

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN Y ASOCIACIONES CLÍNICAS DE LA DISCORDANCIA
DE EPLETS HLA EN EL TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO
HAPLOIDÉNTICO AMBULATORIO CON UN RÉGIMEN DE
ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA**

PRESENTA

MAGALI IRAIS UREÑO SEGURA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN LABORATORIO DE
HEMATOLOGIA**

**CARACTERIZACIÓN Y ASOCIACIONES CLÍNICAS DE LA DISCORDANCIA DE
EPLETS HLA EN EL TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO HAPLOIDÉNTICO
AMBULATORIO CON UN RÉGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD
REDUCIDA**



Dr. med. José Carlos Jaime Pérez

Director de Tesis



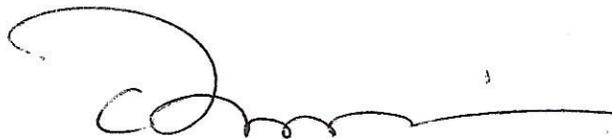
Dr. César Homero Gutiérrez Aguirre

Codirector de la comisión de Tesis



Dr. David Gómez Almaguer

Miembro de la comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

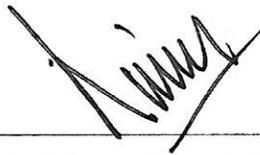
CARACTERIZACIÓN Y ASOCIACIONES CLÍNICAS DE LA DISCORDANCIA DE EPLETS HLA EN EL TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO HAPLOIDÉNTICO AMBULATORIO CON UN RÉGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA

Presentado por:



Q.F.B. Magali Irais Ureño Segura

Este trabajo se realizó en el Servicio de Hematología del departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. med. José Carlos Jaime Pérez.



Dr. med. José Carlos Jaime Pérez

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. med. José Carlos Jaime Pérez, por su ayuda, tiempo y paciencia para guiar este proyecto de investigación. Estando siempre disponible para dudas y aportaciones al trabajo.

A la Q.C.B.E.H. Rosario Salazar Riojas por los consejos basados en su experiencia y facilitarnos los medios y recursos para asistir a cursos y actividades complementarias a la maestría, todo con el fin de recibir el mayor enriquecimiento posible durante nuestra estancia en el posgrado.

A todos los Químicos que forman parte del servicio de Hematología, por brindarme el apoyo y compartirme sus conocimientos para mi formación como profesionista, siendo la voz de la experiencia laboral. Estoy infinitamente agradecida por lo que adquirí y aprendí de cada uno.

Al equipo de secretarías y personal administrativo por brindarme el apoyo en todo momento, así como residentes y doctores que resolvieron las dudas que surgieron durante el camino. En especial a la Dra. Adriana Domínguez, por ser parte primordial para obtener los resultados estadísticos de esta tesis, y a la Dra. Nidia Moncada por proporcionarme los recursos necesarios para realizar el presente trabajo.

A mis compañeros de maestría, Ricardo, Roberto, Andrea y Vanessa, por dar ese ánimo cuando era requerido y proporcionarme la mano cuando era necesario.

DEDICATORIA

A mi madre, mi heroína de capa larga, quien con su fortaleza, sabiduría y amor incondicional me ha guiado en cada paso de mi vida.

Gracias por escucharme y aconsejarme en momentos difíciles y por creer en mí siempre. Por dar esas muestras de cariño cuando más son necesarias.

A mi padre, quien me enseñó que la dedicación y el esfuerzo son imprescindibles para lograr metas, inculcarme desde niña el valor del trabajo y darme el ejemplo de perseverancia me hace ser la mujer que soy ahora.

Este logro también es de ustedes.

A Abraham, por la paciencia, el amor y el apoyo durante el proceso. Sus palabras de aliento siempre fueron impulso para lograr concluir este proyecto.

A Dios por siempre cuidar de mis pasos, por permitirme vivir esta experiencia y poner en mi camino las enseñanzas necesarias para ser quien soy, personal y profesionalmente. Por darme la fuerza, la salud y la sabiduría para lograr mis metas.

ÍNDICE

1.Introducción.....	1
1.1 Aspectos inmunológicos del trasplante de células hematopoyéticas.....	2
1.2 Reconstitución inmunitaria después del trasplante de células hematopoyéticas.....	5
1.2.1 Monocitos.....	6
1.2.2 Neutrófilos.....	7
1.2.3 Células NK.....	8
1.2.4 Linfocitos T.....	9
1.2.5 Linfocitos B.....	10
1.3 Falla del injerto.....	11
1.4 Mecanismo de recaída y evasión inmune después del TCPH haploidéntico...13	
1.5 Sistema Antígeno Leucocitario Humano	15
1.6 Eplets.....	18
1.7 HLA Eplet Registry.....	20
1.8 Antecedentes de estudios de eplets en pacientes hematológicos.....	28
2.Justificación.....	30
3.Objetivo general.....	31
3.1 Objetivos específicos.....	31
4.Hipótesis nula.....	32
5.Hipótesis alterna.....	32
6.Diseño metodológico.....	32
6.1 Aspectos éticos.....	33
6.2 Confidencialidad de la información.....	33
6.3 Criterios de inclusión.....	34
6.4 Criterios de exclusión.....	34
6.5 Criterios de eliminación.....	34
7. Estudios de laboratorio.....	34

7.1 Determinación de HLA.....	35
7.2 Anticuerpos anti-HLA del receptor específicos contra el donador.....	37
8. Análisis estadístico.....	38
9. Resultados.....	39
10. Discusión.....	50
11. Conclusión.....	53
12. Referencias.....	54

Caracterización y asociaciones clínicas de la discordancia de Eplets HLA en el trasplante hematopoyético haploidéntico ambulatorio con un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida.

1- Introducción

En la última década la incidencia mundial de cáncer hematológico se ha incrementado, según estadísticas globales se estima que se generan aproximadamente 1.24 millones de casos nuevos por año en todo el mundo, representando el 6% del total de todos los cánceres. Se reporta que al año las defunciones mundiales debido a este padecimiento son de 720,000 personas, representando el 7% de las muertes totales por cáncer. (1)

En México, de igual manera, la incidencia va al alta. En el 2018 se detectaron 18 mil casos nuevos de cáncer hematológico, siendo las leucemias y el mieloma múltiple los que ocupan los primeros lugares de incidencia en el país. (2). Además de la quimioterapia específica, como alternativa de tratamiento cuando no se obtiene la remisión o el enfermo recae, se recurre al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), siendo un opción curativa para muchos pacientes con indicaciones hematológicas malignas y no malignas.(3)

El fundamento de esta intervención médica se basa en la sustitución de las células hematopoyéticas del paciente después de la administración de regímenes de acondicionamiento con quimioterapia que pueden ser mieloablativos (4), no mieloablativos, o de intensidad reducida, así como incluir o no la radiación,(5) para eliminar las células malignas y sustituirlas por células sanas de un donador, estas células, una vez que se injertan en el paciente, cumplen las funciones del sistema hematopoyético normal, erradicando la

población malignizada, ofreciendo al paciente una mayor duración y una mejor calidad de vida.

El cuerpo humano tiene un sistema de respuesta inmune que se activa cuando reconoce algún antígeno extraño a las células propias. En el trasplante de progenitores hematopoyéticos los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son los causantes de esta reacción inmune (6), por lo que la elección del donador es de importancia crítica para que el trasplante sea exitoso. El donador ideal sería un gemelo idéntico, en su ausencia, que constituye la mayoría de los casos, un hermano HLA idéntico es la mejor opción; sin embargo, esto es posible solo en el 15% de los pacientes, por lo que se debe de encontrar un donante con un HLA compatible o, al menos, parcialmente compatible.(7) Hablando de trasplantes entre donadores haploidénticos, es decir que comparten la mitad del HLA entre ellos, la probabilidad de encontrar un donante óptimo varía significativamente entre los grupos raciales y étnicos, con posibilidades de encontrar un donante apropiado que van desde el 75% para los blancos de ascendencia europea hasta el 16% para los negros de ascendencia sudamericana o centroamericana.(8) Sin embargo cualquier diferencia entre los HLA, incluso las discrepancias de alelos individuales afectan negativamente los resultados de los pacientes después del TCPH (9).

1.1 Aspectos inmunológicos del trasplante de células hematopoyéticas.

Históricamente, las barreras inmunológicas prohibitivas resultantes del alto grado de discrepancia de HLA incluían la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y el fracaso

del injerto. Estos se superaron con estrategias cada vez más sofisticadas para manipular el delicado equilibrio entre las células inmunes del donante y del receptor. Como por ejemplo el uso de ciclofosfamida post-trasplante (PTCy) en dosis altas para lograr en vivo atenuación de la alorreactividad de las células T (10). También ha sido factible una estrategia diferente que utiliza injertos de médula ósea movilizados con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) con inmunosupresión extensa (11). Además, se está poniendo especial énfasis en el uso de células asesinas naturales (NK) para aprovechar la inmunidad tanto innata como adaptativa en el TCPH haploidéntico, estas células NK desempeñan un papel clave ya que no intervienen en la enfermedad de injerto contra huésped, pero pueden generar con éxito un efecto de injerto contra leucemia. Este efecto está regulado en parte por receptores KIR que inhiben la función citotóxica de las células NK cuando se unen a los ligandos HLA de clase I apropiados, absteniéndose de atacar tejidos sanos en estado estacionario. La mayoría de los KIR inhibidores reconocen a las moléculas HLA de clase I (HLA-A, B y C). Las moléculas HLA de los genes KIR están ubicados en el cromosoma 19, mientras que los genes HLA están ubicados en el cromosoma 6, por lo tanto, los genes KIR y HLA se segregan de forma independiente y un individuo puede expresar o no el ligando HLA afín para cualquier KIR determinado (12). En el caso del TCHP haploidéntico, la incompatibilidad de HLA clase I entre donado y receptor produce una falta de señales de inhibición lo que contribuye a la alorreactividad de las células NK, lo que conduce a un mayor efecto anticancerígeno (13). Por lo tanto, en ausencia de inhibición de receptores KIR, las células NK pueden mediar niveles más altos de función efectora cuando reciben fuertes señales estimulantes en condiciones inflamatorias, como infección por CMV o cuando se desencadenan procesos inflamatorios por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (14).

