442
A*29	0.07481	0.00439	B*37	0.01073	0.00178
A*30	0.05171	0.00345	B*38	0.03713	0.00307
A*31	0.02145	0.00233	B*39	0.0165	0.00207
A*32	0.03438	0.00340	B*40	0.03465	0.00294
A*33	0.02723	0.00254	B*41	0.01073	0.00176
A*34	0.00303	0.00104	B*42	0.0011	0.00057
A*36	0.00083	0.00045	B*44	0.16942	0.00601
A*43	0.00000	0.00000	B*45	0.0165	0.00223
A*66	0.00578	0.00121	B*46	0.00055	0.00039
A*68	0.04235	0.00423	B*47	0.00138	0.00055
A*69	0.00330	0.00094	B*48	0.00028	0.00025
A*74	0.00083	0.00048	B*49	0.04153	0.00350
A*80	0.00083	0.00054	B*50	0.02585	0.00255
			B*51	0.08196	0.00436
			B*52	0.01485	0.00203
DRB1*01	0.12239	0.00576	B*53	0.01238	0.00176
DRB1*03	0.12651	0.00568	B*54	0.00000	0.00000
DRB1*04	0.13586	0.00593	B*55	0.01238	0.00185
DRB1*07	0.14961	0.00587	B*56	0.00495	0.00115
DRB1*08	0.02613	0.00267	B*57	0.02503	0.00275
DRB1*09	0.00688	0.00144	B*58	0.01155	0.00191
DRB1*10	0.01623	0.00198	B*59	0.00028	0.00027
DRB1*11	0.12541	0.00579	B*67	0.00000	0.00000
DRB1*12	0.01018	0.00163	B*73	0.00083	0.00054
DRB1*13	0.14136	0.00572	B*78	0.00055	0.00038
DRB1*14	0.02750	0.00287	B*81	0.00000	0.00000
DRB1*15	0.09681	0.00472	B*82	0.00000	0.00000
DRB1*16	0.01513	0.00208	B*83	0.00000	0.00000

Standard deviations (SD) have been approximated by 100 bootstrap iterations.
n = number of individuals

Table 4. Most common HLA-A,B, -B,DRB1 multilocus haplotype frequencies found in Castilla y León population estimated by maximum likelihood

A,B haplotype	Frequency (2n =3636)	SD	B,DRB1 haplotype	Frequency (2n =3636)	SD
A*02,B*44	0.05607	0.00334	B*44,DRB1*07	0.06659	0.00416
A*29,B*44	0.04491	0.00343	B*18,DRB1*03	0.04239	0.00378
A*01,B*08	0.03815	0.00326	B*08,DRB1*03	0.04191	0.00355
A*02,B*51	0.03767	0.00366	B*07,DRB1*15	0.03129	0.00304
A*30,B*18	0.02516	0.00255	B*44,DRB1*04	0.02815	0.00332
A*03,B*07	0.02454	0.00274	B*14,DRB1*01	0.02806	0.00266
A*02,B*18	0.02368	0.00288	B*35,DRB1*01	0.02393	0.00283
A*02,B*07	0.02282	0.00321	B*44,DRB1*13	0.02226	0.00291
A*11,B*35	0.02062	0.00264	B*51,DRB1*11	0.02173	0.00262
A*33,B*14	0.02053	0.00221	B*35,DRB1*11	0.01898	0.00270
A*23,B*44	0.01739	0.00239	B*38,DRB1*13	0.01652	0.00228
A*02,B*35	0.01593	0.00258	B*18,DRB1*11	0.01565	0.00251
A*03,B*35	0.01516	0.00223	B*44,DRB1*11	0.01565	0.00259
A*24,B*35	0.01378	0.00226	B*35,DRB1*13	0.01467	0.00223
A*02,B*50	0.01303	0.00205	B*51,DRB1*04	0.01287	0.00213
A*03,B*51	0.01242	0.00231	B*40,DRB1*04	0.01282	0.00210
A*26,B*38	0.01136	0.00172	B*15,DRB1*13	0.01223	0.00204
A*01,B*57	0.01131	0.00175	B*35,DRB1*04	0.01220	0.00238
A*02,B*15	0.01119	0.00191	B*44,DRB1*01	0.01144	0.00223
A*02,B*49	0.01075	0.00194	B*51,DRB1*13	0.01081	0.00213
A*02,B*14	0.01034	0.00203	B*57,DRB1*07	0.01074	0.00191
A*02,B*40	0.01031	0.00178	B*07,DRB1*01	0.01049	0.00204
			B*44,DRB1*15	0.01017	0.00189
			B*35,DRB1*14	0.01008	0.00184

Standard deviations (SD) have been approximated by 100 bootstrap iterations. *n* = number of individuals

Table 5. Most frequent HLA-A,B,DRB1 extended haplotype found in Castilla y León estimated by maximum likelihood

A,B,DRB1 haplotype	Frequency (2n =3636)	SD	Possible origin
A*29,B*44,DRB1*07	0.03160	0.00302	Western European
A*01,B*08,DRB1*03	0.02913	0.00284	Pan European
A*30,B*18,DRB1*03	0.02187	0.00215	Iberian-paleo-North African
A*02,B*44,DRB1*04	0.01580	0.00263	Western European
A*03,B*07,DRB1*15	0.01432	0.00238	North African / Western European
A*02,B*44,DRB1*07	0.01429	0.00258	Western European
A*02,B*51,DRB1*11	0.01268	0.00245	Mediterranean / Eastern European?
A*02,B*44,DRB1*13	0.01216	0.00233	Mediterranean?
A*02,B*18,DRB1*03	0.01188	0.00243	Mediterranean?
A*23,B*44,DRB1*07	0.01010	0.00179	Mediterranean European

Standard deviations (SD) have been approximated by 100 bootstrap iterations. *n* = number of individuals

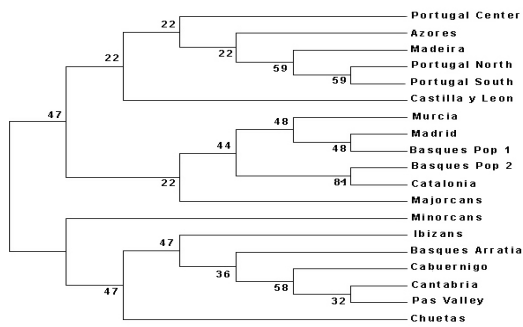


Figure 2. Dendrogram based on HLA-A, -B, and -DRB1 allele frequency data showing relatedness between Castilla y León and other Iberian populations..

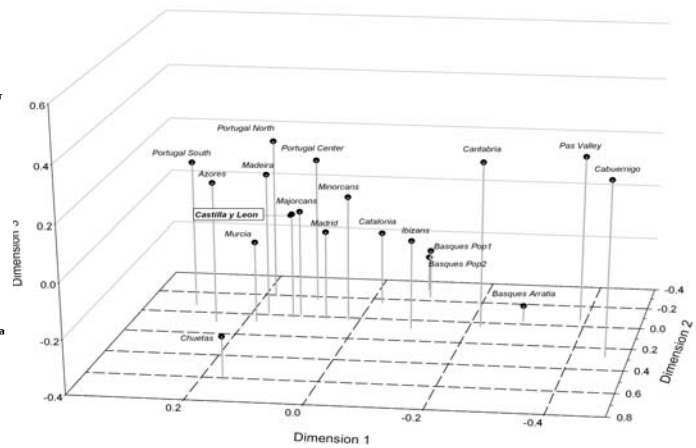


Figure 3. Three principal components distribution in Iberian populations.

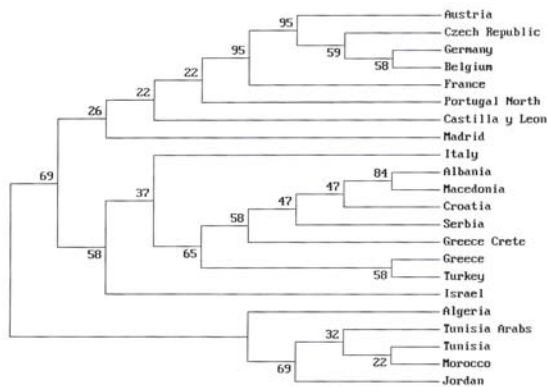


Figure 4. Dendrogram based on HLA-A, -B, and -DRB1 allele frequency data showing relatedness between Castilla y León and other European and Mediterranean populations..

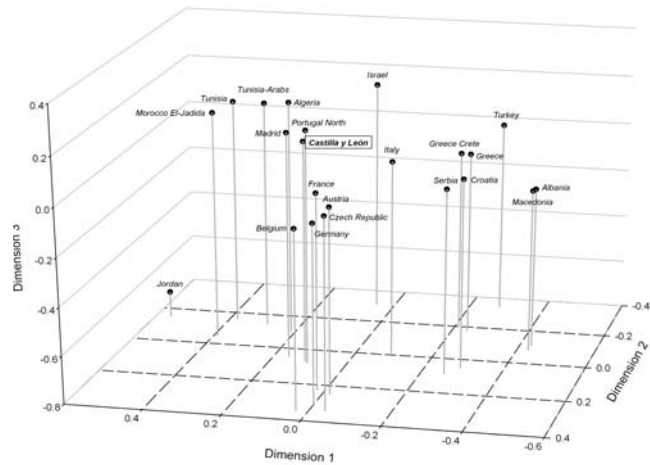


Figure 5. Three principal components distribution in European and Mediterranean populations.

We then compare our population with other Mediterranean and European populations, including in the analyses the previous commented Madrid and North Portugal as Iberian population's references. Taking together DA, the resulting tree and the correspondence analysis, the following can be observed: (1) Castilla y León, others Spaniard and Portugal represent the closest branch, close to the group of Western European (France, Belgium, Germany, Czech Republic and Austria); (2) a second group includes Algeria, Tunisia, Morocco and Jordan, with genetic distances respect to our population similar than Western Europeans, with the exception of Jordan; and (3) Albania, Macedonia, Croatia, Serbia, Greece, and Turkey constitutes the third group. Italy appears between groups 1 and 3 whereas

Israel is separated from the rest of the groups (Figures 4 and 5).

Discussion

The results presented in the present work show that the HLA allelic and haplotypic frequencies of the Castilian-Leonese population are related with those observed within the other neighbouring populations from the Iberian Peninsula. Taking into account the analysis of allelic frequencies and the corresponding distances or dendrograms, these results allow us to demonstrate that our population is genetically situated together with other Spaniard and Portuguese populations.

Table 6. Genetic distances between populations (DA) between Castilla y León and other Iberian populations obtained from using HLA-A, -B and - DRB1 allelic frequencies

Population	Genetic distances
Portugal Center	0.0038
Portugal North	0.0107
Majorcans	0.0128
Minorcans	0.0143
Madeira	0.0162
Murcia	0.0200
Azores	0.0214
Portugal South	0.0215
Madrid	0.0241
Catalonia	0.0460
Ibizans	0.0573
Cantabria	0.0611
Basques Pop 1	0.0639
Basques Pop 2	0.0968
Basques Arratia	0.1120
Chuetas	0.1123
Pas Valley	0.1298
Cabuernigo	0.1700

Table 7. Genetic distances between populations (DA) between Castilla y León and Western European and Mediterranean populations obtained from using HLA-A, -B and - DRB1 allelic frequencies

Population	Genetic distances
Portugal North	0.0107
Madrid	0.0119
France	0.017
Algeria	0.0254
Tunisia	0.0312
Tunisia Ghannouch	0.0336
Austria	0.0373
Belgium	0.0481
Germany	0.0501
Italy	0.0505
Morocco El-Jadida	0.056
Czech Republic	0.0608
Serbia	0.066
Croatia	0.0825
Israel	0.1108
Greece Crete	0.1109
Greece	0.1257
Macedonia	0.1403
Albania	0.1505
Turkey	0.1886
Jordan	0.1932

On the other hand, it is well known that there are marked differences in the distribution of HLA haplotypes among different human populations(6;7), and that HLA multilocus or its extended haplotypes distribution can be determined due to the linkage disequilibrium between neighbouring HLA loci. In this way, ten haplotypes occurs with the greatest frequency in Castilian-Leonese, all of them are shared with Portuguese, being eight of them also described in other Spaniard populations and five in North-Africans populations. Moreover, it is interesting to remark that the frequency of certain haplotypes found in Castilian-Leonese can help us to situate this population genetically and to differentiate it from other Iberian populations.

In our population there are three haplotypes described as Western-European origin: A*29,B*44,DRB1*07 (3.2% in Castilla y León) the most frequent in our population, is generally the one most frequent in the Iberian Peninsula and other European populations; other Spaniard populations (2.2-6.7%), Portugal (1-3.8%), Northern Ireland (2.1%), France (1.96%), Wales (1.5%) and Italy (1.3-1.5%). In addition, it is also

found in Americans of European ancestry such as Cuba (3.8%), Brazil (1.4-1.6%) and Mexico (1.1%)(21;34;35). The haplotype A*02,B*44,DRB1*07 (1.4%) is also present in Portugal (1.8-5.4%), rest of Spain (1.5-3.5%), Switzerland (2.9%), Tunisia (2.4-3%), Wales (1.8%), Italy (1.5%) and Georgia (1.3%)(21;34). Finally, A*02,B*44,DRB1*04 haplotype (1.6%) is also present in Iberian and European populations like Germany (1.4%), Wales (5%), Northern Ireland (4.1%), Ireland (3-4%), Portugal (1.1-3.1%), rest of Spain (1.1-4%) and Italy (0.9%)(21;34;36). Despite that this haplotype has been defined as Western European origin, is also present in some Mediterranean populations such as Tunisia (1.8%), while in Algeria appears with a frequency of 0.9%(21), which suggests a possible Mediterranean / Western European origin.

The previously described as an ancient Pan European haplotype (Indo-European-Celtic origin), A*01,B*08,DRB1*03, is the second most common haplotype in Castilian-Leonese (2.9%) population and is also found in Europeans from Northern, Central and Eastern Europe(21;34) with very high frequency in Wales (10%), Northern Ireland (9%),

Finland (6.3%) and Germany (6.2%), and similar as Castilla y León in rest of Spain (1.1-6.1%), Hungary (3.1-5.9%), Macedonia (4.9%), Croatia (4.3%), Switzerland (4.3%), France (2.5%), Greece (1.1-3.3%), Italy (1-3.1%), Portugal (1.5-3%) and Georgia (1.3%) been also found in Americans of European ancestry such as USA (4.9%), Cuba (3.2%) and Brazil (1.6-2.5%)(21;36-38).

Two frequent haplotypes in our population showed a North-African origin implication. A*30,B*18,DRB1*03 (2.2%) is infrequent in other European populations, except in Sardinians (10,2%), where it appears with a very high frequency, but is common in Iberian Peninsula: rest of Spain (3.1-3.6%), Portugal (2.6-4.1%), and is present in North-African populations such as Tunisia (2%), Algeria (1.5%) and Morocco (1.5%), as well as in other populations of European ancestry such Cape Verde (1.6-2.4%)(21). The A*03,B*07,DRB1*15 haplotype (1.4%), is present in European and North-African populations: Algeria (1.5%), Croatia (2.4%), France (1.66%), Germany (3.4%), Ireland Northern (4.9%), Italy (1.1-1.5%), Portugal (1.3-1.8%), Russia (4.9%), Spain (1.4-6.5%), Switzerland (4.5%), Tunisia (1.8%) and Wales (3%) and USA (1.9%)(20;21;34;36;37).

Finally, to the best of our knowledge, the last four frequent haplotypes has not a clear origin assigned. A*23,B*44,DRB1*07 (1%) is proposed as Mediterranean European since is present in Hungary (1.8%), Palestine (1.2%), Poland (1%) and Portugal (1.3%)(21;34). A*02,B*51,DRB1*11 (1.3%) is present in Bulgaria (2.7%), Croatia (1.2%), Georgia (1.3%), Greece (1.6-2.5%), Italy (1.2-2.7%), Portugal (1-3.3%), Turkey (5.5%)(21;34). In the light of these populations, it could be assumed as Mediterranean-Eastern European origin. Although there is no origin attributed for the haplotypes A*02,B*44,DRB1*13 (1.2%), present in Georgia (3.1%), Italy (1.1%), Morocco (2.5%) and Portugal (1-1.6%) and USA (1.8%)(21;34;37), and A*02,B*18,DRB1*03 (1.2%) present in Italy (1-2.2%) and Portugal (2-4.1%)(21;34), we propose a possible Mediterranean origin for both haplotypes.

Likewise, some common haplotypes have been previously described in the Iberian Peninsula but are present with a frequency below 1% in our population. The A*33,B*14,DRB1*01 (Mediterranean origin) and A*02,B*07,DRB1*15 (North Africa-Western European) haplotypes, common in other Spaniards (1.1-3.8%) and

Portuguese (1-4.3%)(12;13;16;20;21), appears with a frequency of 0.8% in Castilla y León. The haplotypes A*24,B*35,DRB1*11 (European origin) and A*26,B*38,DRB1*13 (Iberian origin attributed), with a frequency of 0.6% in our population, is described in some Spaniards (1.1-2.6%) and Portuguese (1-1.5%) populations(12;16;20;21;34). Finally, the A*02,B*51,DRB1*04 (Portuguese origin suggested) haplotype (0.24%) is only common in Portugal (1-1.2%)(21;34).

Many population studies with other polymorphisms such as SNP, STR or mtDNA in the Iberian Peninsula have been carried out(39-44). However, to the best of our knowledge, due to lack of population studies comparisons between several populations are limited. Thus, comparisons involved few and usually close populations. Despite of this, the degree of inter-population diversity is consistent with our data, in which the different populations share a genetic cluster except for some isolated populations such as Chuetas or Pas Valley(39;45;46).

In conclusion, and with these premises, Castilian-Leonese population seems to belong to the South-western European genetic pool and could have the same common origin as other Iberian and North African populations, as suggested by Arnáiz-Villena et al(47), especially due to the substantial gene flow from Paleo-North African populations to Iberia. Despite the general picture in the dendrogram, resembling closer relation with Portuguese populations, it is interesting to remark that the relative genetic distance in the correspondence analysis between Castilian-Leonese and other Iberian populations indicate a grouping of the studied populations, with the exception of isolated populations, been Castilla y León placed between Portuguese and other Spaniards. This fact could be explained with the presence of frequent haplotypes A*02,B*51,DRB1*11 and A*02,B*18,DRB1*03 in Portuguese but not in other Spaniard populations. However, the relative low sample sizes in some populations difficult a better comparison.

This is the first report on HLA allele and haplotype frequencies focused on Castilla y León population and represent the highest sample size at the date in the Iberian Peninsula studies. Castilla y León region reflects an intermediate genetic distance between Portuguese and other Spaniards and shows a common origin with other Iberian populations, in which European, Mediterranean and North-African components are

present, in agreement with the historical and, therefore, genetic composition of the population.

Acknowledgements:

This work was supported in part by the Spanish Consejería de Educación y Cultura from Junta de Castilla y León (grant SA044A06) and Gerencia Regional de Salud (GRS265/A/08).

The authors thank Manuel Alcoceba (Bachelor in History) for their comments on and help with the historical introduction of this manuscript.

References

- (1) Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007 Oct 25;357(17):1731-43.
- (2) Brionez TF, Reveille JD. The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2008 Jul;20(4):384-91.
- (3) Lech-Maranda E, Juszczynski P, Szmigielska-Kaplon A, Jamrozak K, Balcerzak E, Robak T. Human leukocyte antigens HLA DRB1 influence clinical outcome of chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 2007 May;92(5):710-1.
- (4) Alcoceba M, Marin L, Balanzategui A, Sarasquete ME, Martin-Jimenez P, Chillon MC, et al. The presence of DRB1*01 allele in multiple myeloma patients is associated with an indolent disease. *Tissue Antigens* 2008 Jun;71(6):548-51.
- (5) Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008 Oct;42 Suppl 2:S71-S76.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) Hurley CK, Maiers M, Marsh SG, Oudshoorn M. Overview of registries, HLA typing and diversity, and search algorithms. *Tissue Antigens* 2007 Apr;69 Suppl 1:3-5.
- (9) Mack SJ, Erlich HA. Population relationships as inferred from classical HLA genes. In: Hansen JA, editor. *Immunobiology of the MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*. Seattle: IHWG Press; 2007. p. 747.
- (10) Lorrío AJ, Ruiz-Zapatero G. The Celts in Iberia: An Overview. *e-Keltoi: Journal of Interdisciplinary Celtic Studies* 2005 Feb 1;6:167-254.
- (11) López-Davalillo J. In: *Síntesis*, editor. *Atlas histórico de España y Portugal. Desde el Paleolítico hasta el siglo XX*. 1999.
- (12) Crespi C, Mila J, Martínez-Pomar N, Etxagibel A, Muñoz-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.
- (13) Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martínez-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.
- (14) Comas D, Mateu E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Bosch E, Martínez-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.
- (15) Martínez-Laso J, De Juan D, Martínez-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.
- (16) 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.
- (17) Spinola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J. HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* 2005 Sep;66(3):217-30.
- (18) Spinola H, Brehm A, Williams F, Jesus J, Middleton D. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route. *Ann Hum Genet* 2002 Jul;66(Pt 4):285-96.
- (19) Sulcebe G, Sanchez-Mazas A, Tiercy JM, Shyti E, Mone I, Ylli Z, et al. HLA allele and haplotype frequencies in the Albanian population and their relationship with the other European populations. *Int J Immunogenet* 2009 Dec;36(6):337-43.
- (20) Arnaiz-Villena A, Martínez-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.
- (21) Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens* 2003 May;61(5):403-7.
- (22) Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, et al. Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* 2009 Nov;70(11):895-902.
- (23) Arnaiz-Villena A, Iliakis P, Gonzalez-Hevilla M, Longas J, Gomez-Casado E, Sfyridaki K, et al. The origin of Cretan populations as determined by characterization of HLA alleles. *Tissue Antigens* 1999 Mar;53(3):213-26.

- (24) Rendine S, Borelli I, Barbanti M, Sacchi N, Roggero S, Curtoni ES. HLA polymorphisms in Italian bone marrow donors: a regional analysis. *Tissue Antigens* 1998 Aug;52(2):135-46.
- (25) Sanchez-Velasco P, Karadsheh NS, Garcia-Martin A, Ruiz de AC, Leyva-Cobian F. Molecular analysis of HLA allelic frequencies and haplotypes in Jordanians and comparison with other related populations. *Hum Immunol* 2001 Sep;62(9):901-9.
- (26) Arnaiz-Villena A, Dimitroski K, Pacho A, Moscoso J, Gomez-Casado E, Silvera-Redondo C, et al. HLA genes in Macedonians and the sub-Saharan origin of the Greeks. *Tissue Antigens* 2001 Feb;57(2):118-27.
- (27) Gomez-Casado E, del MP, Martinez-Laso J, Garcia-Gomez A, Allende L, Silvera-Redondo C, et al. HLA genes in Arabic-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians. *Tissue Antigens* 2000 Mar;55(3):239-49.
- (28) Hajjej A, Kaabi H, Sellami MH, Dridi A, Jeridi A, El bW, et al. The contribution of HLA class I and II alleles and haplotypes to the investigation of the evolutionary history of Tunisians. *Tissue Antigens* 2006 Aug;68(2):153-62.
- (29) Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Labonne MP, Gebuhrer L. HLA class-I and HLA class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. *Tissue Antigens* 2004 Oct;64(4):520-32.
- (30) Arnaiz-Villena A, Karin M, Bendikuzen N, Gomez-Casado E, Moscoso J, Silvera C, et al. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 2001 Apr;57(4):308-17.
- (31) Gonzalez M, Gonzalez D, Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Chillon MC, Balanzategui A, et al. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 1999 Sep;84(9):779-84.
- (32) Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;1:47-50.
- (33) Young FW, Bann CM. ViSta: A visual statistics system. Stine, R A & Fox, J (Eds), *Statistical Computing Environments for Social Research* 1996;207-36.
- (34) 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.
- (35) Barquera R, Zuniga J, Hernandez-Diaz R, Acuña-Alonso 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.
- (36) Muller CR, Ehninger G, Goldmann SF. Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A, HLA-B, and HLA-DR based on over 13,000 German blood donors. *Hum Immunol* 2003 Jan;64(1):137-51.
- (37) 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.
- (38) 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.
- (39) Alcoceba M, Marin L, Balanzategui A, Martin-Jimenez P, Sarasquete ME, Chillon MC, et al. Allelic frequencies on 15 STR loci in Castilla y León (Northwest-Central Spain) population sample using Powerplex 16 system kit. *International Society of Forensic Genetics - English Speaking Working Group, Tuusula (Finland), 8-11 June*, Not published. 2006. Ref Type: Abstract
- (40) Perez-Lezaun A, Calafell F, Clarimon J, Bosch E, Mateu E, Gusmao L, et al. Allele frequencies of 13 short tandem repeats in population samples from the Iberian Peninsula and northern Africa. *Int J Legal Med* 2000;113(4):208-14.
- (41) Gusmao L, Sanchez-Diz P, Alves C, Gomes I, Zarrabeitia MT, Abovich M, et al. A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Legal Med* 2009 May;123(3):227-34.
- (42) Corte-Real HB, Macaulay VA, Richards MB, Hariti G, Issad MS, Cambon-Thomsen A, et al. Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann Hum Genet* 1996 Jul;60(Pt 4):331-50.
- (43) Bosch E, Calafell F, Comas D, Oefner PJ, Underhill PA, Bertranpetit J. High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet* 2001 Apr;68(4):1019-29.
- (44) Gonzalez-Neira A, Gusmao L, Brion M, Lareu MV, Amorim A, Carracedo A. Distribution of Y-chromosome STR defined haplotypes in Iberia. *Forensic Sci Int* 2000 May 15;110(2):117-26.
- (45) Maca-Meyer N, Sanchez-Velasco P, Flores C, Larruga JM, Gonzalez AM, Oterino A, et al. Y chromosome and mitochondrial DNA characterization of Pasiegos, a human isolate from Cantabria (Spain). *Ann Hum Genet* 2003 Jul;67(Pt 4):329-39.
- (46) Brion M, Quintans B, Zarrabeitia M, Gonzalez-Neira A, Salas A, Lareu V, et al. Micro-geographical differentiation in Northern Iberia revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Gene* 2004 Mar 31;329:17-25.
- (47) Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Alonso-Garcia J. Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics. *Hum Biol* 1999 Oct;71(5):725-43.

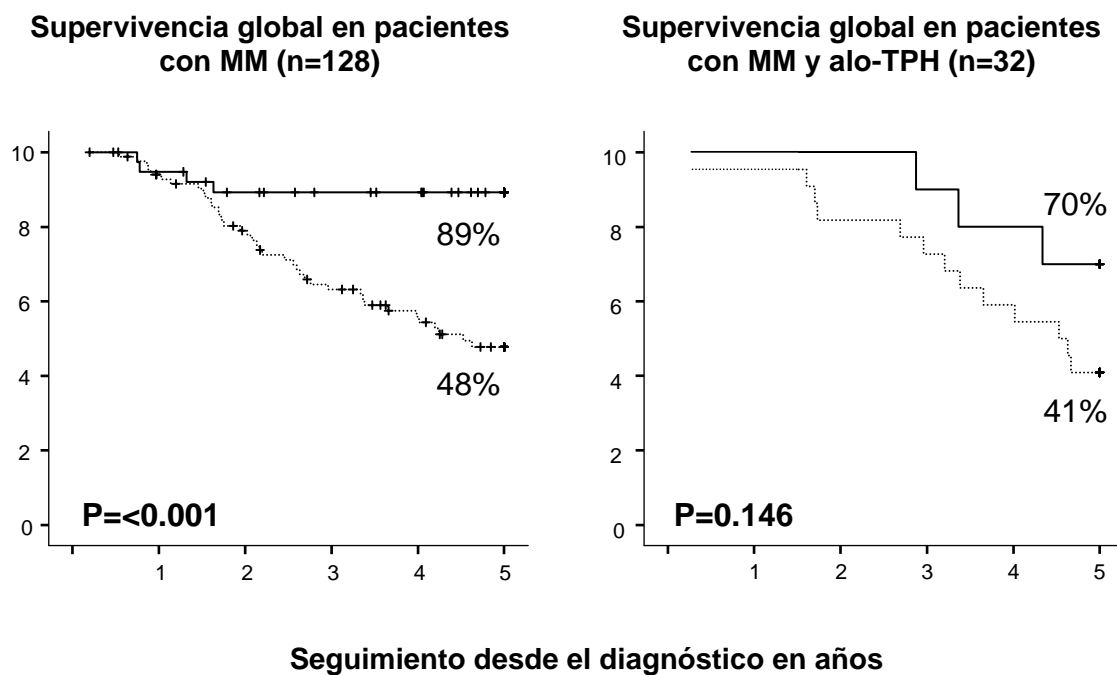
2. INFLUENCIA DE POLIMORFISMOS HLA EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE CANDIDATOS A TRASPLANTE ALOGÉNICO EMPARENTADO HLA IDÉNTICO

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia linfoide B en la que el sistema inmune juega un papel relevante tanto en la aparición como en el desarrollo y expansión del clon tumoral^{102;103}. Diversos estudios han confirmado que la producción de respuestas T oligoclonales o la utilización de inmunizaciones activas pueden mejorar la evolución de la enfermedad¹⁰³⁻¹⁰⁵. Así, el sistema HLA como sistema de presentación antigénica podría jugar un papel muy activo en el control de la enfermedad. No obstante, este aspecto ha sido escasamente estudiado y únicamente se cuenta con algunos datos que sugieren una mayor frecuencia de ciertas especificidades HLA como B18 y B5 en pacientes con MM, dando a entender una peor capacidad de presentación de antígenos propios de mieloma en estos casos.

