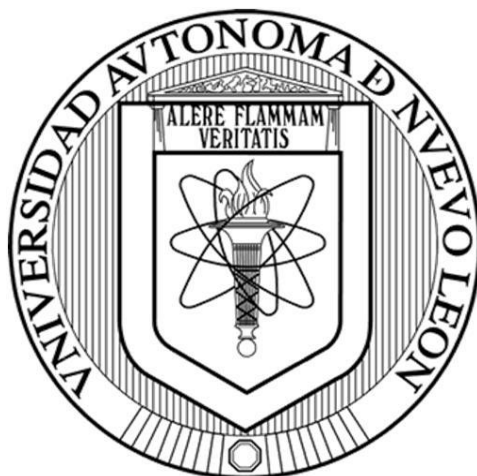


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA INCOMPATIBILIDAD EN EL LOCUS HLA DPB1 DEL
SISTEMA HLA EN EL PRENDIMIENTO DEL TRASPLANTE
HEMATOPOYÉTICO HAPLOIDÉNTICO RELACIONADO**

Por

CARLOS OCTAVIO CANCELA MURRIETA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN LABORATORIO DE HEMATOLOGIA**

ABRIL, 2019

**EFFECTO DE LA INCOMPATIBILIDAD EN EL LOCUS HLA DPB1 DEL
SISTEMA HLA EN EL PRENDIMIENTO DEL TRASPLANTE
HEMATOPOYÉTICO HAPLOIDÉNTICO RELACIONADO**

Aprobación de la tesis:



Dr. Med. José Carlos Jaime Pérez
Director de Tesis



Dr. David Gómez Almaguer
Miembro de Comisión



Dr. José Luis Herrera Garza
Miembro de Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios..... Por darme vida y fuerzas para terminar este proyecto tan importante en mi vida.

Agradezco a mi Asesor, el Dr. José Carlos Jaime Pérez por su invaluable apoyo, paciencia, enseñanzas y colaboración, y por ser guía en la realización de mi maestría.

Agradezco y dedico esta tesis a mi familia, Por ser el soporte más fuerte en momentos de desesperación y angustia, por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas y porque sin su apoyo no hubiera podido seguir adelante.

RESUMEN

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son el sistema más complejo y polimórfico conocido en el hombre que se encarga de la presentación de péptidos a los linfocitos T. Además de su reconocida importancia en la aceptación y rechazo de trasplantes, se ha demostrado que desempeña un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades. Una característica fundamental del HLA es su alto grado de polimorfismo que conduce a diferentes especificidades de ligamiento de péptidos por diferentes alelos y puede contribuir a diferencias en la respuesta inmune entre individuos, jugando un papel importante en los trasplantes de órganos y la susceptibilidad a ciertas enfermedades. Las moléculas HLA son altamente polimórficas y se expresan como heterodímeros en la superficie celular. Este polimorfismo extremo ha permitido conocer al menos 3830 alelos para las moléculas de la clase HLA-A, 4647 para HLA-B, 3382 para HLA-C, 2011 para HLA-DRB1, 1054 para HLA-DQB1 y 740 para HLA-DPB1. Estudios a nivel de población han demostrado que ciertas combinaciones de alelos se heredan más frecuentemente de lo esperado debido al azar. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium), varía con la población y con la etnia y a veces incluso entre grupos de población de una misma etnia.

La región en donde se encuentra el HLA DPB es el extremo próximo al centrómero del brazo corto del cromosoma 6, por lo que es posible que pueda darse una recombinación en este punto, lo que podría dar paso a una variación en el haplotipo heredado de los padres. La evidencia inicial para un papel de HLA-DPB1 en TPH no relacionado se informó desde mediados de la década de 1990. Experimentalmente, se ha confirmado la capacidad de una amplia gama de disparidad de alelos HLA-DPB1 que provocan respuestas policlonales de células T alorreactivas, de acuerdo con estas observaciones se ha demostrado que las diferencias de HLA-DPB1 están asociados con un mayor riesgo de EICH aguda aun presentando identidad HLA 8/8 en el TCH no relacionado. En estudios previos se ha encontrado que la probabilidad de que la EICH aguda grado III o IV se desarrolle en los receptores con alelos HLA idénticos en los loci DPA1 y DPB1 es

de 19% y 18%. La diferencia es que todos estos se han llevado a cabo en pacientes “No relacionados”.

El objetivo de esta tesis consiste en Investigar el efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 en el prendimiento del trasplante haploidéntico relacionado, así como tratar de encontrar una asociación a un mejor o peor pronóstico de prendimiento en un TPH, identificar los alelos más frecuentes presentes en la población analizada en nuestro centro y comparar estas frecuencias con otros estudios nacionales e internacionales.

Los resultados obtenidos arrojaron que el alelo HLA DPB1 más frecuente fue el DPB1* 04:01 (con 33.2%), seguido del DPB1* 04:02. (27.5 %) Los estudios que se han hecho en México son efectuados en grupos étnicos muy cerrados y con un número de muestras muy reducido y que en 26% de los casos hubo homocigocidad para el alelo estudiado. No se pudo Identificar si predomina un antígeno HLA-DPB1 asociado a la reconstitución hematopoyética.

No hubo asociación de las variables analizadas con la TRM, SG o EICH aguda. El alelo DPB1 no se asoció a la velocidad de la reconstitución hematopoyética. Podemos decir que en pacientes haploidénticos “relacionados” no influye la identidad o disparidad del locus DPB1 para un TPH.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
1.-INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Nomenclatura HLA	7
1.2 Recombinación.....	8
1.3 HLA Dp.....	9
2.- JUSTIFICACIÓN.....	11
3.- HIPÓTESIS.....	12
4.- OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo General.....	13
4.2 Objetivos Particulares.....	13
5.-DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	14
5.1 Diseño Metodológico.....	14
5.2 Población.....	14
5.3 Tamaño de la Muestra	14
5.4 Criterios de Inclusión	14
5.5 Criterios de Exclusión	15

5.6 Criterios de Eliminación	15
6.- MATERIAL Y METODOS.....	16
6.1 Metodología.....	16
6.2 Amplificación de locus HLA DPB1.....	17
6.3 Análisis de la Prueba.....	19
6.4 Adquisición de Datos	23
7.- VALORES PARA CONSIDERAR LA ACEPTACIÓN O RECHAZO DEL TRASPLANTE	24
8.- RESULTADOS	25
9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
10.- DISCUSIÓN.....	30
11.- CONCLUSIONES	34
12.-LISTA DE FIGURAS	35
13.-LISTA DE TABLAS	43
14.- LITERATURA CITADA	50
15.- RESUMEN BIOGRAFICO	56

1. INTRODUCCIÓN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas es un recurso terapéutico imprescindible en la práctica moderna de la medicina.¹

En 1957 E. Donnall Thomas llevo a cabo el primer trasplante de médula ósea, actualmente denominado de progenitores hematopoyéticos (TPH), como tratamiento de la lesión medular provocada por la irradiación y, más tarde, para tratar distintas enfermedades hematológicas empleando distintos métodos².

En 1980 Ricardo Sosa Sánchez efectuó el primer trasplante de médula ósea en México, apoyado por sus colaboradores del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en la Ciudad de México¹

Los trasplantes de progenitores hematopoyéticos pueden ser autólogos, cuando los progenitores proceden del propio paciente, y alogénicos, si los progenitores proceden de otro individuo que actúa como donante³. Ambas modalidades son formas de terapia celular bien establecida y ampliamente utilizada en el curso del tratamiento de neoplasias hematológicas, como las leucemias, linfomas, mielomas, la aplasia medular, las inmunodeficiencias congénitas y ciertos tumores sólidos⁴.

En el caso de los trasplantes alogénicos, su efecto curativo se basa por un lado en la utilización de quimio-radioterapia para erradicar la enfermedad e inmunosupresora para evitar el rechazo del injerto, administrada como “condicionamiento” y por otro el

potente efecto inmunoterapéutico producto de la alorreactividad inmunológica del injerto (efecto injerto contra tumor) mediada principalmente por los linfocitos T.⁵

Cuando se requiere un TPH es ideal encontrar un donante histocompatible en los antígenos del sistema HLA (Human Leukocyte Antigens)⁶. Los trasplantes alogénicos más frecuentes son aquellos en los que el donante es un hermano histocompatible o HLA-idéntico, Sin embargo sólo un 30% de los pacientes que requieren un trasplante disponen de un donante familiar histocompatible y, con la reducción del número de hijos que tienden a tener las familias actuales, este porcentaje disminuirá⁷. En respuesta a lo anterior se han desarrollado procedimientos que aprovechan fuentes alternativas de progenitores para las situaciones en las que no se dispone de un donante familiar compatible⁸.

El trasplante haploidéntico (“mitad idéntico”) consiste en la utilización de células hematoprogenitoras derivadas de un donante familiar con identidad HLA parcial, típicamente la madre, padre, un hermano o hijo⁹. Existe la disponibilidad inmediata de este tipo de donante en casi todos los pacientes.

La función biológica del sistema HLA en el sistema inmune consiste en el reconocimiento de los diferentes antígenos que después de transformados son presentados junto con las moléculas de histocompatibilidad al macrófago (restricción del reconocimiento antigénico), para provocar el desarrollo de la respuesta inmune¹⁰. Los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad juegan un papel importante en la función del sistema inmune y presentan antígenos a los linfocitos T para su eliminación¹¹. Una característica fundamental del HLA es su alto grado de polimorfismo que conduce a diferentes especificidades de ligamiento de péptidos por

diferentes alelos y puede contribuir a diferencias en la respuesta inmune entre individuos, jugando un papel importante en los trasplantes de órganos y la susceptibilidad a ciertas enfermedades¹². El sistema HLA consta de 4 millones de pares de bases, se localiza en la porción distal de la banda 6p21.3, en el brazo corto del cromosoma 6¹⁰. Las moléculas HLA son altamente polimórficas y se expresan como heterodímeros en la superficie celular¹¹. y está dividido en las familias HLA de clase I, II y III, con más de 200 genes (Fig. 1).

Las familias más estudiadas del MHC comprenden los antígenos de clase I (A, B y C) y II (DP, DQ y DR), también conocidos como moléculas clásicas, los cuales son estructural y funcionalmente similares (Taylor *et al.*, 2009).

El contenido genético del MHC está compuesto de muchos genes, retrotransposones, transposones, elementos regulatorios, pseudogenes y muchos otros genes que tienen secuencias no conocidas¹³. La región genómica del MHC es una de las regiones que más genes contienen y de las regiones mejor definidas del genoma humano, las secuencias no conocidas son solo un pequeño porcentaje de la región del MHC (Takashi *et al.*, 2009).