El “modelo de discordancia entre ligando y ligando de KIR” (figura 1) se basa en la hipótesis de que la presencia del ligando HLA correspondiente previene la aloreactividad de las células NK, mientras que la falta de un ligando en el receptor del TCPH desencadena la aloreactividad de las células NK. Sin embargo, si bien este modelo tiene en cuenta las discrepancias de HLA clase I, no considera el genotipo ni el fenotipo KIR.

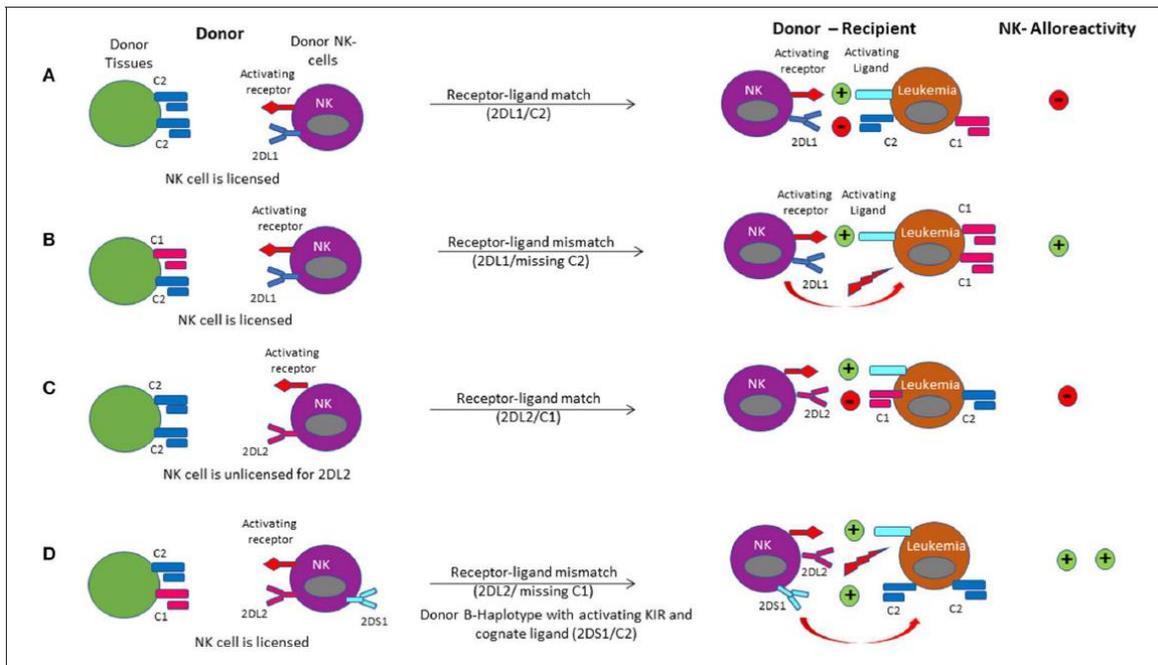


Figura 1.- Tomada de Baumeister SHC, Rambaldi B, Shapiro RM, Romee R. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2020 Feb 14;11:191. doi: 10.3389/fimmu.2020.00191.

Los trabajos emergentes revelan fenómenos de evasión inmune, como la pérdida de heterocigosidad de la copia neutra de los alelos HLA incompatibles, como uno de los principales mecanismos de recaída. Las recaídas y las complicaciones infecciosas siguen siendo las principales causas que afectan la supervivencia general y son fundamentales para los avances científicos que buscan mejorar el TCPH.

Ruggeri et al. estableció por primera vez que una alorreactividad de las células NK del donante hacia el receptor basada en una falta de coincidencia entre el ligando y el receptor KIR, es capaz de destruir las células leucémicas promoviendo la presencia de clones alorreactivos contra las células del receptor, reduciendo el riesgo de recaída de la leucemia mieloide aguda (LMA) en el TCPH haploidéntico (15). Estos resultados se consolidaron posteriormente en una cohorte más grande de 112 pacientes con LMA, donde el trasplante de un donante alorreactivo de células NK se asoció con una tasa de recaída significativamente menor (3 % en comparación con 47 %) cuando se trasplantó en remisión completa y obtuvo una mejor supervivencia libre de eventos que cuando se trasplantó en recaída (34% en comparación con 6%) o recuperación completa (67% en comparación con 18%) (16).

Estos enfoques han contribuido a un aumento en el uso de TCHP haploidéntico en los últimos años. A medida que el TCHP haploidéntico evoluciona para perfeccionar y establecer su papel en el campo de los trasplantes, es fundamental examinar las propiedades inmunobiológicas y la trayectoria de la reconstitución inmune, que es fundamental para el control de las infecciones y recaídas postrasplante.

1.2 Reconstitución inmunitaria después trasplante de células hematopoyéticas.

Los resultados del trasplante están directamente relacionados con el logro de una restauración aceptable del sistema inmunológico. Varios subconjuntos de células desempeñan un papel clave en la protección contra infecciones y recurrencia de enfermedades. En general, la

inmunidad innata se recupera poco después del trasplante y representa la primera línea de defensa contra los patógenos. En concreto, los monocitos seguidos de los neutrófilos y las células NK surgen en el primer mes después del trasplante. La inmunidad adaptativa mediada por los linfocitos de células T y B se recupera más tarde y es crucial tanto para el mantenimiento de la tolerancia inmune como para la protección a largo plazo contra infecciones y recaídas de enfermedades. La reconstitución de las células T puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes: la expansión periférica de las células T de memoria del donante independientes del timo y la expansión periférica de las células T dependientes del timo de novogeneración a partir de progenitores hematopoyéticos del donante (17).

1.2.1 Monocitos

Los monocitos son el primer subconjunto inmunológico que se recupera después del TPCH. La reconstitución celular se ha correlacionado con la mejora de los resultados del trasplante, Recientemente, un estudio realizado por Turcotte y colegas demostró que un mayor recuento absoluto de monocitos, y un mayor número de subconjuntos de monocitos clásicos (CD14CD16⁻) en el día +28 se asociaron con un riesgo reducido de recaída y mortalidad asociada al tratamiento, mejor supervivencia global a 2 años en una cohorte de pacientes trasplantados por diferentes neoplasias malignas hematológicas utilizando regímenes de intensidad reducida o acondicionamiento mieloablativo intensificado (AMI) y diferentes fuentes de células madre (18). En una cohorte separada de 144 pacientes tratados con acondicionamiento AMI para neoplasias hematológicas, que recibieron un injerto repleto de células T que consistía en médula ósea movilizada con G-CSF de HLA haploidénticos o

donante hermano, los monocitos se recuperaron rápidamente y el recuento mayor de monocitos estuvo por encima del rango normal desde el primer mes hasta el primer año después del trasplante. Ambos grupos de pacientes recibieron profilaxis de EICH con metotrexato, tacrolimus, micofenolato de mofetilo (MMF) y ciclosporina con la adición de hemoglobina antitimocítica (ATG) en el grupo haploidéntico (protocolo GIAC). La reconstitución de monocitos fue comparable entre los receptores después de HLA compatible y haploidénticos en los días +30, 90 y 180 después del trasplante. Ninguna de las características del paciente trasplantado afectó la recuperación de monocitos en el análisis multivariable (19).

1.2.2 Neutrófilos

El injerto de neutrófilos se define por la presencia de más de 500 neutrófilos/ μ l de sangre y representa un paso crucial en la fase temprana después del trasplante. La neutropenia prolongada se asocia con infección grave y aumento de mortalidad asociada al tratamiento (20). En el contexto de un trasplante repleto de células T, la recuperación de neutrófilos se produce rápidamente. Con los protocolos GIAC, la mediana del injerto de neutrófilos se logró a los 14 días (rango 9-25), mientras que con acondicionamiento de intensidad reducida y ciclofosfamida utilizando injertos de médula ósea y profilaxis basada en Tacrolimus y MMF, el tiempo medio hasta la recuperación de los neutrófilos fue de 15 días (rango 11-42). (21). Para ambos protocolos, los pacientes recibieron factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinante (rhG-CSF) desde el día +6 o +4 al injerto, respectivamente. Específicamente, los pacientes en el TCHP haploidéntico con depleción de

células $\alpha\beta$ -T tuvieron una recuperación de neutrófilos más rápida en comparación con trasplantes con donante no emparentado, y aquellos tratados con Metotrexato e inhibidores de calcineurina, con una mediana de tiempo hasta el injerto de neutrófilos de 13 (rango 6-23), 19 (rango 9-46) y 20 días (rango 10-120), respectivamente (22). Los tres grupos recibieron ATG durante el acondicionamiento para la prevención del fracaso del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped y ninguno de los pacientes recibió G-CSF para acelerar la recuperación de los neutrófilos. En conjunto, estos datos muestran que el TCPH haplóidéntico proporciona una recuperación de neutrófilos comparable o incluso acelerada en comparación con el TCPH de donante compatible estándar.