Nuestro trabajo pretende analizar la posible relación del sistema HLA en la aparición o en el comportamiento clínico del MM en pacientes de nuestra región. Para ello, se realizó un estudio preliminar empleando una población heterogénea no seleccionada de 130 pacientes diagnosticados de MM en la que se disponía del tipaje HLA-A, -B y -DRB1 de forma retrospectiva en base a la posible indicación de un trasplante alogénico emparentado, y se comparó con una población control formada por 1818 individuos sanos previamente descrita en el apartado anterior de la sección de resultados.

No se observó asociación entre los distintos alelos HLA y una mayor presencia de MM, por lo que ninguno de los alelos previamente publicados se confirmó en nuestra serie. Sin embargo, cuando analizamos los parámetros clínicos, observamos una mayor supervivencia global (SG) a 5 años en aquellos pacientes que presentaban el alelo

DRB1*01 (89% vs. 48%, $p < 0.001$), así como una mayor supervivencia libre de progresión, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (59% vs. 40%, $p = 0.103$). Ello sugiere un curso de la enfermedad más indolente en los pacientes portadores del antígeno DRB1*01. Además, cuando analizamos específicamente aquellos pacientes que recibieron un alo-TPH emparentado HLA idéntico estas diferencias se mantuvieron (SG a los 5 años de 70% vs. 41%. La falta de significación estadística ($p = 0.15$) en las diferencias se justificó por la drástica reducción del tamaño de la muestra del estudio ($n = 32$). Estos datos sugieren un papel potencial del alelo DRB1*01 en el control de la enfermedad.



3. LA PRESENCIA DEL ALELO DRB1*01 EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE SE ASOCIA CON UNA ENFERMEDAD MÁS INDOLENTE

Debido a los resultados obtenidos en el estudio preliminar, y dado que partíamos de un grupo de pacientes previamente tipado, en el que tanto la clínica de los mismos como su tratamiento era heterogéneo, nos planteamos ampliar el estudio analizando el locus DRB1 en dos poblaciones seleccionadas de pacientes con MM en los que se realizó el tipaje de HLA prospectivamente: 1) Población homogénea de enfermos con Mieloma Múltiple sintomático diagnosticados en 2000-01 incluidos en el protocolo terapéutico GEM-00 (*6 ciclos de VBMCP/VBAD seguido de intensificación con dosis elevadas de melfalán y rescate con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica*): n=128; 2) Población homogénea de pacientes con diagnóstico de MM quiescente o asintomático: n=53. Como población control se empleó los donantes de Médula ósea del registro de Castilla y León, previamente descrita.

No se observó asociación entre los distintos alelos de HLA-DRB1 y una mayor presencia de MM. Sin embargo, cuando se analizaron los dos grupos de pacientes por separado, se observó una mayor frecuencia fenotípica del alelo DRB1*01 en el grupo de pacientes con MM quiescente respecto al grupo de MM sintomático (38% vs. 14%, $P=0.001$, $P_c=0.014$) y al grupo control (38% vs. 22%, $P=0.01$, $P_c>0.5$). Además, se observó una mayor incidencia del alelo DRB1*07 en el grupo de pacientes con MM sintomático comparado con la población control (38% vs. 28%, $P=0.01$, $P_c>0.05$).

En este trabajo se sugiere por vez primera que las especificidades HLA pueden jugar un papel en el control de la enfermedad en pacientes con MM. Así, aquellos individuos que tienen el alelo HLA-DRB1*01 podrían tener una mayor habilidad para presentar de una manera eficiente los antígenos tumorales a las células

inmunocompetentes, lo que podría favorecer una mejor respuesta inmune contra la neoplasia. Esto podría traducirse en un control de la enfermedad más apropiado, condicionando así una enfermedad más indolente y una supervivencia prolongada. El alelo HLA-DRB1*07 podría tener un significado opuesto, con una presentación menos eficaz de los antígenos tumorales del MM.

The presence of DRB1*01 allele in multiple myeloma patients is associated with an indolent disease

M. Alcoceba¹, L. Marín¹, A. Balanzategui¹, M. E. Sarasquete¹, P. Martín-Jiménez¹, M. C. Chillón¹, R. Corral¹, E. Pérez-Persona¹, F. J. Fernández-Calvo^{2,3}, J. M. Hernández^{2,3}, J. Bladé³, J. J. Lahuerta³, M. González¹, J. F. San Miguel^{1,2,3} & R. García-Sanz^{1,2,3}

¹ Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

² Castellano-Leonés Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies, Spain

³ Grupo Español de Mieloma GEM/PETHEMA, Red Española de Mieloma (G03/136), Spain

Key words

DRB1; human leukocyte antigen; multiple myeloma; smoldering multiple myeloma

Correspondence

Ramón García-Sanz, MD, PhD
Servicio de Hematología
Hospital Clínico Universitario
Paseo de San Vicente, 58-182
37007 Salamanca
Spain
Tel: +34 23 291629
Fax: +34 23 264743
e-mail: rgarcias@usal.es

Received 21 December 2007; revised 26 February 2008; accepted 16 March 2008

doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01048.x

Abstract

The human leukocyte antigen (HLA) system could play an essential role in multiple myeloma (MM) disease control. This report describes the results comparing HLA-DRB1 phenotypic frequencies in 181 MM patients (53 smoldering/indolent MM and 128 symptomatic MM patients) and healthy individuals. Higher DRB1*01 phenotypic frequencies were found in the smoldering patients compared with symptomatic MM patients (38% vs 14%, $P = 0.001$) and with the healthy individuals (38% vs 22%, $P = 0.01$). Additionally, higher DRB1*07 phenotypic frequencies were found in symptomatic MM compared with control population (38% vs 28%, $P = 0.01$). The present data suggest that HLA-DRB1*01 individuals may have a better ability to efficiently present myeloma-related antigens to immunocompetent cells, which could favor a better immune response against the tumor. This would translate into a more appropriate disease control associated with more indolent disease and prolonged survival.

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a B-cell lymphoid neoplasia in which immune system is closely involved into the control of tumor development and progression (1). Several studies have reported the presence of expanded T-cell clones in patients with MM; such T cells could play a role in the anti-tumor response (2–4), and they have been associated with early stages of the disease and extended survival (5). Accordingly, interventions on the immune system represent an attractive therapeutic target in MM. Several groups have employed different idotype vaccination strategies on MM patients, mainly including idotype-pulsed autologous dendritic cells or idotype-specific proteins followed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-12 as immunoadjuvants (6–8). Moreover, other approaches, such as the transfer of immunocompetent cells (i.e. donor lymphocyte infusion), have been shown to be effective after allogeneic bone marrow transplantation in MM patients (9–

11). Even more, the development of chronic graft vs host disease after hematopoietic stem cell transplantation (SCT) has shown to be associated with a lower rate of relapse (12, 13), reflecting a remarked graft vs myeloma effect.

In this context, the human leukocyte antigen (HLA) system, as an antigen presentation system, could play an essential role in the neoplasia control. Previous studies have shown a relationship between HLA specificities and susceptibility to hematological and nonhematological disorders [i.e. chronic lymphocytic leukemia (CLL) and myelodysplastic syndromes (MDS)] (14, 15). Thus, DR15 has been shown to be overrepresented in MDS and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in MDS (15). In a recent study, Lech-Maranda et al. found a relationship between DRB1*01 antigen and shorter overall survival in patients affected with CLL (16). In MM, this feature has not been extensively studied, and there are only few data indicating a higher incidence of some HLA

specificities, such as B18 and B5, in myeloma patients as compared with the matched healthy population (17–19), which could indicate an impaired presentation for certain myeloma-related antigens in such cases.

In the present work, we have analyzed the HLA class II (DRB1) specificity in two large series of MM patients: one included uniformly treated patients with symptomatic MM and the other included untreated smoldering/indolent MM patients. This analysis shows that the presence of the DRB1*01 specificity is associated with indolent forms of the disease.

Patients and methods

A total of 181 patients with a diagnosis of MM were analyzed after obtaining their informed consent. According to the criteria of the international myeloma group (20), patients were classified into two subsets: (a) symptomatic MM patients ($n = 128$), who were all diagnosed between 1 January 2000 and 31 December 2001 and treated according to the GEM-2000 protocol, which consists on polychemotherapy followed by autologous peripheral blood SCT (21), and (b) smoldering/indolent MM ($n = 53$), with the uniform characteristic that they did not require therapy for at least 1 year since the diagnosis. Additionally, 1818 healthy donor individuals from the Castilla y León (Northwest-Central Spain) registry for stem cell transplant donors were employed as the control population (22). All three populations involved in the study included Caucasian individuals.

Genomic DNA extraction from peripheral blood samples from all individuals was carried out with standard methods (23). HLA-DRB1 typing at low-resolution level (two digits) was carried out using the polymerase chain reaction and reverse sequence-specific oligonucleotide (PCR-rSSO) methodology according to the standards of the European Federation of Immunogenetics (<http://www.efiweb.org>). Allele frequencies were estimated by direct counting. Comparison of allele and phenotype frequencies between populations was performed with the two-sided Fisher's exact test or chi-squared test using GRAPHPAD PRISM 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) or SPSS software 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The strength of associations was estimated by the odds ratio, and their 95% confidence intervals were calculated by the Cornfield methods (P values < 0.05 were considered statistically significant). P value was corrected (P_c) for the number of valid comparisons made (Bonferroni correction). The different clinical and biological characteristics were considered individually for their relationship with the probability to be associated with a diagnosis of smoldering vs symptomatic MM by univariate tests using SPSS software. Subsequently, all variables for which there was some indication of a significant association with symptomatic MM in univariate test

($P < 0.1$) were included in the multivariate analysis – stepwise regression. Age was excluded because one of the groups was biased by definition (GEM-00 protocol excluded patients older than 70 years).

Results

The clinical characteristics of the patients are presented in Table 1. All allelic and phenotypic frequencies were

Table 1 Patient characteristics

Variable	Smoldering/ indolent MM ($n = 53$)	Symptomatic MM ($n = 128$)	P value
Age in years, mean (SD)	64 (10.942)	58 (7.807)	<0.001
Sex: male	31 (58.5%)	63 (49%)	NS
ECOG scale ≥ 2	7%	51%	<0.001
Osteolytic lesions	0	65%	<0.001
Hemoglobin < 8.5 g/dl	0	21%	<0.001
Platelets $< 100 \times 10^9$	4%	8%	NS
Durie and salmon stage III	0	58%	<0.001
Bone marrow PC $> 40\%$	2%	53%	<0.001
LDH > 460 U/l	2%	9%	NS
Albumin < 3.5 g/dl	23%	44%	0.009
Type of monoclonal component			
IgG	71%	56%	
IgA	27%	26%	
Biclonal IgG and IgA	2%	0	0.020
Bence-Jones	0	16.5%	
Nonsecretory	0	1.5%	
Type of light chain			
κ	63%	64%	
λ	37%	34%	NS
Nonsecretory	0	2%	
Bence-Jones proteinuria	13%	53%	<0.001
International staging system			
Stage I	68%	39%	
Stage II	27%	39%	0.004
Stage III	4% ^a	22%	
Creatinine > 2 g/dl	2% ^a	12%	0.040
Calcium > 11 mg/dl	0	11%	0.010
β_2 microglobulin > 6 mg/dl	2% ^a	21%	0.007
C-reactive protein > 6 mg/dl	9%	11%	NS
S-phase plasma cells $> 3\%$	0	28%	<0.001
Cytogenetics ^b			
Normal	60%	44%	
del(13q)	20%	43%	
14q32 translocations			NS
t(11;14)	5%	12%	
Other	10%	17%	
Others	10%	7%	

ECOG scale, Eastern Cooperative Oncology Group scale; IG, immunoglobulin; LDH, lactate dehydrogenase; NS, not significant; PC, plasma cells.

^a One patient displayed renal insufficiency due to other causes than MM.

^b Cytogenetics was only available in 38% of cases in smoldering MM group, while 45% in symptomatic MM.

Table 2 DRB1 phenotypic frequencies

DRB1 phenotype	Smoldering/indolent MM (n = 53)	Symptomatic MM (n = 128)	Healthy control population (n = 1818)	P value
DRB1*01	37.7	14.1	21.7	^a
DRB1*03	24.5	23.4	23.9	NS
DRB1*04	15.1	22.7	24.7	NS
DRB1*07	24.5	38.3	27.6	^b
DRB1*08	1.9	3.9	5.2	NS
DRB1*09	0	2.3	1.4	NS
DRB1*10	1.9	4.7	3.2	NS
DRB1*11	26.4	21.9	23.6	NS
DRB1*12	3.8	3.9	2	NS
DRB1*13	26.4	27.3	26	NS
DRB1*14	5.7	4.7	5.2	NS
DRB1*15	24.5	15.6	18.3	NS
DRB1*16	1.9	4.7	3	NS

^a Significant differences reached in smoldering MM vs controls (38% vs 22%, $P = 0.0106$, $P_c > 0.05$), symptomatic MM vs controls (14% vs 22%, $P = 0.0437$, $P_c > 0.05$) and smoldering MM vs symptomatic MM (38% vs 14%, $P = 0.0011$, $P_c = 0.0143$).

^b Significant differences among symptomatic MM and controls (38% vs 28%, $P = 0.0111$, $P_c > 0.05$).

systematically examined and compared among the three groups (Table 2). HLA-DRB1 allelic frequencies were consistent in all cases with the Hardy–Weinberg equilibrium. The HLA-DRB1 allele frequencies of the control population from our region have been previously described (22).

DRB1 phenotypic frequencies were not significantly different in MM patients compared with healthy control individual (data not shown). However, when the two MM cohorts were analyzed, DRB1*01 phenotypic frequencies were significantly higher in smoldering/indolent MM patients compared with MM symptomatic patients (37.7% vs 14.1%, $P = 0.0011$; OR 3.7, 95% CI 1.76–7.81). DRB1*01 differences remained statistically significant even upon using the Bonferroni correction for multiple testing, $P_c = 0.0143$. Furthermore, DRB1*01 phenotypic frequencies were significantly higher in the smoldering/indolent patients compared with the healthy control individual (37.7% vs 21.7%, $P = 0.0106$, OR 2.19, 95% CI 1.24–3.86).

Another interesting association was that symptomatic MM patients showed a higher incidence in DRB1*07 phenotypic frequencies compared with the control population (38.3% vs 27.6%, $P = 0.0111$, OR 1.63, 95% CI 1.12–2.36). Other phenotypic frequencies did not show statistical differences among the three groups. Similar results were obtained when allelic frequencies were compared.

Univariate analysis to compare clinical characteristics among MM patients groups was performed. Several characteristics were associated with the probability of diagnosis of symptomatic vs indolent disease (Table 1). However, the multivariate analysis revealed that only the presence of osteolytic lesions ($P < 0.001$, OR 83, 95% CI 11.2–618.5), presence of bone marrow plasma cells more than 40% ($P < 0.001$, OR 35, 95% CI 3.9–318.8), the absence of DRB1*01 allele ($P < 0.001$, OR 28, 95% CI 4.1–184.8) and the presence of Bence-Jones proteinuria ($P = 0.001$, OR: 13, 95% CI 2.9–55.6) were independently associated with symptomatic MM (Table 3).

Discussion

Myeloma patients are able to initiate proliferative and cytotoxic T-cell responses against tumor cells, and this response can be enhanced via antigen-presenting cells through HLA proteins (1, 5). Therefore, HLA specificity could play an essential role in disease control. The present findings support this hypothesis because they suggest that natural T-cell responses against MM idiotypes are likely to depend on certain inherited HLA alleles (DRB1*01 in this case) and their ability to efficiently present tumor-related antigens. Previous immunologically based studies conducted in solid tumors [adrenocortical carcinoma (24) and

Table 3 Multivariate analysis including variables associated to symptomatic disease

Variable	Smoldering/indolent MM (n = 53)	Symptomatic MM (n = 128)	P value (univariate)	P value (multivariate)	OR (95% CI)
Osteolytic lesions ≥ 2	0	65%	<0.001	<0.001	83.1 (11.2–618.5)
Bone marrow PC >40%	2%	53%	<0.001	<0.001	35.3 (3.9–318.8)
DRB1*01 absent	62%	86%	0.0143	<0.001	27.6 (4.1–184.8)
Bence-Jones proteinuria	13%	53%	<0.001	0.001	12.6 (2.9–55.6)

cutaneous melanoma (25)] as well as in hematological disorders [i.e. CLL (16)] have found a link between DRB1*01 antigen and disease characteristics.

Our present finding could be helpful in future classification, treatment and monitoring of smoldering/indolent patients and can contribute to redefine future vaccination strategies.

In conclusion, the present data suggest that HLA-DRB1*01 individuals may have a better ability to efficiently present myeloma-related antigens to immunocompetent cells, which could favor a better immune response against the tumor. This would translate into a more appropriate disease control associated with more indolent disease and prolonged survival. By contrast, HLA-DRB1*07 could have the opposite significance, with a negative effect on myeloma-related antigen presentation.

References

- Rhee F. Idiotype vaccination strategies in myeloma: how to overcome a dysfunctional immune system. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 1353–5.
- Moss P, Gillespie G, Frodsham P, Bell J, Reyburn H. Clonal populations of CD4+ and CD8+ T cells in patients with multiple myeloma and paraproteinemia. *Blood* 1996; **87**: 3297–306.
- Kay N, Leong T, Kyle RA et al. Altered T cell repertoire usage in CD4 and CD8 subsets of multiple myeloma patients, a Study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E9487). *Leuk Lymphoma* 1999; **33**: 127–33.
- Raitakari M, Brown RD, Sze D et al. T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells. *Br J Haematol* 2000; **110**: 203–9.
- Brown RD, Yuen E, Nelson M, Gibson J, Joshua D. The prognostic significance of T cell receptor beta gene rearrangements and idiotype-reactive T cells in multiple myeloma. *Leukemia* 1997; **11**: 1312–7.
- Reichardt VL, Okada CY, Liso A et al. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma—a feasibility study. *Blood* 1999; **93**: 2411–9.
- Rasmussen T, Hansson L, Osterborg A, Johnsen HE, Mellstedt H. Idiotype vaccination in multiple myeloma induced a reduction of circulating clonal tumor B cells. *Blood* 2003; **101**: 4607–10.
- Hansson L, Abdalla AO, Moshfegh A et al. Long-term idiotype vaccination combined with interleukin-12 (IL-12), or IL-12 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, in early-stage multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 1503–10.
- Bertz H, Burger JA, Kunzmann R, Mertelsmann R, Finke J. Adoptive immunotherapy for relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation (BMT): evidence for a graft-versus-myeloma effect. *Leukemia* 1997; **11**: 281–3.
- Kwak LW, Taub DD, Duffey PL et al. Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet* 1995; **345**: 1016–20.
- Cabrera R, Diaz-Espada F, Barrios Y et al. Infusion of lymphocytes obtained from a donor immunised with the paraprotein idiotype as a treatment in a relapsed myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**: 1105–8.
- Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; **102**: 1108–13.
- Perez-Simon JA, Martino R, Alegre A et al. Chronic but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-meloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2003; **121**: 104–8.
- Montes-Ares O, Moya-Quiles MR, Montes-Casado M et al. Human leucocyte antigen-C in B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2006; **135**: 517–9.
- Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; **100**: 1570–4.
- Lech-Maranda E, Juszczynski P, Szmigielska-Kaplon A et al. Human leukocyte antigens HLA DRB1 influence clinical outcome of chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 2007; **92**: 710–1.
- Mason DY, Cullen P. HL-A antigen frequencies in myeloma. *Tissue Antigens* 1975; **5**: 238–45.
- Ludwig H, Mayr W. Genetic aspects of susceptibility to multiple myeloma. *Blood* 1982; **59**: 1286–91.
- Patel M, Wade AA, Galpin J et al. HLA class I and class II antigens associated with multiple myeloma in southern Africa. *Clin Lab Haematol* 2002; **24**: 215–9.
- Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; **121**: 749–57.
- Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2007; **21**: 143–50.
- Alcoceba M, Marín LA, Balanzategui A et al. Analysis of the frequencies of HLA-A, B and DRB1 alleles and haplotypes in Castilla y León (Northwest-Central Spain) population. *Tissue Antigens* 2006; **67**: 574.
- Gonzalez M, Gonzalez D, Lopez-Perez R et al. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 1999; **84**: 779–84.
- Wolkersdorfer GW, Marx C, Brown J et al. Prevalence of HLA-DRB1 genotype and altered Fas/Fas ligand expression in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 1768–74.
- Luongo V, Pirozzi G, Caraco C et al. HLA allele frequency and clinical outcome in Italian patients with cutaneous melanoma. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 84–7.

4. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE 15 REGIONES STR ANALIZADAS MEDIANTE POWERPLEX16 EN LA POBLACIÓN DE CASTILLA Y LEÓN: COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Los microsatélites son marcadores altamente polimórficos que presentan un poder de discriminación muy elevado. Ello, unido a la posibilidad de emplear pequeñas cantidades de ADN para su análisis, e incluso ADN parcialmente degradado, les convierte en los polimorfismos de elección en múltiples disciplinas forenses. No obstante, el espectro de aplicaciones es especialmente amplio, siendo su principal utilidad médica el estudio del quimerismo hematopoyético, ya que permite evaluar el prendimiento y evolución del injerto al discriminar el origen de las células hematopoyéticas.

Al igual que el sistema HLA, estos polimorfismos están restringidos geográficamente y racialmente, pudiéndose emplear también en estudios de genética de poblaciones.

La distribución de las 15 regiones microsatélite comprendidas en el kit *PowerPlex 16*® ha sido ya estudiada en algunas poblaciones de la Península Ibérica como Baleares, Cantabria, Cataluña, Madrid, País Vasco y Portugal así como algunas poblaciones aisladas como los Chuetas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que analice dichos polimorfismos en detalle en la región de Castilla y León. En este trabajo describimos las frecuencias alélicas junto con otros parámetros genéticos de interés forense de 15 regiones STR en 325 individuos no emparentados nacidos en la población de Castilla y León, comparando la distribución en la región con las de otras poblaciones de la Península Ibérica.

Ninguno de los marcadores mostró desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg. Los *loci* más informativos en base al contenido en información del polimorfismo (PIC) fueron Penta E, D18S51, FGA y D21S11 ($PIC \geq 0.85$), mientras

que TPOX, D5S818 y CSF1PO se mostraron como los menos informativos ($PIC \leq 0.68$). En conjunto, los 15 marcadores mostraron un poder global de exclusión de 0.9999984 y una probabilidad de identidad de 2.14×10^{-18} . Cabe destacar del estudio la presencia de un alelo infrecuente, el alelo 11 en el marcador D3S1358, variante observada hasta la fecha únicamente en otras tres ocasiones. El dato que fue remitido a la base *on-line* STRbase¹⁰⁶.

Al examinar la relación genética entre Castilla y León y las diferentes poblaciones de la Península Ibérica previamente descritas se observa que las poblaciones de Baleares, Cantabria, Cataluña, Madrid, País Vasco y Portugal comparten un mismo grupo junto con la de Castilla y León, mientras que poblaciones aisladas (Chuetas) están claramente separadas del resto de poblaciones.

Los datos presentados son concordantes con los estudios de HLA previamente presentados y sugieren asimismo la pertenencia al pool genético del suroeste europeo, con origen común con otras poblaciones de la Península Ibérica y del norte de África, como se ha sugerido previamente¹⁰⁷, especialmente debido al sustancial flujo genético de poblaciones paleo-norafricanas a Iberia.

Announcement of population data

Allelic frequencies on 15 STR loci in Castilla y León (Northwest-Central Spain) population sample using Powerplex 16 system kit

M. Alcoceba, L. Marín, A. Balanzategui, M.E. Sarasquete, M. Carmen Chillón, P. Martín-Jiménez, R. Corral, N. Puig, C. Santamaría, R. García-Sanz, J.F. San Miguel, M. González

Laboratorio de Biología Molecular y HLA, Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Spain

Submitted for publication in Forensic Science International: Genetics

Abstract

Allele frequencies for the fifteen STRs included in the PowerPlex 16 System kit were determined in 277 unrelated individuals born in Castilla y León (Northwest-Central Spain) population. All loci met Hardy-Weinberg expectations. Exact tests disequilibrium analysis revealed no departures from independence out of 10^5 pair-wise comparisons. The combined PM and PE for all 15 loci are 2.14×10^{-18} and 0.9999984, respectively.

Keywords: STRs; Population data; Castilla y León

Population	325 unrelated Caucasian individuals born in Castilla y León region (official population of 2,557,330 inhabitants according to the Statistical National Institute 2008 population census). Distributions per province: Avila (n=11 donors), Burgos (n=9), León (n=56), Palencia (n=14), Salamanca (n=122), Segovia (n=24), Soria (n=5), Valladolid (n=52) and Zamora (n=32).
Extraction	From peripheral blood samples using DNAzol method (Molecular Research Center, Cincinnati, OH).
PCR	Amplification with multiplex PowerPlex™ 16 Kit was performed following manufacturer instructions (Promega Corporation, Madison, WI).
Typing	ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer and ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and reference sequenced ladders provide by manufacturer (Promega Corporation).
Results	See supplementary Table 1.
Analysis of data	PowerStats 1.2 Software [1] and Cervus 2.0 [2] were used for forensic efficiency parameters.
Access to the data	Through migalcoceba@gmail.com , or accessing http://www.strdna-db.org/ .
Other remarks	A rare allele 11 in D3S1358 was observed in two individuals in the present study. Retyped was carried out to confirmed the obtained results. These variants were submitted to on-line database STRbase [3]. The allelic frequencies observed were similar to those of other Iberian populations [4-14]. Linkage disequilibrium has been tested using shuffling test for all possible combinations between loci obtaining an exact probability upper than 0.05 indicating independence of loci in all cases. This paper follows the guidelines for publication of population data requested by the journal [15].

Supplemental Table 1. Allelic frequencies for fifteen STRs in the Castilla y León population (North-West Central, Spain)

Allele	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
2.2											0.005				
5		0.003			0.059										
6		0.225			0.002										
7		0.145			0.150		0.006	0.029			0.005				
8		0.154			0.022	0.008	0.131	0.146	0.017	0.005	0.017		0.008	0.492	
9		0.188			0.017	0.045	0.040	0.126	0.123	0.026	0.169		0.006	0.127	
9.3		0.272													
10		0.011		0.003	0.094	0.049	0.062	0.272	0.034	0.284	0.122		0.086	0.080	
11	0.003	0.002		0.009	0.106	0.383	0.346	0.235	0.283	0.343	0.165		0.091	0.267	
12	0.003			0.172	0.211	0.355	0.283	0.163	0.285	0.273	0.219	0.002	0.124	0.034	
13	0.005			0.109	0.113	0.149	0.088	0.025	0.225	0.059	0.187	0.002	0.293		
14	0.140			0.165	0.061	0.008	0.040	0.003	0.032	0.009	0.077	0.131	0.252		
15	0.225			0.152	0.033	0.003	0.005		0.002	0.002	0.030	0.123	0.114		
16	0.243			0.148	0.033						0.005	0.254	0.026		
17	0.222			0.099	0.044							0.240			0.002
18	0.139			0.075	0.027							0.186			0.013
18.2															0.002
19	0.019			0.030	0.013							0.057			0.069
19.2															0.002
20	0.003			0.020	0.009										0.167
21				0.009	0.006							0.005			0.165
22				0.008	0.002							0.002			0.159
22.2															0.006
23				0.002											0.143
23.2															0.006
24															0.126
24.2				0.008											
25				0.002											0.097
25.2				0.002											
26				0.005											0.037
27				0.037											0.006
28				0.123											0.002
28.2				0.008											
29				0.192											
29.2				0.015											
30				0.237											
30.2				0.032											
31				0.072											
31.2				0.111											
32				0.009											
32.2				0.080											
33				0.002											
33.2				0.059											
34				0.002											
34.2				0.003											
35				0.003											
PD	0.933	0.919	0.963	0.964	0.975	0.854	0.915	0.927	0.914	0.880	0.949	0.932	0.935	0.822	0.967
PM	0.067	0.081	0.037	0.036	0.025	0.146	0.085	0.073	0.086	0.120	0.051	0.065	0.065	0.178	0.033
PE	0.506	0.644	0.622	0.759	0.683	0.376	0.506	0.693	0.480	0.392	0.669	0.560	0.644	0.439	0.659
PIC	0.77	0.76	0.85	0.86	0.88	0.65	0.74	0.78	0.73	0.67	0.82	0.78	0.78	0.61	0.85
Ho	74.8	82.4	81.2	88.2	84.4	66.5	74.8	84.9	73.2	67.6	83.7	77.8	82.4	70.7	83.2
He	80.3	79.6	86.3	87.1	88.9	70.1	76.9	80.6	77.2	72.4	84.1	80.9	80.7	66.4	86.9
H-W	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nº Alleles	10	8	20	14	18	8	9	8	8	8	11	10	9	5	16
TPI	1.98	2.84	2.66	4.24	3.2	1.49	1.98	3.32	1.87	1.54	3.07	2.26	2.84	1.71	2.97
n	325	324	325	322	320	325	325	325	325	324	319	325	324	324	321

PD – Power of Discrimination, PM – Probability of Match, PE - Power of Exclusion, PIC – Polymorphism Information Content, He – Heterozygosity expected (%), Ho – Heterozygosity observed (%), H-W – Hardy-Weinberg equilibrium, TPI – Typical Paternity Index, n – Number of individuals analyzed per *loci*

References

- [1] A. Tereba. Tools for analysis of population statistics. Profiles in DNA 2 (1999) 14-16.
- [2] S. T. Kalinowski, M. L. Taper, T. C. Marshall. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol.Ecol. 16 (2007) 1099-1106.
- [3] C. M. Ruitberg, D. J. Reeder, J. M. Butler. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. Nucleic Acids Res. 29 (2001) 320-322.
- [4] C. Entrala, M. Lorente, J. A. Lorente, J. C. Alvarez, T. Moretti, B. Budowle, E. Villanueva. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci: Spanish population data. Forensic Sci.Int. 98 (1998) 179-183.
- [5] J. J. Gamero, J. L. Romero, J. L. Gonzalez, M. I. Arufe, M. I. Cuesta, F. Corte-Real, M. Carvalho, M. J. Anjos, D. N. Vieira, M. C. Vide. A study on ten short tandem repeat systems: African immigrant and Spanish population data. Forensic Sci.Int. 110 (2000) 167-177.
- [6] A. Perez-Lezaun, F. Calafell, J. Clarimon, E. Bosch, E. Mateu, L. Gusmao, A. Amorim, N. Benchemsi, J. Bertranpetit. Allele frequencies of 13 short tandem repeats in population samples from the Iberian Peninsula and northern Africa. Int.J Legal Med 113 (2000) 208-214.
- [7] C. Tomas, A. Picornell, J. A. Castro, M. M. Ramon, L. Gusmao, M. V. Lareu, A. Carracedo. Genetic variability at nine STR loci in the Chuerta (Majorcan Jews) and the Balearic populations investigated by a single multiplex reaction. Int.J Legal Med 113 (2000) 263-267.
- [8] L. Gusmao, P. Sanchez-Diz, C. Alves, M. V. Lareu, A. Carracedo, A. Amorim. Genetic diversity of nine STRs in two northwest Iberian populations: Galicia and northern Portugal. Int.J Legal Med 114 (2000) 109-113.
- [9] M. T. Zarrabeitia, J. A. Riancho. Population data on nine STRs from Cantabria, a mountainous region in northern Spain. Forensic Sci.Int. 122 (2001) 175-177.
- [10] A. Torio, M. R. Moya-Quiles, A. Luna, M. R. Alvarez-Lopez. STR data for the AmpFISTR Profiler Plus loci from Murcia region (SE Spain). Forensic Sci.Int. 129 (2002) 140-141.
- [11] Garcia-Hirschfeld J, Farfan MJ, Prieto V, Lopez-Soto M, Torres P, Sanz P. Allele distribution of 15 STRs in a population from Extremadura (Central-Western Spain). Progr. Forensic Genet. 9, 2003, International Congress Series, 1239, Elsevier, pp. 165-169.
- [12] A. M. Perez-Miranda, M. A. fonso-Sanchez, A. Kalantar, J. A. Pena, M. M. Pancorbo, R. J. Herrera. Allelic frequencies of 13 STR loci in autochthonous Basques from the province of Vizcaya (Spain). Forensic Sci.Int. 152 (2005) 259-262.
- [13] M. V. Camacho, C. Benito, A. M. Figueiras. Allelic frequencies of the 15 STR loci included in the AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit in an autochthonous sample from Spain. Forensic Sci.Int. 173 (2007) 241-245.
- [14] V. Lopes, A. Serra, J. Gamero, L. Sampaio, F. Balsa, C. Oliveira, L. Batista, F. Corte-Real, D. N. Vieira, M. C. Vide, M. J. Anjos, M. Carvalho. Allelic frequency distribution of 17 STRs from Identifiler and PowerPlex-16 in Central Portugal area and the Azores archipelago. Forensic Science International: Genetics 4 (2009) e1-e7.
- [15] P. Lincoln, A. Carracedo. Publication of population data of human polymorphisms. Forensic Sci.Int. 110 (2000) 3-5.