La región HLA de clase I contiene 19 genes, tres son conocidos como clásicos (HLA-A, -B y -C) por su gran polimorfismo e importancia en trasplantes médicos, tres llamados no clásicos (HLA-E, -F y -G) cuya distribución en los tejidos es restringida y su papel en el área de trasplantes no ha sido bien definida y 12 pseudogenes cuyo polimorfismo y funciones no han sido bien establecidas. (Figura 2)

La región HLA de clase II se expande en 0.7 Mb de ADN y contiene los genes que codifican para las cadenas clásicas α y β . HLA-DP, -DQ y -DR se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos para presentar péptidos a las células

T cooperadoras. Existen 27 locus identificados dentro de la región de clase II desde HLA-DRA a HLA-DPA3, con 17 genes que codifican para proteínas, siete genes candidatos y cinco pseudogenes. Se conoce que las proteínas codificadas por los 17 genes son funcionales¹³.

La región de los genes HLA de clase III, también está implicada en aspectos de la respuesta inmune (complemento), pero su homología estructural y funcional es diferente que los genes HLA de clase I y II.

Este polimorfismo extremo ha permitido conocer al menos 3830 alelos para las moléculas de la clase HLA-A, 4647 para HLA-B, 3382 para HLA-C, 2011 para HLA-DRB1, 1054 para HLA-DQB1 y 740 para HLA-DPB1¹⁴.

1.1 Nomenclatura del sistema HLA

El utilizar un código de cuatro dígitos para distinguir los alelos HLA que difieren en las proteínas que se codifican por estos genes, se estableció en un informe de nomenclatura en 1987 por el comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud. Desde entonces dígitos adicionales se han añadido, y en la actualidad el nombre de un alelo puede estar compuesto por cuatro, seis u ocho dígitos dependiendo de su secuencia.

Los primeros dos dígitos describen el alelo de la familia, que a menudo corresponde con el antígeno serológico que lleva el alotipo. El tercer y cuarto dígitos se asignan en el orden en que las secuencias se han determinado. Alelos cuyos números difieren en los cuatro primeros dígitos pueden diferir en una o más sustituciones de nucleótidos que cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Los alelos que se

diferencian sólo por sustituciones de nucleótidos sinónimo dentro de la secuencia de codificación se distinguen por el uso de los dígitos quinto y sexto. Alelos que sólo se diferencian por polimorfismos de secuencia en los intrones o en las regiones 5' y 3' no traducidas, que flanquean los exones e intrones, se distinguen por el uso de los dígitos séptimo y octavo¹⁵.

Con el paso del tiempo y la adición de nuevos alelos encontrados, surgió un problema, el número de algunos alelos de ciertos genes se estaba acercando al máximo posible, por tal motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité de Nomenclatura de los factores del sistema HLA decidieron introducir nuevos cambios en la manera en que los alelos eran designados y nombrados, incluyendo una separación por dos puntos entre un alelo y su subsecuente, estos cambios entraron en vigor el 1° de abril del año 2010 (HLA Nomenclature, 2010). (Figura 3)

1.2 Recombinación

A pesar de la complejidad de los grupos de genes, normalmente hay sólo cuatro genotipos que pueden transmitirse a la descendencia, y la probabilidad de identidad HLA genotípica de cualquiera de los dos hermanos es del 25%. Cuando los genotipos HLA se obtienen tipificando familias completas, aproximadamente el 2% de la descendencia mostrará un genotipo HLA recombinante¹⁶. Los haplotipos recombinantes HLA se crean durante la meiosis de las células germinales¹⁷. Durante la replicación de los cromosomas, a menudo se superponen, formando quiasmas en forma de X (Fig. 4). Cuando se separan los cromosomas durante la meiosis, roturas cromosómicas pueden ocurrir en los lugares de cruce, lo que resulta en un cambio en el material genético¹⁸. La

frecuencia de recombinación entre dos loci HLA se relaciona con la distancia entre los loci. Por ejemplo, la recombinación entre los locus HLA-A y HLA-DP es frecuente, aunque son relativamente distantes dentro del complejo HLA.

Estudios familiares demuestran que la recombinación en esta región se puede dar en alrededor del 5 %, el conjunto completo de alelos se hereda como una unidad denominada haplotipo, siendo el conjunto de los dos haplotipos el genotipo del individuo; los antígenos del sistema HLA se heredan de manera codominante, por lo que siempre se expresan¹⁹.

Estudios a nivel de población han demostrado que ciertas combinaciones de alelos se heredan más frecuentemente de lo esperado debido al azar²⁰. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium), varía con la población y con la etnia²¹ y a veces incluso entre grupos de población de una misma etnia²².

1.3 HLA DP

El HLA-DP fue descubierto como un objetivo de la alorreactividad en las pruebas de linfocitos sensibilizados²³. La evidencia inicial para un papel de HLA-DPB1 en TPH no relacionado se informó desde mediados de la década de 1990²⁴. Experimentalmente, se ha confirmado la capacidad de una amplia gama de disparidad de alelos HLA-DPB1 que provocan respuestas policlonales de células T alorreactivas²⁵; de acuerdo con estas observaciones se ha demostrado que las diferencias de HLA-DPB1 están asociados con un mayor riesgo de EICH aguda aun presentando identidad HLA 8/8 en el TCH no relacionado²⁵.

La región en donde se encuentra el HLA DPB (Figura 5) es el extremo próximo al centrómero del brazo corto del cromosoma 6²⁶, por lo que es posible que pueda darse una recombinación en este punto, lo que podría dar paso a una variación en el haplotipo heredado de los padres²⁷, considerando esto es importante hacer la determinación del locus DPB1 para confirmar que todo el bloque del haplotipo se esté transmitiendo como una unidad^{18,28}, si este no es el caso habrá una ligera pero importante variación en la compatibilidad del paciente con el donante familiar^{26,27}.

Para llevar a cabo un TPH se tipifican las moléculas de la clase I, HLA A, B , C y II, DRB1²⁸; hay estudios que sugieren la adición del locus DPB1 debido a su importancia numérica^{22,29}, su ubicación dentro del cromosoma 6 y su mayor frecuencia de recombinación³⁰.

En estudios previos se ha encontrado que la probabilidad de que la EICH aguda grado III o IV se desarrolle en los receptores con alelos HLA idénticos en los loci DPA1 y DPB1 es de 19 % y 18 % (respectivamente)³¹

2. JUSTIFICACIÓN

Aunque se ha descrito un efecto negativo de la incompatibilidad del locus DPB1 en el TPH HLA-idéntico no relacionado, no se ha establecido la relevancia de la compatibilidad HLA DPB1 en el TPH haploidéntico relacionado.

3. HIPÓTESIS

En el TPH HLA-haploidéntico relacionado la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 se asocia a un retraso en el prendimiento del injerto.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 en el prendimiento del trasplante haploidéntico relacionado.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir los alelos de DPB1 más frecuentes en la población estudiada.
2. Identificar si en esta población predomina un antígeno HLA-DPB1 asociado a la velocidad de la reconstitución hematopoyética.
3. Evaluar el efecto de la incompatibilidad HLA DPB1 en el desarrollo y severidad de enfermedad injerto vs. huésped.

5. DESCRIPCIÓN

5.1 Diseño metodológico:

Estudio retrospectivo, descriptivo, observacional.

5.2 Población:

Pacientes que en el periodo de enero del 2009 a Octubre del 2017 acudieron al servicio de hematología del Hospital Universitario Dr. José E. González de la Facultad de Medicina de la UANL por el diagnóstico de una enfermedad maligna hematológica y que recibieron un trasplante haploidéntico de progenitores hematopoyéticos. La información necesaria se recabo de la base de datos electrónica del laboratorio del Servicio de Hematología y en algunos casos fue necesario tomarla del expediente clínico.

5.3 Tamaño de la muestra

Se incluyeron 91 muestras de pacientes con enfermedades hematológicas malignas que recibieron un trasplante haploidéntico en el Servicio de Hematología y cuyo ADN se encuentra almacenado a -70°C en el Laboratorio de Medicina Molecular del Servicio de Hematología.

5.4 Criterios de inclusión:

- Pacientes en los que el donador sea un familiar directo (Padre, Madre o Hermano)
 - Que donadores y receptores sean haploidénticos en los loci HLA A, B, y DRB1
- (3/6)

5.5. Criterios de exclusión

- Qué resulten no ser haploidénticos, es decir, que tengan al menos una diferencia alélica en dos loci, HLA A, B, o DRB1.

5.6 Criterios de eliminación

No aplica

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Metodología del estudio

A partir del ADN previamente extraído se procederá a hacer la tipificación de HLA³⁴.

El genotipo de HLA se determinará utilizando el ensayo LABType®SSO (One Lambda, Canoga Park, CA).

LABType™ SSO utiliza sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) unidas a unas microesferas marcadas de forma fluorescente para identificar los alelos codificados mediante el ADN de muestra.

LABType™ aplica la tecnología Luminex® (Luminex, Austin, TX) para el método de tipificación inversa de ADN de SSO. Primero, el ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de grupo. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE).

El producto de PCR se desnaturaliza y vuelve a hibridar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas cifradas de forma fluorescente. Un analizador de flujo, el LABScan™ 100 de Luminex®, identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas en la literatura especializada.

El protocolo para el genotipaje de HLA por LABType SSO es el siguiente:

6.2 Amplificación

1. Encender el termociclador para poner en funcionamiento la tapa térmica.
2. Ingresar al “Programa PCR LABType™” en el termociclador tal como se muestra a continuación.

Paso	Temperatura y Tiempo Incubación	Número de ciclos
Paso 1	96°C 03:00	1
Paso 2	96° C 00:20	5
	60° C 00:20	
	72° C 00:20	
Paso 3	96 ° C 00:10	30
	60° C 00:15	
	72° C 00:20	
Paso 4	72 ° C 10:00	1
Paso 5	4°C infinito	1

3. Confirmar todos los parámetros.
4. Descongelar el ADN, los cebadores de amplificación y la mezcla D-mix, Mantener en hielo hasta su uso.
5. Ajustar la concentración de ADN genómico en 20 ng/μl con agua estéril.
6. Agitar en el vórtex la D-mix y el cebador de amplificación durante 15 segundos; centrifugar durante 3 - 5 segundos.
7. Con la ayuda de la Tabla que se muestra a continuación, mezclar el volumen indicado de D-mix y cebadores.

Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

Reactivo	Volumen
D-Mix (μ l)	13.8 μ l
cebador	4 μ l
Taq Polimerasa	0.2 μ l
ADN	2 μ l (20 ng)

8. Agitar en el vórtex durante 15 segundos y colocar en hielo. Para pipetear de forma precisa la Taq polimerasa.
9. Añadir la Taq polimerasa inmediatamente antes del uso.
10. Pipetear 2 μ l de ADN (a 20 ng/ μ l) en el fondo de un tubo (para un volumen final de 20 μ l por reacción de PCR). Almacenar los tubos o la placa parcialmente cubierta para evitar la evaporación y la contaminación.
11. Añadir la cantidad adecuada de Taq polimerasa (por ejemplo, 0,2 μ l por 20 μ l de reacción) a la mezcla de amplificación preparada
12. Agitar en el vórtex durante unos segundos y centrifugar 3 - 5 segundos.
13. Tomar 18 μ l de mezcla de amplificación y añadir en cada pocillo que contenga ADN.
14. Tapar o cerrar, asegurarse de que esté fuertemente apretado contra el borde cada pocillo. Colocar una almohadilla para termociclador en la placa antes de cerrar la tapa.
15. Cerrar y apretar la tapa del termociclador.

16. Ejecutar el “Programa para PCR de LABType™ SSO”
17. Si el producto amplificado no se utiliza inmediatamente, almacenar la placa con ADN cubierta a temperaturas entre -80° y -20° C durante un mes como máximo.

6.3 Análisis de la prueba

1. Encender los equipos LABScan™ 100 y Platlaforma XY y seguir el procedimiento de puesta en marcha de instrucciones de uso. El LABScan™ 100 (necesita 30 minutos como mínimo para calentarse)
2. Encender el termociclador y ejecutar el programa a 60 °C continuo o equivalente durante 1,5 horas como mínimo (o mantenerlo por tiempo ilimitado). Tener a mano una almohadilla para PCR apropiada para el termociclador preparada para el uso. Esperar hasta que la tapa térmica del termociclador alcance la temperatura adecuada antes de utilizarlo. Utilizar el soporte de placa de 96 pocillos para PCR adecuado para garantizar la temperatura de incubación correcta.
3. Sacar todos los reactivos (excepto el frasco marrón con SAPE 100X) del almacenamiento y ponerlos a temperatura ambiente.

RX	Tampon de desnaturalizacion (µl)	Tampon de neutralización (µl)	Tampon de hibridación (µl)	Tampon de lavado (µl)	Mezcla de microesferas (µl)
1	2,5	5	34	480	4
10	25	50	340	4800	40

4. Asegurarse de preparar SAPE 1X durante el tercer paso de lavado. Extraer el frasco con SAPE 100X del almacenamiento sólo cuando sea necesario y devolverlo inmediatamente a una temperatura de 2° - 8 °C. Devolver cualquier parte no utilizada de la mezcla de perlas y el tampón con SAPE a una temperatura de 2° - 8 °C.

Rx	SAPE de reserva (µl)	Tampon con SAPE (µl)
1	0,5	49,5

Preparación de perlas LABType™

1. Hacer una rotación rápida de los tubos, 10-15 segundos a 100 RCF, (fuerza centrífuga relativa) inmediatamente después de descongelar.
2. Agitar los viales en vórtex a intensidad media durante 20 segundos, y luego hacer una rotación rápida nuevamente tal como se describe arriba.
3. Tomar el vial con las perlas stock, y lenta, pero completamente, pipetear hacia arriba y hacia abajo varias veces, utilizando una pipeta P1000 o su equivalente para mezclar la solución de perlas.
4. Utilizando la misma pipeta transferir con cuidado el volumen necesario de las perlas stock al vial perlas de trabajo.
5. Mezclar las perlas combinadas vigorosamente, agitando en vórtex el tubo con tapón 3 veces durante 10 segundos cada vez para obtener una mezcla homogénea de perlas. Utilizar inmediatamente.

6. Asegurarse de agitar en vórtex el vial de perlas a velocidad media durante al menos 20 segundos inmediatamente antes de utilizarlo.

Desnaturalización/Neutralización

1. Preparar un baño de hielo
2. Colocar una placa de 96 pocillos limpia en un soporte de placa.
3. Transferir 2,5 µl de tampón de desnaturalización en un pocillo de una placa de 96 pocillos limpia.
4. Añadir 5 µl de cada ADN amplificado.
5. Mezclar a conciencia (preferentemente pipeteando arriba y abajo) e incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 10 minutos.
6. Añadir 5 µl de tampón de neutralización con la pipeta y mezclar a conciencia (preferentemente pipeteando arriba y abajo). Observar el cambio de color de rosado brillante a amarillo pálido o transparente.
7. Colocar la placa de PCR con el producto de PCR neutralizado en el baño de hielo.

Hibridación

1. Combinar los volúmenes adecuados de mezcla de perlas y tampón de hibridación para preparar la mezcla de hibridación.
2. Añadir 38 µl de mezcla de hibridación a cada pocillo.
3. Cubrir la placa y agitar en el Vórtex a velocidad baja.
4. Extraer la placa del soporte y colocarla en el termociclador precalentado (60 °C).

5. Colocar la almohadilla para PCR sobre la placa o colocar tapones sobre los tubos para PCR.
6. Cerrar y apretar el tapón. Incubar durante 15 minutos.
7. Retirar la placa del Termociclador
8. Añadir rápidamente 100 μ l de tampón de lavado a cada pocillo.
9. Cubrir la placa.
10. Centrifugar la placa durante 5 minutos a 1000 - -1300 g.
11. Colocar la placa en el soporte y extraer el tampón de lavado.
12. Repetir el paso anterior dos veces más para completar tres pasos de lavado en total. Recordar preparar la solución de SAPE 1X durante la tercera centrifugación.

Etiquetado

1. Colocar la bandeja en el soporte. Añadir 50 μ l de solución de SAPE 1X a cada pocillo. Tapar la placa y agitar en el vórtex a velocidad baja. Colocar la placa en el termociclador precalentado (60 °C). Colocar la almohadilla para PCR sobre la placa o colocar tapones sobre los tubos para PCR.
2. Cerrar y apretar. Incubar durante 5 minutos.
3. Extraer la placa. Colocarla en el soporte.
4. Quitar la tapa y añadir rápidamente 100 μ l de tampón de lavado a cada pocillo.
5. Cubrir la placa y centrifugarla durante 5 minutos a 1000 - 1300 g. Colocar la placa en el soporte y extraer el sobrenadante.

6. Añadir 70 μ l de tampón de lavado a cada pocillo. Mezclar pipeteando con cuidado. Transferir a la placa de lectura con una pipeta de 8 o 12 canales. Evitar la contaminación entre muestras utilizando puntas de pipeta nuevas.
7. Cubrir la placa.
8. Mantener la bandeja en la oscuridad a 4 °C hasta que se coloque en LABScan™ 100 para su lectura.
9. Para obtener los mejores resultados, leer las muestras tan pronto como sea posible. El almacenamiento prolongado de muestras (más de 4 horas) puede provocar una pérdida de señal.
10. Almacenar las muestras a 4 °C en la oscuridad con una película de aluminio si no se pueden leer inmediatamente. Asegurarse de mezclar las muestras a conciencia inmediatamente antes de su lectura.

6.4 Adquisición de datos

1. Encender el sistema y configurar el equipo LABScan™ 100 para la adquisición de muestras y calibración de acuerdo con el manual del usuario de Luminex.
2. Seleccionar una plantilla/protocolo de acuerdo con el ID del catálogo y el número de lote del producto.
3. Se dispone de plantillas/protocolos de adquisición de One Lambda en un CD o las mismas pueden descargarse por medio del sitio web de One Lambda.
4. Crear un nombre de archivo para las muestras que se analizarán.
5. Asegurarse de que la configuración de la plantilla/protocolo sea correcta.
6. Introducir los ID de las muestras.
7. La placa está lista para el análisis.

8. Cargar la placa en la plataforma XY y llenar el depósito con buffer de lavado.
9. Pulsar el botón START para iniciar la sesión. Después de haber procesado las muestras, los datos obtenidos deben guardarse en un archivo de tipo .csv.
10. Lavar el analizador dos veces con buffer de lavado al final de la sesión.

Una vez obtenidos los datos se importan al software HLA Fusion™ (one Lambda) en donde se hace el análisis y la interpretación para la tipificación del HLA (figura 6)

7. Valores de Referencia para considerar la aceptación o rechazo del trasplante

La cuenta absoluta de neutrófilos debía ser igual o mayor a 500/ μ l por dos días consecutivos y la cuenta de plaquetas debía ser igual o mayor a 20,00/ μ l por dos días consecutivos y por lo menos 7 días después de la última transfusión plaquetaria.

El porcentaje de quimerismo se determinó usando un análisis de STR (Short Tandem Repeat), en los casos que el paciente y el donador fueron de diferente sexo se llevó a cabo una Hibridación Fluorescente In Situ (FISH), en donde se comparan los cromosomas X y Y.

El quimerismo completo fue definido como resultado en donde por lo menos el 95 % de las células del donador estaban presentes, el quimerismo mixto se consideró con 5 o más por ciento de células del receptor encontradas. La determinación de quimerismo fue hecha a los 30 y 100 días posteriores al TPH

8. RESULTADOS

Se analizaron 91 pacientes con sus respectivos donadores, provenientes de la consulta del Servicio de Hematología del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL en el periodo de enero 2009 a octubre de 2017; Se tipificaron 182 muestras para HLA DPB1 obteniendo los siguientes resultados:

Un total de 34 diferentes alelos DPB1, de los cuales se muestra la distribución de alelos, así como sus frecuencias en la tabla No 1

El alelo DPB1* 04:01 (n121) es el más frecuente (33%), seguido del alelo DPB1* 04:02

En la tabla No 2 se detallan 4 muestreos realizados en México (que incluyen el locus DPB1* 04:01) y de los cuales se han obtenido los siguientes resultados.³⁵

En la tabla No 3 se muestran las frecuencias DPB1* 04:02 llevada a cabo en estudios hechos en México, este alelo corresponde al segundo en importancia dentro de los que se encontraron en este trabajo.

Una vez obtenida la tipificación HLA DPB1 de los pacientes, estos se dividieron en base al grado de identidad de este locus entre la pareja Receptor-Donador, quedando así una clasificación de tres grupos

HLA DPB1			
	Idénticos en ambos alelos	Haploidénticos (uno de los alelos compartidos)	Diferentes (no comparten ninguno de los alelos)

Se obtuvieron 24 pacientes idénticos, 60 haploidénticos y 7 de ellos no compartían ningún alelo HLA DPB1.