1.2.3 Células NK

Utilizando sangre periférica movilizada como fuente de CD34+ y PTCY como terapia inmunosupresora, Russo y colaboradores describieron que las células NK alorreactivas del donante infundidas con el injerto fueron eliminadas por la ciclofosfamida. Esto se tradujo en un retraso en la recuperación y maduración de células NK en la fase temprana después de la infusión del injerto. La ausencia de células NK positivas para aldehído deshidrogenasa (ALDH) sugirió que eran susceptibles a la citotoxicidad por ciclofosfamida, y esto luego se confirmó mediante un ensayo in vitro de muerte celular inducida por mafosfamida, un derivado pre-activado de la ciclofosfamida. Por otro lado, en el mismo estudio Russo y colaboradores también informaron un pico de IL-15 en el suero de pacientes el día +15 después del trasplante que se asoció con un aumento progresivo de células NK que expresan un fenotipo inmaduro (CD62L+, NKG2A+, kir⁻) entre el día +15 y el día +30. La

distribución normal de los fenotipos NK se logró sólo entre 9 y 12 meses después del trasplante, con una disminución de CD56brillante, NKG2A y CD62L y un aumento de los marcadores de maduración (CD16, CD57 y KIR). La expresión de receptores KIR volvió a niveles normales alrededor del día+ 60, pero la expresión de NKG2A disminuyó sólo después de 6 meses.

Curiosamente, en esta cohorte de pacientes, no hubo diferencias en la sobrevida libre de progresión entre los pacientes con o sin una aloreactividad KIR prevista, lo que sugiere que la actividad antitumoral protectora de las células NK se amortigua después de que las células T repletan el injerto del TCHP utilizando la PTCY (23).

1.2.4 Linfocitos T

Lograr una reconstitución aceptable de células T después del TCHP representa un objetivo crucial y se correlaciona con mejores resultados del trasplante. El deterioro de la reconstitución de las células T es más pronunciado después del agotamiento de las células T. En el trasplante de sangre periférica movilizada utilizando el protocolo GIAC, los recuentos de células T CD3+ fueron 125, 883, 1163 y 1308 células/ μ L a los 30, 90, 180 y 360 días después del TCH, respectivamente. Las células T CD8+ se recuperaron antes que las células T CD4+. La recuperación de células T en el día +90 se correlaciona con un nivel más alto de CD3+células en el injerto, pero no se asoció con una mayor incidencia de enfermedad de injerto contra huésped. Los mismos estudios resaltaron que la recuperación de linfocitos CD4+ estuvo deteriorada durante todo el primer año después del trasplante, pero no lograron demostrar una correlación entre el retraso en la producción de reconstitución de células T

CD4+ y mortalidad sin recaída (NRM) como se muestra en el entorno de donante compatible con HLA (25). Cabe destacar que en la experiencia del GIAC el retraso de la reconstitución de las células T CD4+ fue compensada por el aumento proporcional de fracciones de células T CD8+ y monocitos y la NRM fue relativamente baja (19,5 % en el grupo de haploidénticos frente a 17,4 % para la cohorte de donantes de hermanos compatibles). Esto probablemente se debió a las mejoras en la atención al paciente, especialmente en el manejo de la reactivación del CMV. No se encontró asociación entre ninguno de los recuentos de subconjuntos de células T, células B o células NK con la mortalidad relacionada con la recaída. (24)

1.2.5 Linfocitos B

La recuperación de las células B es más tardada después del TCHP. Las células B son casi indetectables durante el primer y segundo mes y los valores normales sólo se alcanzan alrededor de 12 meses después del trasplante. Utilizando PTCy, MMF y Tacrolimus como profilaxis de EICH, las células B fueron indetectables hasta el día+28. La recuperación de las células B comenzó desde la semana 5 con un CD38+ CD10+Fenotipo Ki-67 negativo, lo que sugiere que el aumento en el número de células B no se debió a la proliferación homeostática de las células B transferidas sino de novo (26). Usando el protocolo GIAC, los recuentos medios de células B no difirieron del TCHP de HLA idéntico con el TCHP haploídentico. (24)

1.3 Falla del injerto

El injerto de neutrófilos exitoso se define como recuento absoluto de neutrófilos $\leq 0,5 \times 10^9/L$ el día +28 durante tres días consecutivos y ausencia de hematopoyesis del donante.

Cuando el paciente no alcanza estas cifras celulares se considera una falla del injerto primario, el cual incluye un rechazo del injerto (RG), definiéndose como la imposibilidad de generar neutrófilos.

La incidencia de la falla primaria del injerto va del 2 al 15% en pacientes que se someten a trasplante de progenitores hematopoyéticos, lo que representa un problema que contribuye a la morbilidad y mortalidad post trasplante. (27)

El papel de los DSA (anticuerpos específicos contra el donante) en el trasplante de órganos sólidos está bien establecido. En TCPH haploidéntico, Ciurea et al. mostraron que el 75 % de los pacientes con DSA positivo antes del trasplante con una intensidad fluorescente media (MFI) >1500 no lograron injertar, en comparación con el 5 % de los pacientes con DSA negativo. (28)

Estos anticuerpos anti-HLA se generan contra específicamente un antígeno no coincidente del donante y es imprescindible detectar si el paciente tiene estos anticuerpos específicos contra el donador antes del trasplante, para evitar respuestas primarias de inmunidad afectando el éxito del injerto una vez realizado el trasplante.

El pobre funcionamiento del injerto puede ser el resultado de una recuperación incompleta de células sanguíneas, por lo que las cifras celulares posterior a un injerto exitoso bajan y no logran mantenerse en los niveles óptimos para la mejoría del paciente.

Existen factores que afectan el prendimiento del injerto, en lo trasplantes de médula ósea a continuación se enlistan los más importantes:

- Enfermedad de injerto contra huésped.
- Medicamentos inmunosupresores.
- Infecciones o reactivaciones virales.
- Sepsis bacteriana de organismos oportunistas.
- Incompatibilidad mayor en grupo sanguíneo ABO.

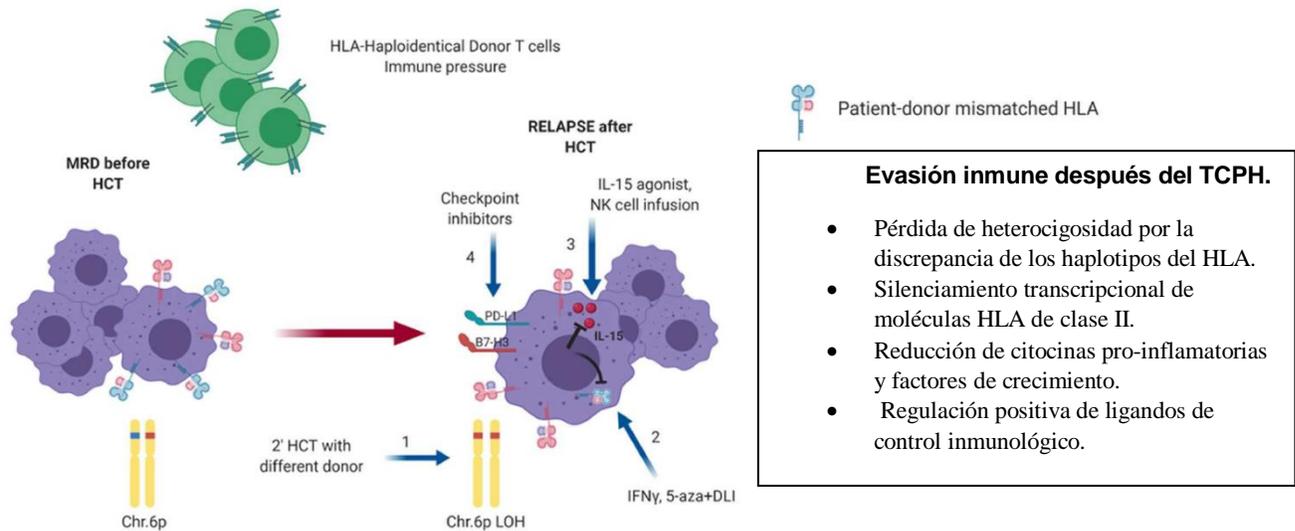
Es importante considerar el tipo de incompatibilidad del sistema ABO (Tabla 1) que se presenta en cada trasplante en específico, se toma en cuenta para el tratamiento de las células del donador previo a trasplantarse, como para las transfusiones posteriores al trasplante si es que son requeridas. Cuando existe una incompatibilidad mayor las guías recomiendan que debe de realizarse una reducción de eritrocitos al paquete de células recolectadas del donante y al paciente se le debe de tratar con algún medicamento inmunosupresor, siendo el Rituximab el más comúnmente usado en nuestro centro.

Tabla 1. Incompatibilidad en el sistema ABO en el trasplante de células progenitoras					
Incompatibilidad mayor		Incompatibilidad menor		Incompatibilidad mixta (mayor y menor)	
Grupo del receptor	Grupo del donante de las células progenitoras	Grupo del receptor	Grupo del donante de las células progenitoras	Grupo del receptor	Grupo del donante de las células progenitoras
0	A, B O AB	A, B O AB	0	A, B O AB	0
A	B o AB	A o AB	B	A	B
B	A o AB	B o AB	A	B	A

Tomada de la NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

1.4 Mecanismos de recaída y evasión inmune después de TCHP haploidéntico

Datos recientes han resaltado el papel fundamental del sistema inmunológico en el control enfermedades hematológicas después del TCHP y han aclarado nuestra comprensión sobre los mecanismos inmunológicos que subyacen a la recaída después del TCHP haploidéntico. El trabajo de Vago y sus colegas reveló que una proporción sustancial de las recaídas tardías de LMA y síndrome mielodisplásico (SMD) después de TCHP haploidéntico puede deberse a una serie de mecanismos inmunológicos (Figura 2)(29). Bajo la presión inmune de injerto contra leucemia (GVL) a través de la falta de coincidencia de HLA en un entorno haploidéntico, la pérdida de heterocigosidad para el alelo HLA no coincidente es un mecanismo de escape de la vigilancia inmune y la recaída. Otro mecanismo implica el silenciamiento transcripcional de la molécula HLA de clase II, reduciendo así la GVL mediada por células T. Este efecto puede revertirse parcialmente en presencia de moléculas inmunomoduladoras como el IFN- γ o el regulador epigenético 5-azacitidina (5-aza). La modificación del microambiente tumoral mediante la supresión de la liberación de mediadores que promueven la GVL es otro mecanismo utilizado por las células leucémicas recurrentes, que puede revertirse parcialmente mediante la administración de agonistas de IL-15 e infusiones de células NK que promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias. Un mecanismo común adicional de recaída implica la aparición de agotamiento de las células T con una regulación positiva asociada de PD-L1 y otros receptores inhibidores. Esto último puede revertirse mediante la administración de inhibidores de puntos de control.