5. VALOR DE LA EVOLUCIÓN DE QUIMERISMO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA

Los regímenes quimioterápicos mieloablativos convencionales empleados en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos presentan una elevada toxicidad que conlleva un mayor riesgo de mortalidad, lo que limita su aplicación en pacientes de edad avanzada y en aquellos cuya comorbilidad previa al trasplante sea desfavorable. Los regímenes con acondicionamientos de intensidad reducida (AIR) han sido diseñados para ser más inmunosupresores que mieloablativos, con la doble intención de permitir el efecto inmune del injerto contra el tumor (EICT) y reducir la mortalidad relacionada con el trasplante. En este juego de objetivos del alo-TPH con AIR, el principal sería la inducción del EICT como mecanismo para erradicar la enfermedad maligna subyacente. Esto obliga a disponer de técnicas sensibles y específicas para monitorizar los cambios en la masa tumoral tras el trasplante, ya que la detección de un aumento de la carga tumoral permitiría facilitar intervenciones terapéuticas precoces (como retirada de la inmunosupresión, infusión de linfocitos del donante [ILD]), en un momento en el que estas medidas inmunoterapéuticas son especialmente eficaces, cuando el nivel de la enfermedad residual es aún muy bajo. En esta línea, algunos autores han observado una relación entre persistencia de enfermedad residual, quimerismo mixto y riesgo de recaída. Más recientemente, se ha hecho mayor énfasis en el grado de quimerismo y su evolución secuencial, especialmente en lo que se refiere a su valor en la influencia de desarrollo de EICH crónico y riesgo de recaída a largo plazo.

En el presente trabajo analizamos un total de 100 casos de alo-TPH con AIR con células progenitoras de sangre periférica de donante emparentado HLA idéntico. La monitorización del grado de quimerismo hematopoyético se realizó de forma secuencial

los días +28, +56 y +100 en muestras provenientes de médula ósea y en estudios por separado en células mieloides (selección CD15+) y células T (selección CD3+), mediante amplificación de 15 regiones microsatélites (STR). El estado del quimerismo se definió en base a los criterios previamente descritos por Bader *et al.*¹⁰⁸. Brevemente, se define como quimerismo completo (QC) si la señal corresponde en todo momento a hematopoyesis del donante, niveles bajos de quimerismo mixto (NB-QM) con señales inferiores al 5% en todo momento, quimerismo mixto ascendente (A-QM), que implica un aumento de >5% de células autólogas en dos estudios consecutivos y quimerismo mixto decreciente (D-QM) cuando hubo reducción del número de células autólogas en dos muestras consecutivas.

Se pudieron evaluar 74 de los 78 pacientes, mostrando QC ó NB-QM en 54 casos, 14 A-QM y 6 D-QM. Se observó una mayor frecuencia de recaída en los pacientes con QM ascendente (11 de 14) respecto a aquellos con QC/NB-QM (14/54) ó D-QM (2/6; $p < 0.001$). Del mismo modo, la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a 5 años, que fue del 40% en todos los pacientes, se redujo al 14% en pacientes con A-QM y aumentó al 53% para los demás pacientes ($p < 0.001$). En nuestra serie, por protocolo, a los 14 pacientes con A-QM se les disminuyo/suprimió la inmunosupresión (retirada o descenso de la dosis de ciclosporina). Además, seis de ellos recibieron inmunoterapia adicional (ILD), consiguiendo contrarrestar en cierta medida el efecto negativo del aumento del quimerismo, ya que en estos pacientes la supervivencia global a 5 años fue del 67%, mientras que en aquellos que no recibieron inmunoterapia fue de tan solo un 25% (Log Rank, $p = 0.05$). Como era de esperar, la frecuencia de EICHc fue claramente inferior en los pacientes con A-QM (17% vs. 69%, $p < 0.001$).

Estas observaciones nos permiten concluir que el quimerismo secuencial es una técnica fiable para identificar pacientes con alto riesgo de recaída, que deberían ser considerados para un tratamiento inmunoterápico activo (por ejemplo, ILD) antes de que se produzca la recidiva franca de la enfermedad.

Valor de la evolución del quimerismo y la discordancia en regiones STR en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida

M. Alcoceba, M. Díez-Campelo, L. Marín, M.D. Caballero, M.E. Sarasquete, M.C. Chillón, A. Balanzategui, A. Armellini, R. Corral, J.A. Pérez-Simón, J.F. San Miguel, M. González y R. García-Sanz

Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Centro de investigación del Cáncer de Salamanca.

INTRODUCCIÓN

El trasplante alogénico con células progenitoras hematopoyéticas (alo-TPH) es una modalidad terapéutica que se utiliza por su posible capacidad para curar diversas hemopatías, tanto malignas como no malignas (1). Las principales causas de fracaso de esta modalidad terapéutica estriban en la toxicidad del acondicionamiento, la recaída de la enfermedad y el desarrollo de la enfermedad del injerto contra huésped (EICH). Hasta hace relativamente poco tiempo, el acondicionamiento en el alo-TPH para pacientes con hemopatías malignas se basaba en el empleo de quimioterapia en dosis mieloablativas; sin embargo, ello se asocia a un elevado riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante (20% a un 40%) (2, 3). Por otro lado, la capacidad del alo-TPH para erradicar las células malignas se basa, no sólo en la intensidad del régimen de acondicionamiento, sino también en el efecto inmune del tejido inmunocompetente injertado (efecto injerto contra la leucemia [EICL]) (4). Ello ha permitido, por ejemplo, usar infusiones de linfocitos del donante como tratamiento en casos de recaída. Estos y otros datos permitieron llevar a cabo alotrasplantes con acondicionamientos de intensidad reducida (alo-TIR) (5, 7), diseñados para ser más inmunosupresores que mieloablativos, con la intención de reducir la toxicidad y la mortalidad relacionada con el trasplante asociadas a las altas dosis de quimioterapia pero permitiendo mantener el EICL.

USO DEL QUIMERISMO PARA MEDIR LA ENFERMEDAD RESIDUAL

Dado que el EICL es la principal arma para erradicar la leucemia en el alo-TIR (1, 4), se necesitan técnicas sen-

sibles y específicas para monitorizar los cambios en la masa tumoral tras el trasplante (8). Estas técnicas de detección de la enfermedad residual podrían facilitar intervenciones terapéuticas precoces, con bajo nivel de enfermedad residual, cuando la inmunoterapia es especialmente eficaz. Esta presunción se apoya en diversos hallazgos como el de la mayor probabilidad para obtener remisiones en pacientes con leucemia mieloide crónica en recaída citogenética o molecular, comparado con recaídas clínicas en forma crónica o acelerada (9). Además, hay datos que sugieren que los pacientes con una fase acelerada o crónica necesitan dosis más elevadas de linfocitos del donante para alcanzar la remisión que si la enfermedad sólo está en recaída molecular o citogenética (9, 10). Por ello, el riesgo de desarrollar una toxicidad relacionada con la infusión de linfocitos del donante, como EICH o aplasia secundaria, sería mayor en los primeros. En este sentido, tanto el momento como la dosis de la infusión de linfocitos del donante pueden adaptarse a la respuesta tumoral si ésta se puede medir de forma adecuada.

No obstante, hay muchas entidades como diversas leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos en los que no se dispone de marcadores inmunofenotípicos, citogenéticos o moleculares que permitan medir la enfermedad residual de forma directa. Por ello, la detección de las discordancias genéticas entre donante y receptor se ha utilizado, durante mucho tiempo, como herramienta clave en la distinción entre células hematopoyéticas procedentes del donante y aquellas residuales del receptor (quimerismo hematopoyético) tras el alo-TPH. El desarrollo de nuevos métodos más sensibles, como la distinción entre regiones microsátelites del ADN (*STR* o *Short Tandem Repeats*),

ha permitido aplicar esta idea como método indirecto de detección de la enfermedad residual (11, 12). Así, algunos autores han encontrado relación entre la persistencia de la enfermedad residual, el quimerismo mixto y el riesgo de recaída (13).

En este sentido, los datos de nuestro grupo y de otros evidencian que la obtención de un quimerismo completo en la subpoblación de células T se asocia con un menor riesgo de recaída, especialmente si tal estado se consigue antes del día +90 postalo-TIR (14-16). Más recientemente, se ha hecho hincapié en el grado de quimerismo y su evolución secuencial, especialmente en lo que se refiere a su valor en la influencia del desarrollo de la EICH crónica y el riesgo de recaída a largo plazo. En nuestro centro hemos analizado 100 casos de alo-TIR con células progenitoras de sangre periférica de donantes familiares HLA idénticos. La mediana de edad fue de 53 años (entre 23 y 69), con 63 varones y 37 mujeres, entre los cuales hubo una disparidad de sexo donantes/receptor del 49%. Por diagnósticos, hubo 21 mielomas múltiples, 18 linfomas no Hodgkin, 17 leucemias mieloblásticas agudas, 13 síndromes mielodisplásicos, 12 leucemias linfoides crónicas, 8 linfomas de Hodgkin, 5 leucemias agudas linfoblásticas, 4 leucemias mieloides crónicas y 2 síndromes mieloproliferativos crónicos. Dos pacientes murieron antes de ser evaluados; el resto pudieron ser evaluados con respecto al riesgo de desarrollar EICH aguda y 78 con respecto al riesgo de desarrollar EICH crónica. El quimerismo cuantitativo se evaluó de forma secuencial mediante análisis de regiones STR con la técnica Gene-Scanning los días +28, +56 y +100. Para ello, se utilizó el equipo PowerPlex®16 System kit (Promega Corporation, Madison, WI) que amplifica 16 regiones STR (15 más el género con la amilogenina) y un secuenciador automático ABIPrism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA). También se dispuso de estudios, por separado, en células mieloides y células T empleando el sistema de separación inmunomagnética de Miltenyi con los anticuerpos monoclonales CD15 y CD3. Los criterios para definir el estado del quimerismo fueron los descritos por Bader y cols. (17). Los datos fueron completos en el 95% de los pacientes (74/78) y la mediana de seguimiento fue de 2 años (entre 21 días y 75 meses).

De los 74 pacientes evaluables para EICH crónica, 54 revelaron un quimerismo completo o niveles bajos de quimerismo mixto; 14 tuvieron un quimerismo mixto ascendente, que implica un aumento de >5% de células autólogas en 2 señales consecutivas; y, finalmente, hubo 6 casos con quimerismo mixto decreciente. La recaída fue significativamente más frecuente en pacientes con quimerismo mixto ascendente (11 de 14) que en pacientes con quimerismo completo, niveles bajos de quimerismo mixto (14/54) o quimerismo mixto decreciente (2/6; $p < 0,001$). De este modo, la probabilidad de superviven-

cia libre de enfermedad a 5 años, que fue del 40% en todos los pacientes, se redujo al 14% en los pacientes con quimerismo mixto ascendente y aumentó al 53% para los demás pacientes ($p < 0,001$). Hay que destacar que en los 14 pacientes con quimerismo mixto ascendente, 6 recibieron inmunoterapia adicional (infusión de linfocitos del donante o bortezomib, aparte de retirar la CsA), hecho que, en cierta medida, contrarrestó el efecto negativo del aumento del quimerismo, ya que en estos 6 pacientes la supervivencia global a 5 años fue del 67%, mientras que en aquellos que no recibieron inmunoterapia fue de tan sólo un 25% ($p = 0,05$).

Como era de esperar, los pacientes con quimerismo completo, niveles bajos de quimerismo mixto o quimerismo mixto decreciente desarrollaron EICH crónica con mucha mayor frecuencia que los pacientes con quimerismo mixto ascendente (69% frente a 17%, $p < 0,001$).

Todo ello, nos permite concluir que el quimerismo secuencial es una técnica fiable para identificar pacientes con alto riesgo de recaída. De acuerdo con todo esto, aquellos pacientes que presenten un incremento del quimerismo mixto superior al 5% deberían ser considerados para un tratamiento activo antes de que se produzca la recaída clínica.

REGIONES STR, DISPARIDAD GENÉTICA Y EICH

La EICH sigue siendo la principal causa de morbimortalidad del alo-TPH, incluso en pacientes con identidad HLA completa con su donante (18,19). Ello se debe a que, aunque los antígenos HLA son los principales genes polimórficos implicados en el desarrollo de la EICH (20, 21), hay otras moléculas implicadas en su aparición, entre ellas, los antígenos menores de histocompatibilidad (por ejemplo HA-1), las citocinas (por ejemplo IL-10), las enzimas involucradas en el metabolismo de fármacos (por ejemplo MTHFR) y las proteínas relacionadas con el sistema inmunitario innato (por ejemplo NOD2/CARD15) (22-29).

Como hemos visto antes, la detección de discordancias entre donante y receptor en regiones microsátélites del ADN (*STR* o *Short Tandem Repeats*) se ha utilizado durante mucho tiempo como una herramienta clave en la monitorización del quimerismo hematopoyético después del alo-TPH (11, 12). Sin embargo, su posible valor como marcador de discordancias genéticas implicadas en el desarrollo de la EICH aún no se ha explorado. En una experiencia preliminar de nuestro grupo, pudimos determinar que la presencia de un número elevado de disparidades STR entre donante y receptor se asociaba a una supervivencia inferior, y que las discordancias en algunas regiones STR concretas, como D13S317, parecen estar asociadas a una mayor prevalencia y gravedad de la EICH y a una corta supervivencia (30). En esa línea, otros dos

estudios muy preliminares que evaluaron algunas regiones STR proporcionaron resultados similares, tanto analizando las discordancias STR de forma global (31) como individual (32). Más recientemente, Kim y cols. (33) obtuvieron, en una serie pequeña de pacientes, algunos resultados que les permitieron hipotetizar que las discrepancias en el VNTR D1S80 podrían estar relacionadas con la aparición de EICH crónica gastrointestinal.

En nuestro centro, hemos evaluado un gran número de pacientes analizando las discordancias entre donante y receptor en 15 loci con STR para conocer la incidencia y gravedad de la EICH aguda y la EICH crónica, así como su posible impacto en la supervivencia global y libre de enfermedad posterior a un alo-TPH con progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

Se evaluaron 149 pacientes consecutivos con hemopatías malignas que recibieron un alo-TPH de un donante emparentado HLA idéntico, 92 con un régimen de intensidad reducida y 57 con acondicionamiento mieloablativo. Se analizaron 15 regiones STR con la metodología antes expuesta. La mediana de discordancias entre donante y receptor fue de 9 (extremos 4 y 15). Se observó un aumento de la gravedad de la EICH aguda (grados II-IV, 46% frente a un 31%, $p=0,043$) y menor supervivencia global a los 5 años (54% frente a un 36%, $p=0,046$) en aquellos pacientes con ≥ 10 disparidades donante/receptor. Además, el riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante fue superior (29% frente a un 13%, $p=0,023$) en aquellas parejas con discrepancias en el marcador D13S317.

Estos datos sugieren que hay incompatibilidades genéticas entre donante y receptor situadas fuera de la región HLA que pueden influenciar la respuesta inmunitaria posterior al trasplante con progenitores hematopoyéticos. Por este motivo, las diferencias STR entre el donante y el receptor pueden ser un indicador indirecto de las diferencias globales entre ambos genomas. Nuestros datos indican que las diferencias STR podrían ser un buen dato para la estimación de las reacciones entre donante y receptor mediadas por tales diferencias. Los datos de otros grupos (32, 33) van en la misma dirección y, en especial, en lo que se refiere al impacto negativo que tienen las disparidades en la región D13S317. Así, el grupo de Stern (32), con el análisis de 9 regiones STR, observó que las disparidades en el marcador D13S317 se asociaban a un aumento de la incidencia y la gravedad de la EICH aguda. En un estudio más reciente, Kim y cols. (33) analizaron tres regiones VNTR en el cromosoma 1 y las discordancias en el locus D1S80, cercano al anterior, se asociaron a una baja supervivencia global, a la mortalidad no relacionada con la recaída y a un aumento de la EICH crónica. En resumen, todo ello indica que cerca del marcador D13S317 puede haber algún gen que codifique una proteína cuya función puede tener influencia sobre facto-

res que condicionan la mortalidad relacionada con el trasplante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Copelan, E.A. *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med 2006; 354: 1813-1826.
2. Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Report from the International Bone Marrow Transplant Registry. Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry*. Bone Marrow Transplant 1989; 4: 221-228.
3. Bortin, M.M., Horowitz, M.M., Rowings, P.A. et al. *1993 progress report from the International Bone Marrow Transplant Registry. Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry*. Bone Marrow Transplant 1993; 12: 97-104.
4. MacKinnon, S. *Who may benefit from donor leucocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation?* Br J Haematol 2000; 110: 12-17.
5. Niederwieser, D., Lange, T., Cross, M., Basara, N., Al-Ali, H. *Reduced intensity conditioning (RIC) haematopoietic cell transplantation in elderly patients with AML*. Best Pract Res Clin Haematol 2006; 19: 825-838.
6. Barrett, A.J., Savani, B.N. *Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: A review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents*. Leukemia 2006; 20: 1661-1672.
7. Valcárcel, D., Martino, R., Caballero, D. et al. *Sustained Remissions of High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome After Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Transplantation: Chronic Graft-Versus-Host Disease Is the Strongest Factor Improving Survival*. J Clin Oncol 2007.
8. Szczepański, T., Orfão, A., van der Velden, V.H., San Miguel, J.F., van Dongen, J.J. *Minimal residual disease in leukaemia patients*. Lancet Oncol 2001; 2: 409-417.
9. Dazzi, F., Fozza, C. *Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: Risk factors and treatment*. Best Pract Res Clin Haematol 2007; 20: 311-327.
10. Guilhot, F., Roy, L., Martineau, G., Guilhot, J., Millot, F. *Immunotherapy in chronic myelogenous leukemia*. Clin Lymphoma Myeloma 2007; 7(Suppl. 2): S64-S70.
11. González, M., López-Pérez, R., García-Sanz, R., Pérez-Simón, J.A., San Miguel, J.F. *Debate round-table: Comments concerning chimerism studies*. Leukemia 2001; 15: 1986-1988.
12. Kreyenberg, H., Hölle, W., Möhrle, S., Niethammer, D., Bader, P. *Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: The Tuebingen experience*. Leukemia 2003; 17: 237-240.
13. Baron, F., Sandmaier, B.M. *Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning*. Leukemia 2006; 20: 1690-1700.
14. Pérez-Simón, J.A., Caballero, D., Díez-Campelo, M. et al. *Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation*. Leukemia 2002; 16: 1423-1431.
15. Baron, F., Maris, M.B., Sandmaier, B.M. et al. *Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning*. J Clin Oncol 2005; 23: 1993-2003.

16. Mohty, M., Avinens, O., Faucher, C. et al. *Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation.* Haematologica 2007; 92: 1004-1006.
17. Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W. et al. *Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: Possible role for pre-emptive immunotherapy?* J Clin Oncol 2004; 22: 1696-1705.
18. Ferrara, J.L., Deeg, H.J. *Graft-versus-host disease.* N Engl J Med 1991; 324: 667-674.
19. Reddy, P., Ferrara, J.L. *Immunobiology of acute graft-versus-host disease.* Blood Rev 2003; 17: 187-194.
20. Baron, F., Storb, R. *Hematopoietic cell transplantation after reduced-intensity conditioning for older adults with acute myeloid leukemia in complete remission.* Curr Opin Hematol 2007; 14: 145-151.
21. Flomenberg, N., Baxter-Lowe, L.A., 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.
22. Goulmy, E., Schipper, R., Pool, J. et al. *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.* N Engl J Med 1996; 334: 281-285.
23. 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.
24. Chao, N.J. *Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant 2004; 10: 215-223.
25. Lin, M.T., Storer, B., Martin, P.J. 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.
26. Dickinson, A.M., Charron, D. *Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation.* Curr Opin Immunol 2005; 17: 517-525.
27. Middleton, P.G., Taylor, P.R., Jackson, G., Proctor, S.J., Dickinson, A.M. *Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants.* Blood 1998; 92: 3943-3948.
28. Rocha, V., Porcher, R., Filion, A. et al. *Association of Pharmacogenes Polymorphisms with Toxicities and GvHD after HLA-Identical Sibling Bone Marrow Transplantation.* Blood 2003; 102: 848a.
29. 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.
30. Alcoceba, M., Díez-Campelo, M., Martín-Jiménez, P. et al. *Allogeneic transplantation with identical MHC: Clinic-prognostic value of discrepancies of microsatellite DNA regions between recipient and donor.* Blood 2004; 104: 3336a.
31. Dalva, K., Arat, M., Serbest, E., Beksaç, M. *A comparison of the number of informative short tandem repeat (STR) loci between HLA identical donor-recipient pairs and the frequency of graft versus host disease (GvHD).* Genes Immun 2004; 5: (abstract [91]).
32. Stern, M., Meyer-Monard, S., Bucher, C. et al. *Prognostic value of discrepancies in micro-satellite DNA regions between donor and recipient in allogeneic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant 2005; 35: 249a.
33. Kim, D.H., Jung, H.D., Kwack, D.H. et al. *Predicting outcomes of HLA-identical allogeneic stem cell transplants from variable number of tandem repeat disparity between donors and recipients.* Haematologica 2006; 91: 71-77.

6. VALOR CLÍNICO-PRONÓSTICO DE LAS DISCREPANCIAS EN REGIONES DE ADN MICROSATÉLITE ENTRE RECEPTOR Y DONANTE EN EL CONTEXTO DE TRASPLANTE ALOGÉNICO EMPARENTADO HLA IDÉNTICO

La detección de disparidades entre donante y receptor de regiones microsátélites (STR) permite una monitorización específica y sensible del grado de quimerismo hematopoyético. Es bien conocido que las disparidades entre donante y receptor en varios sistemas polimórficos (principalmente HLA) se asocian con un incremento de la incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH). Sin embargo, el posible papel biológico de las discrepancias de STR en el desarrollo de EICH aún no ha sido establecido.

En el presente trabajo evaluamos un total de 149 pacientes consecutivos con neoplasias hematológicas receptores de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) de sangre periférica de un donante emparentado HLA idéntico. Se analizaron un total de 15 regiones STR mediante el kit comercial PowerPlex 16 y se clasificaron como idéntico cuando receptor y donante compartían los mismos alelos, o dispar, si al menos uno de los alelos difería.

Se observó una mayor severidad de EICH aguda (grados II-IV, $P=0.043$) y una menor supervivencia global a 5 años ($P=0.016$) en aquellos pacientes que presentaban 10 o más disparidades STR respecto del donante. Además, se encontró un mayor riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante en aquellas parejas donante-receptor con discrepancias en el marcador D13S317 ($P=0.019$).

Los datos aquí presentados sugieren que incompatibilidades genéticas fuera de la región HLA entre donante y receptor influye en la evolución de los pacientes sometidos a alo-TPH. Además, disparidades en la región colindante de D13S317 podría influir en la mortalidad relacionada con el trasplante.

Clinical and Prognostic Value of Discrepancies in Microsatellite DNA Regions Between Recipient and Donor in Human Leukocyte Antigen-Identical Allogeneic Transplantation Setting

Miguel Alcoceba, Ana Balanzategui, Maria Díez-Campelo, Patricia Martín-Jiménez, Maria Eugenia Sarasquete, M. Carmen Chillón, Carlos Santamaría, Jose Antonio Pérez-Simón, Luis Marín, M. Dolores Caballero, Jesús F. San Miguel, Ramón García-Sanz, and Marcos González

Background. Detection of recipient versus donor disparities in microsatellite DNA regions (short tandem repeats [STR]) allows for sensitive and specific monitorization of the degree of hematopoietic chimerism. It is well known that disparities between donor and recipient in various polymorphic systems (mainly human leukocyte antigen [HLA]) are associated with an increased incidence of graft-versus-host disease (GvHD). However, the possible biological role of STR discrepancies in GvHD development has not yet been well established.

Methods. We evaluated 149 consecutive patients with hematologic malignancies receiving peripheral blood stem-cell transplantation from a human leukocyte antigen-identical sibling donor. A total of 15 STR regions were analyzed using the PowerPlex16 kit and classified as identical when recipient and donor share the same alleles, and mismatched when at least one of the alleles differed.

Results. Higher severity of acute GvHD (II–IV, $P=0.043$) and shorter 5-year overall survival ($P=0.016$) was found in patients displaying more than 10 mismatches with respect to their donor. Additionally, higher risk of transplant-related mortality ($P=0.019$) was found in recipient–donor pairs with discrepancies in the D13S317 STR marker.

Conclusion. The present data suggest that genetic incompatibilities outside the human leukocyte antigen region between donors and recipients influence the outcome of patients receiving stem-cell transplantation. In addition, disparities in the neighboring D13S317 region could influence transplant-related mortality.

Keywords: Stem-cell transplantation, Microsatellite DNA regions, Short tandem repeats, Graft-versus-host disease.

(*Transplantation* 2008;86: 983–990)

Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (allo-HSCT) is an established treatment that can potentially cure patients with hematologic malignancies and inherited or acquired nonmalignant disorders of blood cells (1). Disease relapse and occurrence of graft-versus-host disease (GvHD) are the major complications of allogeneic HSCT; thus, GvHD is the main cause of morbidity and mortality even in the setting of human leukocyte antigen (HLA)-identical allo-HSCT (2, 3). Although HLA antigens are the main polymorphic genes involved in GvHD development (4, 5), other molecules such as minor histocompatibility antigens (i.e., HA-1), cytokines (i.e., IL-10), enzymes involved in drug metabolism (i.e., MTHFR), and innate immune system-related proteins (i.e., NOD2/CARD15), could play a role in the triggering or maintenance of GvHD (6–13).

Detection of donor versus receptor discordances in microsatellite DNA regions (short tandem repeats [STR]) has long been a key tool for the monitorization of hematopoietic

chimerism after allo-HSCT (14, 15). However, the possible biological role of such discrepancies in GvHD development has not yet been well established. Previous preliminary data from our group suggested that a high number of STR disparities between recipient and donor could be associated with short survival, and moreover, discrepancies in some STR regions (i.e., D13S317) could be associated with higher prevalence and severity of GvHD and poor survival (16). In line with these observations, two abstracts exploring a small number of STR regions reported similar results analyzing the overall number (17) or individual STR mismatches (18). More recently, in a short series of patients, Kim et al. (19) have hypothesized that discrepancies in VNTR D1S80 could be related to the occurrence of gut chronic GvHD (cGvHD).