Características principales de pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico relacionado entre 2009 y 2017

La edad de los pacientes fue desde 0 hasta 64 años, la cual se dividió en dos grupos (pediátricos, menores a 16 años y adultos, mayores de 16), el género fue de 60% masculino y 40% femenino. Tabla 4

En la tabla No 5 se muestran los diagnósticos más frecuentes encontrados en los pacientes del estudio

La Distribución por sexo Donador-Receptor así como la compatibilidad ABO se detallan en las tablas 6 y 7 respectivamente.

La recuperación hematopoyética observada, se detalla en la tabla No 8

Hubo complicaciones post-trasplante, las cuales se describen en la tabla No 9

Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

La Sobrevida general de los pacientes se muestra en la tabla No 10, tomando como intervalos 6, 12 y 24 meses.

La mediana de sobrevida general para DPB1 haploidéntico fue de 19 meses.

Para el grupo de DPB1 idéntico no fue alcanzada

En el grupo que no comparten alelo solo son 7 pacientes y 2 presentaron defunción, quizá eso explica el por qué la sobrevida fue más alta; esta sobreestimada. (Figura 7: Sobrevida general expresada en meses)

En la Figura 8 se muestra la Tasa de mortalidad relacionada al trasplante (TMR) expresada en meses.

Incidencia acumulada de recaída Figura 9

Regresión de Cox, incidencia acumulada de recaída y mortalidad relacionada al trasplante (MRT) se detallan en la tabla No 11

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de los alelos de DPB1 más frecuentes.

Los datos se analizaron utilizando IBM SPSS Statistics para Windows v. 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

Las variables continuas se describieron como medias, medianas y rangos.

Las características demográficas y clínicas se compararon entre los grupos de trasplante haploidéntico con diferencias de 0-DPB1 y 1-DPB1 utilizando la prueba de X² para las variables categóricas.

Para el cálculo de las diferencias entre variables y para comparar datos, se usaron las pruebas de Wilcoxon, Mann-Whitney y t de Student.

La supervivencia global (SG) se midió desde el momento del trasplante hasta el momento de la muerte o la última visita.

El método de Kaplan-Meier (KM) se empleó para estimar la supervivencia general (OS) y se comparó utilizando la prueba de log-rank.

La incidencia acumulada de recaída se midió desde el momento del trasplante hasta el momento de la recaída.

Incidencia acumulada de mortalidad relacionada con el trasplante fue medida desde el momento del trasplante a la fecha de muerte.

Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

El modelo de regresión de riesgo proporcional de Cox con un intervalo de confianza (IC) del 95% se utilizó para examinar la asociación entre las diferentes variables y su efecto sobre la TRM del sistema operativo y la recaída.

Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

10. DISCUSIÓN

El motivo del estudio tipificación de HLA DPB1 en pacientes con TPH Haploidenticos relacionados fue porque hay estudios en donde se demuestra que con discrepancia entre la pareja Donador-Receptor en este locus existen variaciones significativas en los resultados de prendimiento en el trasplante; es de suma importancia mencionar que estos resultados se han obtenido exclusivamente de trasplantes Haploidenticos “no relacionados” es por esa misma razón que adquiere relevancia este estudio.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas conocido comúnmente como trasplante de médula ósea, es una estrategia terapéutica indicada para algunas patologías hematooncológicas, congénitas y autoinmunes.

En el trasplante alogénico los progenitores hematopoyéticos trasplantados proceden de otro individuo (donante), es un procedimiento en donde la médula ósea enferma del paciente es reemplazada por una médula ósea sana, normalmente de un hermano que comparta los mismos antígenos de trasplante (HLA idéntico), o procedente de donantes alternativos (no relacionado, sangre de cordón umbilical no relacionado).

El fundamento del trasplante alogénico en patologías benignas es reemplazar la médula ósea del paciente por una sana, ya sea por ser ésta insuficiente como en el caso de los síndromes de fallo medular (aplasia medular, etc.) o defectuosa como en el caso de la

enfermedad falciforme. En las neoplasias hematológicas el beneficio obtenido esta mediado por el nuevo sistema inmune del donante para combatir la enfermedad neoplásica; en el caso de las leucemias, este efecto que se llama efecto injerto versus leucemia o injerto versus tumor en el caso de los linfomas cuando el trasplante autólogo no ha sido suficiente.

El trasplante haploidéntico es una opción de tratamiento cuando el paciente requiere un trasplante alogénico de urgencia y no cuenta con un hermano HLA idéntico (donante ideal) y que no da espera de búsqueda de un donante no relacionado la cual muchas veces es prolongada es infructuosa.

Trasplante haploidéntico, “una modalidad de TPH que se realiza cada vez con más frecuencia y que presenta buenos resultados a corto y medio plazo”. En este tipo de trasplante, el donante es compatible con el receptor solo en un 50 por ciento, por lo que constituye una alternativa que tener en cuenta para aquellos pacientes que carecen de un donante emparentado o no emparentado, con una compatibilidad aceptable, o que necesitan recibir el trasplante de forma urgente.

Los resultados de la tipificación HLA DPB1 obtenidos en el presente trabajo muestran la variación genética dependiendo de la región geográfica en donde se lleve a cabo la misma, sea a nivel internacional, e incluso nacional, ya que los alelos obtenidos por nuestro análisis difieren a los reportados en otros trabajos hechos dentro del territorio mexicano, considerando que los pocos que hay están hechos principalmente en la zona centro y sureste del país y en grupos étnicos muy específicos; nuestros resultados son mas comparables a estudios hechos en poblaciones principalmente europeas y en

especifico españolas en donde el porcentaje de nuestro principal alelo obtenido (DPB1* 04:01) es prácticamente igual, alcanzando el 34 %, seguido del alelo DPB1* 04:02 que esta mas presente en poblaciones de América del sur, por ejemplo Colombia en el que se presenta en hasta 89% de los casos, el siguiente alelo que se encontró en este estudio es el DPB1* 04:02 y representa un porcentaje muy alto en los estudios hechos en México (hasta 90%) con lo cual podemos confirmar la evidente mezcla de razas española y etnias mexicanas.

Los resultados obtenidos también arrojaron un dato muy importante, ya que al hacer la tipificación de HLA DPB1 encontramos que de 91 pacientes con su respectivo donador, en 24 de ellos, no había diferencia alelica (ambos alelos DPB1 fueron iguales), esto se puede explicar solo considerando un alto grado de homocigocidad dentro de los individuos, en nuestro caso el alelo DPB1* 04:01.

De los 91 pacientes HLA haploidénticos (en los locus HLA A, B y DRB1) al hacer la ampliación de la tipificación, incluyendo el locus DPB1 tuvimos que solo 60 de ellos continuaban siendo haploidénticos, con lo que confirmamos que si se extiende el estudio del HLA incluyendo el locus DPB1, seria mas difícil encontrar un donador haploidéntico, sin embargo en 24 de los casos donador y receptor (26%), estos son idénticos en el par de alelos DPB1, lo cual si en pacientes futuros se continuara presentando la misma tendencia sería bueno ya que esto podría llevar a un menor índice de rechazo (por el hecho de presentar el mismo par de alelos).

En 7 casos la pareja receptor/donador no compartieron ninguno de los alelos, este punto es muy importante señalarlo ya que nos da un % de recombinación cercano al 8,

porcentaje que esta por arriba del promedio reportado en el análisis de los locus clásicos, con lo cual podemos comprobar que esta región, en específico el locus DPB1, si presenta un grado mayor de recombinación, uno de los motivos que nos llevo a considerar el análisis de este trabajo.

Existen numerosos artículos en donde se reporta la importancia de la identificación del locus DPB1 TPH, pero todos están hechos en pacientes haploidénticos no relacionados, en nuestro caso podremos decir que en pacientes haploidénticos “relacionados”, considerando que se tiene que incrementar el costo de los estudios previos al trasplante por el hecho de ampliar la tipificación en un locus mas, y viendo que después de los resultados obtenidos en este trabajo no se obtuvieron mejorías significativas en el paciente, afirmamos que se puede prescindir de la tipificación del locus ya que no sería de mucha ayuda en el TPH haploidéntico relacionado, ya que el costo beneficio no es significativo.

En lo que a la parte clínica se refiere podemos resaltar que no se tuvo una diferencia significativa en los parámetros de sobrevida, recaída y mortalidad relacionada al trasplante.

11.-CONCLUSIONES

- En nuestro estudio se encontraron 34 alelos HLA DPB1 diferentes.
- El alelo HLA DPB1 más frecuente fue el DPB1* 04:01 (con 33.2%), seguido del DPB1* 04:02. (27.5 %)
- Encontramos 5 estudios más hechos en México en donde se incluyó la tipificación del locus DPB y el alelo 04:02 fue el más frecuente con una tasa de hasta el 90%
- Los estudios que se han hecho en México son efectuados en grupos étnicos muy cerrados y con un número de muestras muy reducido.
- En 26% de los casos hubo homocigocidad para el alelo estudiado.
- Siete (7.6 %) pares donador/receptor no compartieron alelos HLA DPB1
- No se pudo Identificar si predomina un antígeno HLA-DPB1 asociado a la reconstitución hematopoyética.
- No hubo asociación de las variables analizadas con la TRM, SG o EICH aguda.
- No se encontró un efecto de la incompatibilidad HLA DPB1 en el desarrollo y severidad de enfermedad injerto vs. huésped.
- El alelo DPB1 no se asoció a la velocidad de la reconstitución hematopoyética.
- Podemos decir que en pacientes haploidénticos “relacionados “ no influye la identidad o disparidad del locus DPB1 para un TPH

Figuras

Figura 1. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6. Los genes del complejo principal de histocompatibilidad se catalogan en tres clases denominadas HLA de clase I, II y III.