Las flechas azules indican posibles estrategias terapéuticas para superar los diferentes mecanismos de evasión inmune.

Figura 2.-“Evasión inmune después del trasplante de células progenitoras”. Adaptada de Baumeister SHC, Rambaldi B, Shapiro RM, Romee R. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. Front Immunol. 2020 Feb 14;11:191. doi: 10.3389/fimmu.2020.00191.

La expresión general mantenida de las moléculas de clase I discordantes también evadió la activación de respuestas anti leucémicas mediadas por células NK que potencialmente podrían basarse en un ligando faltante para el receptor inhibidor KIR (29). Aproximadamente el 30% de las recaídas después del TCPH haploidentico son atribuibles a este mecanismo de eliminación de los alelos HLA incompatibles, independientemente de la profilaxis de la EICH o del medio utilizado para controlar la aloreactividad de las células T. (30).

Toffalori et al. analizaron firmas transcripcionales específicas para las recaídas de LMA posteriores al trasplante. Este estudio demostró una desregulación en la coestimulación entre las células T del donante y las células leucémicas del huésped, con pérdida de interacciones coestimuladoras y refuerzo de las inhibidoras (PD-1/PDL-1), Además, el estudio documentó la regulación negativa de la expresión superficial de moléculas HLA clase II en células

leucémicas debido a la regulación negativa del transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CIITA: coactivador transcripcional) (31).

Se encontró que en la recaída después del TCPH los pacientes tenían una mayor proporción de células T infiltradas en médula ósea que expresaban receptores TCR restringidos, en comparación con los pacientes que permanecían en respuesta completa, igualmente el fenotipo de estas células T reportaba funciones efectoras deterioradas y especies reactivas a la leucemia. Además, la detección temprana de células T madre de memoria en médula ósea agotadas predijo la recaída (32).

En todos los estudios anteriores, vemos como la discrepancia en el HLA entre el donador y el receptor afecta directamente en los resultados del TCPH, desde el tiempo de reconstitución celular, la supervivencia de vida del injerto, hasta el riesgo de recaída. Así que entre mejor se elija al donador, mejor será el resultado en los pacientes.

1.5 Sistema del antígeno leucocitario humano (HLA)

Los estudios de histocompatibilidad que deben realizarse antes del trasplante incluyen la tipificación en alta resolución de los antígenos HLA, tanto del donador como del receptor para así evaluar los genes HLA particulares que ha heredado cada individuo y si son compatibles entre sí para llevar a cabo el trasplante (33). Así mismo la determinación de los DSA que puede tener el paciente, para saber si existe algún anticuerpo preformado que cause una respuesta de incompatibilidad tisular y el rechazo del injerto de células progenitoras hematopoyéticas.(34)

En los últimos años, la tecnología ha permitido hacer uso de recursos virtuales para simular lo que se realiza en el laboratorio, acortando el tiempo de análisis y aumentando la eficacia de los procesos para realizar un estudio completo de histocompatibilidad antes del trasplante, es el caso de la prueba cruzada virtual, que consiste en un estudio basado en la compatibilidad inmunológica del perfil de aloanticuerpos anti-HLA del paciente, comparada a la composición antigénica del donador, permitiendo conocer con precisión y con alta sensibilidad si un receptor posee anticuerpos IgG contra cada uno de los antígenos del sistema HLA del donador, por lo tanto permite identificar posibles incompatibilidades al conocer previamente los DSA del paciente.(35)

Se ha demostrado que a mayor histocompatibilidad entre los individuos es mayor la supervivencia del injerto y del paciente (36). Conocer la compatibilidad de los loci del sistema HLA de cada sujeto implicado en el trasplante es un potente factor pronóstico para la respuesta del paciente al trasplante, ayudando a la toma de decisiones médicas post-trasplante, como el suministro de inmunosupresores.

Para comprender la inmunogenicidad de los antígenos del sistema HLA, se han desarrollado varios programas que predicen la composición de aminoácidos de los epítopes reconocidos por los anticuerpos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). (Figura3)

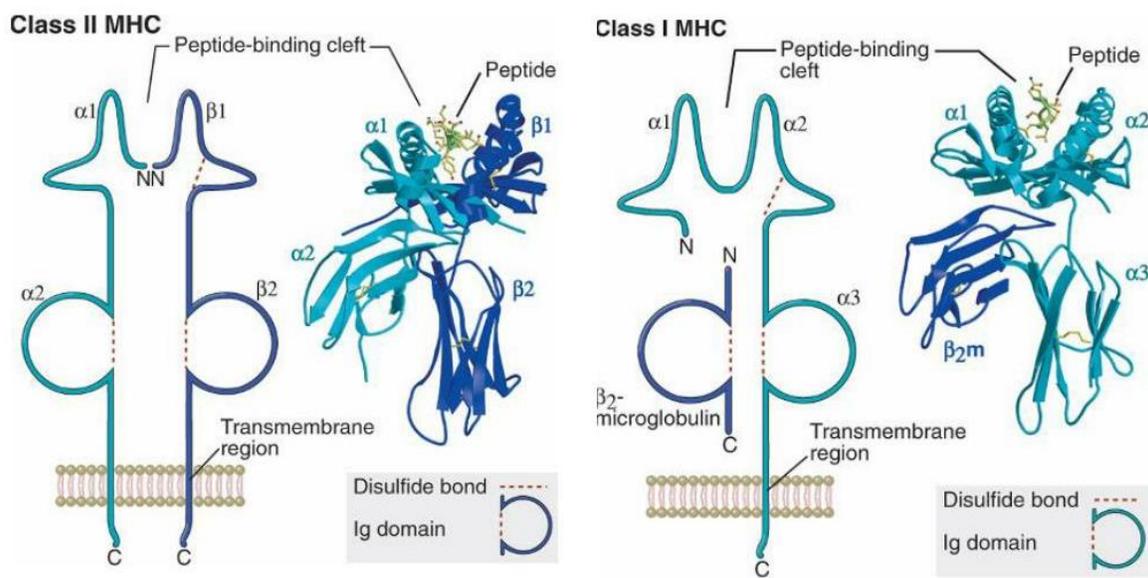


Figura 3. Esquema y estructura 3D de la molécula CMH clase I y II. Tomada de Abbas, Lichtman, and Pillai, 2012.

El sistema HLA desempeña un papel fundamental para el reconocimiento inmunológico que se lleva a cabo en el trasplante entre donador y receptor, es el componente primordial para el del autorreconocimiento por parte del sistema inmunológico del receptor por lo que determina la compatibilidad de los tejidos entre el paciente y el donador. Los genes del HLA muestran un alto nivel de polimorfismos con más de 30.000 alelos descritos. (37), pero a pesar de su alto nivel de polimorfismos los alelos del HLA suelen compartir algunos epítopes entre ellos, lo que indica sus respectivos niveles de similitud. Por tanto, la coincidencia de epítopes podría mejorar la asignación del injerto. Si bien la coincidencia clásica de genotipos HLA se realiza a nivel alélico, se desarrollaron avances recientes para explorar el reconocimiento anticuerpo-antígeno mediante el estudio de epítopes. La compatibilidad entre donante y receptor a nivel epitópico se está convirtiendo en un tema de tendencia en el campo

de la investigación sobre trasplantes porque los anticuerpos anti-HLA son específicos de un epítoto en lugar de un alelo específico.

1.6 Eplets

Los anticuerpos reconocen regiones superficiales específicas de los antígenos llamadas epítotos estructurales, que a su vez contienen epítotos funcionales. (38) Los epítotos funcionales transportan residuos de aminoácidos esenciales, es decir, la sustitución de uno de estos residuos disminuiría significativamente la afinidad del anticuerpo por el epítoto. A estos epítotos funcionales, compuestos de 1 a 5 residuos de aminoácidos, se les llama eplets ubicados principalmente dentro de los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y $\alpha 1$ - $\beta 1$ de las moléculas HLA de clase I y HLA de clase II, respectivamente. Un eplet puede constituir epítotos lineales o tridimensionales y puede ubicarse en áreas críticas o expuestas de las proteínas HLA (39).

(figura 4)

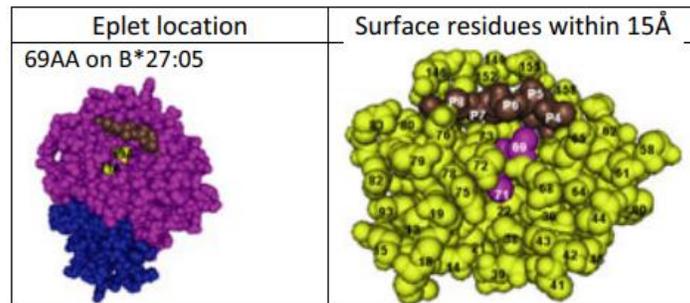


Figura 4. Ejemplo de la estructura molecular de los eplets. Tomada de Duquesnoy et. al, 2019

Además, algunos eplets, como ya se mencionó, son compartidos por varios alelos del HLA, del mismo gen o de diferente, mientras que algunos son exclusivos de solo un alelo. (Figura 5). Particularmente el HLA de clase I tiene más eplets compartidos, mientras que la clase II

sólo comparten un número muy limitado de eplets. Esta observación podría explicar por qué los desajustes de los eplets de HLA de clase II parecen ser más inmunogénicos que los desajustes de los eplets de clase I (40,41).