In the present study, in a large series of patients, we have evaluated the effect of donor versus receptor discrepancies in 15 STR loci in incidence and severity of both acute (aGvHD) and cGvHD, as well as in the long-term overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) after allogeneic peripheral blood HSCT from an HLA-identical sibling donor.

DESIGN AND METHODS

A total of 149 consecutive patients with hematologic malignancies receiving peripheral blood stem cells (PBSC) from HLA-matched sibling donor between January 1998 and September 2005 at the University Hospital of Salamanca were included in the present study. Childhood patients or those receiving transplantation with bone marrow stem cells or from unrelated donors were excluded from the analysis. This

The authors have not disclosed any potential conflict of interest.
Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain.

Address correspondence to: Ramón García Sanz, Ph.D., Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario, Paseo de San Vicente, 58-182, 37007, Salamanca, Spain.

E-mail: rgarcias@usal.es

Received 2 April 2008. Revision requested 17 April 2008.

Accepted 20 May 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8607-983

DOI: 10.1097/TP.0b013e318183ee2a

study was approved by the local ethics committee in accordance with the Spanish law and written informed consent was obtained from all participants.

Patient and Transplant Characteristics

Median age was 46 years, ranging from 15 to 70 years. Twenty-five patients (17%) had received a prior autologous transplant. Sixty percent of the recipients were men and 40% were women, with a sex disparity of 44%. Other patient characteristics, including categorized disease status based on previously established criteria (20), ABO incompatibility, cytomegalovirus (CMV) serology, and number of CD34+ cells infused are listed in Table 1.

Ninety-two patients (62%) received a reduced intensity conditioning regimen, as previously described (21, 22). Briefly, myeloid diseases (n=37) were treated with fludarabine (30 mg/m² intravenously on days -9 to -5) and busulfan (1 mg/kg×10 doses, days -6 to -4, total 10 mg/kg), whereas lymphoid diseases (n=55) received fludarabine (same doses as above) followed by melphalan (70 mg/m² intravenously on days -3 to -2). The remaining patients (n=57, 38%) received a conventional myeloablative conditioning regimen mainly based on busulfan and cyclophosphamide (n=31) or cyclophosphamide and total body irradiation (n=21).

Graft-versus-host disease prophylaxis consisted of cyclosporin A plus methotrexate in 144 transplantations (97%), as previously described (22).

Acute GvHD and cGvHD were scored according to well-established criteria (23, 24). Engraftment was considered when the absolute neutrophil count was more than 0.5×10⁹/L and platelets more than 20×10⁹/L, without transfusion requirements, for more than 3 consecutive days.

Genotyping for 15 Short Tandem Repeats Loci

Genomic DNA extraction from peripheral blood samples from both recipient and donor was performed using DNAzol method (MRC, Cincinnati, OH), as previously described (25).

Microsatellite genotyping were carried out using the PowerPlex16 System kit (Promega Corporation, Madison, WI), following the manufacturers' protocol, slightly modified according to the "Eurochimerism project," in which we have participated (26). This kit allows the amplification of 15 STR regions: D3S1358 (3p), TH01 (11p15.5), D21S11 (21q11-21q21), D18S51 (18q21.3), Penta E (15q), D5S818 (5q23.3-32), D13S317 (13q22-q31), D7S820 (7q11.21-22), D16S539 (16q24-qter), CSF1PO (5q33.3-34), Penta D (21q), vWA (12p12-pter), D8S1179 (8q), TPOX (2p23-2pter), and FGA (4q28), plus the gender marker, Amilogenin (Xq22.1-22.3 and Y). The amplified products were analyzed using GeneScan 2.0 or GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) after electrophoresis in the ABIPrism 377 or ABIPrism 3130 (Applied Biosystems).

Short Tandem Repeats Disparity Definitions

The loci examined were classified as identical, when recipient and donor share the same alleles, and mismatched, when at least one of the alleles differed between recipient and donor of the 15 STR regions analyzed.

TABLE 1. Patient and transplant characteristics

Variable	Patients (n=149), n (%)
Median follow-up (mo)	64
Age (yr), mean (SD)	
Patient	45.54 (13.9)
Donor	44.39 (14.6)
Sex (recipient)	
Male	89 (60)
Sex disparity	66 (44)
Donor female	70 (47)
ABO incompatibility	
Minor	31 (21)
Major	25 (17)
CMV	
Patient positive	123 (83)
Donor positive	117 (79)
Patient-/donor+	10 (7)
Diagnosis	
Acute leukaemia	51 (34.2)
AML	33 (22.1)
ALL	18 (12.1)
MDS	19 (12.8)
CLPD	60 (40.3)
MM	20 (13.4)
NHL	20 (13.4)
CLL	12 (8.1)
HL	8 (5.4)
MPD	17 (11.4)
CML	14 (9.4)
Other MPD	3 (2)
Others ^a	2 (1.3)
Performance status	
ECOG ≥1	88 (60)
ECOG ≥2	10 (7)
Categorised disease status ^b	
Low risk	66 (44)
Intermediate risk	49 (33)
High risk	34 (23)
CD34 ⁺ cells infused (×10 ⁶ /kg), mean (SD)	5.22 (2.1)

CMV, cytomegalovirus; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CLPD, chronic lymphoproliferative disorder; CML, chronic myeloid leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma; MPD, myeloproliferative disorder; NHL, non-Hodgkin's lymphoma.

^a T-lymphoblastic-lymphoma, n=1; CLL+HL, n=1.

^b Based on previously established criteria (20).

Definitions and Statistical Analysis

The results were analyzed according to the information available in May 2007.

The day of the stem-cell infusion was defined as day 0. Overall survival was calculated from transplant until death for any cause, and surviving patients were censored at last follow-up. Second and third transplants were excluded for survival calculations. Transplant-related mortality (TRM)

was defined as death because of causes unrelated to the underlying disease. Relapsing patients were censored at the time of the first clinical evidence of relapse among those who reached a complete remission at any time after transplantation. All patients who had evidence of engraftment were evaluated for aGvHD, whereas only patients who engrafted and survived more than 100 days after infusion were evaluated for cGvHD. The day of GvHD was calculated from transplant until diagnosis of aGvHD or cGvHD among valuable patients.

Hardy-Weinberg equilibrium was tested applying a modified hidden Markov chain with 100,000 steps approach, as implemented in the Arlequin 3.0 Software (27).

The influence on OS, DFS, aGvHD, and cGvHD was evaluated for the following variables: STR individual mismatches, number of STR disparities, donor or patient age, donor or patient sex (including female-to-male), donor or patient CMV serology, ABO mismatch, type of diagnosis, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status at transplant, disease status at transplant, CD34+ cell dosage, conditioning regimen, and previous transplant. For this purpose, the two-sided log-rank test was used to test the univariate association between variables, and survival curves were plotted according to the Kaplan and Meier method.

All factors that significantly or marginally ($P < 0.1$) influenced OS, DFS, or incidence and severity of aGvHD and cGvHD in univariate analysis were included in a multivariate analysis using a forward-step Cox regression model. The statistical data were generated using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (SPSS 14.0, Inc. Chicago, IL). Differences were considered to be statistically significant when P values were less than 0.05.

RESULTS

Short Tandem Repeats Disparity

The number of STR disparities between recipient and donor ranged from 4 to 15, with a median of 9. Individually, all STR markers showed a disparity of greater than 50% (median, 61.8% of disparity; range, 51.7–73.2) and were valid for the study. A possible bias in patient selection was excluded by testing the homogeneity in the distribution of STR disparities according to patient characteristics. Allelic frequencies were consistent in all cases with the Hardy-Weinberg equilibrium for any of the different 15 STR included in the study.

Acute Graft-Versus-Host Disease

All transplants were engrafted and could be evaluated for aGvHD. Cumulative incidence of aGvHD was of 49%, with 35% grades II–IV and only 7% grade III–IV (Table 2). The mean day of aGvHD was +40 (SD ± 29 days).

In univariate analysis, those patients with 10 or more disparities between donor and recipient increased the incidence of aGvHD although the differences did not reach statistical significance (61% vs. 48%, $P = 0.07$). By contrast, significant differences were observed in severity of aGvHD, on comparing patients with greater than or equal to 10 or less than 10 disparities (46% vs. 31% grades II–IV aGvHD, respectively; $P = 0.049$, see Table 3 and Fig. 1). As far as single STR disparities were concerned, no relationship between any STR marker and incidence or severity of aGvHD was found.

TABLE 2. Incidence and characteristics of acute and chronic GvHD

Variable	Patients, n (%)
Acute GvHD (n=149)	73 (49)
Grade of aGvHD	
0	76 (51)
1	25 (16.8)
2	38 (25.5)
3	10 (6.7)
4	0
Chronic GvHD (n=115)	80 (69.6)
Grade of cGvHD	
Limited	17 (21.25)
Extensive	63 (78.75)

GvHD, graft-vs.-host disease.

The only relevant finding was a trend toward an association between TPOX discordances and the severity of aGvHD (28% vs. 39%, $P = 0.09$).

All variables with statistically significant or marginal impact on the incidence of aGvHD in univariate ($P < 0.1$) (conditioning regimen, donor CMV serology, ECOG ≥ 2 at transplant, presence of ≥ 10 disparities, TPOX mismatch) were included in the multivariate analysis. ECOG greater than or equal to 2 (HR 2.4, 95% CI 1.03–5.64), donor CMV serology (HR 2.2, 95% CI 1.12–4.32), and conditioning regimen (HR 1.8, 95% CI 1.14–2.89) were selected as independent variables influencing the incidence of aGvHD, whereas ECOG greater than or equal to 2 (HR 3.5, 95% CI 1.46–8.43) and presence of greater than or equal to 10 disparities (HR 1.9, 95% CI 1.02–3.60) did so for severity of aGvHD (see Table 3).

Chronic Graft-Versus-Host Disease

A total of 115 transplants could be evaluated for cGvHD, whose 5-year cumulative incidence was 78% (16% limited and 61% extensive, Table 2). Within the group of patients with cGvHD, 40 patients (50%) developed the disease without preceding aGvHD symptoms and 30 (37.5%) presented cGvHD after remission of a previous aGvHD. Finally, 10 patients (12.5%) suffered cGvHD directly arising after aGvHD without a disease-free interval.

In univariate analysis, patients with donor or recipient disparities in D13S317 presented 85% incidence of cGvHD when compared with 70% among those who had identical D13S317 alleles ($P = 0.044$, Fig. 2). By contrast, the number of STR disparities did not influence the incidence or severity of cGvHD.

All statistically or marginally significant variables in univariate ($P < 0.1$) were included in the multivariate analysis (Table 3). Only ECOG greater than or equal to 2 (HR 3.1, 95% CI 1.31–7.11) retained an independent statistically significant influence on the development of cGvHD, and female-to-male donation (HR 1.9, 95% CI 1.09–3.29) on the extensive cGvHD. D13S317 mismatch may have an influence on cGvHD incidence although no significant differences were reached (Table 3).

TABLE 3. Variables influencing the incidence and severity of aGvHD and cGvHD

	n	aGvHD ^a				II-IV aGvHD ^a			
		Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
		%	P	HR (95% CI)	P	%	P	HR (95% CI)	P
Performance status									
ECOG <1	136	50	0.072	2.411 (1.031–5.637)	0.042	32	0.004	3.509 (1.461–8.427)	0.005
ECOG ≥2	9	75				75			
Donor CMV serology									
Negative	31	34	0.034	2.205 (1.125–4.324)	0.021	—	—	—	—
Positive	116	55							
Conditioning regimen									
Myeloablative	57	62	0.022	1.816 (1.140–2.893)	0.012	—	—	—	—
Reduced intensity	91	44							
STR disparity									
<10 Disparities	111	48	0.07	—	NS	31	0.049	1.918 (1.021–3.606)	0.043
≥10 Disparities	32	60				46			
cGvHD ^a									
Performance status									
ECOG <1	107	77	0.006	3.054 (1.312–7.110)	0.01	—	—	—	—
ECOG ≥2	6	100							
D13S317 identity									
Identical	55	70	0.044	1.525 (0.974–2.388) ^b	0.065 ^b	—	—	—	—
Mismatch	60	85							
Donor sex									
Female-to-male donor	26	—	—	—	—	77	0.02	1.897 (1.095–3.288)	0.022
Other	89					57			
Extensive cGvHD ^a									

^a No other variables (other single STR disparities, donor or recipient age, recipient sex, recipient CMV serology, ABO mismatch, diagnosis, disease status at transplant, CD34+ cell dosage, previous autologous transplant and GvHD prophylaxis) significantly influenced the incidence and severity of aGvHD and cGvHD.

^b D13S317 mismatch could have a marginal influence on cGvHD incidence.

Overall Transplant Outcomes

Overall TRM was 20% and was significantly higher in pairs with D13S317 mismatch (29% vs. 13%, $P=0.023$). The number of STR disparities did not influence TRM.

In the multivariate analysis, independent variables influencing TRM were aGvHD severity (HR 3.4, 95% CI 1.59–7.06), high-risk categorized disease status (HR 2.7, 95% CI 1.18–6.06), and D13S317 mismatch (HR 2.5, 95% CI 1.16–5.51) (Table 4).

Neither the number of STR disparities nor discrepancies in any STR marker were related to 5-year DFS. The only variable with an independent favorable impact on DFS in multivariate analysis was the presence of cGvHD (HR 4.0, 95% CI 1.22–13.05) (Table 4).

With a median follow-up of 27 months (range, 17 days–105 months), the estimated 5-year OS was 51%. Interestingly, in the univariate analysis, patients presenting greater than or equal to 10 disparities (36% vs. 54%, $P=0.047$; Table 4 and Fig. 1) and mismatched pairs for D13S317 (43% vs. 56%, $P=0.048$; Table 4 and Fig. 2) significantly influenced the 5-year OS.

In multivariate analysis, ECOG greater than or equal to 2 at transplant (HR 2.9, 95% CI 1.32–6.32), disease status at transplant (HR 2.2, 95% CI 1.28–3.76), and presence of

greater than or equal to 10 disparities (HR 1.9, 95% CI 1.13–3.21) significantly influenced 5-year OS (Table 4).

DISCUSSION

Human leukocyte antigen-A, -B, and -DR molecules seem to be the most important factors for determining whether transplanted T-cells initiate a graft-versus-host reaction (4, 5), because they provide the crucial surface on which T-cell receptors recognize nonself antigens. However, GvHD is a common finding even among patients receiving transplants from HLA-identical SCT donors, which indicate that other molecules must be involved in the development of GvHD (6–13). Short tandem repeats differences between the recipient and the donor could be used as an indirect estimator of donor versus recipient reactions mediated by such differences. Nevertheless, to date little information is available about microsatellite donor or recipient discrepancies and its relationship with the transplant outcome.

In this study, we have used 15 STR microsatellite markers to assess the genetic variability between donor and recipient to explore potential relationships with the clinical outcome of patients receiving an allogeneic PBSCT from HLA-identical siblings. Our results show that a high number

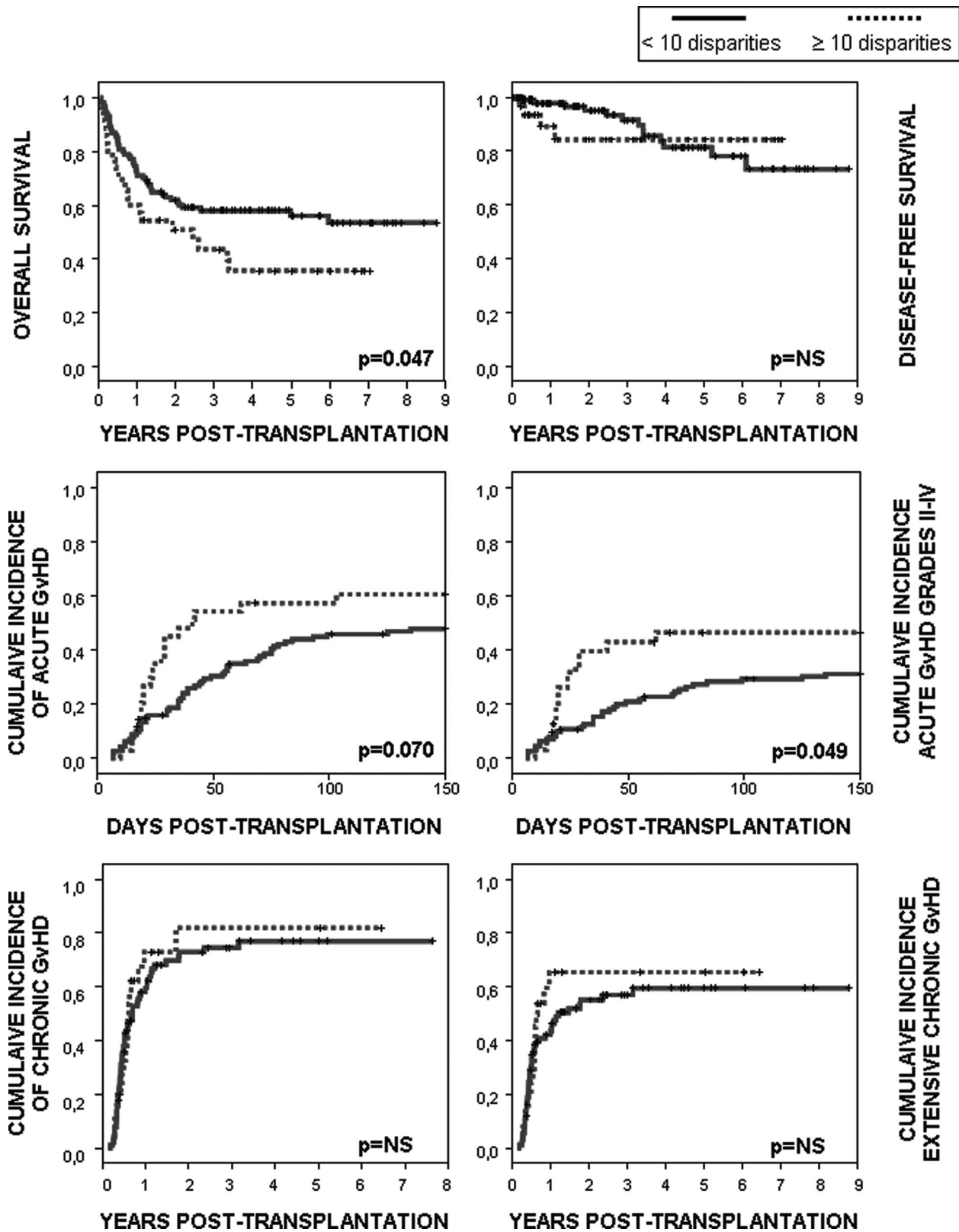


FIGURE 1. Survival curves estimated according to 10 disparities.

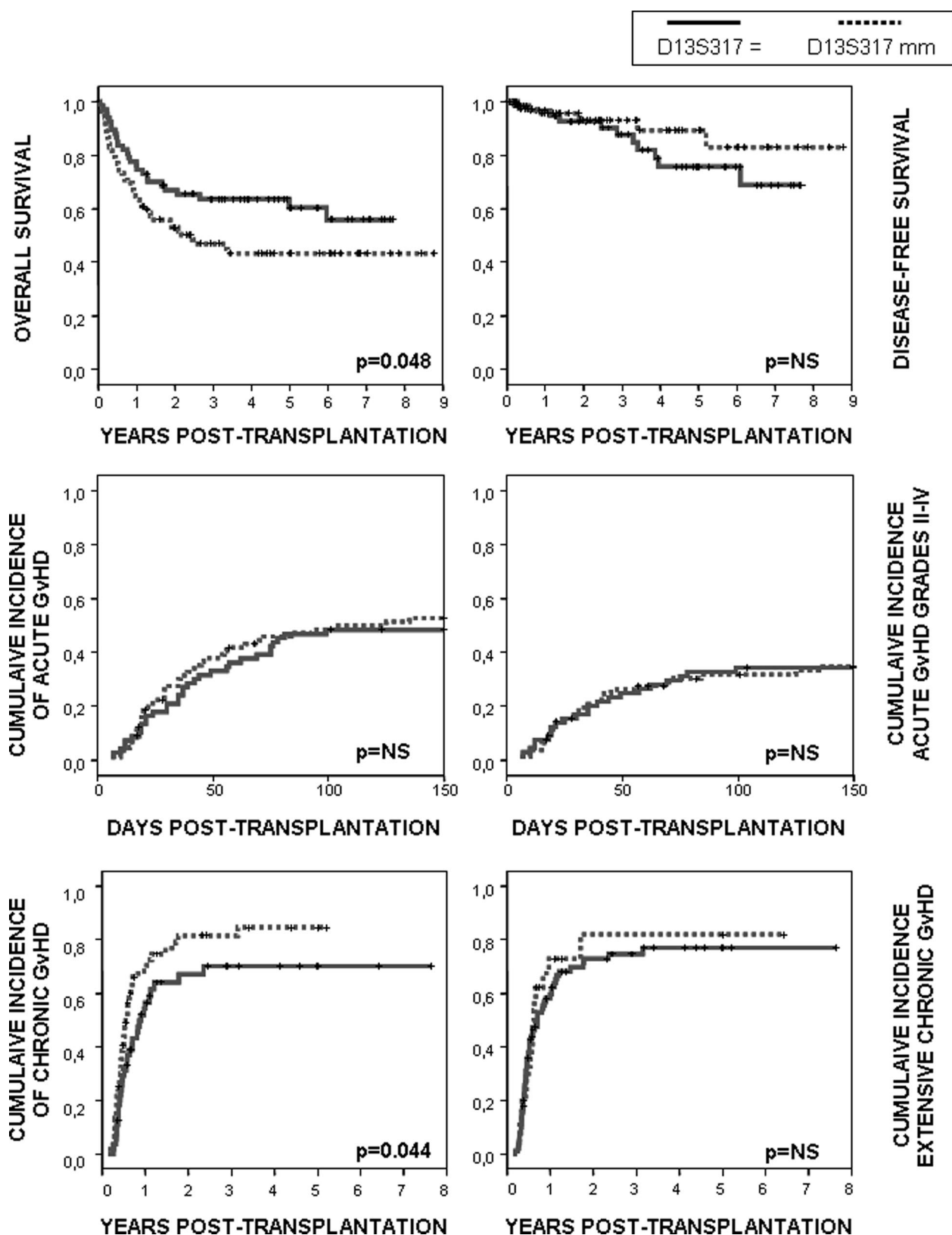


FIGURE 2. Survival curves according to discrepancies in D13S317.

TABLE 4. Variables influencing the TRM, 5-yr DFS and 5-yr OS

	n	Univariate		Multivariate	
		%	P	HR (95% CI)	P
TRM^a					
Performance status					
ECOG <1	136	19	<0.001	—	NS
ECOG ≥2	10	70			
aGvHD severity					
0–I	35	14	0.001	3.351 (1.591–7.055)	0.001
II–IV	114	39			
Categorized disease stat.					
Others	115	17	0.01	2.669 (1.176–6.055)	0.019
High-risk	34	40			
D13S317 identity					
Identical	67	13	0.023	2.533 (1.164–5.512)	0.019
Mismatch	82	29			
STR disparity					
<10 disparities	114	19	0.100	—	NS
≥10 disparities	35	32			
5 yr DFS^a					
Categorized disease stat					
Others		79	0.018	—	NS
High-risk		56			
cGvHD					
Yes	80	84	0.004	3.987 (1.218–13.054)	0.022
No	35	54			
Donor age (yrs)					
<32	111	100	0.010	—	NS
≥32	37	72			
ABO disparity					
Major	30	55	0.029	2.870 (0.940–8.832) ^b	0.066 ^b
Other	119	83			
5 yr OS^c					
Performance status					
ECOG <1	136	52	<0.001	2.889 (1.320–6.322)	0.008
ECOG ≥2	10	20			
Categorized disease status					
Others	115	55	<0.001	2.194 (1.281–3.756)	0.004
High-risk	34	32			
STR disparity					
<10 disparities	114	54	0.047	1.903 (1.128–3.210)	0.016
≥10 disparities	35	36			
Recipient sex					
Male	89	39	0.023	—	NS
Female	60	64			
D13S317 identity					
Identical	67	56	0.048	—	NS
Mismatch	82	43			

TRM, transplant related mortality; DFS, disease-free survival; OS, overall survival; STR, short tandem repeats; CMV, cytomegalovirus; GvHD, graft-vs.-host disease; TRM, transplant-related mortality.

^a No other variables (other single STR disparities, recipient age, donor or recipient sex, donor or recipient CMV serology, CD34+ cell dosage, previous autologous transplant, and GvHD prophylaxis) significantly influenced the TRM and DFS.

^b ABO major disparity could have a marginal influence on 5-yr DFS.

^c No other variables (other single STR disparities, donor or recipient age, donor sex, donor or recipient CMV serology, ABO mismatch, diagnosis, CD34+ cell dosage, conditioning regimen, previous autologous transplant, and GvHD prophylaxis).

of disparities between donor and recipient (>10 mismatches, at least two thirds of the total STR analyzed) are associated with a higher incidence of aGvHD severity and a shorter OS. This data favor the hypothetical, unfavorable effect of a high-genetic discrepancy between siblings in the immunologic reaction during the allogeneic transplant despite the HLA identity. In addition, the use of STR mismatch screening could also be used to localize possible genes or chromosomal regions involved in allo-SCT outcome. Accordingly, we have found that recipient–donor pairs with discrepancies in D13S317 STR marker are at higher risk of TRM, and shorter OS. However, none of the known minor histocompatibility antigens is located on chromosome 13 (7). Moreover, to the best of our knowledge no association have been described between the specific STR or 13q31.1 chromosome region with immunoreactivity up to now. Furthermore, the neighboring genes have unknown functions or have not been associated with immunoreactivity.

In conclusion, the use of mismatch evaluation of STRs could be a valuable tool to predict the transplant outcome and therefore may help to identify the most appropriate donor. Furthermore, the use of STR could be used as a guide to choose the best prophylactic regimen for GvHD. In addition, the differences in the posttransplant behavior according to D13S317 STR, which is placed in 13q22–q31, suggests the presence of a genetic complex neighbor to this chromosomal region with a potential role in the alloimmune recognition and reaction.

REFERENCES

- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354: 1813.
- Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 667.
- Reddy P, Ferrara JL. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2003; 17: 187.
- Baron F, Storb R. Hematopoietic cell transplantation after reduced-intensity conditioning for older adults with acute myeloid leukemia in complete remission. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 145.
- 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.
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 281.
- Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 171.
- Chao NJ. Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 215.
- 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.
- Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 517.
- Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, et al. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998; 92: 3943.
- Rocha V, Porcher R, Filion A, et al. Association of pharmacogenes polymorphisms with toxicities and GvHD after HLA-identical sibling bone marrow transplantation [abstract]. *Blood* 2003; 102: 848.
- 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.
- Gonzalez M, Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, et al. Debate round-table: Comments concerning chimerism studies. *Leukemia* 2001; 15: 1986.
- Kreyenberg H, Holle W, Mohrle S, et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: The Tuebingen experience. *Leukemia* 2003; 17: 237.
- Alcoceba M, Díez-Campelo M, Martín-Jiménez P, et al. Allogeneic transplantation with identical MHC: Clinic-prognostic value of discrepancies of microsatellite DNA regions between recipient and donor [abstract]. *Blood* 2004; 104: 3336.
- Dalva K, Arat M, Serbest E, et al. A comparison of the number of informative short tandem repeat (STR) loci between HLA identical donor-recipient pairs and the frequency of graft versus host disease (GvHD) [abstract]. *Genes Immun* 2004; 5: 91.
- Stern M, Meyer-Monard S, Bucher C, et al. Prognostic value of discrepancies in micro-satellite DNA regions between donor and recipient in allogeneic stem cell transplantation [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 249.
- Kim DH, Jung HD, Kwack DH, et al. Predicting outcomes of HLA-identical allogeneic stem cell transplants from variable number of tandem repeat disparity between donors and recipients. *Haematologica* 2006; 91: 71.
- Perez-Simon JA, Díez-Campelo M, Martino R, et al. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2005; 130: 394.
- Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: Results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2001; 115: 653.
- Perez-Simon JA, Díez-Campelo M, Martino R, et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102: 1108.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825.
- Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca I, Díez-Campelo M, et al. Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs* 2006; 66: 1041.
- Gonzalez M, Gonzalez D, Lopez-Perez R, et al. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 1999; 84: 779.
- Watzinger F, Lion T, Steward C. The RSD code: Proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2006; 20: 1448.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; 1: 47.

7. EL GENOTIPO DE CD31 (PECAM-1) DEL DONANTE SE ASOCIA CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED AGUDA TRAS TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EMPARENTADO HLA IDÉNTICO

Introducción

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) sigue siendo una de las mayores complicaciones tras alo-TPH incluso en el contexto de identidad HLA^{42:109}. En la fase II de la EICH las células T del donante son activadas y migran junto con otros leucocitos a los diversos tejidos⁴³. Esta migración está mediada por selectinas (p.ej. CD62L, CD62E, CD62P), integrinas (p.ej. LFA-1) y moléculas de adhesión (p.ej. ICAM-1 (CD54), ICAM-2, JAM-1, VCAM-1, CD99 ó PECAM-1 (CD31))¹¹⁰⁻¹¹². Así, polimorfismos dentro de estas moléculas pueden dar lugar a diferentes interacciones con sus ligandos, pudiendo influir en la migración de los leucocitos y jugando un papel en el desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Estudios previos señalan la presencia de polimorfismos en algunas moléculas como CD62L ó CD31 con una mayor incidencia de EICH^{90:91}, si bien otros resultados reflejan resultados contradictorios¹¹³. Por su parte, polimorfismos en ICAM-1 se han relacionado previamente con enfermedades autoinmunes o inflamatorias¹¹⁴⁻¹¹⁶. Por tanto, el valor del papel de los polimorfismos en estas moléculas debe ser aún esclarecido.