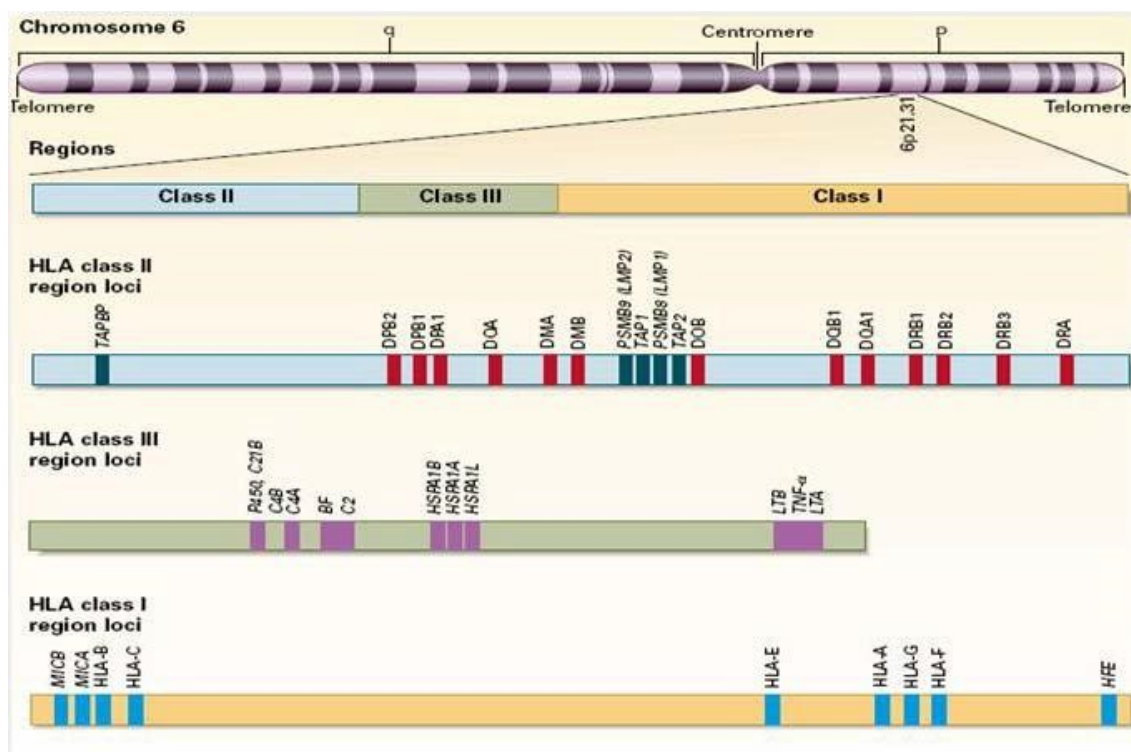


Figura 2. Productos de los genes del MHC. Muchos de los productos de los genes del MHC son ligandos, receptores, proteínas de interacción, factores de señalización y transcripción.

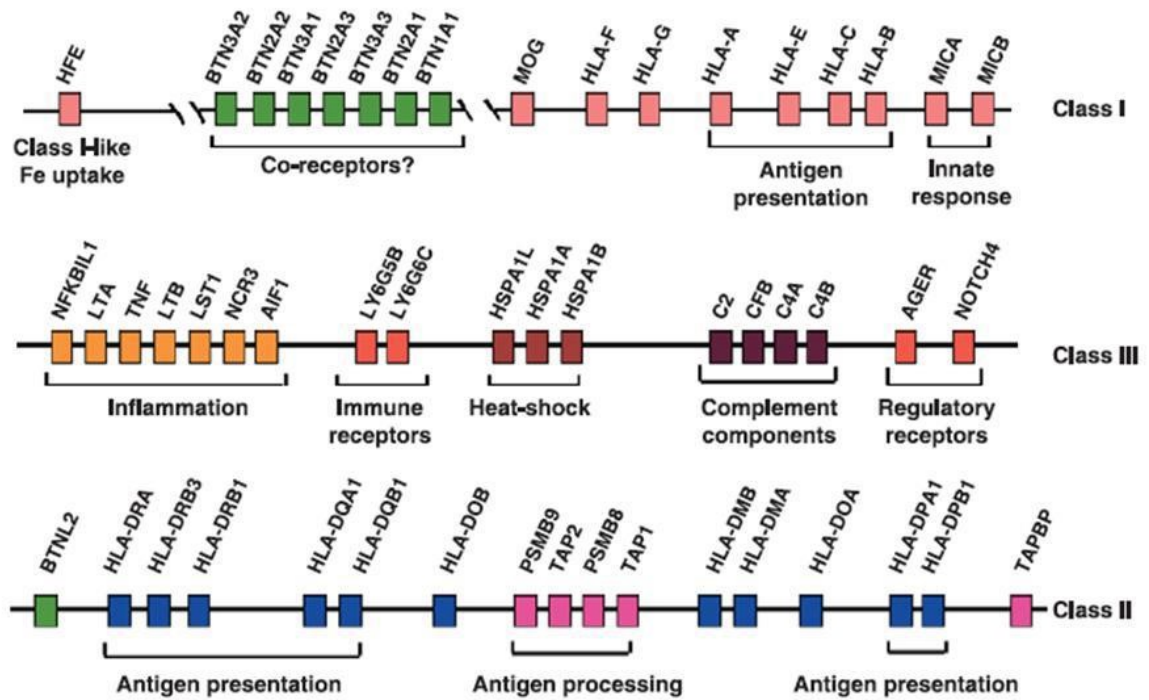


Figura 3 Nomenclatura actual del HLA

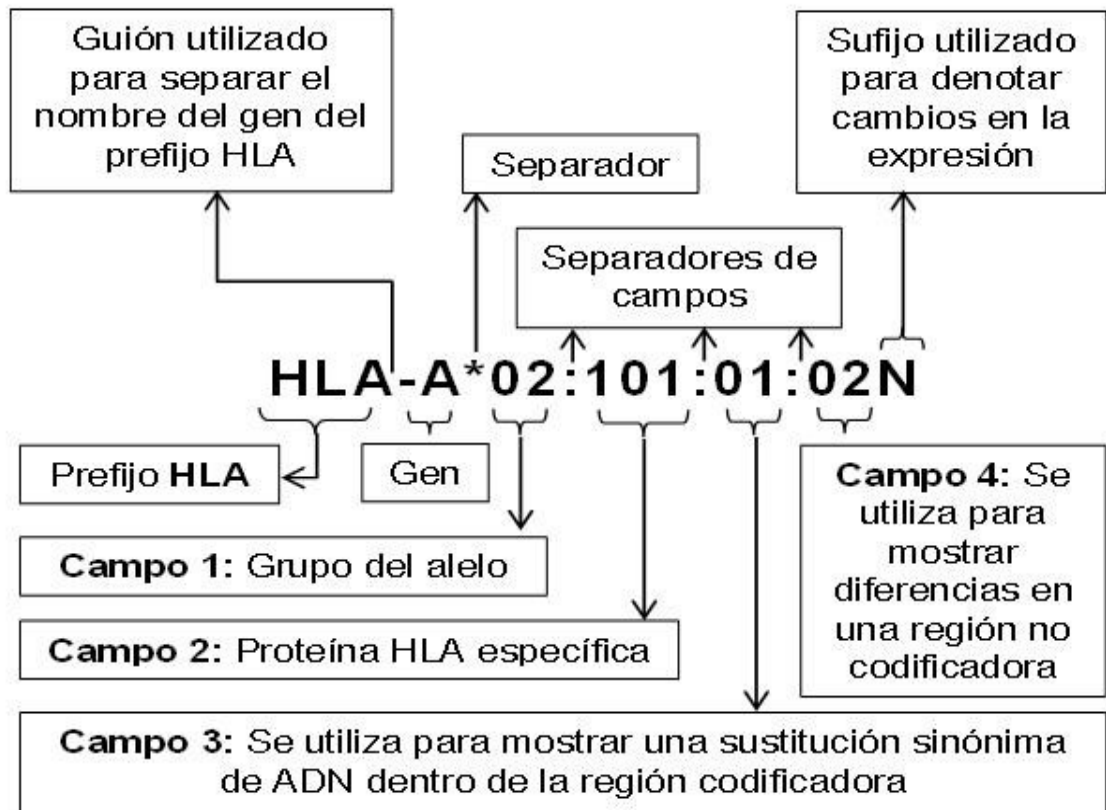
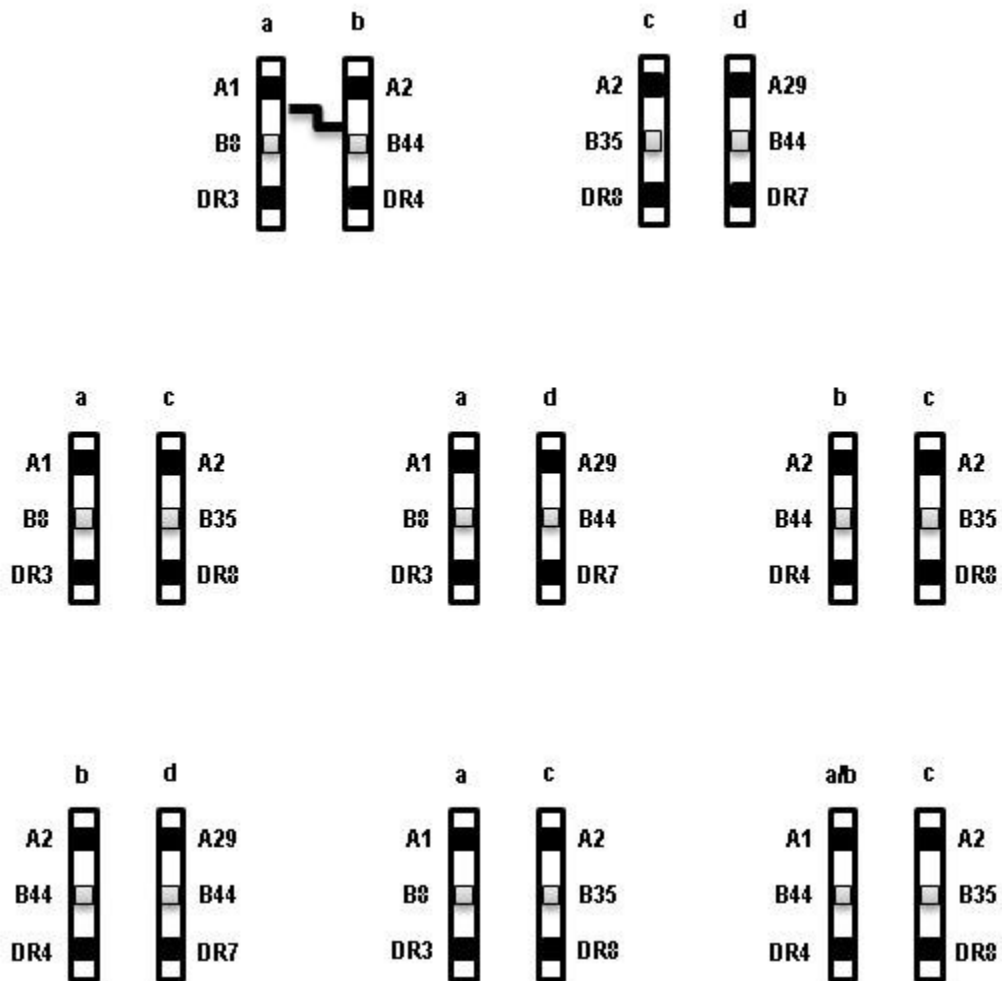


Figura 4. Herencia de los haplotipos HLA. El diagrama muestran la recombinación del haplotipo a/b de un evento de recombinación ocurrido entre el cromosoma 6 de los padres durante la meiosis.



Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

Figura 5. Ubicación cromosómica de los Antígenos Leucocitarios de Histocompatibilidad (HLA).

Los genes de clase II, los de clase III y los de clase I en dirección del centrómero (Cen) al telómero (Tel).

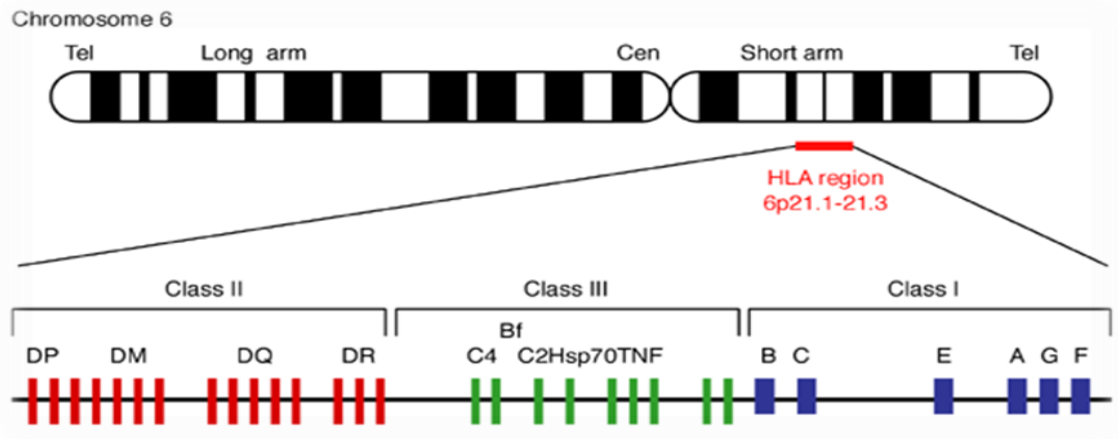


Figura 6: Análisis y asignación HLA en software *HLA Fusion*

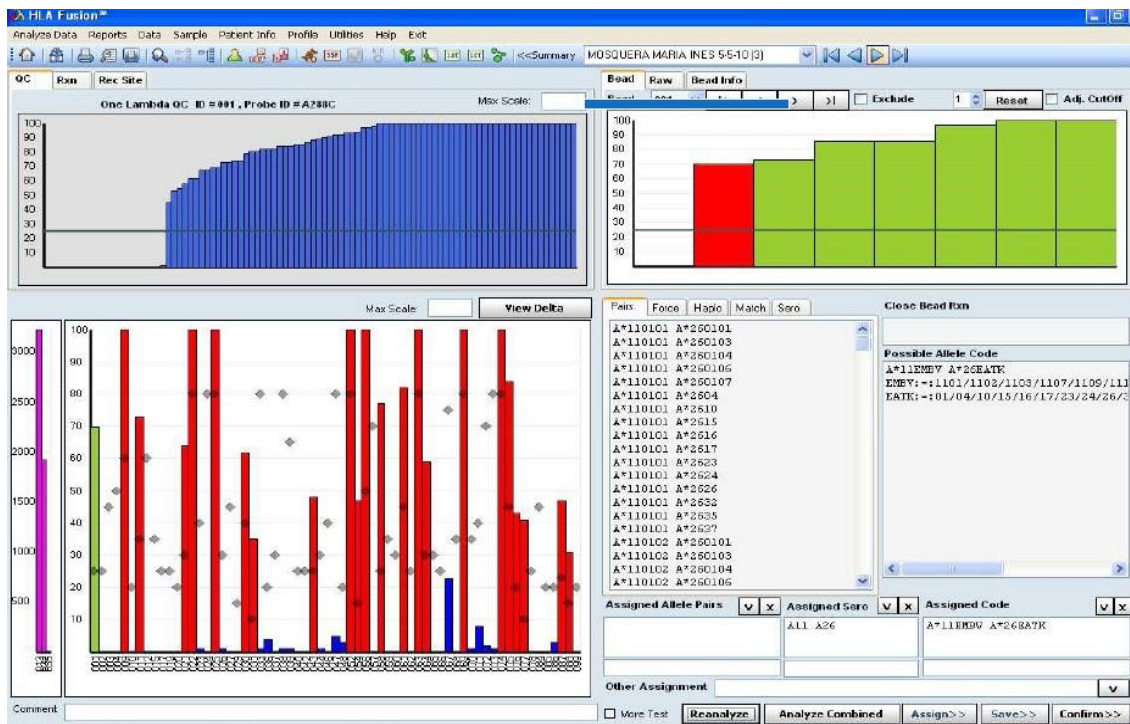


Figura 7: Sobrevida general expresada en meses

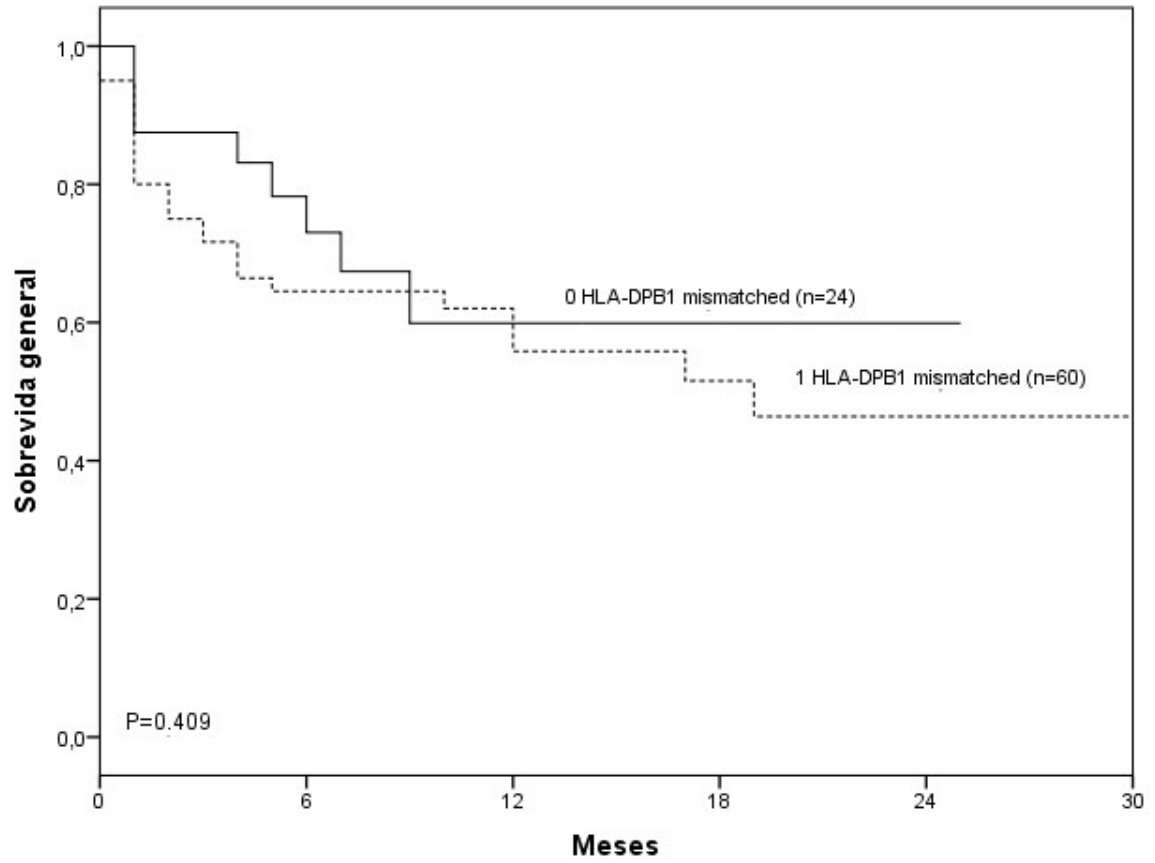
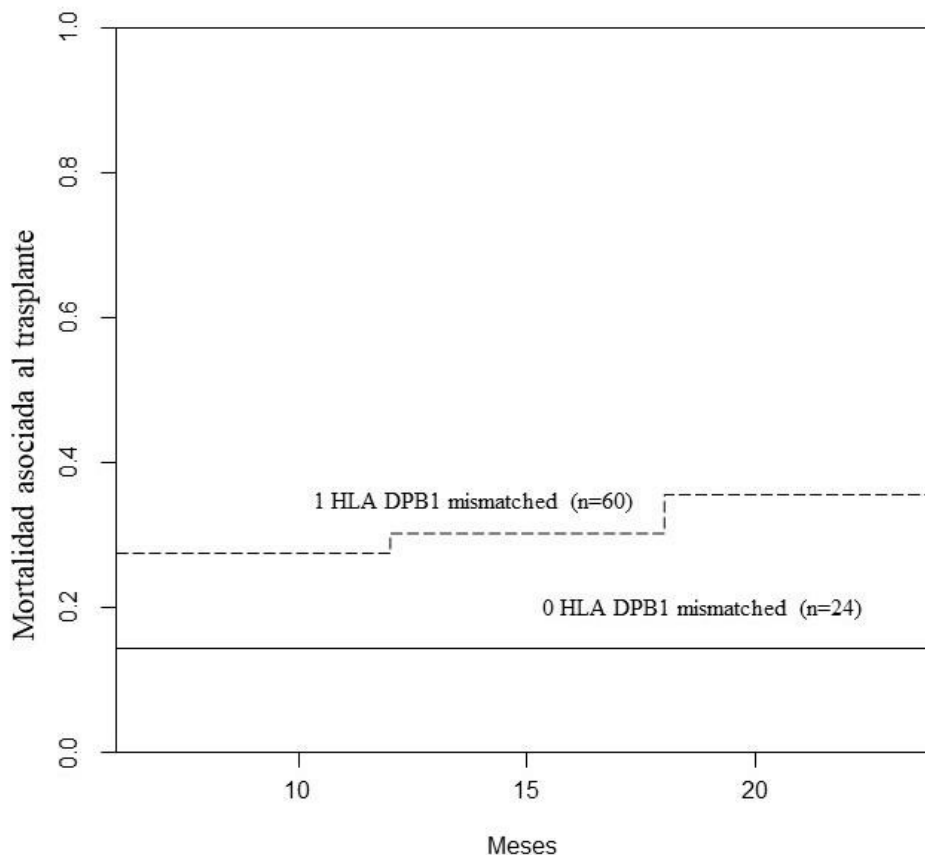