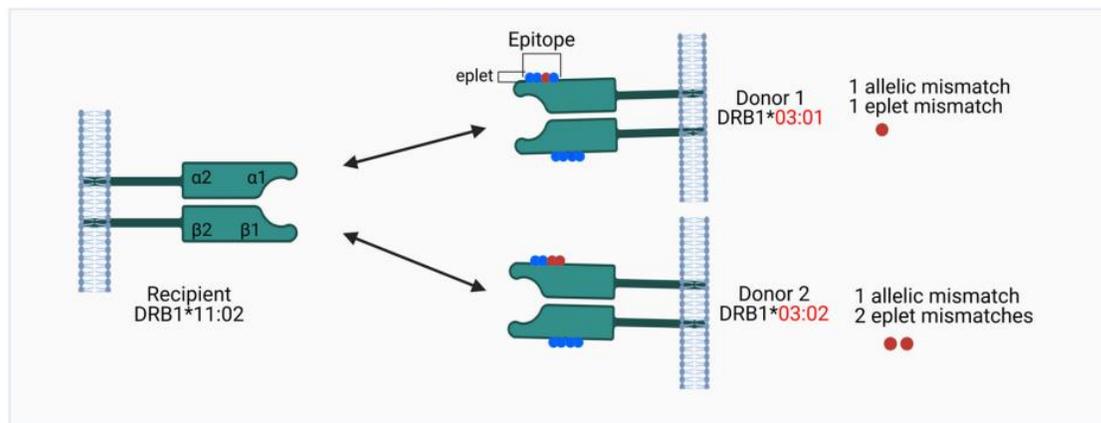


Figura 5. Principio de concordancia de epítopes HLA. Tomada de Geffard et al, 2021

Es posible determinar la carga de discrepancia de los eplets del HLA entre el donante y el receptor para refinar el sistema de compatibilidad, saber el nivel de discrepancia entre estos dos, nos permite clasificar mejor el riesgo inmunológico entre la pareja donador-receptor en el trasplante.

Los eplets podrían disminuir la clasificación errónea del riesgo inmunológico postrasplante, cuando se confirma que los anticuerpos están dirigidos contra los eplets del donante que faltan en el repertorio de eplets del receptor. La consideración de eplets también puede aumentar la sensibilidad de la evaluación del riesgo inmunológico, al identificar eplets no coincidentes que podrían dar lugar a nuevos anticuerpos específicos del donante, no detectados previamente, después del trasplante. La coincidencia de eplets puede servir como

una estrategia racional para la mitigación del riesgo inmunológico, requiriendo menos tratamiento inmunosupresor para el paciente (42), o en su caso aumentarlo si fuera necesario.

1.7 HLA Eplet Registry

Se han puesto a disposición varios programas informáticos para estudiar la compatibilidad de epítopes entre donante y receptor. HLAMatchmaker se utiliza para identificar micrones tridimensionales en la superficie molecular del HLA hacia las que se pueden dirigir los anticuerpos. Este programa con formato Excel para el análisis de anticuerpos HLA y la comparación basada en eplets define un eplet según las diferencias dentro de tripletes repetidos de secuencias de aminoácidos lineales. El software Fusion MatchMaker de OneLambda Incorporated está basado en HLAMatchmaker. Utiliza la misma base de datos y el mismo proceso de cálculo, pero también incluye datos adicionales y ofrece una herramienta de cálculo fácil de usar. HLA-EMMA (HLA Epitope Mismatch Algorithm, por sus siglas en inglés) analiza las compatibilidades HLA clase I y clase II entre el donante y el receptor en el nivel de aminoácidos centrándose en las discrepancias de aminoácidos accesibles a los anticuerpos, con opciones de análisis individuales o por lotes.

El algoritmo PIRCHE (Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes, por sus siglas en inglés) se estableció para identificar péptidos presentados por células presentadoras de antígenos (APC) a las células T CD4 receptoras después de la digestión de residuos de proteínas HLA. En este caso, el reconocimiento de aloantígeno se califica como indirecto ya que las APC pertenecen al receptor. Por el contrario, HLAMatchmaker se centra en el reconocimiento directo de aloantígenos. El algoritmo PIRCHE compara fragmentos de

proteína HLA del receptor potencialmente detectados por células T CD8+ (presentadas por HLA clase I) y CD4+ (presentadas por HLA clase II). En el trasplante de órganos sólidos, PIRCHE es una herramienta muy utilizada ya que considera los desajustes peptídicos del donante presentados por las moléculas HLA clase II del receptor a las células T CD4+. (43) En el caso de nuestro trabajo de investigación se utilizará un programa disponible en la web, basado en el reconocimiento directo de eplets y su estructura molecular, “HLA Eplet Registry”.

Las compatibilidades entre epítopes se definen por las diferencias moleculares y estructurales de los eplets del HLA entre el donante y el receptor; una falta de coincidencia se define por un eplet traído por el donante y desconocido para el receptor. Es posible comparar un receptor con uno o varios donantes potenciales, como es el caso del TCHP, o bien comparar un donante con uno o varios receptores potenciales, herramienta que se usa en los trasplantes de órgano sólido. HLA Eplet Registry permite el estudio del HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, y -DPB1, y además, permite hacer estudio en tipificación de alta y baja resolución. Esta herramienta electrónica es una base de datos pública que incluye 560 correspondencias de eplets distintas transportadas por 2976 alelos de HLA alelos provenientes del Registro Internacional de Epítopes HLA (<http://www.epregistry.com.br>). (44) De ellos, a 154 se les han realizado pruebas de anticuerpos. La plataforma representa un excelente recurso para estudiar la histocompatibilidad a nivel de epítopes y las respuestas de anticuerpos contra las discrepancias de HLA en pacientes trasplantados. Esta base de datos considerara diferentes propiedades de epítopes, como eplets expuestos, cubiertos, controlados por anticuerpos y no controlados. Los eplets expuestos corresponden a los accesibles a compuestos presentes en el medio como los anticuerpos. En consecuencia, estos eplets tienen un mayor riesgo de inmunogenicidad en comparación con los eplets cubiertos. Los eplets están anotados con la

posición de sus primeros aminoácidos constituyentes, seguidos por el símbolo del nombre de los aminoácidos por ejemplo 71QS, que nos indica que el eplet empieza en un aminoácido de glutamina en la posición 71 de la cadena seguido de una serina. Aunque esta base de datos cubre sólo entre el 10% y el 15% de todos los HLA descritos, representa más del 99% del total de los alelos HLA más frecuentes. Solo alelos raros con frecuencia baja no están representados en esta base de datos.

Es importante también recalcar que los epítopes HLA participan tanto en el reconocimiento directo como indirecto por parte del sistema inmunológico del huésped. Después del trasplante, la célula presentadora de antígeno (APC) del injerto del donante migrará a los ganglios linfáticos del receptor. Las células T CD8+ del huésped reconocerán estas células de donantes extraños a través de su HLA clase I y péptidos presentados de forma extraña. Este mecanismo, denominado reconocimiento directo de aloantígeno, puede provocar un rechazo agudo. Por otro lado, en el reconocimiento indirecto, los aloantígenos (incluidos los péptidos derivados del HLA) del injerto se internalizan, procesan y presentan en la superficie de la APC del receptor. Esto puede provocar un rechazo crónico mediado por células T (Figura 6).

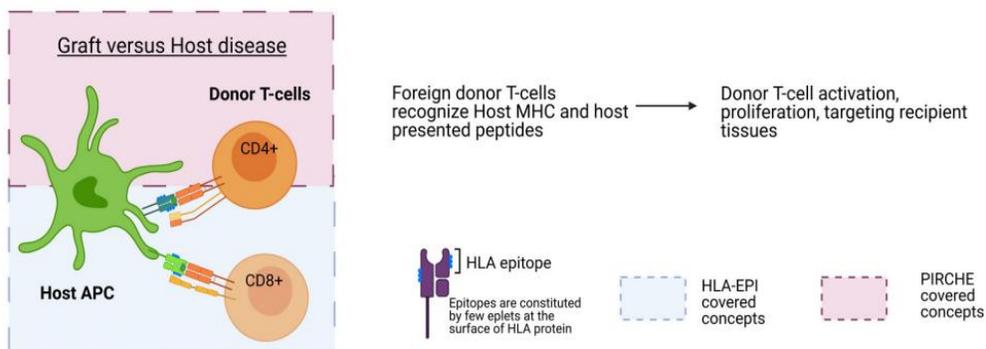


Figura 6. Principios de reconocimientos de aloantígenos. Tomada de Geffard et al. 2021

Siendo un importante punto inmunogénico el determinar cuantitativamente el grado de estas diferencias, comparando los reportorios de los eplets entre el donante y el receptor, refleja cómo será potencialmente la interacción de reconocimiento inmune entre las células del donador y las del paciente. Se ha demostrado que una menor carga de diferencia en los antígenos del sistema HLA en la pareja donador-receptor se asocia con una mayor supervivencia del injerto, una mayor velocidad de recuperación de la hematopoyesis, y una menor sensibilización humoral en el trasplante.(45)

Los eplets están determinados por su unión con un anticuerpo específico, y estos complejos epítipo-parátipo resultan de múltiples fuerzas de unión fisicoquímicas que involucran las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos. Los nombres de los eplets que le da la plataforma, tienen una posición de secuencia numérica distinta y descripciones de residuos polimórficos con códigos estándar de aminoácidos de una sola letra. Por ejemplo, el repertorio de ABC tiene más de 200 epítopes potenciales presentes en alelos de clase I en los paneles de Luminex. Cada epítipo tiene su propia fila y se clasifican según sus posiciones en la secuencia. También son consideradas las posibles variantes como un par de epítopes u otras moléculas.

Las configuraciones que afectan la reactividad con el anticuerpo son importantes de considerar, por lo que se crearon los modelos de residuos de aminoácidos polimórficos con posiciones de secuencia. La reactividad de los anticuerpos se determinó en ensayos de unión con paneles de un solo alelo. El registro también incluye epítopes descritos en publicaciones de investigación originales. De la información sobre la reactividad de los anticuerpos, asignamos el estado del epítipo como confirmado (bien documentado) o provisional (se necesitan más datos). En la actualidad, el registro tiene 69 HLA de locus A, B y C, 53

DRB1/3/4/5, 17 DQ, 8 DP para cada epítotope, el sitio web muestra su composición de aminoácidos y alelos HLA que comparten el epítotope.