Con esta premisa nos planteamos evaluar la influencia del genotipo del SNP en el codón 125 de CD31 (CD31-125, C577G Leu->Val) y del SNP en el codón 241 de CD54 (CD54-241, G864A Gly->Arg) en receptor y donante con la incidencia y severidad de la EICH aguda (EICHa), así como la supervivencia global a largo plazo (SG) y la supervivencia libre de recaída (SLR) tras alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico.

Pacientes y métodos

Pacientes

Se incluyen muestras pareadas receptor/donante de 127 pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda o síndrome mielodisplásico receptores de un alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico entre Enero de 1994 y Diciembre de 2005 en 13 centros de trasplante pediátrico de Alemania remitidos al centro de estudio en Tübingen. Este estudio ha sido aprobado por el comité ético clínico local de la Universidad de Tübingen, desarrollándose de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki, habiéndose obtenido el consentimiento informado de todos los participantes y sus padres de acuerdo a las guías internas de la institución.

La mediana de edad de los pacientes fue de 10 años, con una mediana de seguimiento de 16 meses. Todos los pacientes recibieron un acondicionamiento mieloablatoivo basado principalmente en busulfán y ciclofosfamida (n=64) o irradiación corporal total y etopósido (n=48). La graduación de la EICHa realizó según criterios previamente bien establecidos^{117;118}. Otras características clínicas incluyendo el estado de la enfermedad categorizado basado en criterios previamente establecidos¹¹⁹, la fuente de progenitores hematopoyéticos, el régimen de acondicionamiento o la profilaxis de EICH se resumen en la Tabla 1.

Detección de polimorfismos SNP

La extracción del ADN a partir de muestras de sangre periférica de paciente y su donante se realizó mediante los kits comerciales Qiagen Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany), según se ha descrito previamente¹²⁰.

Tabla 1. Características de pacientes y transplantes

Variable	Pacientes n=127 (%)
Mediana de seguimiento (meses)	16
Edad (años), [mediana (rango)]	9.66 (0.39-20.51)
Sexo (receptor)	
Varón	81 (63)
Disparidad de sexo	55 (43)
Donante mujer	60 (47)
Diagnóstico	
Leucemia aguda	101 (80)
LLA	67 (53)
LMA	34 (27)
SMD	26 (20)
Fuente de progenitores hematopoyéticos	
Médula ósea	105 (82.7)
Sangre periférica	21 (16.5)
Cordón umbilical	1 (0.8)
Estado de la enfermedad categorizado ^a	
Bajo riesgo	62 (48.8)
Intermedio riesgo	48 (39.4)
Alto riesgo	15 (11.8)
Régimen de acondicionamiento	
Basados en Busulfán	65 (51.2)
Bus + Cyc (\pm ATG)	22 (17.3)
Bus + Cyc + Mel (\pm ATG)	32 (25.2)
Bus + Cyc + Thio (\pm ATG/OKT3)	2 (1.6)
Bus + Cyc + Eto (\pm ATG)	9 (7.1)
No basados en Busulfán	62 (48.8)
ICT + Eto	49 (38.6)
Otros	13 (10.2)
Profilaxis EICH	
Sólo CsA	77 (60.6)
CsA + Mtx	25 (19.7)
Sin profilaxis	6 (4.7)
Sin datos	19 (15)

^a Basado en criterios previamente establecidos (Pérez-Simón 2005)

Abreviaturas: ATG, globulina antitímocítica; Bus, busulfán; Cyc, ciclofosfamida; Eto, etopósido; ICT, irradiación corporal total; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LMA, leucemia mieloblástica aguda; Mel, melfalán; Mtx, metotrexato; SMD, síndrome mielodisplásico; Thio, Thiotepe

El tipaje de los SNP en posición 125 del gen que codifica CD31 y 241 de CD54 se realizó empleando los primers descritos por Maas y col.¹²¹, con las condiciones de PCR descritas por Willasch y col.¹²². Brevemente, se realizó una PCR a tiempo real en

el ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems), aplicando tecnología Taqman y empleando FAM como reporter y TAMRA como quencher. Los productos amplificados se analizaron mediante Sequence Detector Software (Applied Biosystems).

Definiciones y análisis estadístico

Los fenotipos de CD31 y CD54 se analizaron individualmente para identidad y compatibilidad. Se clasificaron como idénticos cuando receptor y donante compartían ambos alelos y no idénticos cuando al menos uno de los alelos difería entre donante y receptor. Del mismo modo, se clasificaron como incompatibles si el donante reconoce como extraño un alelo del receptor, siendo compatibles cuando ambos alelos del receptor son reconocidos por el donante.

Se evaluó la influencia en SG, SLR y EICHa de las siguientes variables: genotipo de receptor y donante de CD31 y CD54, identidad e incompatibilidad de CD31 y CD54, edad de receptor y donante, sexo de receptor y donante (incluyendo donante mujer a receptor varón), diagnóstico y estado de la enfermedad al trasplante. Para los cálculos de supervivencia se excluyeron segundos trasplantes. Los análisis univariantes se estimaron mediante el test de log-rank, realizando las curvas de supervivencia global y supervivencia libre de recaída según el método de Kaplan-Meier. Aquellas variables con tendencia ($P < 0.1$) o significación que influyeran en SG, SLR o en la incidencia o severidad de EICHa en el análisis univariante se incluyeron en un análisis multivariante empleando el método de regresión de Cox para analizar simultáneamente diferentes factores de riesgo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el paquete estadístico SPSS 15.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores de la P fueron menores a 0.05.

Resultados y Discusión

Frecuencias alélicas y fenotípicas de los polimorfismos

Las frecuencias alélicas y fenotípicas de ambos polimorfismos fueron similares a las previamente publicadas^{114;121;123-125} (ver Tabla 2), sin observarse diferencias entre el grupo de receptores y el de donantes (datos no mostrados).

Tabla 2. Frecuencias alélicas y fenotípicas de los polimorfismos CD31-125 y CD54-241					
CD31-125					
	CC	CG	GG	C	G
Estudio actual (n=254)	0.20	0.49	0.31	0.45	0.55
Behar, Nichols, Maas (n=1064)	0.27	0.48	0.25	0.51	0.49
CD54-241					
	GG	AG	AA	G	A
Estudio actual (n=90)	0.16	0.56	0.29	0.43	0.57
Vora, Mycko (n=160)	0.22	0.42	0.36	0.43	0.57

Evolución clínica

Todos los trasplantes injertaron y pudieron ser evaluados para EICHa. La incidencia acumulada de EICHa fue del 68%, con 55% de grado II-IV y 19% grado III-IV (Tabla 3).

No se halló relación entre el genotipo del receptor, la disparidad o la incompatibilidad de CD31-125 y CD54-241 entre donante y receptor con los parámetros clínicos analizados: incidencia o severidad de EICHa, supervivencia libre de recaída y supervivencia global. Sin embargo, sí se observó una mayor severidad de EICHa

(grados II-IV) en aquellos pacientes con un donante heterocigoto para CD31-125 (67% vs. 47%, $P=0.003$).

Variable	Pacientes, n (%)
EICH aguda (n=127)	86 (68.3)
Grado de EICHa	
0	40 (31.7)
1	17 (13.5)
2	45 (35.7)
3	20 (15.9)
4	4 (3.2)

El polimorfismo CD31-125 produce un cambio de aminoácido que produce una alteración de la estructura de la proteína¹⁷¹. Asimismo, se ha observado que el genotipo heterocigoto de este SNP confiere una mayor adherencia los monocitos que lo expresan¹⁷². Así, en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, la presencia del genotipo heterocigoto para este SNP en los monocitos del donante (que por tanto llevaría ambas formas de la proteína) favorecería la migración de los mismos a través de las células endoteliales, facilitando el acceso a los distintos tejidos y con ello facilitando una reacción contra las células del receptor.

El papel del genotipo de CD31 del donante ha sido escasamente estudiado, reduciendo los estudios hasta la fecha a la incompatibilidad o identidad de la molécula entre receptor y donante, entendiendo su papel como antígeno menor de histocompatibilidad^{113;124;163-166}. Goodman y *col.* encontró una asociación del genotipo heterocigoto del donante con una mayor incidencia y severidad de la EICH⁹⁰. Por su parte, Cavanagh y *col.* observaron una peor supervivencia global con el mismo genotipo¹⁶¹. Los resultados aquí expuestos irían en consonancia con las observaciones descritas.

Conclusiones

En conclusión, los datos obtenidos sugieren que el genotipo de ICAM-1 (CD54) parece no influir en la evolución tras alo-TPH. Por el contrario, el genotipo del donante para PECAM-1 (CD31) se relaciona con el desarrollo de complicaciones tras trasplante alogénico, como la severidad de la EICHa. De confirmarse el valor de PECAM-1 en estudios prospectivos, su estudio en el donante podría ser de relevancia clínica para anticiparse a complicaciones tras alo-TPH.

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 adquiridas³⁴. 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. Los de mayor importancia son el reconocimiento inmune, que da lugar a EICH y EICL, el rechazo del injerto y la recaída. Estos fenómenos se relacionan 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 capacidad de presentación antigénica¹⁰⁹. Sin embargo, aún existiendo identidad HLA entre receptor y donante la EICHa sigue presentándose en ~40% de los pacientes⁴². Esto supone una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, limitando por tanto el empleo del procedimiento^{42;126}. Así, en estos procesos intervienen otros factores, como las diferencias genéticas fuera de los loci HLA, los denominados antígenos menores de histocompatibilidad (mHLA)^{64;65}, polimorfismos en genes de citocinas implicadas en la tormenta de citocinas de la EICH⁶⁶ o polimorfismos de proteínas implicadas en la inmunidad innata^{67;68}.

Un mayor conocimiento de los factores genéticos junto con los factores clínicos posibilitará una evaluación más ajustada del riesgo de complicaciones relacionadas con el trasplante propio de cada paciente. Ello permitirá, además, individualizar el tratamiento inmunosupresor, la profilaxis de la EICH, la manipulación del inóculo y la inmunoterapia post-trasplante. Asimismo, en caso de disponer de varios donantes HLA idénticos permitiría realizar una mejor selección el candidato más idóneo. Finalmente,

también puede ayudar en un futuro al desarrollo de un índice pronóstico de riesgo de EICH¹²⁷.

En el presente trabajo nos planteamos analizar la influencia de tres grupos de polimorfismos genéticos en el marco del alo-TPH (HLA, microsatélites y dos moléculas de adhesión). A continuación serán discutidos de forma resumida el conjunto de resultados obtenidos en los diferentes objetivos planteados.

1. SISTEMA HLA Y TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

En el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) disponer de un donante emparentado con identidad en los polimorfismos HLA es la opción idónea, debido al menor riesgo de complicaciones derivadas de la enfermedad y del trasplante, principalmente EICH y recaída. La descripción de los 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 Castilla y León, razón por la que en nuestro centro se emplea el listado de haplotipos frecuentes proporcionados por el REDMO. Estos están extraídos de publicaciones, existiendo regiones pendientes de analizar y pudiendo haber por tanto ausencias en el listado de haplotipos frecuentes de algunas regiones. 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.

Por esta razón así como para disponer de una población control para estudios de asociación, nos planteamos como primer objetivo describir las frecuencias alélicas y haplotípicas de los polimorfismos HLA-A, -B y -DRB1 en nuestra población (este trabajo está sometido a publicación en *Human Immunology*).

La distribución de los polimorfismos HLA de nuestra región fue semejante a la de otras poblaciones de la Península Ibérica excluyendo poblaciones aisladas (Cabuérnigo, Valle del Pas, Valle de Arratia y Chuetas), y concuerda con el contexto histórico y el componente genético de la población.

En el trabajo describimos un total de 10 haplotipos frecuentes en nuestra región, ocho de los cuales ya estaban previamente descritos en otras poblaciones españolas e incluidos por tanto en el listado de haplotipos frecuentes del REDMO. Sin embargo, hubo otros dos haplotipos comunes descritos en nuestra población y no descritos en otras poblaciones españolas: $A*02,B*51,DRB1*11$ y $A*02,B*18,DRB1*03$. Curiosamente, sí se han descrito en poblaciones portuguesas^{128;129}, hecho que concuerda con la situación geográfica e histórica de Castilla y León. Estos dos haplotipos se han incorporado de manera inmediata al listado de haplotipos frecuentes empleados en nuestro centro junto con los aportados por el REDMO.

Asimismo, establecemos una población control representativa de nuestra región como base para estudios de asociación, remitiendo los resultados a la base de datos *online* Allele Frequencies in Worldwide Populations¹³⁰.

En algunos tumores sólidos y/o hematopoyéticos existen datos que sugieren la importancia del sistema HLA en el desarrollo y agresividad clínica de los mismos⁶⁰⁻⁶³. El siguiente objetivo que nos planteamos fue explorar esta hipótesis en el Mieloma Múltiple (MM), neoplasia muy representativa en nuestro centro. En él analizamos el

papel del sistema HLA como sistema de presentación antigénica en el control de esta enfermedad en pacientes sometidos a distintos esquemas de tratamiento incluyendo el alo-TPH. Datos preliminares apuntaron a una mayor frecuencia de ciertas especificidades HLA en MM¹³¹⁻¹³³, lo que podría suponer una peor capacidad de presentación de antígenos propios de la enfermedad.

Para confirmar este extremo, realizamos un estudio preliminar comparando la población control definida en la presente tesis con una población heterogénea sin seleccionar de 130 pacientes diagnosticados de MM en la que disponemos del tipaje HLA-A, -B y -DRB1, realizado en base a la posible indicación de un trasplante alogénico emparentado. Cabe destacar que observamos una mayor supervivencia global así como una mayor supervivencia libre de progresión en aquellos pacientes que presentaban el alelo DRB1*01. Las diferencias son aún más acusadas cuando analizamos específicamente aquellos pacientes que fueron sometidos a alo-TPH emparentado HLA idéntico, aunque el tamaño de la muestra no nos permitió hacer un análisis más exhaustivo. Estos datos apuntan a un papel potencial del alelo DRB1*01 en el control de la enfermedad.

Dados los resultados obtenidos en el estudio preliminar, nos propusimos confirmar la influencia del alelo DRB1*01 en dos poblaciones de pacientes con MM con un tratamiento homogéneo: 1) Población de enfermos con MM sintomático incluidos en el protocolo terapéutico GEM-00 diagnosticados en 2000-01: n=128; 2) Población de pacientes con MM quiescente o asintomático en abstención terapéutica: n=53 (esta sección de nuestro trabajo está publicada en *Tissue Antigens* 2008; 71; 548-551).

Como resultado de este análisis, observamos que la frecuencia fenotípica del alelo DRB1*01 fue mayor en el grupo de pacientes con MM quiescente comparado con el grupo de MM sintomático y por el contrario, la incidencia del alelo DRB1*07 fue

mayor en el grupo de pacientes con MM sintomático comparado con la población control.

En conjunto, los datos aportados apuntan por primera vez que las especificidades HLA pueden jugar un papel en el control de la enfermedad en pacientes con MM. Concretamente el alelo HLA-DRB1*01 podría tener una mayor habilidad para presentar de manera eficiente los antígenos tumorales de mieloma a las células inmunocompetentes, lo que a su vez favorecería una mejor respuesta inmune contra la neoplasia. A su vez, esto podría traducirse en un control de la enfermedad más apropiado asociado con una enfermedad más indolente y una supervivencia prolongada.

Por el contrario, el alelo HLA-DRB1*07 podría tener un significado opuesto, con una presentación menos eficaz de los antígenos tumorales del MM.

2. MICROSATÉLITES Y TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Los datos de frecuencias alélicas y genotípicas de los distintos polimorfismos son requisitos esenciales en genética forense (criminalística, identificación de desaparecidos, etc.) así como en genética de poblaciones^{134;135}, debido a su diferente distribución entre regiones. Igualmente, para el estudio del quimerismo hematopoyético se precisa identificar marcadores genéticos informativos (por ejemplo análisis de microsatélites), que permitan discernir entre células del donante y del receptor. Hasta la fecha no existe ningún estudio de frecuencia de regiones de microsatélites que comprenda a nuestra región. Con esta intención nos planteamos describir las frecuencias alélicas de 15 marcadores microsatélite así como varios parámetros de interés forense en nuestra serie, representativa de la población de Castilla y León (esta sección de nuestro trabajo se ha sometido a publicación en *Forensic Science International: Genetics*).

La distribución de los marcadores STR en nuestra región se muestra similar a la de otras poblaciones de la Península Ibérica y es acorde con los datos observados en nuestro análisis con polimorfismos HLA (Bloque 1 de la sección Resultados). Los altos valores de PIC (contenido en información de un polimorfismo) ó PD (capacidad para discernir entre dos individuos distintos) muestran 4 marcadores microsatélite altamente informativos (Penta E, FGA, D18S51, D21S11), concordando con los observados en otras series con individuos caucásicos^{106;136;137}. Estos marcadores son por tanto los de mayor utilidad en el estudio del quimerismo hematopoyético al ser los que con mayor probabilidad mostrarán alelos diferentes entre receptor y donante.

Asimismo, en el trabajo observamos la presencia de una variante alélica con una frecuencia muy baja en el marcador D3S1358, habiéndose descrito previamente únicamente en dos ocasiones y ninguna en España. Esta variante se ha remitido a la base de datos *on-line* STRbase¹⁰⁶, que recopila información de polimorfismos microsatélite como recurso para la comunidad forense.

A continuación analizamos el papel de los STR en el contexto del trasplante alogénico, primero en su empleo para medir el grado de quimerismo hematopoyético en un grupo de pacientes con alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) y después su comportamiento como medida indirecta de la divergencia genética entre receptor y donante.

La presencia de quimerismo mixto en pacientes con neoplasias hematológicas tras alo-TPH con acondicionamiento mieloablativo suele preceder la reaparición de células malignas de origen del receptor, siendo por tanto indicador de recidiva de la enfermedad¹³⁸. Asimismo, se ha visto que la evolución del quimerismo post-trasplante

es un proceso dinámico, y aquellos pacientes con quimerismo mixto bien pueden aumentar o disminuir el porcentaje de células autólogas¹³⁹. Estos estudios son la base para intervenciones terapéuticas con inmunoterapia preventiva que tienen como objetivo evitar el rechazo del injerto, mantenerlo o impedir una recaída inminente^{108;139}.

El alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) basa su efectividad en su capacidad inmunosupresora que permite el injerto de las células del donante con una menor toxicidad y mortalidad relacionada con el trasplante al emplear regímenes no mieloablativos, manteniendo por otro lado la actividad injerto contra tumor. Sin embargo, este tipo de trasplante no logra disminuir la incidencia de EICH, tiene menor capacidad citorreductora tumoral y el riesgo de rechazo es mayor¹⁴⁰⁻¹⁴³. Estas características son las que han permitido su empleo en pacientes con enfermedades hematológicas que no serían candidatos a alo-TPH convencional, ya que su elevada edad o comorbilidad lo impiden^{142;143}. En este tipo de trasplantes existe un periodo de tiempo en el que coexisten células del donante y células del receptor, durante el cual se produce una tolerancia recíproca en la que puede darse un efecto injerto contra leucemia, tras el que se establece un quimerismo completo del donante^{144;145}. Por tanto, la sola presencia de quimerismo mixto en ausencia de EICH no es suficiente para la intervención terapéutica mediante inmunoterapia preventiva.

El impacto del quimerismo hematopoyético en el caso particular del alo-TPH con AIR ha sido poco estudiado. Los estudios realizados por lo general analizan el impacto de la subpoblación de linfocitos T en los primeros momentos del injerto (días +21 ó +56)^{96;146}, siendo escasa la información acerca del valor de la dinámica del quimerismo, bien por no emplear criterios cuantitativos y/o no establecer definiciones objetivas del mismo^{146;147} o bien estando limitada a pacientes pediátricos^{108;148-150}. Por estas razones nos planteamos analizar el valor de la evolución del quimerismo en

pacientes adultos con alo-TPH con AIR de sangre periférica de donante emparentado HLA idéntico.

En nuestra serie observamos un grupo de pacientes con aumento del quimerismo mixto en médula ósea que se asoció con una alta incidencia de recaída. A todos ellos se les retiró la inmunosupresión y en seis casos se administró inmunoterapia adicional (infusión de linfocitos del donante, ILD). Cinco pacientes de los seis que recibieron ILD respondieron, pudieron ser rescatados y alcanzaron remisión completa (4 casos) o parcial (1 caso) y permanecen en seguimiento 4-7 años después del trasplante. De ellos, tres casos desarrollaron EICH post-ILD (dos casos leve y uno grave), recayendo un paciente 5 años después de la ILD. Los dos pacientes restantes, que no desarrollaron EICH, acabaron progresando entre 12 y 18 meses después de la infusión. Por el contrario, todos los pacientes que no recibieron ILD acabaron recayendo y falleciendo con un promedio de 2 y 6 meses post-trasplante, respectivamente.

De este modo, el seguimiento de la dinámica post-trasplante del quimerismo hematopoyético en pacientes con AIR, de manera análoga a alo-TPH con acondicionamiento mieloablatoivo, es un método eficaz para identificar aquellos pacientes con muy elevado riesgo de recaída que podrían beneficiarse de un tratamiento inmunomodulador.

Como segundo objetivo nos planteamos evaluar el impacto de las discrepancias de microsatélites entre receptor y donante en la evolución de los pacientes sometidos a alo-TPH de sangre periférica de donante emparentado HLA idéntico. Partimos de la hipótesis de que a mayor discrepancia mayor probabilidad de diferencias en antígenos menores de histocompatibilidad entre receptor y donante⁶⁵, y por tanto mayor

probabilidad de la reacción inmune consecuyente y con ella mayor frecuencia y severidad de EICH.

De acuerdo con la hipótesis, en nuestro estudio observamos que aquellos pacientes con una elevada discrepancia genética respecto a su donante (2 tercios del total) presentaban una mayor incidencia y severidad de EICHa, así como una menor supervivencia. De hecho, fue un factor independiente de las variables clínicas convencionales asociadas a complicaciones tras alo-TPH. Los datos coinciden con las observaciones previamente apuntadas por nuestro grupo así como por otros autores¹⁵¹⁻¹⁵⁴, y concuerdan con la hipótesis de una reacción inmunológica frente al huésped más intensa cuanto mayor es la distancia genética, aún con identidad HLA. Además, en el estudio encontramos un microsatélite específico cuya discrepancia entre receptor y donante se asocia a un peor comportamiento clínico post-trasplante, lo que sugiere la presencia de un componente genético próximo a 13q22-q31 con un posible papel en el reconocimiento y/o en la respuesta inmunológica.

Con todo, proponemos que el estudio de las discrepancias microsatélites puede ser un método válido como estimador directo de las diferencias genéticas entre receptor y donante que nos permite identificar un grupo de pacientes con mayor riesgo de EICH y peor supervivencia. Ello nos permitiría seleccionar mejor entre varios donantes, programar un control más estricto y/o plantear tratamiento más intensivo de la EICH en el seno de ensayos clínicos.

3. OTROS POLIMORFISMOS: MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Finalmente, nos propusimos analizar el papel de polimorfismos en la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (PECAM-1, CD31) y en la molécula de

adhesión celular intercelular 1 (ICAM-1, CD54) con el desarrollo de EICH tras alo-TPH.

PECAM-1 e ICAM-1 son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresan constitutivamente en leucocitos y células endoteliales¹⁵⁵. Permiten la unión entre leucocitos y células endoteliales facilitando la migración leucocitaria a tejidos^{156;157}, teniendo la primera igualmente un importante rol en la activación de linfocitos en respuesta a reconocimiento de antígenos extraños¹⁵⁸.

Dentro de PECAM-1 se localizan tres polimorfismos SNP (L125V, S563N y R670G, (CD31-125, CD31-563 y CD31-670, respectivamente)) que se han relacionado con un aumento en la incidencia y/o severidad de la EICH aguda (EICHa)^{90;91;123;159-162}, si bien hay resultados discrepantes y contradictorios^{113;124;163-166}, permaneciendo sin clarificar el efecto real de PECAM-1. En población caucásica estos tres polimorfismos se encuentran en desequilibrio de unión, siendo este completo entre CD31-563S y CD31-670R y existiendo un desequilibrio muy fuerte entre CD31-125L y CD31-563S/670R. Así, las frecuencias haplotípicas muestran dos haplotipos mayoritarios en caucásicos, designados LSR y VNG, que se encuentran en más del 98% de los individuos^{167;168}.

Por su parte, ICAM-1 se ha relacionado con enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn^{115;116;169}. Por lo que sabemos sólo existe un único artículo que analice su papel en EICH, evaluando el polimorfismo situado en el codón 56 (K/M) que posteriormente es excluido del análisis por su baja heterocigosidad en población caucásica¹¹³.

En nuestra serie ni la disparidad ni la incompatibilidad tanto de CD31-125 como de CD54-241 entre receptor y donante se relacionaron con una mayor incidencia y/o

severidad de EICHa. Por el contrario, el genotipo heterocigoto del donante se asoció a una mayor severidad de la EICHa.

CD31-125 está implicado en interacciones homofílicas PECAM-1-PECAM-1 tanto entre células endoteliales como entre leucocitos y células endoteliales¹⁷⁰. Recientemente se ha comprobado que este polimorfismo produce cambios estructurales en la proteína¹⁷¹. Del mismo modo, se ha observado una mayor adherencia de monocitos cuando estos expresan el genotipo heterocigoto en CD31-125 (L/V), sin que influya el genotipo de las células endoteliales¹⁷². Ambos resultados están en consonancia con la hipótesis planteada por Goodman⁹⁰, que proponía una diferente capacidad de migración de los leucocitos debida a una estructura distinta de la proteína a su vez definida por cada haplotipo.

Con estas premisas y los resultados obtenidos, se podría hipotetizar en el contexto de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, que los monocitos infundidos del donante que lleven ambas formas de la proteína tendrían una mayor capacidad de adhesión a las células endoteliales, al verse afectada la unión homofílica entre moléculas de PECAM-1, favoreciendo su migración a través de las mismas y facilitando de esta manera el acceso a tejidos, pudiendo desencadenar la reacción de injerto contra huésped.

En conclusión, los datos expuestos sugieren que el genotipo del donante de PECAM-1 se relaciona con el desarrollo de complicaciones tras trasplante alogénico, como la severidad de la EICHa. Es preciso confirmar su valor en estudios prospectivos, así como identificar las bases moleculares de cómo se produciría este hecho. De confirmarse esta hipótesis, el estudio del genotipo de PECAM-1 en el donante podría ser de relevancia clínica para anticiparse a la EICH.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo de tesis doctoral se muestran tanto en castellano como en inglés, cumpliendo así con la normativa de la Universidad de Salamanca para la obtención de la mención de *Doctor Europeus*.

En relación con los estudios de HLA:

1. Se establecen las frecuencias alélicas y haplotípicas en una muestra referencia de la región de Castilla y León, mostrándose genéticamente similar a otras regiones de la Península Ibérica. Esto permite disponer de una población control como base para estudios de asociación.
2. Se describen los haplotipos frecuentes en nuestra población entre los que se incluyen dos que no habían sido descritos antes en otras regiones españolas. Estos dos haplotipos se agregan al listado empleado para seleccionar aquellos pacientes de nuestra región en los que se ampliará el estudio HLA a familiares de segundo grado.
3. En relación con el papel del sistema HLA como posible mecanismo de control y desarrollo de tumores, se ha observado que los pacientes con Mieloma Múltiple, la presencia del alelo DRB1*01 se asocia con un curso de la enfermedad más indolente. Este hecho sugiere su efecto inmune en el control de esta neoplasia.

En relación con los estudios de Microsatélites:

1. Se establecen las frecuencias alélicas y otros parámetros de interés forense en 15 regiones STR de una muestra control de la población de Castilla y

León. Los marcadores Penta E, D18S51, FGA y D21S11 se muestran como los STR más informativos y por tanto son los de mayor utilidad en estudios de quimerismo hematopoyético en pacientes sometidos a alotrasplante.

2. Se describe la presencia del alelo 11 en el marcador D3S1358 en dos individuos de nuestra población, alelo observado únicamente en otras tres ocasiones y que ha sido remitido a la base de STRs *on-line* STRbase.
3. El estudio del quimerismo secuencial se muestra como una técnica fiable para identificar un grupo de pacientes con muy alto riesgo de recaída que deberían ser considerados para un tratamiento activo precoz antes de que ésta se produzca.
4. En los pacientes sometidos a alo-TPH emparentado con donante HLA idéntico, una mayor discrepancia genética entre donante y receptor en las regiones STR analizadas se correlaciona con una mayor incidencia de EICH y un peor pronóstico
5. La presencia de disparidades en D13S317 se asocia con una mayor mortalidad relacionada con el trasplante.