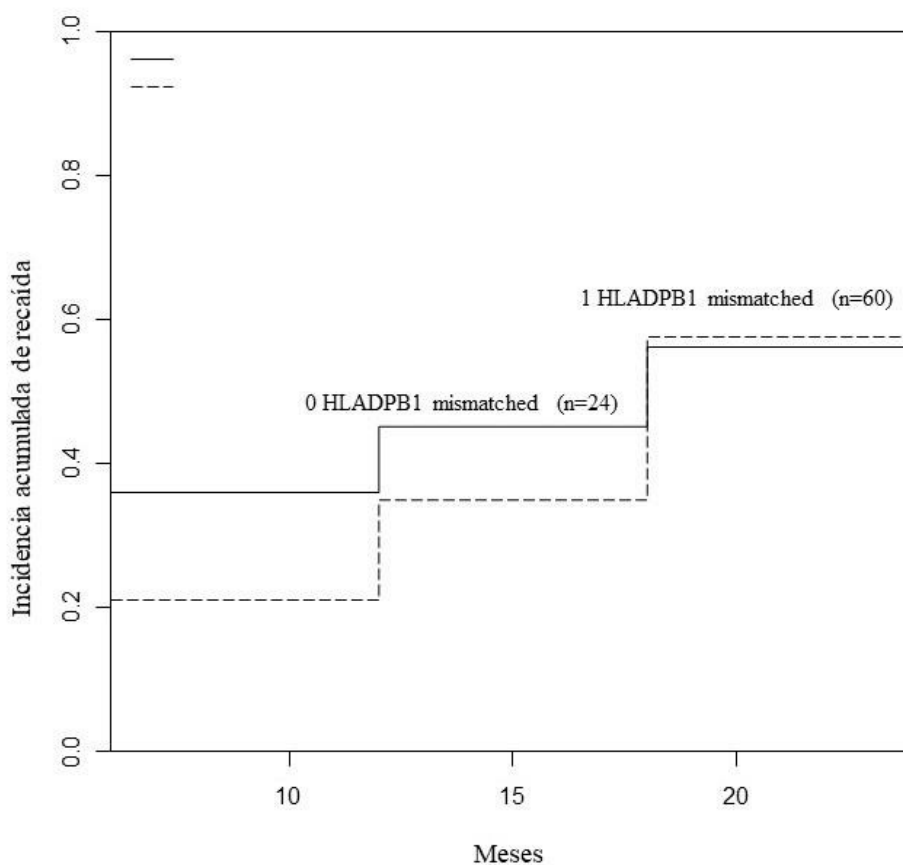
Figura 8. Tasa de mortalidad relacionada al trasplante expresada en meses



Mortalidad Relacionada al trasplante

	0 DPB1 diferente (n=24)	1 DPB1 diferente (n=60)	P
MRT			
6 meses	14 ± 8.1%	27 ± 5.9%	0.111
12 meses	14 ± 8.1%	30 ± 6.4%	
24 meses	14 ± 8.1%	36 ± 8.0%	

Figura 9 Incidencia de recaída



	<i>0 DPB1 mismatch (n=24)</i>	<i>1 DPB1 mismatch (n=60)</i>	<i>P -value</i>
Recaída			
6 meses	36 ± 11%	21 ± 6.0%	0.750
12 meses	45 ± 13%	35 ± 7.6%	
24 meses	56 ± 15%	58 ± 10%	

Tablas

Tabla 1. Frecuencia de alelos HLA-DPB1 en la población estudiada.

Alelo	Numero	Porcentaje
01:01	6	1.64
02:01	21	5.8
02:02	2	0.5
03:01	23	6.3
04:01	121	33.2
04:02	100	27.5
05:01	15	4.1
10:01	3	0.8
11:01	2	0.5
13:01	4	1.1
14:01	6	1.6
15:01	2	0.5
17:01	5	1.4
18:01	1	0.3
22:01	2	0.5
29:01	1	0.3
33:01	1	0.3
57:01	3	0.8
59:01	1	0.3
65:01	6	1.6
70:01	8	2.2
94:01	2	0.5
105:01	7	1.9
126:01	4	1.1
131:01	2	0.5
134:01	1	0.3
155:01	2	0.5
173:01	1	0.3
214:01	1	0.3
410:01	1	0.3
424:01	6	1.6
430:01	1	0.3
463:01	1	0.3
621:01	2	0.5
Total	364	100

Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

Tabla No2 Hla DPB1* 04:01 Oaxaca Zapotecos JA Hollenbach Human Immunology,2001,62,378

Alelo	Población	Frecuencia	Muestras
DPB1*04:01	Chihuahua Tarahumara	0.216	44
DPB1*04:01	Oaxaca Zapoteca	0.128	90
DPB1*04:01	Oaxaca Mixe	0.028	55
DPB1*04:01	Oaxaca Mixteca	0.019	103

Tabla No 3. Frecuencia del lelo DPB1* 04:02 reportado en 4 estudios hechos en México

Alelo	Población	Frecuencia	Muestras
DPB1*04:02	Oaxaca Mixe	0.907	55
DPB1*04:02	Oaxaca Mixteca	0.757	103
DPB1*04:02	Maya	0.733	16
DPB1*04:02	Oaxaca Zapoteca	0.711	90
DPB1*04:02	Chihuahua Tarahumara	0.636	44

Tabla No 4 Edad y sexo de los pacientes involucrados en el estudio.

	<i>Haploidéntico</i> (n=91)	<i>DPB1 0 mismatch</i> (n=24)	<i>DPB1 1 mismatch</i> (n=60)	<i>DPB1 2 mismatches</i> (n=7)
Edad, mediana (rango)	18 (0-64)	16 (2-52)	18.5 (0-64)	19 (3-48)
< 16 años (%)	36(39.6)	12 (50)	21 (35)	3 (42.9)
> 16 años (%)	55 (60.4)	12(50)	39 (65)	4 (57.1)
Género (%)				
Masculino	55(60.4)	14 (58.3)	35 (58.3)	6 (85.7)
Femenino	36 (39.6)	10 (41.7)	25 (41.7)	1(14.3)

Tabla No 5 Diagnósticos de pacientes incluidos en el estudio

Diagnóstico (%)	<i>Haploidéntico</i> (n=91)	<i>DPB1 0 mismatch</i> (n=24)	<i>DPB1 1 mismatch</i> (n=60)	<i>DPB1 2 mismatches</i> (n=7)
LLA	42 (46.2)	13(54.2)	24 (40)	5 (71.4)
LMA	16 (17.6)	4(16.7)	11 (18.3)	1 (14.3)
AA	6 (6.6)	2(8.3)	4 (6.7)	0 (0)
LNH	6(6.6)	1(4.2)	5 (8.3)	0 (0)
EH	6(6.6)	0 (0)	6 (10)	0 (0)

Tabla No 6. Muestra La Distribución por sexo Donador-Receptor

Sexo Donador/Receptor	<i>Haploidéntico</i> (n=91)	<i>DPB1 0 mismatch</i> (n=24)	<i>DPB1 1 mismatch</i> (n=60)	<i>DPB1 2 mismatch</i> (n=7)
Masculino/masculino	25 (27.5)	6 (25)	15 (25)	4 (57.1)
Masculino/femenino	13 (14.3)	4 (16.7)	8 (13.3)	1 (14.3)
Femenino/masculino	31 (34.1)	8 (33.3)	21 (35)	2 (28.6)
Femenino/femenino	22(24.2)	6 (25)	16 (26.7)	0 (0)

Tabla No 7 Compatibilidad ABO, entre la pareja Receptor /Donador

Compatibilidad ABO Donador-Receptor	<i>Haploidéntico</i> (n=91)	<i>DPB1 0 mismatch</i> (n=24)	<i>DPB1 1 mismatch</i> (n=60)	<i>DPB1 2 mismatch</i> (n=7)
Compatible	71 (78)	20(83.3)	45 (75)	6 (85.7)
Incompatibilidad Menor	11 (12.1)	2 (8.3)	8 (13.3)	1 (14.3)
Incompatibilidad Mayor	9 (9.9)	2(8.3)	7 (11.7)	0 (0)

Tabla No 8 Recuperación hematopoyética

Días del Injerto (mediana, rango)	<i>DPB1 0 mismatch (n=24)</i>	<i>DPB1 1 mismatch (n=60)</i>	<i>DPB1 2 mismatch (n=7)</i>
Mieloide	16 (10-56)	16 (11-43)	16.5 (14-24)
Plaquetas	17 (10-56)	17 (9-30)	18.5 (12-24)
Quimerismo (%) 30 días			
Completo	13 (54.2)	37 (61.7)	3 (42.9)
Parcial	5 (20.8)	5 (8.3)	2 (28.6)
No disponible	6 (25)	18 (30)	2 (28.6)
Quimerismo (%) 100 Días			
Completo	8 (33.3)	25 (41.7)	4 (57.1)
Parcial	4 (16.7)	3 (5)	1 (14.3)
No disponible	12 (50)	32 (53.3)	2 (28.6)

Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

Tabla No 9 Complicaciones post-trasplante

	<i>0 DPB1 mismatched (n=24)</i>	<i>1 DPB1 mismatched (n=60)</i>	<i>2 DPB1 mismatched (n=7)</i>
Complicaciones posteriores TPH (%)			
Fiebre y neutropenia	15 (62.5)	47 (78.3)	5 (71.4)
Infecciones (Cualquier tipo)	15 (62.5)	40 (66.7)	4 (57.1)
Transfusiones	16 (66.7)	42 (70)	6 (85.7)
Mucositis (I-IV)	6 (25)	12 (20)	2 (28.6)
CMV PCR (+)	5 (20.8)	7 (11.7)	2 (28.6)
GVHD Aguda	7 (29.2)	21 (35)	4 (57.1)
Grado I	2 (8.3)	9 (15)	2 (28.6)
Grado II	4 (16.7)	8 (13.3)	2 (28.6)
Grado III	1 (4.2)	5 (8.3)	0 (0)
Grado IV	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)
GVHD Crónica	5 (20.8)	14 (23.3)	2 (28.6)
Recaída	9 (37.5)	20 (33.3)	4 (57.1)
Falla de Injerto	7 (29.2)	9 (15)	2 (28.6)
Muerte	8 (33.3)	26 (43.3)	2 (28.6)