Por ejemplo, los alelos HLA-A2, B57 y B58 en el panel Luminex comparten un epítotope distinto 62GE, que puede describirse mediante 62G (glicina), 63E (ácido glutámico) y 65R (arginina). Algunos antígenos tienen más de un epítotope único en diferentes posiciones de secuencia. Por ejemplo, los alelos A1 y A36 en los paneles Luminex comparten cinco epítotoses únicos: 44KM (descrito por 44Q, 44K, 45M y 46E), 149A + 150V + 151H y 158V. La notación del epítotope es 44KM₅, donde el subíndice indica la posibilidad de cinco epítotoses distintos que no pueden distinguirse con los paneles Luminex que se utilizan actualmente para las pruebas de anticuerpos.

Otro ejemplo es el epítotope 82LR (descrito por 79R, 82L y 83R) presente en todos los antígenos HLA-B asociados a Bw4 (familia serológica de epítotoses) y en HLA A23, A24, A25 y A32. Aunque se ha informado que muchos anticuerpos son monoespecíficos para 82LR, otros reconocen epítotoses relacionados presentes en subgrupos de antígenos portadores de 82LR que comparten configuraciones de residuos únicas adicionales. Por ejemplo, ciertos anticuerpos reaccionan con todos los antígenos HLA-B portadores de 82LR pero no con los HLA-A23, A24, A25 y A32 portadores de 82LR; estos antígenos HLA-B comparten un residuo de glutamina (Q) en la posición 43, mientras que los antígenos HLA-A tienen una fenilalanina o 43P. (46)

Los epítotoses de otros loci HLA tienen nombres y descripciones de residuos con formato similar. Se utilizan bases de datos de epítotoses de clase II separadas para DRB1/3/4/5, DQB + DQA y DPB + DPA. Por ejemplo, DRB1*01, DRB5*01 y DRB5*02 comparten el epítotope

96EV descrito por el grupo 96E, 98K y 180V en ubicaciones de secuencia discontinua. Las moléculas HLADQ y HLA-DP son heterodímeros de cadenas alfa y beta, la plataforma tiene anotaciones de epítopes para todos ellos. Por ejemplo, DQB1*02 y *03:02 (DQ8) comparten el epítope 56PA y DQA1*02, *04 y *06 tienen el epítope 75IL.

Cabe señalar que los epítopes DQ se asignan únicamente a las moléculas DQB1-DQA1 y no a DQB2-DQA2, que no se expresan en la membrana celular. (47)

Los epítopes HLA-DP se enumeran según cadenas y ubicaciones de secuencia. Por ejemplo, los alelos DPB1*03, *14 y *28 comparten el epítope 65LK, y DPA1*02 y *04 comparten el epítope 50RA. Aunque los epítopes de reacción cruzada compartidos entre diferentes antígenos DR, DQ y DP son raros, existen algunas excepciones notables. Por ejemplo, los anticuerpos contra 57DE en los alelos DRB1*11 a menudo reaccionan de forma cruzada con 55DE en DPB1*02, *03, *04:02, *06, *09, *10 *14, *16, *17, *18, *20 y *28. (48) Todos estos son ejemplos de algunos epítopes que se han estudiado y como es que se puede predecir la interacción que habrá entre los eplets discordantes en el trasplante.

Como se describió anteriormente, cada base de datos comprende una lista de epítopes potenciales que se puede predecir que servirán como sitios de reconocimiento para anticuerpos específicos. HLA Eplet Registry tiene como objetivo documentar epítopes que han sido verificados experimentalmente con anticuerpos específicos informativos. El sitio web también clasifica la reactividad de cada uno de los eplets, haciendo una clasificación de muy baja, baja, media, alta y muy alta reactividad. Esta clasificación de los epítopes definidos por anticuerpos depende del patrón de reactividad del anticuerpo con un panel informativo HLA. En contraste con la definición de alelos HLA, que se basa únicamente en diferencias

de aminoácidos o nucleótidos en cualquier posición de secuencia, los eplets HLA se definen por criterios distintos. Los epítopes del HLA podría ser estructuralmente equivalentes a un aminoácido en distintas configuraciones y posiciones accesibles a los anticuerpos. Además, los epítopes están determinados por su unión con un anticuerpo específico y estos complejos epítope-parátopo resultan de múltiples uniones de fuerzas fisicoquímicas que implican la complementariedad determinante regiones de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos.

Para cada epítope definido por anticuerpo, un cuadro de enlace en la página web proporciona información sobre el patrón de reactividad del anticuerpo, así como la fuente del anticuerpo con el que se estudió, información sobre el evento de inmunización, incluyendo los HLA utilizados para la producción de anticuerpos e los del inmunizador. Los patrones de reactividad de anticuerpos registrados se basan principalmente en ensayos de unión directa (Luminex), preferiblemente con paneles de un solo alelo. Hay una cantidad considerable de información publicada sobre epítopes definidos por anticuerpos que se ha registrado en el sitio web.

Estos enlaces citan a investigadores que brindan información sobre la reactividad de los anticuerpos, así como nombres locales de epítopes y referencias bibliográficas específicas.

El sitio web también tiene un enlace a la información de frecuencia de epítopes en diferentes poblaciones; las cuales se han calculado a partir del Centro para la Investigación Internacional de Trasplantes de Sangre y Médula (CIBMTR).

La distinción entre epítopes HLA y los antígenos son importantes no sólo para la determinación del desajuste para pacientes sensibilizados, sino también para una mejor

comprensión de la inmunidad humoral, la cual es una consecuencia a la respuesta de una discrepancia de HLA, por lo que información detallada sobre la estructura molecular del HLA y las secuencias de aminoácidos que conforman estas moléculas ha permitido determinar la base estructural de los epítopes HLA. Sin embargo, la verdadera existencia de los epítopes sólo puede comprobarse con anticuerpos específicos. Por lo que este sitio web nos permite enlistar los eplets que son clínicamente importantes.

Aunque muchos epítopes HLA definidos por anticuerpos corresponden a configuraciones simples de aminoácidos bien establecidas, se debe esperar que muchos otros tengan una composición más compleja. Por lo que se han estudiado estas uniones y se tienen en cuenta para hacer el patrón de reactividad de cada uno de los eplets con los DSA encontrados. La información sobre los epítopes estructurales correspondientes nos hacen una distinción entre la antigenicidad del epítope (la capacidad de reaccionar con anticuerpos) y la inmunogenicidad (la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos) (49)

Aunque el concepto de coincidencia de epítopes parece prometedor para evaluar la asignación del injerto, aún falta algo de información, especialmente con respecto a la inmunogenicidad de cada eplet individual. De hecho, dos combinaciones de donante-receptor con el mismo número de discrepancias entre epítopes pueden exhibir esquemas de inmunogenicidad muy diferentes. Además, es muy probable que la inmunogenicidad de un eplet individual varíe de un receptor a otro y, por tanto, cambie el curso del injerto en cada paciente.

1.8 Antecedentes de estudios de eplets en pacientes hematológicos

Si bien amplios estudios han demostrado que la disparidad de HLA se asocia con un mayor riesgo de EICH y un tiempo más prolongado hasta el injerto, lo que lleva a un mal pronóstico de pares receptor-donante no compatibles con HLA en trasplantes de donantes no emparentados. Los primeros estudios se centraron en el número de antígenos o alelos HLA no coincidentes, y la cuantificación de los antígenos y alelos HLA se prioriza en la selección de donantes (50). Los patrones pronósticos de discrepancia de HLA también se han investigado basándose en haplotipos de HLA (51). Sin embargo, aún no se comprende completamente qué subyace al efecto heterogéneo de la falta de coincidencia de HLA en los resultados del TCHP.

Para aclarar la heterogeneidad en la inmunogenicidad de la disparidad HLA, ha habido muchos intentos de identificar patrones específicos de sustitución de aminoácidos asociados con un mal pronóstico después del TCHP. (52). Un estudio anterior del Programa Japonés de Donantes de Médula (JMDP) informó combinaciones no permisivas de desajustes de alelos HLA basadas en la asociación con la EICH aguda grave de grado III-IV, que es un marcador sólido de aloreactividad en el TCHP (53). Un estudio posterior del JMDP mostró una asociación significativa entre el HLAC*14:02 no coincidente del paciente y la EICHa grave (54). Para comprender la inmunogenicidad de las secuencias de aminoácidos en pares HLA no coincidentes, se han desarrollado varios métodos para predecir epítopes reconocidos por el sistema inmunológico. (55)

Duquesnoy et al. estableció el algoritmo HLAMatchmaker (HLAMM) basado en la predicción *in silico* combinada con una reacción *in vitro* antígeno-anticuerpo para identificar

epítopes de células B presentados como tripletes, a los que llamaron 'eplets' (56). Duquesnoy et al. encontraron que no se pudo encontrar una asociación significativa entre la falta de coincidencia de los eplets con los resultados del trasplante en trasplantes de médula ósea no relacionados (UR-BMT) (24). El TCMH haploidéntico HLA (haplo-TCPH) que utiliza profilaxis de la EICH (PTCy) basada en ciclofosfamida postrasplante en dosis altas se ha utilizado ampliamente porque la PTCy suprime las células T alorreactivas y previene la EICH aguda y crónica. (57). Varios estudios investigaron la asociación de la coincidencia de eplets en haplo-HSCT utilizando PTCy. Rimando et al. informaron que la compatibilidad con eplets para HLA clase II en la dirección GVH se asoció con la incidencia de recaída en pacientes que recibieron haplo- HSCT utilizando PTCy (58). Zou et al. demostraron que la falta de coincidencia de eplets HLA-B se asociaba con EICHa en pacientes que recibieron haplo-HSCT utilizando PTCy en un estudio de un solo centro, pero no pudieron validar los resultados en los datos de registro del Centro para la Investigación Internacional de Trasplantes de Sangre y Médula (CIBMTR) (59)

La importancia y consecuencias clínicas de la falta de concordancia entre eplets de la pareja donador-receptor también han sido estudiadas en la Universidad de Texas MD Anderson Cancer Center por Jun Zou y colaboradores, encontrando la relevancia clínica en el loci HLA DP, determinando que, a mayor similitud de los eplets de este loci, existe menor riesgo de EICH y una disminución del riesgo de recaída de la enfermedad (60).