En relación con los estudios de Moléculas de Adhesión:

1. El genotipo de ICAM1 parece no influir en el pronóstico o en complicaciones tras alo-TPH. Por el contrario, el genotipo del donante en PECAM1 parece estar asociado con el desarrollo de complicaciones tras alo-TPH HLA idéntico, en especial con el desarrollo de cuadros de EICH aguda más severos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-738.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-1351.
3. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-945.
4. Fowler JC, Burgoyne LA, Scott AC, Harding HW. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation-- a concise review relevant to forensic biology. *J Forensic Sci.* 1988;33:1111-1126.
5. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.
6. Olaisen B, Stenersen M, Mevag B. Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. *Nat.Genet.* 1997;15:402-405.
7. Brenner CH. Some mathematical problems in the DNA identification of victims in the 2004 tsunami and similar mass fatalities. *Forensic Sci.Int.* 2006;157:172-180.
8. Phillips C, Prieto L, Fondevila M et al. Ancestry analysis in the 11-M Madrid bomb attack investigation. *PLoS.One.* 2009;4:e6583.
9. Primorac D, Schanfield MS. Application of forensic DNA testing in the legal system. *Croat.Med J* 2000;41:32-46.
10. Frudakis T, Venkateswarlu K, Thomas MJ et al. A classifier for the SNP-based inference of ancestry. *J Forensic Sci.* 2003;48:771-782.
11. Reich D, Thangaraj K, Patterson N, Price AL, Singh L. Reconstructing Indian population history. *Nature* 2009;461:489-494.
12. Prinz M, Sansone M. Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croat.Med J* 2001;42:288-291.
13. Sibille I, Duverneuil C, Lorin de la GG et al. Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa. *Forensic Sci.Int.* 2002;125:212-216.
14. Appendix: Method in focus. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia* 2001;15:303-306.
15. Endicott P, Ho SY, Metspalu M, Stringer C. Evaluating the mitochondrial timescale of human evolution. *Trends Ecol.Evol.* 2009;24:515-521.
16. Huebner C, Petermann I, Browning BL, Shelling AN, Ferguson LR. Triallelic single nucleotide polymorphisms and genotyping error in genetic epidemiology studies: MDR1 (ABCB1) G2677/T/A as an example. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2007;16:1185-1192.
17. The Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> . 2009. 9-12-2009. Ref Type: Electronic Citation
18. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-796.
19. International HapMap Project. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en/> . 2009. 9-12-2009. Ref Type: Electronic Citation
20. Chung CC, Magalhaes W, Gonzalez-Bosquet J, Chanock SJ. Genome-wide Association Studies in Cancer - Current and Future Directions. *Carcinogenesis* 2009
21. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Marin L et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with

- polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood* 2008;112:2709-2712.
22. Hinrichs AL, Larkin EK, Suarez BK. Population stratification and patterns of linkage disequilibrium. *Genet.Epidemiol.* 2009;33:S88-S92.
 23. Brutlag DL. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annu.Rev.Genet.* 1980;14:121-144.
 24. Butler JM. Forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers.: Elsevier Academic Press, Burlington, MA; 2005.
 25. Jasinska A, Krzyzosiak WJ. Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Lett.* 2004;567:136-141.
 26. Riley DE, Krieger JN. Short tandem repeat (STR) replacements in UTRs and introns suggest an important role for certain STRs in gene expression and disease. *Gene* 2005;344:203-211.
 27. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:3320-3323.
 28. Iglesias AR, Kindlund E, Tammi M, Wadelius C. Some microsatellites may act as novel polymorphic cis-regulatory elements through transcription factor binding. *Gene* 2004;341:149-165.
 29. Rosales-Reynoso MA, Ochoa-Hernandez AB, Barros-Nunez P. [Diseases caused by triplet expansion]. *Rev.Neurol.* 2009;49:79-87.
 30. Robinson J, Waller MJ, Fail SC et al. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D1013-D1017.
 31. International Immunogenetics (IMGT/HLA). <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> . 2009. 17-11-2009.
Ref Type: Electronic Citation
 32. Roitt I. Inmunología. Fundamentos.: Medica Panamericana; 1998.
 33. 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.
 34. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1813-1826.
 35. 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.* 2009
 36. Saba N, Abraham R, Keating A. Overview of autologous stem cell transplantation. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2000;36:27-48.
 37. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N.Engl.J.Med.* 1975;292:832-843.
 38. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 1975;292:895-902.
 39. de Lima M, Champlin R. Unrelated donor hematopoietic transplantation. *Rev.Clin.Exp.Hematol.* 2001;5:100-134.
 40. Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu.Rev.Med.* 2003;54:491-512.
 41. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:273-281.
 42. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
 43. Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:4191-4199.
 44. Ozawa K, Sato K, Oh I et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun.* 2008;30:121-127.
 45. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate

- allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
46. Edinger M, Powrie F, Chakraverty R. Regulatory mechanisms in graft-versus-host responses. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2009;15:2-6.
 47. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp.Med* 2002;196:389-399.
 48. Salomon BL, Sudres M, Cohen JL. Regulatory T cells in graft-versus-host disease. *Springer Semin.Immunopathol.* 2006;28:25-29.
 49. Pillai AB, George TI, Dutt S, Strober S. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113:4458-4467.
 50. 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.
 51. 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.
 52. 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.
 53. van Rood JJ, Oudshoorn M. Eleven million donors in Bone Marrow Donors Worldwide! Time for reassessment? *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:1-9.
 54. Bone Marrow Donors Worlwide (BMDW). <http://www.bmdw.org/> . 2009. 22-12-2009.
Ref Type: Electronic Citation
 55. Red Española de Donantes de Médula Ósea (REDMO). <https://fcarreras.org/redmo.php> . 2009.
Ref Type: Electronic Citation
 56. 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.
 57. 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.
 58. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N.Engl.J.Med.* 2007;357:1731-1743.
 59. 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.
 60. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100:1570-1574.
 61. Lech-Maranda E, Juszczynski P, Szmigielska-Kaplon A et al. Human leukocyte antigens HLA DRB1 influence clinical outcome of chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 2007;92:710-711.
 62. Montes-Ares O, Moya-Quiles MR, Montes-Casado M et al. Human leucocyte antigen-C in B chronic lymphocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2006;135:517-519.
 63. Campillo JA, Martinez-Escribano JA, Muro M et al. HLA class I and class II frequencies in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain: the role of HLA-C in disease prognosis. *Immunogenetics* 2006;57:926-933.
 64. Goulmy E, Schipper R, Pool J et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone

- marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 1996;334:281-285.
65. 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.
 66. 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.
 67. 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.
 68. 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.
 69. Chao NJ. Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2004;10:215-223.
 70. Schetelig J, Kiani A, Schmitz M, Ehninger G, Bornhauser M. T cell-mediated graft-versus-leukemia reactions after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Immunol.Immunother.* 2005;54:1043-1058.
 71. Tseng LH, Lin MT, Hansen JA et al. Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1999;94:2911-2914.
 72. Gallardo D, Arostegui JI, Balas A et al. Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation. *Br.J Haematol.* 2001;114:931-936.
 73. Bidwell J, Keen L, Gallagher G et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun.* 2001;2:61-70.
 74. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998;92:3943-3948.
 75. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. Impact of cytokine gene polymorphisms on graft-vs-host disease. *Tissue Antigens* 2008;72:507-516.
 76. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 2009;126:449-457.
 77. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
 78. Murphy N, Diviney M, Szer J et al. Donor methylenetetrahydrofolate reductase genotype is associated with graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplant patients treated with methotrexate. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:773-779.
 79. Rocha V, Porcher R, Fernandes JF et al. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia* 2009;23:545-556.
 80. Kim DH, Park JY, Sohn SK et al. The association between multidrug resistance-1 gene polymorphisms and outcomes of allogeneic HLA-identical stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91:848-851.
 81. Eckmann L. Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2006;22:95-101.
 82. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661-1665.

83. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J et al. Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 2006;107:4189-4193.
84. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat.Clin.Pract.Rheumatol.* 2008;4:404-412.
85. Mullin GE, Dobs A. Vitamin d and its role in cancer and immunity: a prescription for sunlight. *Nutr.Clin.Pract.* 2007;22:305-322.
86. Pernis AB. Estrogen and CD4+ T cells. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2007;19:414-420.
87. Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Seriola B. Vitamin D in rheumatoid arthritis. *Autoimmun.Rev.* 2007;7:59-64.
88. Middleton PG, Cullup H, Dickinson AM et al. Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:223-228.
89. Middleton PG, Norden J, Cullup H et al. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism associates with occurrence of graft-versus-host disease and reduced survival in HLA-matched sib-allo BMT. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:41-47.
90. Goodman RS, Ewing J, Evans PC et al. Donor CD31 genotype and its association with acute graft-versus-host disease in HLA identical sibling stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:151-156.
91. Maruya E, Saji H, Seki S et al. Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood* 1998;92:2169-2176.
92. Levine JE, Paczesny S, Mineishi S et al. Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008;111:2470-2475.
93. Schmeling H, Horneff G. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms and etanercept therapy in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol.Int.* 2007;27:383-386.
94. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL et al. Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum.Mol.Genet.* 2008;17:3532-3538.
95. Ranganathan P. An update on pharmacogenomics in rheumatoid arthritis with a focus on TNF-blocking agents. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 2008;10:562-567.
96. Perez-Simon JA, Caballero D, ez-Campelo M et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002;16:1423-1431.
97. European Federation of Immunogenetics (EFI). <http://www.efiweb.eu> . 2009. 9-11-2009.
Ref Type: Electronic Citation
98. Young FW, Bann CM. ViSta: A visual statistics system. Stine, R.A.& Fox, J.(Eds), *Statistical Computing Enviroments for Social Research* 1996:207-236.
99. Huston KA. Statistical analysis of STR data. *Profiles in DNA* 1998;1:14-15.
100. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol.Ecol.* 2007;16:1099-1106.
101. Lee HS, Lee JW, Han GR, Hwang JJ. Statistical Parameters for Evaluating the Identification Power of STR Loci. *Korean J Leg Med* 1998;22:13-19.
102. Joshua DE, Brown RD, Ho PJ, Gibson J. Regulatory T cells and multiple myeloma. *Clin.Lymphoma Myeloma.* 2008;8:283-286.
103. Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in

- multiple myeloma. *Br.J Haematol.* 2007;138:563-579.
104. Kay N, Leong T, Kyle RA et al. Altered T cell repertoire usage in CD4 and CD8 subsets of multiple myeloma patients, a Study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E9487). *Leuk.Lymphoma* 1999;33:127-133.
 105. Raitakari M, Brown RD, Sze D et al. T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells. *Br.J.Haematol.* 2000;110:203-209.
 106. Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:320-322.
 107. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Alonso-Garcia J. Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics. *Hum.Biol.* 1999;71:725-743.
 108. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J.Clin.Oncol.* 2004;22:1696-1705.
 109. 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.
 110. Johnson-Leger C, Imhof BA. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res.* 2003;314:93-105.
 111. Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Lee BP, Imhof BA. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem.Soc Trans.* 2008;36:203-211.
 112. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol.* 2008;180:6439-6446.
 113. 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.
 114. Mycko MP, Kwinkowski M, Tronczynska E, Szymanska B, Selmaj KW. Multiple sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469. *Ann Neurol.* 1998;44:70-75.
 115. Yang H. Analysis of ICAM-1 gene polymorphism in immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Exp.Clin Immunogenet.* 1997;14:214-225.
 116. Low JH, Williams FA, Yang X et al. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2004;10:173-181.
 117. Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
 118. Klingebiel T, Schlegel PG. GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21 Suppl 2:S45-S49.
 119. Perez-Simon JA, ez-Campelo M, Martino R et al. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br.J Haematol.* 2005;130:394-403.
 120. Bader P, Holle W, Klingebiel T et al. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.* 1996;16:1759-1763.
 121. Maas F, Schaap N, Kolen S et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003;17:621-629.
 122. Willasch A, Schneider G, Reincke BS et al. Sequence polymorphism systems for quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize hematopoietic

- chimerism-high informativity and sensitivity as well as excellent reproducibility and precision of measurement. *Lab Hematol.* 2007;13:73-84.
123. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 1996;334:286-291.
 124. Nichols WC, Antin JH, Lunetta KL et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 is not a significant risk factor for graft-versus-host disease. *Blood* 1996;88:4429-4434.
 125. Vora DK, Rosenbloom CL, Beaudet AL, Cottingham RW. Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster. *Genomics* 1994;21:473-477.
 126. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* 2007;25:139-170.
 127. Dickinson AM. Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT. *Int.J.Immunogenet.* 2008;35:375-380.
 128. Spinola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J. HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* 2005;66:217-230.
 129. Spinola H, Brehm A, Williams F, Jesus J, Middleton D. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route. *Ann.Hum.Genet.* 2002;66:285-296.
 130. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens* 2003;61:403-407.
 131. Ludwig H, Mayr W. Genetic aspects of susceptibility to multiple myeloma. *Blood* 1982;59:1286-1291.
 132. Mason DY, Cullen P. HL-A antigen frequencies in myeloma. *Tissue Antigens* 1975;5:238-245.
 133. Patel M, Wade AA, Galpin J et al. HLA class I and class II antigens associated with multiple myeloma in southern Africa. *Clin.Lab Haematol.* 2002;24:215-219.
 134. Lincoln P, Carracedo A. Publication of population data of human polymorphisms. *Forensic Sci.Int.* 2000;110:3-5.
 135. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 2007;43:ii-iv.
 136. Gusmao L, Sanchez-Diz P, Alves C et al. Genetic diversity of nine STRs in two northwest Iberian populations: Galicia and northern Portugal. *Int.J Legal Med* 2000;114:109-113.
 137. Cassar M, Farrugia C, Vidal C. Allele frequencies of 14 STR loci in the population of Malta. *Leg Med (Tokyo)* 2008;10:153-156.
 138. Liesveld JL, Rothberg PG. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:297-310.
 139. Bader P, Beck J, Schlegel PG et al. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:79-81.
 140. Giralt S, Estey E, Albitar M et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89:4531-4536.
 141. Slavin S, Nagler A, Naparstek E et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-763.
 142. Alousi A, de LM. Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Adv.Hematol.Oncol.* 2007;5:560-570.

143. Storb R. Reduced-intensity conditioning transplantation in myeloid malignancies. *Curr.Opin.Oncol.* 2009;21 Suppl 1:S3-S5.
144. Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:387-392.
145. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev.* 2005;19:153-164.
146. Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006;20:1690-1700.
147. Michallet AS, Furst S, Le QH et al. Impact of chimerism analysis and kinetics on allogeneic haematopoietic stem cell transplantation outcome after conventional and reduced-intensity conditioning regimens. *Br.J Haematol.* 2005;128:676-689.
148. Bader P, Niemeyer C, Willasch A et al. Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br.J.Haematol.* 2005;128:649-658.
149. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:815-821.
150. Formankova R, Honzatkova L, Moravcova J et al. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leuk.Res.* 2000;24:339-347.
151. Alcoceba M, Díez-Campelo M, Martín-Jiménez P et al. Allogeneic transplantation with identical MHC: clinic-prognostic value of discrepancies of microsatellite DNA regions between recipient and donor. *Blood* 2004;104:3336.
152. Dalva K, Arat M, Serbest E, Beksac M. A comparison of the number of informative short tandem repeat (STR) loci between HLA identical donor-recipient pairs and the frequency of graft versus host disease (GvHD). *Genes Immun.* 2004;5:(abstract[91]).
153. Kim DH, Jung HD, Kwack DH et al. Predicting outcomes of HLA-identical allogeneic stem cell transplants from variable number of tandem repeat disparity between donors and recipients. *Haematologica* 2006;91:71-77.
154. Stern M, Meyer-Monard S, Bucher C et al. Prognostic value of discrepancies in micro-satellite DNA regions between donor and recipient in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:(abstract[249]).
155. Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J.Immunol.* 1996;156:1515-1524.
156. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007;27:2514-2523.
157. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol.Rep.* 2009;61:22-32.
158. Zehnder JL, Shatsky M, Leung LL et al. Involvement of CD31 in lymphocyte-mediated immune responses: importance of the membrane-proximal immunoglobulin domain and identification of an inhibiting CD31 peptide. *Blood* 1995;85:1282-1288.
159. Grumet FC, Hiraki DD, Brown BWM et al. CD31 mismatching affects marrow transplantation outcome. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2001;7:503-512.

160. Balduini CL, Frassoni F, Noris P et al. Donor-recipient incompatibility at CD31-codon 563 is a major risk factor for acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from a human leucocyte antigen-matched donor. *Br.J.Haematol.* 2001;114:951-953.
161. Cavanagh G, Chapman CE, Carter V, Dickinson AM, Middleton PG. Donor CD31 genotype impacts on transplant complications after human leukocyte antigen-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2005;79:602-605.
162. El-Chennawi FA, Kamel HA, Mosaad YM, El-Sherbini SM, El-Billey NA. Impact of CD31 mismatches on the outcome of hematopoietic stem cell transplant of HLA-identical sibling. *Hematology.* 2006;11:227-234.
163. Da Costa L, Charron D, Loiseau P. Does the adhesion molecule CD31 act as a minor histocompatibility antigen? *Blood* 1997;90:1332.
164. Kogler G, Middleton PG, Wilke M et al. Recipient cytokine genotypes for TNF-alpha and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GVHD in unrelated cord blood transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 2002;74:1167-1175.
165. Heinemann FM, Ferencik S, Ottinger HD, Beelen DW, Grosse-Wilde H. Impact of disparity of minor histocompatibility antigens HA-1, CD31, and CD49b in hematopoietic stem cell transplantation of patients with chronic myeloid leukemia with sibling and unrelated donors. *Transplantation* 2004;77:1103-1106.
166. Katagiri T, Shiobara S, Nakao S et al. Mismatch of minor histocompatibility antigen contributes to a graft-versus-leukemia effect rather than to acute GVHD, resulting in long-term survival after HLA-identical stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38:681-686.
167. Novinska MS, Pietz BC, Ellis TM, Newman DK, Newman PJ. The alleles of PECAM-1. *Gene* 2006;376:95-101.
168. Robbins FM, Hartzman RJ. CD31/PECAM-1 genotyping and haplotype analyses show population diversity. *Tissue Antigens* 2007;69:28-37.
169. Kristiansen OP, Nolsoe RL, Holst H et al. The intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism in type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2000;52:107-111.
170. Sun J, Williams J, Yan HC et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J.Biol.Chem.* 1996;271:18561-18570.
171. Kosmoliaptis V, Goodman RS, Dafforn TR, Bradley JA, Taylor CJ. Structural implications of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 polymorphisms. *Transplantation* 2008;86:484-485.
172. Goodman RS, Kirton CM, Oostingh GJ et al. PECAM-1 polymorphism affects monocyte adhesion to endothelial cells. *Transplantation* 2008;85:471-477.

ANEXOS

ANEXO I

GENES SITUADOS EN LA REGIÓN DEL SISTEMA HLA (6p21.31)

<i>Molécula</i>	<i>Equivalentes previos</i>	<i>Clase</i>	<i>Características moleculares</i>	<i>Alelos</i>
HLA-A		I	Cadena α	893
HLA-B		I	Cadena α	1431
HLA-C		I	Cadena α	569
FLA-E	<i>E, 6.2</i>	I	Cadena α	9
HLA-F	<i>F, 5.4</i>	I	Cadena α	21
HLA-G	<i>G, 6.0</i>	I	Cadena α	45
HLA-H	<i>H, AR, 12.4</i>	I	Pseudogén	12
HLA-J	<i>cd12</i>	I	Pseudogén	9
HLA-K	<i>HLA-70</i>	I	Pseudogén	6
HLA-L	<i>HLA-92</i>	I	Pseudogén	5
HLA-N	<i>HLA-30</i>	I	Pseudogén	-
HLA-P	<i>HLA-90</i>	I	Pseudogén	4
HLA-S	<i>HLA-17</i>	I	Pseudogén	-
HLA-T	<i>HLA-16</i>	I	Pseudogén	-
HLA-U	<i>HLA-21</i>	I	Pseudogén	-
HLA-V	<i>HLA-75</i>	I	Pseudogén	3
HLA-W	<i>HLA-80</i>	I	Pseudogén	-
HLA-X		I	Fragmento de clase I	-
HLA-Y	<i>HLA-BEL, COQ, DEL</i>	I	Fragmento de clase I	-
HLA-Z	<i>HLA-Z1</i>	I	Fragmento de clase I (localizado dentro de clase II)	-
HLA-DRA	<i>DRα</i>	II	Cadena DR α	3
HLA-DRB1	<i>DRβI, DR1B</i>	II	Cadena DR β 1	722
HLA-DRB2	<i>DRβII</i>	II	Pseudogén	1
HLA-DRB3	<i>DRβIII</i>	II	Cadena DR52 β 3	52
HLA-DRB4	<i>DRβIV</i>	II	Cadena DR53 β 4	13
HLA-DRB5	<i>DRβIII</i>	II	Cadena DR51 β 5	19
HLA-DRB6	<i>DRBX, DRBσ</i>	II	Pseudogén	3
HLA-DRB7	<i>DRBψ1</i>	II	Pseudogén	2
HLA-DRB8	<i>DRBψ2</i>	II	Pseudogén	1
HLA-DRB9	<i>M4.2 b exon</i>	II	Pseudogén	1
HLA-DQA1	<i>DQα1, DQ1A</i>	II	Cadena DQ α	35
HLA-DQA2	<i>DQβ1, DQ1B</i>	II	Cadena DQ α	-
HLA-DQB1	<i>DXα, DQ2A</i>	II	Cadena DQ β	106
HLA-DQB2	<i>DXβ, DQ2B</i>	II	Cadena DQ β	-
HLA-DQB3	<i>DVβ, DQ3B</i>	II	Cadena DQ β	-
HLA-DOA	<i>DZα, DOα, DNA</i>	II	Cadena DO α	12
HLA-DOB	<i>DOβ</i>	II	Cadena DO β	9
HLA-DMA	<i>RING6</i>	II	Cadena DM α	4
HLA-DMB	<i>RING7</i>	II	Cadena DM β	7
HLA-DPA1	<i>DPα1, DP1A</i>	II	Cadena DP α	28
HLA-DPA2	<i>DPα2, DP2A</i>	II	Pseudogén de Clase II	-
HLA-DPA3	<i>DPA3</i>	II	Pseudogén de Clase II	-
HLA-DPB1	<i>DPβ1, DP1B</i>	II	Cadena DP β	136
HLA-DPB2	<i>DPβ2, DP2B</i>	II	Pseudogén de Clase II	-
PSMB9	<i>LMP2, RING12</i>	II	Proteasa multifuncional	-
PSMB8	<i>LMP7, RING10</i>	II	Proteasa multifuncional	-
TAP1	<i>ABC2, RING4, Y3, PSF1</i>	II	Transportador asociado al procesamiento antigénico	7
TAP2	<i>ABC3, RING11, Y1, PSF2</i>	II	Transportador asociado al procesamiento antigénico	4
Bf		III	Factor de complemento	-
C2		III	Factor de complemento	-
C4A		III	Factor de complemento	-
C4B		III	Factor de complemento	-
CYP21		III	Enzima 21-hidroxilasa	-
Hsp70		III	Chaperona	-
TNF α		III	Citocina	-
MICA	<i>PERB11.1</i>		Antígenos relacionados con las cadenas MHC clase I	68
MICB	<i>PERB11.2</i>		Antígenos relacionados con las cadenas MHC clase I	30
MICC	<i>PERB11.3</i>		Pseudogén	-
MICD	<i>PERB11.4</i>		Pseudogén	-
MICE	<i>PERB11.5</i>		Pseudogén	-

ANEXO II

HISTORIA DEL TRANSPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Inicios/Primeros pasos

El inicio del trasplante de médula ósea lo marcan los estudios de trasplante de órganos y tejidos desarrollados en la primera parte del siglo XX. Aunque los autoinjertos se mantenían indefinidamente, los aloinjertos fallaban al cabo de unos días. Este hecho llevó al principio biológico de que las células u órganos transferidos de un individuo a otro son reconocidos como extraños y por ello son rechazados.

En 1939 se llevó a cabo el que se podría considerar el primer trasplante de progenitores hematopoyéticos, en el que una paciente con anemia aplásica recibió 18ml de médula por vía intravenosa de su hermano, si bien la respuesta no fue satisfactoria¹.

Una nueva era

Con la II Guerra Mundial, la disponibilidad de isótopos radioactivos y ante la posibilidad de una guerra atómica crece el interés por las consecuencias biológicas de la radiación, lo que a su vez abre una nueva era en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Muy pronto se observó que el órgano más sensible a la radiación era la médula ósea y que la muerte asociada a una baja exposición se debía al fallo medular^{2;3}. En 1948 se realiza uno de los primeros estudios de protección ante radiación, tratando de reconstituir la función medular mediante inyección o implantación de médula ósea en perros, aunque no obtuvieron los resultados esperados^{4;5}. Un año más tarde se demostraría recuperación hematopoyética y supervivencia prolongada en roedores que habían sido sometidos a exposiciones letales de radiación pero que tenían el bazo protegido por una laminilla de plomo⁶, demostrando posteriormente un efecto protector similar cubriendo el fémur. En 1951 se

publica un trabajo en el que se demuestra una protección similar al infundir células de bazo ó médula ósea por vía intravenosa en roedores y cobayas⁷. En un principio se pensó que el efecto protector se debía a estimulantes humorales liberados por el bazo protegido (*hipótesis humoral*)⁸, más que por células progenitoras transplantadas (*hipótesis celular*). Sin embargo, más adelante se observa que la recuperación tras radiación letal e infusiones de células de bazo se deben a células vivas⁹ y poco después otro grupo muestra que las infusiones alogénicas de médula ósea promueven larga supervivencia de injertos de piel¹⁰. A pesar de la barrera del HLA, los injertos no eran rechazados, una prueba de tolerancia consistente con la hipótesis celular, en la que células inmunes del donante, ahora residentes en el receptor, sean tolerantes con el injerto de piel del donante¹⁰. A partir de entonces un buen número de investigadores apoyan la hipótesis celular en diversas publicaciones comprendidas entre 1955 y 1956¹¹⁻¹⁶. Estos descubrimientos, sugerentes de que células hematopoyéticas trasplantables pueden originar todas las líneas celulares hematopoyéticas, implicaban una estrategia de tratamiento para pacientes con enfermedades hematológicas con alto riesgo de mortalidad, como aquellos con ausencia funcional de la médula ósea (por ejemplo, anemia aplásica severa), con errores congénitos (como inmunodeficiencias, o la anemia falciforme), e incluso aquellos con neoplasias hematológicas (como leucemias y linfomas).

Éxito y pesimismo

En 1957, D. Thomas y col. fueron pioneros en la aplicación de trasplantes de células hematopoyéticas en humanos, si bien, fueron mayormente infructuosos ya que la mayoría de pacientes fallecían tras un fallo de injerto o bien progresión de la enfermedad, quedando un único paciente con un injerto transitorio¹⁷. En 1959 se

publican tres importantes trabajos que describen trasplantes de médula en pacientes con leucemia y víctimas de exposición a radiación:

- 1) D. Thomas y col. informan sobre dos pacientes con leucemia linfoblástica aguda que reciben irradiación corporal total (ICT) a altas dosis (850 y 1140 Roentgens) seguido de trasplante de médula singénico de sus hermanos gemelos. Aunque la leucemia reapareció a los pocos meses, es el primer ejemplo de pacientes sometidos a irradiación letal que muestran una pronta recuperación clínica y hematológica¹⁸. En el mismo mencionan que la irradiación por sí misma no elimina la leucemia y que debe añadirse quimioterapia adicional. Además, considerando los estudios en roedores de Barnes y col., comentan el papel potencial del injerto en producir una reacción inmunológica contra la leucemia¹⁹.
- 2) G. Mathé y col. muestran los intentos por rescatar a cinco víctimas expuestas a irradiación en el accidente de un reactor experimental en Vinca (Yugoslavia, 1958) mediante infusiones alogénicas de médula ósea²⁰. Cuatro de ellos sobrevivieron, aunque el injerto era pobre y transitorio^{21;22}. Visto retrospectivamente, las observaciones de recuperación medular más bien parecían el resultado de una reconstitución autóloga²³.
- 3) McGovern y col. relatan el primer trasplante autólogo de un paciente con leucemia linfoblástica aguda en fase terminal mediante tratamiento con ICT²⁴. Aunque el paciente alcanza remisión, finalmente la leucemia reaparece, quizás por la presencia de células leucémicas en el injerto almacenado o bien a la ausencia de efecto injerto contra leucemia²⁴.

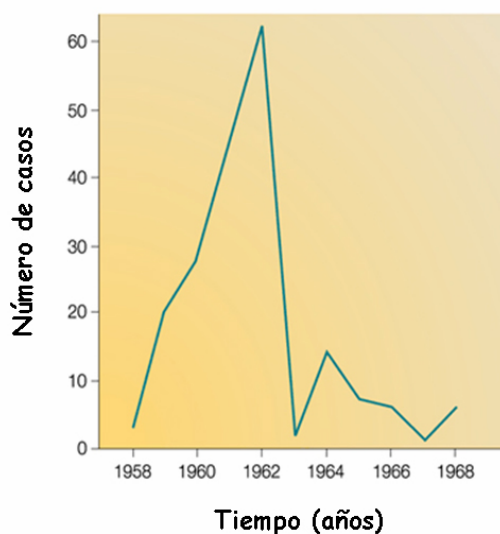
Simultáneamente continúan los estudios mediante modelos animales. Así, Billingham y Brent descubren que las células alogénicas del injerto pueden producir una

reacción inmune contra el tejido del receptor, desembocando en un síndrome ahora conocido como enfermedad injerto contra huésped (EICH)^{25;26}. Uphoff informa que factores genéticos controlan la reacción inmune de las células del donante contra el receptor²⁷, y que el metotrexato podría reducir esta reacción²⁸.

A estos intentos iniciales de trasplante siguen numerosas publicaciones. Sin embargo, todos los trasplantes llevados a cabo entre finales de los 50 y principios de los 60 fracasaron. La mayoría no injertaban o si lo hacían, desarrollaban una enfermedad injerto contra huésped grave letal. En 1970 se publica una revisión de 203 trasplantes alogénicos de médula ósea en humanos llevados a cabo entre 1958 y 1968, concluyendo que ninguno había tenido éxito²⁹ (ver figura 1). Este fracaso al lograr un injerto prolongado en humanos (*quizás por una aplicación temprana antes de solventar las barreras entre roedores y humanos*) lleva a muchos investigadores a abandonar la idea del trasplante de médula ósea como uso clínico, así como a dudar de la viabilidad de traspasar la barrera alogénica en humanos, ya que era manifiesta una mayor violencia de los efectos de la EICH en humanos que en roedores³⁰.