Efecto de la incompatibilidad en el locus HLA DPB1 del sistema HLA en el prendimiento del trasplante hematopoyético haploidéntico relacionado

Tabla No 10 Muestra la Sobrevida general (6, 12 y 24 meses)

Sobrevida Promedio	0 DPB1 mismatch (n=24)	1 DPB1 mismatch (n=60)	2 DPB1 mismatched (n=7)
6 meses	73.0 ±9.5 %	64.5 (63.27 - 65.70)	83.3 ±15%
12 meses	59.9 ±11.6 %	55.8 (54.37 - 57.19)	55.6 ± 24.8%
24 meses	59.9 ±11.6 %	46.4 (44.70- 48.07)	55.6 ± 24.8%

Regresion de Cox

	MRT				Recaida			
	Univariado		Multivariado		Univariado		Multivariado	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P value
Sexo								
Femenino	1		1		1		1	
Masculino	1.58 (0.65 - 3.81)	0.310	1.44 (0.57 - 3.67)	0.440	0.52 (0.25 - 1.08)	0.080	0.47 (0.20 - 1.14)	0.095
Edad	1.01(0.98 - 1.04)	0.470	1.00 (0.97 - 1.04)	0.620	0.99 (0.97 - 1.02)	0.550	1.00 (0.97 - 1.03)	0.770
Diferencias HLA DPB1								
0 alelos	1		1		1		1	
1 alelo	2.53 (0.77 - 8.26)	0.120	2.80 (0.82 - 9.58)	0.100	0.88 (0.41 - 1.87)	0.740	0.85 (0.38 - 1.90)	0.700
DosisCD34+	0.99 (0.97 - 1.01)	0.450	0.99(0.97 - 1.01)	0.450	0.99 (0.97 - 1.01)	0.480	0.99 (0.97 - 1.02)	0.670
Infecciones								
Si	0.72 (0.30 - 1.68)	0.450	0.73 (0.31 - 1.73)	0.480	0.96 (0.44 - 2.11)	0.930	1.00(0.41 - 2.40)	0.990
No	1		1		1		1	
Transfusiones								
Si	1.61 (0.63 - 4.12)	0.320	1.37 (0.53 - 3.54)	0.510	1.30 (0.60 - 2.78)	0.500	1.34 (0.58 - 3.11)	0.490
No	1		1		1		1	
Fiebre y neutropenia								
Si	1.09 (0.41 - 2.86)	0.870	0.84 (0.30 - 2.32)	0.740	0.80 (0.36 - 1.78)	0.590	0.71 (0.27 - 1.84)	0.490
No	1		1		1		1	

Bibliografía

1. Zamora-Ortiz G, Velázquez- Sánchez-De-Cima S, Hernández-Reyes Vargas-Espinosa J, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ. Veinte años de experiencia con trasplantes de células hematopoyéticas en la Clínica Ruiz de Puebla, México. *Rev Hematol Mex* 2013;14:63-70.
2. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257 :491-496.
3. Henig, I., & Zuckerman, T. (2014). Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 5(4), e0028. <http://doi.org/10.5041/RMMJ.10162>
4. Copelan, E. A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, 354(17), 1813-1826.
5. Passweg, J. R., Baldomero, H., Peters, C., Gaspar, H. B., Cesaro, S., Dreger, P., ... & Halter, J. (2014). Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone marrow transplantation*, 49(6), 744-750.
6. Symons, H. J., & Fuchs, E. J. (2008). Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. *Bone marrow transplantation*, 42(6), 365-377.

7. Sasazuki, T., Juji, T., Morishima, Y., Kinukawa, N., Kashiwabara, H., Inoko, H., & Kodera, Y. (1998). Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *New England Journal of Medicine*, 339 (17), 1177-1185
8. Atkinson, K., Norrie, S., Chan, P., Downs, K., & Biggs, J. (1985). Lack of correlation between nucleated bone marrow cell dose, marrow CFU-GM dose or marrow CFU-E dose and the rate of HLA-identical sibling marrow engraftment. *British journal of haematology*, 60 (2), 245-251.
9. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2009). The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics*, 54 (1), 15-39.
10. Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K., & Wain, H. M. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*, 5(12), 889-899.
11. Shiina, T., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2004). An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *HLA*, 64(6), 631-649.
12. Satta, Y., Li, Y. J., & Takahata, N. (1998). The neutral theory and natural selection in the HLA region. *Front. Biosci*, 3, 459-467.
13. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE IPD - the Immuno Polymorphism Database Nucleic Acids Research (2013) 41:DI234-40
14. Otegbeye F. (2017). Understanding population-wide haplotype frequencies of human leukocyte antigen (HLA) alleles in linkage disequilibrium is important for

- hematopoietic stem cell transplantation. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 39(3), 187-188.
15. <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (HLA Nomenclature, 2010).
 16. Alter I, Gragert L., Fingerson, S., Maiers, M., & Louzoun, Y. (2017). HLA class I haplotype diversity is consistent with selection for frequent existing haplotypes. *PLOS Computational Biology*, 13(8), e1005693.
 17. Shaw, B. E., Mayor, N. P., Russell, N. H., Apperley, J. F., Clark, R. E., Cornish, J., ... & Mackinnon, S. (2010). Diverging effects of HLA–DPB1 matching status on outcome following unrelated donor transplantation depending on disease stage and the degree of matching for other HLA alleles. *Leukemia*, 24(1), 58-65.
 18. Meyer, C. G., May, J., & Schnittger, L. (1997). HLA-DP—part of the concert. *Immunology today*, 18(2), 58-61.
 19. Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., ... & Reisner, Y. (1998). Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell–depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New England Journal of Medicine*, 339(17), 1186-1193.
 20. Gaschet, J., Gallot, G., Ibsch, C., Lim, A., Even, J., Vivien, R., ... & Vié, H. (1998). Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1* 1001 mismatch: involvement of different TCRBV subsets. *Bone marrow transplantation*, 22(4).
 21. Fleischhauer, K., & Shaw, B. E. (2017). HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. *Blood*, blood-2017.

22. Begovich, A. B., McClure, G. R., Suraj, V. C., Helmuth, R. C., Fildes, N., Bugawan, T. L., ... & Klitz, W. (1992). Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *The Journal of Immunology*, 148(1), 249-258.
23. Gallardo, D., Brunet, S., Torres, A., Alonso-Nieto, M., Vallejo, C., Jiménez, A., & Osorio, S. (2004). Hla-DPB1 mismatch in HLA-AB-DRB1 identical sibling donor stem cell transplantation and acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, 77(7), 1107-1110.
24. Petersdorf, E. W., Gooley, T., Malkki, M., Anasetti, C., Martin, P., Woolfrey, A., ... & Hansen, J. A. (2001). The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *British journal of haematology*, 112(4), 988-994.
25. Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., ... & Reisner, Y. (1998). Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New England Journal of Medicine*, 339(17), 1186-1193.
26. Kwon, M., Martinez-Laperche, C., Balsalobre, P., Serrano, D., Anguita, J., Gayoso, J., ... & Buño, I. (2014). Early peripheral blood and T-cell chimerism dynamics after umbilical cord blood transplantation supported with haploidentical cells. *Bone marrow transplantation*, 49(2), 212-218.
27. Filion, A., Loiseau, P., Rocha, V., Tamouza, R., Chevret, S., Busson, M., ... & Charron, D. (2004). Decreased Transplant Related Mortality and Better Survival

in HLA Matched (12/12 A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1) Unrelated Bone Marrow Transplants.

28. Fleischhauer, K., Shaw, B. E., Gooley, T., Malkki, M., Bardy, P., Bignon, J. D., ... & Oudshoorn, M. (2012). Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *The lancet oncology*, *13*(4), 366-374.
29. Shaw, B. E., Marsh, S. G., Mayor, N. P., Russell, N. H., & Madrigal, J. A. (2006). HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants. *Blood*, *107*(3), 1220-1226.
30. Shaw, S., Johnson, A. H., & Shearer, G. M. (1980). Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogenic proliferative and cytotoxic responses. *Journal of Experimental Medicine*, *152*(3), 565-580.
31. Gaschet, J., Gallot, G., Ibisch, C., Lim, A., Even, J., Vivien, R., ... & Vié, H. (1998). Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1* 1001 mismatch: involvement of different TCRBV subsets. *Bone marrow transplantation*, *22*(4).
32. Rutten, C. E., van Luxemburg-Heijs, S. A., van der Meijden, E. D., Griffioen, M., Oudshoorn, M., Willemze, R., & Falkenburg, J. F. (2010). HLA-DPB1 mismatching results in the generation of a full repertoire of HLA-DPB1-specific CD4+ T cell responses showing immunogenicity of all HLA-DPB1 alleles. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *16*(9), 1282-1292.

33. Ringdén, O., Labopin, M., Ciceri, F., Velardi, A., Bacigalupo, A., Arcese, W., ... & Mohty, M. (2016). Is there a stronger graft-versus-leukemia effect using HLA-haploidentical donors compared with HLA-identical siblings?. *Leukemia*, 30(2), 447-455.
34. Manual de uso One Lambda RSSO-LTYP-PI-ES-00, Rev 28, 23/01/2017
35. La información de estos datos fue tomada de Allele frequency net 2015 update

RESUMEN BIOGRÁFICO

Carlos Octavio Cancela Murrieta

Candidato para el grado de

Maestro en Laboratorio de Hematología

Tesis: EFECTO DE LA INCOMPATIBILIDAD EN EL LOCUS HLA DPB1 DEL SISTEMA HLA EN EL PRENDIMIENTO DEL TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO HAPLOIDÉNTICO RELACIONADO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Xalapa, Veracruz el 1 de Julio de 1978.

Educación: Egresado de la Facultad de Bioanálisis, de la Universidad Autónoma Veracruzana, Xalapa, Veracruz. Grado Obtenido, Licenciado en Química Clínica en 2004.

Experiencia Profesional: 1996 Servicio Social Hospital ISSSTE, Xalapa Veracruz, 2004 Servicio Social Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UANL Monterrey, Nuevo León, 2005 Tesis de Licenciatura "Prevalencia del alelo APOE en pacientes con la enfermedad de Alzheimer residentes en la ciudad de monterrey N.L." en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UANL Monterrey Nuevo León. Químico Analista en la Unidad de Diagnóstico Molecular del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León. de 2005. Químico Analista laboratorio de Medicina Molecular del Servicio de Hematología, Hospital Universitario U.A.N.L. Monterrey Nuevo León 2005.