Otro estudio, realizado en la misma universidad estudió el grado de discordancia molecular entre los loci HLA individuales, concluyendo que la carga de esta diferencia de eplets en

distintos loci tiene diferentes efectos sobre los resultados clínicos en el TCHP. En clase I, un menor desajuste molecular del loci HLA-A está asociado con una mejor supervivencia global y un decremento de EICH, por lo tanto, una disminución del riesgo de recaída. Haciendo un análisis multivariable, una mayor discrepancia entre eplets en el loci HLA-B, se asocia con una mayor incidencia de enfermedad aguda injerto contra huésped de grado III y IV. Se desarrolló un algoritmo que define las incompatibilidades de HLA-DPB1 permisivas y no permisivas en base a patrones de reactividad de células T de reacción cruzada. Se sugirió que las incompatibilidades permisivas no darían como resultado respuestas de células T, mientras que se esperaba que se generaran respuestas fuertes de células T contra las no permisivas.(61)

2. Justificación

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas es una terapia curativa utilizada en pacientes que desarrollan neoplasias malignas hematológicas y que no responde a otros tratamientos, a pesar de que la terapia inmunosupresora moderna y las intervenciones de trasplante han mejorado significativamente con el paso de los años, aún existe una tasa alta de complicaciones postrasplante, una de la más prevalente es la EICH la cual ocurre en 20 a 80% de los receptores con 15% de mortalidad (62). Está bien establecido que los pacientes que se someten a un trasplante de células hematopoyéticas de un donante que no es totalmente compatible con el HLA, son más propensos a tener una mayor incidencia de EICH aguda y resultados clínicos más desfavorables.

Para todo centro médico, el bienestar del paciente y la mejoría clínica ante su padecimiento son la prioridad, por lo tanto, si se establecen protocolos que puedan mejorar la elección de los donadores y actuar anticipadamente utilizando los eplets como un factor predictor del grado de la respuesta inmune que va a desarrollar el paciente ante las células hematopoyéticas del donador aumentaría la tasa de éxito de trasplantes hematopoyéticos.

Actualmente el tema de la disparidad molecular en HLA cuantificada por la carga de diferencia de eplets en el trasplante haploidéntico es más estudiado en el trasplante de órganos sólidos, sin embargo, en el TCPH existe información limitada, que representa un área de oportunidad relevante de investigación en el área.

3. Objetivo general

Determinar la importancia de la discordancia entre los eplets del donador y del receptor como factor predictor del resultado del trasplante de células hematopoyéticas.

3.1 Objetivos específicos

1.- Investigar el impacto de la discordancia de eplets de moléculas HLA de clase I sobre la sobrevida general y sobrevida libre de evento de los pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico de células hematopoyéticas.

2.- Investigar el impacto de la discordancia de eplets de moléculas HLA de clase II sobre la sobrevida general y sobrevida libre de evento de los pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico de células hematopoyéticas.

3.- Investigar el impacto de la discordancia de eplets de moléculas HLA de clase I y clase II con el tiempo de recuperación del injerto, plaquetas y neutrófilos, tiempo de hospitalización, con la enfermedad injerto contra huésped, recaída o progresión y muerte.

4. Hipótesis nula

Una mayor concordancia de eplets entre donador y receptor se asocia a una mayor velocidad de recuperación hematopoyética y a una tasa menor de complicaciones postrasplante.

5. Hipótesis alterna

Una mayor concordancia de eplets entre donador y receptor no se asocia a una mayor velocidad de recuperación hematopoyética y a una tasa menor de complicaciones postrasplante.

6. Diseño metodológico

El estudio será retrospectivo, por lo que solo se analizarán las bases de datos con la información clínica completa de los pacientes que entran dentro de la categoría de trasplante haploidéntico y que recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida en el Servicio de Hematología del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en el periodo de mayo del 2019 a febrero del 2024, que cuenten con los estudios de histocompatibilidad completos previos al trasplante. Posteriormente se analizarán los datos recopilados de dichos estudios en la plataforma “HLA Eplet Registry” para determinar la carga de la diferencia entre los eplets del donador y del paciente e investigar si

existe una asociación entre la discordancia de eplets y el desarrollo de eventos clínicos adversos.

6.1 Aspectos éticos

Esta investigación es un estudio retrospectivo, documental, y no habrá intervención directa con el paciente, ni incluirá información personal de los sujetos incluidos, teniendo acceso solo a su expediente clínico para documentar su evolución post-trasplante y los resultados de los estudios de laboratorio pertinentes. El presente estudio corresponde a una *investigación sin riesgo* según la clasificación del riesgo del estudio de acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, (63) el proyecto deberá ser evaluado y, en su caso, aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Confidencialidad de la información

No se incluirá información personal de los pacientes, se les identificará solamente con un número progresivo y el número de registro con el que se realizaron los estudios de rutina dentro del servicio.

6.3 Criterios de Inclusión

- 1.- Pacientes que recibieron un trasplante haploidénticos con un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida.
- 2.- Pacientes que tengan una determinación HLA de alta resolución propia y del donador.

3.- Pacientes que cuenten con el expediente clínico completo.

6.4 Criterios de exclusión:

1.- Pacientes con expediente clínico incompleto

2.- Pacientes que recibieron un trasplante HLA-idéntico.

3.- Pacientes que recibieron un trasplante autólogo.

4.- Falta del estudio de HLA de alta resolución en el donador o el receptor.

6.5 Criterios de eliminación

1.- Pacientes que no tengan información completa en el expediente clínico después del trasplante.

7. Estudios de laboratorio

Los estudios de laboratorio que se van a analizar son los HLA de alta resolución de ambos, donador y receptor, y los antígenos más recientes antes del trasplante del paciente. Estos estudios forman parte del protocolo de trasplante realizado de rutina en el centro, por lo que solo se tomarán los resultados de la base de datos del Servicio de Hematología del Departamento de Medicina Interna.

7.1 Determinación de HLA

También conocidos como antígenos HLA (por sus siglas en inglés human leukocyte antigens), son aquellos antígenos que al ser expresados por las células marcan la diferencia

entre lo propio y lo extraño, por lo tanto si se detectan epítopes pertenecientes al donante incompatibles con el receptor se genera una respuesta inmune, la cual, dependiendo de su intensidad, determina el grado de aceptación o rechazo del injerto. La expresión de estos antígenos en el ser humano está regulada por un conjunto de genes agrupados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MCH, por sus siglas en inglés) que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 humano (segmento 6p21.3). (64)

La clasificación de los antígenos HLA es la siguiente:

- Clase I, se denominan HLA A, B y C, son expresados en las plaquetas y en todas las células del cuerpo, con excepción de los eritrocitos, neuronas y el trofoblasto fetal.
- Clase II, denominados HLA-DP, -DQ y -DR, se encuentran en las células presentadoras de antígenos, como macrófagos, linfocitos B y T, células dendríticas, células epiteliales del timo, células de Langerhans y células de Kupffer. Estas moléculas están más relacionados con inmunorregulación. (65)

Existen varios procesos de tipificación molecular de genes HLA, el método que se utiliza en el Laboratorio de Medicina Molecular e Histocompatibilidad del Servicio de Hematología es el de sondas de oligonucleótidos secuencia específica (SSO), este método emplea la tecnología Luminex®, por medio de la cual el ADN extraído del paciente se amplifica por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un primer específico. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE). (Figura 7)

El producto de PCR se desnaturaliza y se vuelve a hibridar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas marcadas de forma fluorescente. Un

analizador de flujo identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera, generando una lectura de intensidad media de fluorescencia (MIF).

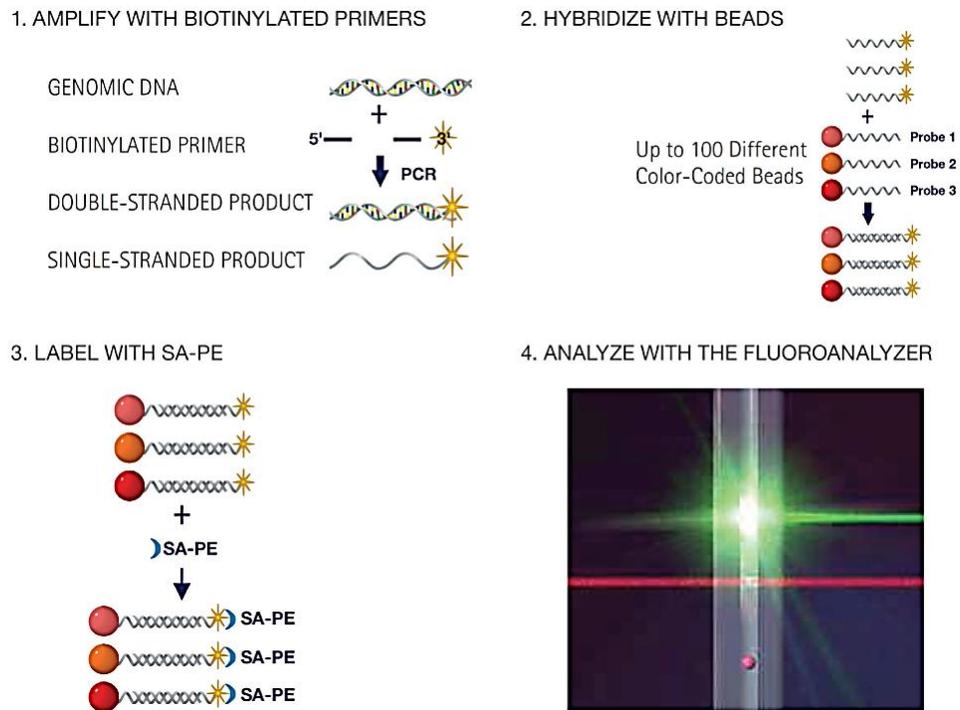


Figura 7.-Esquema del proceso de tipificación de HLA por sondas de oligonucleótidos secuencia específica. (Fuente: Sitio oficial de IMMCORE®)