Figura 1. Trasplantes de médula ósea informados entre 1958-1968.

Los pobres resultados de los trasplantes realizados llevan a los investigadores al abandono del injerto alogénico en humanos. De 203 casos recogidos en el estudio de Bortin, 125 rechazaron el injerto, 49 desarrollaron EICH y tan sólo 11 lograron un injerto prolongado. Únicamente 3 pacientes vivían en el momento de la publicación. El trasplante alogénico de médula ósea fue considerado un fracaso.

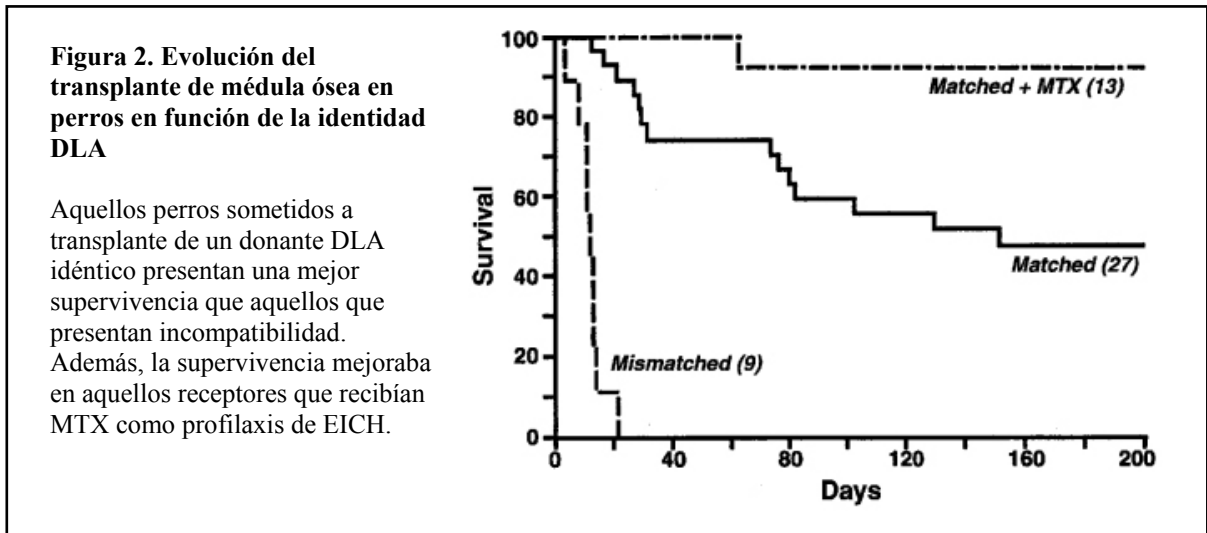


Progresos en modelos animales: Interés renovado

Posteriormente se consigue recuperar la confianza del empleo de trasplante de médula ósea como tratamiento gracias a diversos experimentos en modelos animales.

Así, estudios en cánidos demostraron el espectro de resultados de un trasplante alogénico: fallo de injerto, rechazo de injerto, injerto seguido de EICH e injerto estable sin EICH³¹.

En 1958 se documenta la existencia de sistemas mayores y menores implicados en la histocompatibilidad de roedores³². El mismo año se publican dos trabajos describiendo antígenos de leucocitos en humanos (HLA)^{33,34}. Se sugiere que estos antígenos pueden ser importantes en el trasplante hematopoyético. Nuevos estudios en perros permiten observar que estos antígenos leucocitarios caninos (DLA) son cruciales en la evolución del injerto de médula ósea³⁵. Así, aquellos perros que reciben irradiación y médula de un donante de la misma camada DLA no idéntico fallecen bien por rechazo de injerto o por EICH³⁶. Sin embargo, aquellos que presentaban identidad del DLA lograban una prolongada supervivencia³⁷, especialmente en aquellos que recibieron metotrexato (MTX) post-trasplante para controlar la reacción de EICH³⁸ (Figura 2). Estas observaciones animaron a realizar posteriores ensayos en humanos teniendo en cuenta el parentesco y la identidad HLA.



La era moderna del trasplante de médula ósea

A finales de los 60-principios de los 70 se desarrolló un cuidado de soporte efectivo para pacientes sin función medular, incluyendo la tecnología de transfusión sanguínea, nutrición parenteral, acceso vascular y terapias para prevenir o tratar infecciones bacterianas, virales o fúngicas.

El creciente conocimiento del sistema HLA permite seleccionar miembros familiares compatibles como donantes de médula. Entre 1968 y 1969, tres pacientes pediátricos con inmunodeficiencias reciben con éxito un trasplante de un hermano HLA idéntico³⁹⁻⁴¹. Por las características de las enfermedades no requirieron inmunosupresión para evitar la EICH ni agentes citotóxicos para eliminar la malignidad.

Sin embargo, los estudios con donantes emparentados HLA idénticos se limitaban a pacientes pediátricos con inmunodeficiencias o aplasias anémica severas o bien pacientes con leucemia/linfoma refractario en estadio avanzado, ya que este mismo procedimiento para adultos o pediátricos de mayor edad era más difícil de lograr.

En 1975 se publica en la revista *New England Journal of Medicine* una revisión clave sobre el estado del “momento” del trasplante de médula ósea^{42;43}. Entre sus conclusiones, una aportación importante es la descripción de 73 pacientes con leucemia en fase terminal, observando una mejor respuesta en estadios menos avanzados de la enfermedad, cuando los pacientes muestran un mejor estado general y menor carga tumoral.

En 1979 se publican dos artículos sobre el trasplante en leucemia mieloide aguda en primera remisión mostrando grandes mejoras^{44;45}.

En la década de los 80 se publican los primeros trabajos que describen el tratamiento de la LMC en fase crónica con quimioterapia y trasplante de médula ósea

de un donante emparentado HLA idéntico^{46;47}, en los que se muestra que la mayoría pueden curarse por este tratamiento^{48;49}. Las primeras curas para la talasemia mayor y la anemia falciforme llegan en esta época^{50;51}.

A partir de estas fechas, el trasplante se puede considerar como una terapia de uso estándar para tratar hemopatías malignas. Así, son muchos los grupos publicando resultados. Los avances más significativos desde entonces podrían resumirse a continuación:

- La depleción de células T del injerto de médula ósea reduce la EICH⁵². Sin embargo, esta estrategia conlleva un aumento de las recidivas tumorales. Además, a combinación de metotrexato y ciclosporina previene el EICH^{53;54}.
- El uso de células de sangre periférica o de cordón umbilical como fuente de progenitores, lo que hizo cambiar el nombre clásico de trasplante de médula ósea a trasplante de células hematopoyéticas o de progenitores hematopoyéticos^{55;56}.
- El desarrollo del régimen con ciclofosfamida y busulfán que evita el uso de irradiación en algunas enfermedades⁵⁷.
- Introducción del ganciclovir para controlar infecciones por citomegalovirus^{58;59}.
- El uso de infusiones de linfocitos del donante para erradicar la leucemia recurrente o enfermedades linfoproliferativas^{60;61}.
- El avance en la inmunogenética del HLA, especialmente las técnicas de tipaje molecular de alta resolución en trasplantes alogénicos no emparentados.

- Trasplante mediante regimenes no mieloablativos que reducen la toxicidad relacionada con el trasplante y permiten su aplicación en personas que por edad o características de la enfermedad no serían candidatos con los regimenes convencionales. Además hacen viable el uso del trasplante para enfermedades autoinmunes y la preparación de trasplantes sólidos⁶².
- Ya que sólo el ~35% de los pacientes tienen un donante emparentado HLA idéntico, se ha avanzado hasta la inclusión de donantes emparentados que comparten un haplotipo⁶³ o de donantes no emparentados HLA-idénticos⁶⁴.
- La creación de registros nacionales de donantes de médula ósea que facilitan el trasplante de donantes no emparentados (en España, REDMO – Registro Español de Donantes de Médula Ósea), favoreciendo la cooperación internacional entre países mediante un registro común⁶⁵.

BIBLIOGRAFÍA

1. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med.* 1939;13:357-367.
2. Jacobson LO, Marks EK. The hematological effects of ionizing radiations in the tolerance range. *Radiology* 1947;49:286-298.
3. Prosser CL. The clinical sequence of physiological effects of ionizing radiation in animals. *Radiology* 1947;49:299-313.
4. Rekers P. Transplantation of bone marrow into dogs that have received total body single dose radiation. University of Rochester Report 1948;UR-11:
5. Rekers P, Coulter M, Warren S. Effect of transplantation of bone marrow into irradiated animals. *Arch Surg.* 1950;60:635.
6. Jacobson L, Marks E, Robson M, Gaston E, Zirkle R. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med.* 1949;34:1538-1543.
7. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl.Cancer Inst.* 1951;12:197-201.
8. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science* 1951;113:510-511.

9. Barnes D, Loutit J. What is the recovery factor in spleen? *Nucleonics* 1954;12:68-71.
10. Main JM, Prehn RT. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Natl.Cancer Inst.* 1955;15:1023-1029.
11. Lindsley DL, Odell TTJr, Tausche FG. Implantation of functional erythropoietic elements following total-body irradiation. *Proc Soc Exp.Biol Med* 1955;90:512-515.
12. Vos O, Davids JA, Weyzen WW, Van Bekkum DW. Evidence for the cellular hypothesis in radiation protection by bone marrow cells. *Acta Physiol Pharmacol.Neerl.* 1956;4:482-486.
13. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956;177:452-454.
14. Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL. Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res.* 1956;16:258-261.
15. Makinodan T. Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proc Soc Exp.Biol Med* 1956;92:174-179.
16. Trentin JJ. Mortality and skin transplantability in x-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow. *Proc Soc Exp.Biol Med* 1956;92:688-693.
17. Thomas ED, Lochte HLJr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N.Engl.J Med* 1957;257:491-496.
18. Thomas ED, Lochte HLJr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-1716.
19. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br.Med J* 1956;2:626-627.
20. Mathe G, Jammot H, Pendic B et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation.]. *Rev.Fr.Etud.Clin Biol* 1959;4:226-238.
21. Mathe G, Bernard J, Schwarzenberg L et al. [Trial treatment of patients afflicted with acute leukemia in remission with total irradiation followed by homologous bone marrow transfusion.]. *Rev.Fr.Etud.Clin Biol* 1959;4:675-704.
22. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* 1965;25:1525-1531.
23. Andrews GA. Criticality accidents in Vinca, Yugoslavia, and Oak Ridge, Tennessee. Comparison of radiation injuries and results of therapy. *JAMA* 1962;179:191-197.
24. McGovern JJJr, Russell PS, Atkins L, Webster EW. Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N.Engl.J Med* 1959;260:675-683.
25. Billingham RE, Brent L. A simple method for inducing tolerance of skin homografts in mice. *Transplant.Bull.* 1957;4:67-71.
26. Billingham RR, Brent L. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1959;242:439-477.
27. Uphoff DE. Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow. I. The F1 hybrid effect. *J Natl.Cancer Inst.* 1957;19:123-130.
28. Uphoff DE. Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc Soc Exp.Biol Med* 1958;99:651-653.
29. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970;9:571-587.
30. Van Bekkum DW. Radiation chimeras. *Transplant.Proc* 1970;2:479-482.

31. Thomas ED, Collins JA, Herman EC Jr, Ferrebee JW. Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. *Blood* 1962;19:217-228.
32. Snell GD. Studies in histocompatibility. *Science* 1981;213:172-178.
33. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol.* 1958;20:156-166.
34. van Rood JJ, Eernisse JG, van LA. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958;181:1735-1736.
35. Epstein RB, Storb R, Ragde H, Thomas ED. Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* 1968;6:45-58.
36. Storb R, Epstein RB, Bryant J, Ragde H, Thomas ED. Marrow grafts by combined marrow and leukocyte infusions in unrelated dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation* 1968;6:587-593.
37. Storb R, Rudolph RH, Thomas ED. Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J Clin Invest* 1971;50:1272-1275.
38. Storb R, Graham TC, Shiurba R, Thomas ED. Treatment of canine graft-versus-host disease with methotrexate and cyclophosphamide following bone marrow transplantation from histoincompatible donors. *Transplantation* 1970;10:165-172.
39. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968;2:1364-1366.
40. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-1369.
41. De Koning J, Van Bekkum DW, Dicke KA et al. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969;1:1223-1227.
42. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N.Engl.J.Med.* 1975;292:832-843.
43. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N.Engl.J Med* 1975;292:895-902.
44. Thomas ED, Buckner CD, Clift RA et al. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N.Engl.J Med* 1979;301:597-599.
45. Beutler E, Blume KG, Bross KJ et al. Bone marrow transplantation as the treatment of choice for "good risk" adult patients with acute leukemia. *Trans.Assoc.Am.Physicians* 1979;92:189-195.
46. Clift RA, Buckner CD, Thomas ED et al. Treatment of chronic granulocytic leukaemia in chronic phase by allogeneic marrow transplantation. *Lancet* 1982;2:621-623.
47. Goldman JM, Baughan AS, McCarthy DM et al. Marrow transplantation for patients in the chronic phase of chronic granulocytic leukaemia. *Lancet* 1982;2:623-625.
48. Goldman JM, Apperley JF, Jones L et al. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *N.Engl.J Med* 1986;314:202-207.
49. Thomas ED, Clift RA, Fefer A et al. Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 1986;104:155-163.
50. Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE et al. Marrow transplantation for thalassaemia. *Lancet* 1982;2:227-229.
51. Johnson FL, Look AT, Gockerman J et al. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N.Engl.J Med* 1984;311:780-783.
52. Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G et al. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet* 1984;1:472-476.
53. Deeg HJ, Storb R, Weiden PL et al. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance. *Transplantation* 1982;34:30-35.

54. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N.Engl.J Med* 1986;314:729-735.
55. Juttner CA, To LB, Ho JQ et al. Early lympho-hemopoietic recovery after autografting using peripheral blood stem cells in acute non-lymphoblastic leukemia. *Transplant.Proc* 1988;20:40-42.
56. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N.Engl.J Med* 1989;321:1174-1178.
57. Santos GW. Busulfan (Bu) and cyclophosphamide (Cy) for marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4 Suppl 1:236-239.
58. Schmidt GM, Horak DA, Niland JC et al. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N.Engl.J Med* 1991;324:1005-1011.
59. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N.Engl.J Med* 1991;325:1601-1607.
60. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462-2465.
61. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N.Engl.J Med* 1994;330:1185-1191.
62. Giralt S, Estey E, Albitar M et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89:4531-4536.
63. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D et al. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood* 1983;61:341-348.
64. Henslee-Downey PJ, Abhyankar SH, Parrish RS et al. Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* 1997;89:3864-3872.
65. Oudshoorn M, van LA, vd Zanden HG, van Rood JJ. Bone Marrow Donors Worldwide: a successful exercise in international cooperation. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14:3-8.

ANEXO III

INDICACIONES DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Se tratan enfermedades neoplásicas (hematológicas y tumores sólidos) que no son curables por agentes citotóxicos a dosis tolerables pero curables con alta toxicidad medular (tratamientos mieloablativos), pudiéndose emplear tanto trasplante alogénico como autólogo. Asimismo, está indicado en enfermedades no neoplásicas (aplasias, hemopatías congénitas, inmunodeficiencias, enfermedades metabólicas y otras enfermedades congénitas) con disfunción medular o bien incapaz de producir ciertos elementos celulares en número y función adecuado por distintos defectos genéticos. En estos casos se emplean trasplantes alogénicos, restringiéndose los autólogos a estudios clínicos.

En la tabla se resumen las indicaciones de trasplante de progenitores hematopoyéticos tanto en adultos como en pediátricos según las recomendaciones llevadas a cabo por el Grupo Europeo de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (EBMT¹). Se basan en ensayos clínicos activos, registros del EBMT y en opiniones de expertos en base a una potencial mejor supervivencia y considerando asimismo el riesgo de complicaciones derivadas y la calidad de vida de los pacientes. Los parámetros régimen de acondicionamiento y fuente de progenitores hematopoyéticos a infundir no se incluyen en la tabla debido a que su selección se ve influida por los muchos factores que intervienen en la situación individual de cada paciente (edad, comorbilidad, disponibilidad de un donante, características de la enfermedad, etc.). Igualmente no cubre a pacientes con un donante singénico disponible.

Por tanto, pretende ser una guía-resumen genérica, siendo la decisión final individualizada para cada paciente. De este modo, se incluyen las siguientes categorías:

- **Estándar (E)** – Los trasplantes categorizados como estándar están razonablemente bien definidos y los resultados son comparables o superiores a los obtenidos con estrategias terapéuticas sin trasplante, sin que esto signifique necesariamente que sea la terapia óptima para un paciente dado en cualquier circunstancia clínica. Pueden ser desarrollados en cualquier centro especializado con experiencia en TPH y la infraestructura apropiada, como se define en la guía JACIE^{2,3}.
- **Opción clínica (C)** – Esta categoría se basa en que muchas indicaciones presentan un número bajo de pacientes y por tanto los estudios randomizados comparando tratamiento convencional y TPH son difíciles de llevar a cabo. Los resultados con TPH en pequeñas cohortes muestran eficacia y toxicidad aceptable. Así, en esta categoría, el trasplante es una opción válida para pacientes individuales en función de los riesgos y beneficios propios de cada caso, pero para grupos de pacientes se precisan más evaluaciones. Se recomiendan ser desarrollados en cualquier centro especializado con alta experiencia en TPH y con la infraestructura apropiada, según se indica en la guía JACIE².
- **En desarrollo (D)** – Se incluyen trasplantes en los que hay poca experiencia y que requieren de mayor investigación para definir el papel del TPH. Deben desarrollarse dentro del marco de un protocolo clínico y por centros con conocida experiencia bien en el manejo de la enfermedad concreta o bien del tipo de trasplante. Además cubre nuevas técnicas para el manejo de enfermedades que, en un estadio diferente, podrían clasificarse como C o E.
- **Generalmente no recomendado (NR)** – Incluye enfermedades en estadios tempranos en los que el tratamiento convencional no justifica el riesgo

adicional de la mortalidad relacionada con el trasplante, o cuando la enfermedad está tan avanzada que las opciones de éxito son tan reducidas y es difícil de justificar el riesgo de la recolección para el donante. También incluye TPH para enfermedades en una fase o estado en el que los pacientes no se tratan de manera convencional con TPH. Por tanto, hay cierto solapamiento entre NR y D y debe garantizarse una mayor investigación dentro de estudios clínicos prospectivos.

INDICACIONES PROPUESTAS EN ADULTOS (>16 AÑOS) SEGÚN EL GRUPO EUROPEO DE TPH

Enfermedad	Estadio	Alo			Auto
		MSD	MUD/ MMSD (1mm)	MMUD/ MMSD (>1mm)	
Leucemias					
Leucemia Mieloblástica Aguda	1ª RC en Bajo riesgo	C	D	NR	C
	1ª RC en Riesgo intermedio	E	C	D	E
	1ª RC en Riesgo alto	E	E	C	C
	2ª RC	E	E	C	C
	3ª RC; Recaída incipiente	E	C	D	NR
	LMA M3 con persistencia molecular	E	C	NR	NR
	LMA M3 en 2ª RC	E	C	NR	E
Recaída o Refractaria	C	D	D	NR	
Leucemia Linfoblástica Aguda	1ª RC en Bajo riesgo/intermedio	D	NR	NR	D
	1ª RC en Riesgo alto	E	E	C	D
	2ª RC; Recaída incipiente	E	E	C	NR
	Recaída o Refractaria	C	D	D	NR
Leucemia Mieloide Crónica	1ª Fase crónica (FC), falla imatinib	E	E	C	D
	Fase acelerada; >1ª FC	E	E	C	D
	Crisis blástica	C	C	C	NR
SMP distinto de LMC (TEH, MFI, PV)	1ª ^{aria} ó 2ª ^{aria} con score Lille intermedio	E	E	D	NR
Síndrome Mielodisplásico	AR; AREB	E	E	C	NR
	AREBt; LMA 2ª ^{aria} en 1ª ó 2ª RC	E	E	C	C
	Estadios más avanzados	E	C	D	NR
Leucemia Linfática Crónica	Mal pronóstico	E	E	D	C
Linfomas					
LNH difuso de células grandes	1ª RC con IPI intermedio/alto al Dx	NR	NR	NR	C
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	C	C	NR	E
	Refractario	D	D	NR	NR
LNH de células del manto	1ª RC	C	D	NR	E
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	C	D	NR	E
	Refractario	D	D	NR	NR
Linf. Linfoblástico/Linf. de Burkitt	1ª RC	C	C	NR	C
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	C	C	NR	C
	Refractario	D	D	NR	NR
LNH Folicular de células B	1ª RC	NR	NR	NR	C
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	C	C	D	E
	Refractario	C	C	D	NR
LNH de células T	1ª RC	C	D	NR	C
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	C	C	NR	D
	Refractario	D	D	NR	NR
Linfoma de Hodgkin	1ª RC	NR	NR	NR	NR
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	C	C	C	E
	Refractario	D	D	NR	C
LH con predominio linfocítico nodular	1ª RC	NR	NR	NR	NR
	≥2ª RC; Recaída sensible a QT	NR	NR	NR	C
	Refractario	NR	NR	NR	C

Enfermedad (continúa)	Estadio	Alo			Auto
		MSD	MUD/ MMSD (1mm)	MMUD/ MMSD (>1mm)	
Otras enfermedades					
<i>Hematológicas malignas</i>					
Mieloma Múltiple		C	C	NR	E
Amiloidosis		C	C	NR	C
<i>Hematológicas no malignas</i>					
Anemia aplásica severa	Nuevo diagnóstico	E	C	NR	NR
	Recaída o Refractaria	E	E	C	NR
HPN		E	C	C	NR
<i>Tumores Sólidos</i>					
Cáncer de Mama	Alto riesgo	NR	NR	NR	C
	Metastático	D	D	NR	D/C
Tumores de células germinales	Recaída sensible a QT	NR	NR	NR	C
	Refractario a 3ª línea	NR	NR	NR	E
Cáncer de Ovario	RC/RP	NR	NR	NR	D
	Recaída sensible a platino	D	NR	NR	NR
Meduloblastoma	Post-cirugía	NR	NR	NR	D/C
Cáncer de Pulmón de células pequeñas	Limitado	NR	NR	NR	D
Carcinoma de células renales	Metastático, refractario a citocinas	C	C	NR	NR
Sarcoma de tejidos blandos	Metastático, sensible a QT	D	NR	NR	D
<i>Enfermedades Autoinmunes</i>					
Esclerosis Sistémica		D	NR	NR	C
Esclerosis Múltiple		D	NR	NR	C
Artritis Reumatoide		NR	NR	NR	C
Lupus Eritematoso Sistémico		D	NR	NR	C
Enfermedad de Crohn		NR	NR	NR	C
CIPD		NR	NR	NR	D
Citopenias Autoinmunes *		C	D	D	C

INDICACIONES PROPUESTAS EN PEDIÁTRICOS (≤16 AÑOS) SEGÚN EL GRUPO EUROPEO DE TPH

Enfermedad	Estadio	Alo			Auto
		MSD	MUD/ MMSD (1mm)	MMUD/ MMSD (>1mm)	
Enfermedades Hematológicas					
Leucemia Mieloblástica Aguda	1ª RC en Bajo riesgo	NR	NR	NR	NR
	1ª RC en Alto riesgo	E	C	NR	E
	1ª RC en Muy alto riesgo	E	E	C	C
	2ª RC	E	E	E	E
	>2ª RC	C	D	D	NR
Leucemia Linfoblástica Aguda	1ª RC en Bajo riesgo	NR	NR	NR	NR
	1ª RC en Alto riesgo	E	E	C	NR
	2ª RC	E	E	C	C
	>2ª RC	E	E	C	C
Leucemia Mieloide Crónica	1ª Fase crónica (FC)	E	E	D	NR
	Fase acelerada	E	E	D	NR
Linfoma No Hodgkin	1ª RC en Bajo riesgo	NR	NR	NR	NR
	1ª RC en Alto riesgo	C	C	NR	C
	2ª RC	E	E	C	C
Linfoma de Hodgkin	1ª RC	NR	NR	NR	NR
	2ª RC; 1ª Recaída	C	D	NR	E
Síndrome Mielodisplásico		E	E	D	NR
Otras enfermedades					
<i>Enfermedades hereditarias</i>					
Imunodeficiencias primarias †		E	E	E	-
Talasemia		E	C	NR	-
Anemia Falciforme	Alto riesgo	E	C	NR	-
Anemia Aplásica		E	E	C	-
Anemia de Fanconi		E	E	C	-
Anemia de Blackfan-Diamond		E	C	NR	-
Enfermedad de Kostman		E	E	NR	-
MPS-I H Hurler Scheie	Leve/Intermedio	E	E	C	-
	Grave	NR	NR	NR	-
MPS-VI Maroteaux-Lamy		C	C	C	-
Otras enfermedades de almacenamiento ††		NR	NR	NR	NR
Osteopetrosis		E	E	E	-
Enfermedades Autoinmunes		NR	NR	NR	C
<i>Tumores Sólidos</i>					
Tumores de células germinales		NR	NR	NR	C
Sarcoma de Ewing	>1ª RC; Alto riesgo	D	NR	NR	E
Sarcoma de tejidos blandos	>1ª RC; Alto riesgo	D	D	NR	C
Neuroblastoma	Alto riesgo	C	NR	NR	E
	>1ª RC	C	D	D	E
Tumor de Wilms	>1ª RC	NR	NR	NR	C
Sarcoma Osteogénico		NR	NR	NR	D
Tumores cerebrales		NR	NR	NR	C

Categorías: R – Recomendado, indicado como estándar en pacientes aptos; C – Opción clínica (según evaluación de riesgos y beneficios); D – En desarrollo (necesarios más ensayos clínicos); NR – No recomendado generalmente

Abreviaturas: Alo – Trasplante alogénico; Auto – Trasplante autólogo; CIPD – Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; HPN – Hemoglobinuria Paroxística Nocturna; LH – Linfoma de Hodgkin; LNH – Linfoma No Hodgkin; MFI – Mielofibrosis Idiopática; mm (1 ó >1) – Una o más disparidades HLA; MMSD – Donante emparentado con disparidad HLA; MMUD – Donante no emparentado con disparidad HLA (6-8/10 identidades HLA); MPS – Mucopolisacaridosis; MSD – Donante emparentado HLA idéntico; MUD – Donante no emparentado HLA idéntico (ó 9/10 identidades HLA); PV – Policitemia Vera; QT – Quimioterapia; RC – Remisión completa; RP – Remisión parcial; SMP – Síndrome Mieloproliferativo; TEH – Trombocitemia Esencial, TPH – Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

* Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Anemia Hemolítica Autoinmune, Síndrome de Evans, Neutropenia Autoinmune, etc.

† Síndrome de Inmunodeficiencia combinada (SCID), SCID ligada al cromosoma X; Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X; Síndrome de Wiskott-Aldrich, Síndrome de Chediak-Higashi, Histiocitosis de células de Langerhans, etc.

†† Enfermedad de Gaucher, Enfermedad de Niemann-Pick, Enfermedad de Fabry, Enfermedad de Farber, Gangliosidosis, Leucodistrofias, Enfermedad de Wolman, etc.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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. 2009
2. Link H, Schmitz N, Gratwohl A, Goldman J. Standards for specialist units undertaking blood and marrow stem cell transplants--recommendations from the EBMT. Accreditation Subcommittee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant. 1995;16:733-736.
3. Joint Accreditation Committee. EBMT-EuroSHAGE (JACIE) Accreditation Manual. <http://www.jacie.org> . 2009. 9-11-2009.

Siguiendo el reglamento para la obtención de la mención de “*Doctor Europeus*” en la Universidad de Salamanca (Apartado A, punto segundo), a continuación se presenta un resumen de la tesis doctoral así como las conclusiones originadas de la misma en inglés, como lengua oficial de la Unión Europea seleccionada.

SUMMARY

SUMMARY

Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (allo-HSCT) is a well-established treatment procedure that can potentially cure patients with hematologic malignancies and inherited or acquired non-malignant diseases^{1:2}. An interaction between recipient immunocompetent cells with the donor cells takes place, triggering a series of alloreactive phenomena which will determine the success or failure of the transplant. The most important events are the immune recognition, resulting in graft-versus-host disease (GvHD) and graft-versus-tumor (GvT) effect, the graft rejection and relapse. These phenomena are related to the chimerism establishment and post-transplant tolerance, conditioned by genetic and clinical factors [i.e. stem cell source or myeloablative vs. non-myeloablative regimen].

Contributions like the development of conditioning regimens with lower toxicity, the better management of GvHD, the development of more effective tools for monitoring the engraftment and the better knowledge of GvHD and GvT effects are leading to improvement in the allo-HSCT outcome, with an increased survival reducing allo-HSCT derived complications. Therefore, there is a remarkable increase in the number of indications and patients that could be benefited by this procedure. However, despite the increasing knowledge in this area, about 20-30% of patients undergoing allo-HSCT die due to procedure-derived complications, mainly GvHD and disease relapse, the major complications of allogeneic HSCT.

The HLA system is the most important genetic factor in that processes due to its antigen presentation ability³. However, even in the setting of identical HLA allo-HSCT in which disease relapse rate is relatively low (about 20%), up to 40% of the patients present acute and/or chronic GvHD⁴. This GvHD is a major cause of morbidity and mortality, thereby limiting the use of the procedure^{4:5}. Thus, in these processes there are other factors implicated, such as genetic differences out of HLA loci, the minor histocompatibility antigens (mHLA)^{6:7}, cytokine gene polymorphisms implicated in the cytokine storm of the GvHD⁸ or polymorphisms in proteins related to innate immune response^{9:10}.

Finally, a better knowledge of the immunogenetics together with the clinical risk factors will allow a more accurate assessment of the risk of transplant-related

complications. This fact could lead to the generation of a clinicprognostic index that would help to select the most appropriate donor, to modify the conditioning regimen and to develop individualized immunosuppressive therapy, GvHD prophylaxis and the graft and post-transplant immunotherapy manipulation¹¹. Moreover, a more exhaustive knowledge on the role of donor and recipient genotypes in GvHD triggering or maintenance, could help to include new clinical assays using new drugs.

On the other side, HLA system, as antigen presenting system, could have a role in the development and/or control of some neoplasias. With this premise, its role will be analyzed in multiple myeloma patients, a representative disease from our center.

In this thesis, we aim to analyze the influence of three groups of genetic polymorphisms in the allo-HSCT setting (HLA, microsatellites and two adhesion molecules). The obtained results will be discussed below.

Through the present doctoral study, we attempt to broaden the knowledge and to optimize the allo-HSCT procedure, and with this premises we consider the next objectives:

1. HLA SYSTEM

1.1 To describe HLA class I and class II genotypic and haplotypic frequencies at low resolution level (two digits) in Castilla y León population. This study will allow us to have i) the most frequent haplotypes in the population of Castilla y León, specially helpful in HLA-identical donor searches between second grade related individuals and ii) a healthy control population as a reference cohort for association studies.

1.2 To compare HLA polymorphisms distribution between Castilla y León and other Iberian populations, together with other Mediterranean and European populations.

1.3 To analyze the influence of the HLA system on predisposition and disease prognosis in Multiple Myeloma patients undergoing several treatments including allo-HSCT.

2. MICROSATELLITES (STRs)

2.1 To describe fifteen STR genotypic frequencies in Castilla y León population. This study will allow us to have a healthy control population as a reference population for association studies.

2.2 To compare STR polymorphisms distribution between Castilla y León population and other Iberian populations.

2.3 To evaluate the value of hematopoietic chimerism monitoring using STR-PCR-based in patients receiving HLA-identical sibling allo-HSCT with non-myeloablative conditioning.

2.4 To analyze the value of discrepancies in microsatellite DNA regions between recipient and donor and its relationship with outcome in HLA-identical sibling allo-HSCT patients.

3. OTHER POLYMORPHISMS

3.1 To analyze the role of polymorphisms in cellular adhesion molecules genes PECAM1 (CD31) and ICAM1 (CD54) in HLA-identical sibling allo-HSCT patients.

RESULTS

The results presented in this doctoral thesis have been published in scientific journals. Papers have been attached in supplemental files.

The order of the blocks corresponds to its role and application in the allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation setting: 1) HLA; 2) Microsatellites; 3) Other polymorphisms: cellular adhesion molecules.

BLOCK 1: HLA STUDIES

The first block applies to HLA studies and it is structured in three chapters:

The first of them describes HLA-A, -B and -DRB1 allelic and haplotypic frequencies distribution in our population and its comparison with other Mediterranean and European populations. *HLA-A, -B and -DRB1 allele and haplotype frequencies in Castilla y León (northwest-central Spain) population: Comparison with other Iberian populations* (Submitted to Human Immunology).

The second chapter evaluates the role of HLA polymorphisms in Multiple Myeloma patients candidates to allo-SCT, analysing the possible association of a certain allele with the different clinical evolution of MM patients.

Finally (chapter 3), in a selected group of MM patients treated homogeneously, an association between the presence of DRB1*01 allele with more indolent MM course disease was found. This work was published in Tissue Antigens Journal: *The presence of DRB1*01 allele in multiple myeloma patients is associated with an indolent disease* Tissue Antigens. 2008 Jun;71(6):548-51

BLOCK 2: MICROSATELLITES

The second block compiles the microsatellite regions (also called STR) studies and is also divided in three chapters:

The first of them describes the allelic frequencies on 15 STR regions in our population and compares it with other populations within the Iberian Peninsula. This work, *Allelic frequencies on 15 STR loci in Castilla y León (Northwest-Central Spain)*

population sample using Powerplex 16 system kit, has been submitted for publication in Forensic Science International: Genetics journal.

The second chapter describes the value of STR application in the monitoring of the hematopoietic chimerism, identifying a group of patients with a very high relapse risk which are candidates to an early immunosuppressor treatment. The obtained results were published: “*Valor de la evolución de quimerismo y de la discordancia en regiones STR en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida*”, in Method. Find. Exp. Clin., 2008; 30 (supl. 1) 19-22.

Finally, in the third chapter, the application of STR disparity between recipient and donor is described, showing a correlation between the number of disparities and patients clinical outcome. This work was published: *Clinical and prognostic value of discrepancies in microsatellite DNA regions between recipient and donor in HLA identical allogeneic transplantation setting* Transplantation, 2008 Oct;86(7):983-990.

BLOCK 3: OTHER POLYMORPHISMS

In the last block, results of the analysis of two SNP in two cellular adhesion molecules (PECAM1 and ICAM1) are detailed. The series shows that donor PECAM1 genotype could be associated with a higher severity of acute GvHD. The manuscript regarding this work (*CD31 (PECAM-1) donor genotype is associated with severity of acute graft-versus host disease after HLA identical sibling allogeneic transplantation*) is under preparation.

DISCUSISON

1. HLA SYSTEM AND HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Finding a sibling HLA identical donor is the better choice in allo-HSCT, given its lower risk of disease and transplantation derived complications, mainly GvHD and relapse. The description of the most common haplotypes in each region is essential for this purpose as it allows identifying patients who would benefit from further search among second-degree relatives.

Up to date, there are no studies regarding the population of Castilla y León (CyL) and therefore for this reason in our centre the list of common haplotypes provided by the Spanish bone marrow donor's registry (REDMO) is employed. These data are obtained from published papers and thus, there are regions pending to be analysed with the possibility of common haplotypes in some regions absent in the list. Thus, those patients having these common haplotypes absent from the list would not take advantage from the search for donors among their immediate relatives.

For this reason, and to provide a control population for association studies, our first aim was to describe the allele frequencies of polymorphisms and haplotype HLA-A,-B and-DRB1 in our population (this work is submitted for publication in *Human Immunology*).

The distribution of HLA polymorphisms in our region was similar to that of other populations of the Iberian Peninsula excluding isolated populations (Cabuérnigo, Pas Valley, Valley of Arratia and Chuetas), and it is in agreement with the historical context and the genetic component of the population.

In the paper we describe a total of 10 common haplotypes in our region, being eight of them previously described in other Spanish populations and therefore included in the list of the REDMO frequent haplotypes. However, there were two other common haplotypes described in our population and not described previously in other Spanish populations: A*02,B*51,DRB1*11 and A*02,B*18,DRB1*03. Interestingly, they have been described in Portuguese populations^{12;13}, which is consistent with the geographical and historical situation of CyL. These two haplotypes have been already incorporated to

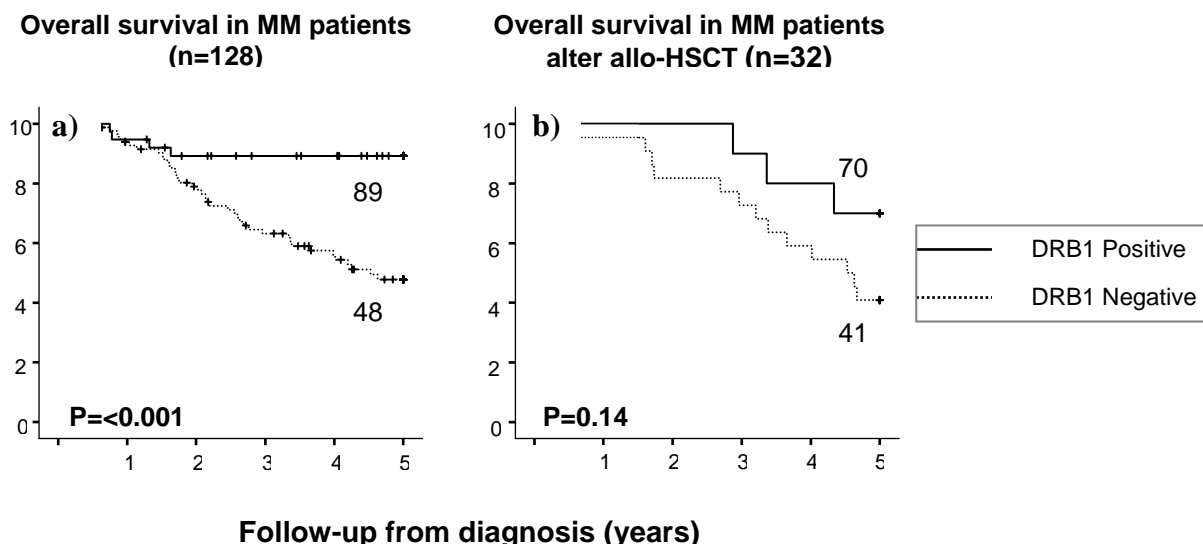
the list of common haplotypes used in our centre together with those provided by the REDMO.

Furthermore, we established a control group representative of our region as a basis for association studies, sending the results to the *online* database Allele Frequencies in Worldwide Populations¹⁴.

Previous studies have shown the relationship between HLA specificities to the susceptibility and/or clinical aggressiveness of some solid and/or hematopoietic tumours¹⁵⁻¹⁸. Our next aim was to explore this hypothesis in multiple myeloma (MM) patients, a very representative neoplasia of our centre. We discussed the role of the HLA as antigen presentation system in the control of this disease in patients undergoing different treatment regimens including allo-HSCT. Preliminary results showed a higher frequency of certain HLA specificities in MM¹⁹⁻²¹, which could suggest a lower ability to disease antigens presentation.

To verify this hypothesis, we performed a preliminary study comparing the control population previously defined with a heterogeneous population of 130 unselected patients diagnosed with MM with HLA-A,-B and-DRB1 typing available, based on the possible indication of a sibling allo-SCT.

The most important observation was a higher overall survival and progression-free survival in patients with the DRB1*01 allele (see figure a). These differences remained when we analyzed specifically those patients who underwent sibling HLA-identical allo-HSCT, although the sample size did not allow us to do further analysis



(see figure b). These data suggest a potential role of DRB1*01 allele in the control of the disease.

Due to the obtained results in the preliminary study, we intended to confirm the influence of the DRB1*01 allele in two populations of MM patients with uniform treatment: 1) Population of patients with symptomatic MM included in the GEM-00 treatment protocol diagnosed in 2000-01: n = 128, 2) population of patients with untreated quiescent or asymptomatic MM: n = 53 (this section of our work is published in *Tissue Antigens* 2008, 71, 548-551).

As a result of this analysis, we noted that the phenotypic frequency of DRB1*01 allele was higher in the group of patients with quiescent MM compared with symptomatic MM and that the incidence of DRB1*07 allele was higher in the group of patients with symptomatic MM compared with the control population.

Taking together, the data provided support for the hypothesis that HLA specificities may play a role in the control of the disease in patients with MM. In particular the HLA-DRB1*01 may have a greater ability to efficiently present tumour antigens to immunocompetent myeloma cells, which would promote a better immune response against the tumour. In turn, this could result in a more appropriate disease control associated with more indolent disease and prolonged survival.

In contrast, the HLA-DRB1*07 allele may have the opposite meaning, with a less effective MM tumour antigens presentation.

2. MICROSATELLITES AND HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Data from allelic and genotypic frequencies of different polymorphisms are essential requirements in forensic genetics (forensic casework, identification of missing people, etc.) and population genetic studies^{22;23}, due to their different distribution among regions. Similarly, for the study of haematopoietic chimerism, the identification of the most informative genetic markers (i.e. microsatellite analysis) is important since it allows discriminating cells between donor and recipient.

To date, there is no study of the microsatellite allele frequencies comprising our region. With this idea, we aimed to describe the allele frequencies of 15 microsatellite markers analysing several parameters of forensic interest in our series, representative of the population of Castile and Leon (this section of our work has been submitted for publication in *Forensic Science International: Genetics*).

The distribution of STR markers in our region is similar to that of other Iberian Peninsula populations and it is consistent with the observed data in our analysis with HLA polymorphisms. Both the high polymorphism information content (PIC) values and power of discrimination (PD) (ability to discern between two different individuals) show four highly informative microsatellite markers (Penta E, FGA, D18S51, D21S11), agreeing with those observed in other series with Caucasian individuals²⁴⁻²⁶. These markers are therefore the most useful in the study of hematopoietic chimerism since there are the ones with the highest probability to show different alleles between recipient and donor.

In addition, we observe the presence of a variant allele with a very low frequency in the marker D3S1358, which has previously been described only twice and none in Spain. This variant has been sent to the *on-line* database STRbase²⁴, which compiles microsatellite polymorphisms information for the forensic community.

We then discuss the role of STR in the allogeneic transplantation setting in two ways; first, analysing its utility to monitor the degree of hematopoietic chimerism in a group of patients with reduced intensity conditioning (RIC) allo-HSCT and second, analysing its behaviour as an indirect measure of genetic divergence between recipient and donor.

The presence of mixed chimerism in patients with hematologic malignancies after allo-HSCT with myeloablative conditioning usually precedes the reappearance of malignant cells of recipient origin and is thus an indicator of disease recurrence²⁷. The chimerism evolution after transplantation is also a dynamic process, and increase or decrease of the percentage of autologous cells in patients with mixed chimerism can occur²⁸. These studies are the basis for preventive immunotherapy therapeutic

interventions aimed to avoid graft rejection, to maintain it or to prevent an imminent relapse^{28;29}.

RIC allo-HSCT base its efficacy on its immunosuppressive ability which allows grafting of the donor cells with less toxicity and transplant-related mortality by using nonmyeloablative regimens, keeping the graft-versus-tumor activity. However, this type of transplant is not able to reduce the incidence of GvHD, it has lower capacity of tumour debulking and the risk of rejection is higher³⁰⁻³³. These characteristics allows its use in patients with hematologic diseases that would not be candidates for conventional allo-HSCT because of their high age or comorbidity^{32;33}. In this type of transplant there is a period of time with the coexistence of donor and recipient cells, with a mutual tolerance in which there may be a graft versus leukemia effect after the establishment of complete donor chimerism^{34;35}. Therefore, the only presence of mixed chimerism in the absence of GvHD is not enough for therapeutic intervention through preventive immunotherapy.

The impact of hematopoietic chimerism in the particular case of RIC allo-HSCT has been little studied. The studies usually analyze the impact of the T lymphocytes subpopulation in the early stages of graft (days +21 or +56)^{36;37}, with little information about the value of the chimerism dynamics, because of the lack of quantitative criteria and/or failure to establish objective definitions^{37;38} or to be limited to paediatric patients^{29;39-41}. For these reasons we examined the value of the chimerism dynamics in adult patients with RIC allo-HSCT with peripheral blood HLA identical sibling donor.

In our series we observed a group of patients with increased mixed chimerism in bone marrow, which associates with a high incidence of relapse. In all cases immunosuppression was withdrawn and in six cases additional immunotherapy was added (donor lymphocyte infusion, DLI). Five of the six patients who received DLI responded, were rescued and reached complete (4 patients) or partial remission (1 case) with a 4-7 years follow up after transplantation. Of these, three cases developed post-DLI GvHD (two cases mild and one severe GvHD) and one patient relapsed 5 years after the DLI. The two remaining patients, who did not develop GvHD, progressed between 12 and 18 months post- DLI. By contrast, all patients who did not receive DLI relapsed and died with an average of 2 and 6 months post-transplantation, respectively.

Thus, monitoring of the post-transplant hematopoietic chimerism dynamics in RIC allo-HSCT patients, similarly as in those with myeloablative conditioning

regimens, is a reliable method to identify those patients with very high risk of relapse who could benefit from immunomodulatory treatment.

The second point is the evaluation of the impact of microsatellites discrepancies between recipient and donor in the evolution of patients undergoing peripheral blood HLA-identical sibling donor allo-HSCT. We assume that the greater the discrepancy is the more differences in minor histocompatibility antigens between recipient and donor will be⁷, and therefore a greater subsequent immune reaction probability with higher frequency and severity of GvHD.

Following to this hypothesis, we show that patients with high genetic divergence with respect to its donor (2 thirds of the total) had a higher incidence and severity of GvHD and lower survival. In fact, it was an independent factor associated with complications after allo-HSCT. The data are consistent with previous observations made by our group as well as other reports⁴²⁻⁴⁵, and consistent with the hypothesis that a more intense immune reaction against the host when greater is the genetic distance between recipient and donor, even with HLA identity. In addition, we found a specific microsatellite discrepancy between donor and recipient associated with a worse post-transplant clinical behaviour, suggesting the presence of a genetic component close to 13q22-q31 with a possible role in the recognition and/or in the immune response.

With these considerations, we propose that the study of microsatellite discrepancies may be a valuable method as a direct estimator of genetic differences between recipient and donor that allows to identify a group of patients with increased risk of GVHD and worse survival. This would enable us to improve donor selection, as well as tighter GvHD control and/or raise more intensive treatment of GVHD within clinical trials.

3. OTHER POLYMORPHISMS: CELLULAR ADHESION MOLECULES

Finally, we proposed to analyze the role of polymorphisms in adhesion molecule platelet endothelial cell (PECAM-1, CD31) and intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in the development of GVHD after allo-HSCT.

PECAM-1 and ICAM-1 are members of the immunoglobulin superfamily and are constitutively expressed in leukocytes and endothelial cells⁴⁶. These molecules

allow the binding between leukocytes and endothelial cells to facilitate leukocyte transmigration^{47;48}, having PECAM1 also an important role in lymphocyte activation in response to foreign antigens recognition⁴⁹.

Three SNP polymorphisms (L125V, S563N and R670G, (CD31-125 CD31-563 CD31-670, respectively)) are found in PECAM-1 gene sequence, which have been associated with increased incidence and/or severity of aGvHD⁵⁰⁻⁵⁶, although there are conflicting results⁵⁷⁻⁶², remaining the real effect of PECAM-1 unknown. The three polymorphisms are in linkage disequilibrium in Caucasian population, being complete between CD31-563S and CD31-670R and with a strong imbalance between CD31-125L and CD31-563S/670R. Thus, the two main haplotypes in Caucasian individuals, designated LSR and VNG, are found in more than 98% of individuals^{63;64}.

Meanwhile, ICAM-1 has been associated with chronic inflammatory diseases such as ulcerative colitis or Crohn disease⁶⁵⁻⁶⁷. To the best of our knowledge there is only one article analyzing their role in GvHD, assessing the polymorphism located at codon 56 (K/M) which is finally excluded from the analysis because of its low heterozygosity in Caucasian⁶⁰.

With these precedents we decided to analyze the role of CD31-125 (as reference of the different haplotypes) and SNP at codon 241 in ICAM-1 (CD54-241) in 127 patients undergoing HLA identical sibling allo-HSCT.

In our series, neither disparity nor the incompatibility of both CD31-125 and CD54-241 between recipient and donor were associated with an increased incidence and/or severity of aGvHD. In contrast, the heterozygous genotype of CD31-125 in the donor was associated with severity of aGvHD.

CD31-125 is involved in PECAM-1-PECAM-1 interactions between two endothelial cells or between leukocytes and endothelial cells⁶⁸. It has recently been shown that this polymorphism produces protein structural changes⁶⁹. Similarly, monocytes expressing the heterozygote genotype in CD31-125 (L/V) have increased adhesion capability, without endothelial cell genotype influence⁷⁰. Both results are consistent with the Goodman's hypothesis⁵⁵, which proposed a different capacity of leukocyte migration due to a different structure of the protein defined by each haplotype.

With these premises and the obtained results it could be hypothesized that in the allo-SCT setting donor monocytes carrying both forms of the protein would have greater ability to adhere to endothelial cells, due to the fact that binding between PECAM-1 molecules is affected, favouring their migration through them and thereby facilitating the access of monocytes to tissues that may trigger the graft-versus-host reaction.

In conclusion, the presented data suggest that donor genotype of PECAM-1 is associated with the development of complications after allogeneic transplantation, such as the severity of GVHD. This result as well as the molecular basis for this mechanism should be confirmed in prospective studies. Whether this hypothesis is confirmed, the study of PECAM-1 donor genotype could be of clinical relevance in anticipation of GvHD.

CONCLUSIONS

Following the HLA studies:

1. Allelic and haplotypic frequencies in a reference sample from our population are well established, showing that it is genetically similar to other Iberian populations and allowing us to obtain a control population for association studies.
2. Frequent haplotypes from our population are described, including two not previously published in other Spanish populations. These two haplotypes were immediately added and applied to extend HLA typing in those patients from our region having a frequent haplotype.
3. Role of HLA system as mechanism control or development of tumors: in Multiple Myeloma patients, the presence of DRB1*01 allele is associated with an indolent disease, which suggests an effect on neoplasm immune control.

According to Microsatellites studies:

1. A total of 15 STR regions allelic frequencies and other forensic parameters from our population were established. Penta E, D18S51, FGA y D21S11 are the most informative markers and therefore they are especially useful for chimerism analysis.
2. An infrequent allele 11 in D3S1358 STR marker in two individuals from our population was reported, which was only observed in other three populations and it was referred to *on-line* STR database STRbase.

3. Sequential chimerism analysis is a valuable tool that allows the identification of a group of patients with high risk of relapse, which should be actively treated.
4. A direct correlation was observed between the higher genetic incompatibilities in STR regions analyzed between recipient and donor and worse outcome of patients receiving an identical HLA sibling donor allogeneic-stem cell transplantation.
5. The presence of disparities in the neighboring D13S317 region could influence transplant-related mortality.

According to Cell Adhesion Molecules studies:

1. ICAM1 genotype does not seem to have any influence on the prognosis or complications after allo-SCT. On the other hand, donor PECAM1 genotype could be associated with complications after HLA identical allo-SCT like the severity of acute GvHD.

REFERENCES

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.* 2009
3. 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.
4. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
5. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* 2007;25:139-170.
6. Goulmy E, Schipper R, Pool J et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 1996;334:281-285.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Dickinson AM. Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT. *Int.J.Immunogenet.* 2008;35:375-380.
12. Spinola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J. HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* 2005;66:217-230.
13. Spinola H, Brehm A, Williams F, Jesus J, Middleton D. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route. *Ann.Hum.Genet.* 2002;66:285-296.
14. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens* 2003;61:403-407.
15. Lech-Maranda E, Juszczynski P, Szmigielska-Kaplon A et al. Human leukocyte antigens HLA DRB1 influence clinical outcome of chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 2007;92:710-711.
16. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100:1570-1574.
17. Campillo JA, Martinez-Escribano JA, Muro M et al. HLA class I and class II frequencies in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain: the role of HLA-C in disease prognosis. *Immunogenetics* 2006;57:926-933.
18. Montes-Ares O, Moya-Quiles MR, Montes-Casado M et al. Human leucocyte antigen-C in B chronic lymphocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2006;135:517-519.

19. Ludwig H, Mayr W. Genetic aspects of susceptibility to multiple myeloma. *Blood* 1982;59:1286-1291.
20. Mason DY, Cullen P. HL-A antigen frequencies in myeloma. *Tissue Antigens* 1975;5:238-245.
21. Patel M, Wade AA, Galpin J et al. HLA class I and class II antigens associated with multiple myeloma in southern Africa. *Clin.Lab Haematol.* 2002;24:215-219.
22. Lincoln P, Carracedo A. Publication of population data of human polymorphisms. *Forensic Sci.Int.* 2000;110:3-5.
23. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 2007;43:ii-iv.
24. Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:320-322.
25. Gusmao L, Sanchez-Diz P, Alves C et al. Genetic diversity of nine STRs in two northwest Iberian populations: Galicia and northern Portugal. *Int.J Legal Med* 2000;114:109-113.
26. Cassar M, Farrugia C, Vidal C. Allele frequencies of 14 STR loci in the population of Malta. *Leg Med (Tokyo)* 2008;10:153-156.
27. Liesveld JL, Rothberg PG. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:297-310.
28. Bader P, Beck J, Schlegel PG et al. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:79-81.
29. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J.Clin.Oncol.* 2004;22:1696-1705.
30. Giralt S, Estey E, Albitar M et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89:4531-4536.
31. Slavin S, Nagler A, Naparstek E et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-763.
32. Alousi A, de LM. Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Adv.Hematol.Oncol.* 2007;5:560-570.
33. Storb R. Reduced-intensity conditioning transplantation in myeloid malignancies. *Curr.Opin.Oncol.* 2009;21 Suppl 1:S3-S5.
34. Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:387-392.
35. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev.* 2005;19:153-164.
36. Perez-Simon JA, Caballero D, ez-Campelo M et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002;16:1423-1431.
37. Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006;20:1690-1700.
38. Michallet AS, Furst S, Le QH et al. Impact of chimerism analysis and kinetics on allogeneic haematopoietic stem cell transplantation outcome after conventional and reduced-intensity conditioning

- regimens. *Br.J Haematol.* 2005;128:676-689.
39. Bader P, Niemeyer C, Willasch A et al. Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimaerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br.J.Haematol.* 2005;128:649-658.
40. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:815-821.
41. Formankova R, Honzatkova L, Moravcova J et al. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leuk.Res.* 2000;24:339-347.
42. Alcoceba M, Díez-Campelo M, Martín-Jiménez P et al. Allogeneic transplantation with identical MHC: clinic-prognostic value of discrepancies of microsatellite DNA regions between recipient and donor. *Blood* 2004;104:3336.
43. Dalva K, Arat M, Serbest E, Beksaç M. A comparison of the number of informative short tandem repeat (STR) loci between HLA identical donor-recipient pairs and the frequency of graft versus host disease (GvHD). *Genes Immun.* 2004;5:(abstract[91]).
44. Kim DH, Jung HD, Kwack DH et al. Predicting outcomes of HLA-identical allogeneic stem cell transplants from variable number of tandem repeat disparity between donors and recipients. *Haematologica* 2006;91:71-77.
45. Stern M, Meyer-Monard S, Bucher C et al. Prognostic value of discrepancies in microsatellite DNA regions between donor and recipient in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:(abstract[249]).
46. Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J.Immunol.* 1996;156:1515-1524.
47. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007;27:2514-2523.
48. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol.Rep.* 2009;61:22-32.
49. Zehnder JL, Shatsky M, Leung LL et al. Involvement of CD31 in lymphocyte-mediated immune responses: importance of the membrane-proximal immunoglobulin domain and identification of an inhibiting CD31 peptide. *Blood* 1995;85:1282-1288.
50. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 1996;334:286-291.
51. Maruya E, Saji H, Seki S et al. Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood* 1998;92:2169-2176.
52. Grumet FC, Hiraki DD, Brown BWM et al. CD31 mismatching affects marrow transplantation outcome. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2001;7:503-512.
53. Balduini CL, Frassoni F, Noris P et al. Donor-recipient incompatibility at CD31-codon 563 is a major risk factor for acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from a human leucocyte antigen-matched donor. *Br.J.Haematol.* 2001;114:951-953.
54. Cavanagh G, Chapman CE, Carter V, Dickinson AM, Middleton PG. Donor CD31 genotype impacts on transplant complications after human leukocyte antigen-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2005;79:602-605.
55. Goodman RS, Ewing J, Evans PC et al. Donor CD31 genotype and its association with acute graft-versus-host disease in HLA identical sibling stem cell

- transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:151-156.
56. El-Chennawi FA, Kamel HA, Mosaad YM, El-Sherbini SM, El-Billey NA. Impact of CD31 mismatches on the outcome of hematopoietic stem cell transplant of HLA-identical sibling. *Hematology.* 2006;11:227-234.
 57. Nichols WC, Antin JH, Lunetta KL et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 is not a significant risk factor for graft-versus-host disease. *Blood* 1996;88:4429-4434.
 58. Da Costa L, Charron D, Loiseau P. Does the adhesion molecule CD31 act as a minor histocompatibility antigen? *Blood* 1997;90:1332.
 59. Kogler G, Middleton PG, Wilke M et al. Recipient cytokine genotypes for TNF-alpha and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GVHD in unrelated cord blood transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 2002;74:1167-1175.
 60. 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.
 61. Heinemann FM, Ferencik S, Ottinger HD, Beelen DW, Grosse-Wilde H. Impact of disparity of minor histocompatibility antigens HA-1, CD31, and CD49b in hematopoietic stem cell transplantation of patients with chronic myeloid leukemia with sibling and unrelated donors. *Transplantation* 2004;77:1103-1106.
 62. Katagiri T, Shiobara S, Nakao S et al. Mismatch of minor histocompatibility antigen contributes to a graft-versus-leukemia effect rather than to acute GVHD, resulting in long-term survival after HLA-identical stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38:681-686.
 63. Novinska MS, Pietz BC, Ellis TM, Newman DK, Newman PJ. The alleles of PECAM-1. *Gene* 2006;376:95-101.
 64. Robbins FM, Hartzman RJ. CD31/PECAM-1 genotyping and haplotype analyses show population diversity. *Tissue Antigens* 2007;69:28-37.
 65. Yang H. Analysis of ICAM-1 gene polymorphism in immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Exp.Clin Immunogenet.* 1997;14:214-225.
 66. Kristiansen OP, Nolsoe RL, Holst H et al. The intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism in type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2000;52:107-111.
 67. Low JH, Williams FA, Yang X et al. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2004;10:173-181.
 68. Sun J, Williams J, Yan HC et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J.Biol.Chem.* 1996;271:18561-18570.
 69. Kosmoliaptsis V, Goodman RS, Dafforn TR, Bradley JA, Taylor CJ. Structural implications of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 polymorphisms. *Transplantation* 2008;86:484-485.
 70. Goodman RS, Kirton CM, Oostingh GJ et al. PECAM-1 polymorphism affects monocyte adhesion to endothelial cells. *Transplantation* 2008;85:471-477.