Las sondas que permiten la tipificación de los genes HLA clase I amplifican y reconocen exones 2 y 3, sin embargo estos kits cuentan con una resolución extendida, ya que también detectan algunos polimorfismos los exones 4 y 5 correspondientes a locus de HLA A y B. El locus C de Clase I amplifica los exones 4, 5, 6 y 7. El producto DRB1 de Clase II solo amplifica y apunta al exón 2, por lo cual la diferencia es el uso de más microesferas magnéticas. (66)

7.2 Anticuerpos anti-HLA del receptor específicos contra el donador.

El desarrollo de DSA se da tras el reconocimiento de HLA no propio por el sistema inmunológico del receptor y genera diversas complicaciones importantes en el trasplante. Hay estudios reportados que asocian la presencia de estos anticuerpos con una supervivencia inferior del injerto, menor calidad de vida del paciente, por consecuente mayores costos de atención médica.

El paso inicial en la generación de anticuerpos DSA anti-HLA es la exposición a un péptido HLA ajeno que se reconoce por un linfocito B; este proceso de sensibilización puede ocurrir por diversas situaciones de exposición antigénica como lo son el embarazo, transfusiones de sangre, trasplantes, etc. Entre más sensibilizado esté el paciente existe una mayor probabilidad que genere DSA, siendo el caso de la mayoría de los pacientes con enfermedades hematológicas, siendo trasfundidos múltiples ocasiones antes de recibir el trasplante, por lo tanto, aumenta la posibilidad de rechazo del injerto o de EICH. (67)

El método utilizado para esta prueba de histocompatibilidad es el ensayo de microesferas de Luminex®. El principio de la prueba consiste en incubar la muestra de suero del paciente con microesferas magnéticas, cada una estas microesferas esta recubierta de moléculas de un solo antígeno HLA, por lo que si esta presente el anticuerpo este se pagara a la microesfera durante la incubación. Posteriormente se añade un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina, para que la previa unión antígeno-anticuerpo pueda ser detectada por el software del equipo (Figura 8).

La MFI de cada microesfera es comparada con la señal emitida por el control negativo, determinando un valor positivo si esta diferencia es mayor o igual a 1000 MFI.

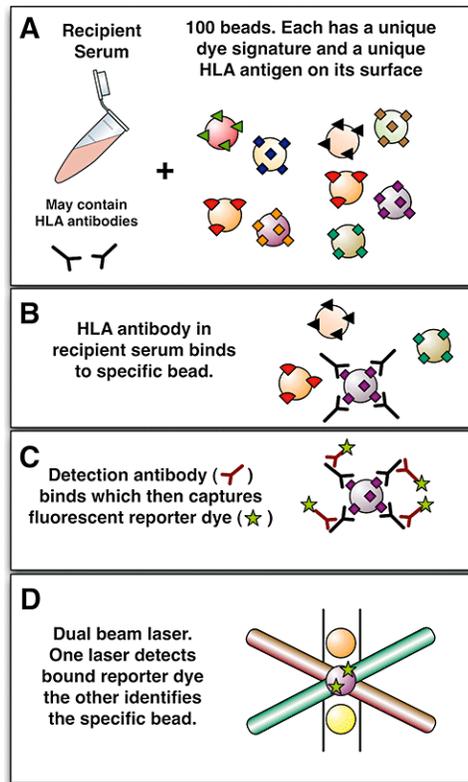


Figura 8: Esquema de la detección de DSA por perlas de Luminex®. Tomada de Mulley y Kanellis, 2010

8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el software IBM SPSS Statistics para Windows v. 22.0. Utilizando la regresión de riesgos proporcionales de Cox univariada y multivariada se determinó la incidencia acumulada de los principales eventos identificados, el impacto de las variables, los scores de epítopes (SE) y el grado de discordancia entre eplets (MM) en las tasas de supervivencia.

Se determinará la incidencia acumulada de los principales eventos identificados en el análisis de Cox. Los SE y los MM se analizaron como variables continuas y variables categóricas. Para comparaciones múltiples, se consideró estadísticamente significativos valores de P <0.05.

9. Resultados

Para abordar el impacto de la disparidad de los eplets en los TCPH se reclutaron los datos de diversas variables de los pacientes, para así analizar los siguientes puntos: la incidencia de recaída, la supervivencia general (SG), supervivencia libre de evento (SLE), la EICH aguda y crónica, diagnóstico y clasificación utilizando criterios estándar (68,69), tiempo de recuperación de neutrófilos y plaquetas y fracaso del injerto en los casos reportados. La SG se definió como el tiempo desde el día 0 del TCPH hasta el momento del último seguimiento o la muerte por cualquier causa. La SLE fue definida como el tiempo desde el día 0 del TCPH hasta la recaída o la muerte por una causa distinta a la recaída de la enfermedad. La recaída se definió en función de la evidencia morfológica y clínica de la actividad de la enfermedad. El tiempo de recuperación del injerto de neutrófilos se definió como un recuento mayor de 500 células por microlitro en tres días consecutivos, de igual manera, el tiempo de prendimiento de plaquetas se definió como un recuento de plaquetas mayor o igual a 20 000 por microlitro, manteniendo los valores durante tres días, sin necesidad de soporte transfusional. El fracaso primario del injerto fue definido como quimerismo indetectable (<5%) del donante en pruebas repetidas en ausencia de recaída de la enfermedad que conduzca a la muerte o retrasplante. El estadio de la enfermedad antes del trasplante se definió en base a criterios clínicos y basándose en la enfermedad mínima residual del paciente.

Las características del paciente y del TCPH se resumieron mediante estadística descriptiva. Las variables categóricas se informaron como frecuencia y porcentaje; variables continuas, como mediana y rango. La puntuación MM también se analizó en cuartiles en análisis exploratorios. El análisis de regresión multivariable se basó en el modelo de riesgos

proporcionales de Cox. Todas las variables clínicas se probaron para confirmar el supuesto de riesgos proporcionales, y aquellas que violaban el supuesto de riesgos proporcionales se ajustaron mediante estratificación.

La mediana de edad de la cohorte de estudio fue de 20 años (rango de 1 a 70 años). Las características de los pacientes y donadores se resumen en la tabla 2. El diagnóstico previo al TCPH fue leucemia linfoblástica aguda en 47 pacientes (41%), leucemia mieloide aguda en 34 (30%), anemia aplásica en 13 (11%), linfoma hodking en 9 (8%), síndrome mielodisplásico en 2 (2%) y algunos otros diagnósticos como leucemia mielomonocítica crónica, linfocitosis hemofagocítica, micosis fungoide, histiocitosis de células de Langerhans; mucopolisacaridosis, linfocitosis hemofagocítica; linfoma cutáneo de células T, y anemia Fanconi que solo corresponde a 1 paciente cada diagnóstico. (1%).

La mediana de duración del seguimiento en los pacientes supervivientes fue de 7 meses (rango, 1 a 52 meses). Treinta y dos (28%) fallecieron y 7 pacientes (6.1%) presentaron recaída en el momento del último seguimiento. Setenta y seis pacientes (66.7%) desarrollaron EICH agudo (cualquier grado) y 26 (22,8%) desarrollaron EICH crónico. La mediana del tiempo hasta el prendimiento de neutrófilos fue de 14 días (rango, 10 a 24 días), la mediana del tiempo hasta el prendimiento plaquetario fue de 14 días (rango, 10 a 29 días). Cinco pacientes (4.3%) tuvieron fracaso del injerto. (Tabla 3).

Tabla 2. Principales características sociodemográficas de 114 pacientes que recibieron un trasplante periférico haploidéntico de progenitores hematopoyéticos en un centro académico en el noreste de México.

Variable	n=114
Edad del receptor, años, mediana (rango)	20 (1-70)
Diagnósticos, n (%)	
LLA	47 (41.2)
LMA	34 (29.8)
LH	9 (7.9)
LNH	3 (2.6)
AA	13 (11.4)
SMD	2 (1.8)
HCL	1 (0.9)
MPS I	1 (0.9)
LHH	1 (0.9)
CTCL	1 (0.9)
AF	1 (0.9)
LMC	1 (0.9)
Edad del donador, años, mediana (rango)	33 (4-69)
Sexo receptor, n (%)	
Hombre	71 (62.3)
Mujer	43 (37.7)
Parentesco donador/receptor, n (%)	
Madre	20 (17.5)
Padre	30 (26.3)
Hija	4 (3.5)
Hijo	7 (6.1)
Hermana	19 (16.7)
Hermano	34 (29.8)
Compatibilidad de sexo donador/receptor, n (%)	
Hombre/hombre	49 (43)
Hombre/mujer	21 (18.4)
Mujer/hombre	22 (19.3)
Mujer/mujer	22 (19.3)
Incompatibilidad ABO, n (%)	25 (21.9)
Incompatibilidad ABO mayor	13 (11.4)
Incompatibilidad ABO menor	12 (10.5)
Seroestatus IgG CMV donador/receptor, n (%)	
Positivo/positivo	65 (57)
Positivo/negativo	18 (15.8)
Negativo/positivo	22 (19.3)
Negativo/negativo	9 (7.9)

Abreviaturas: LLA, leucemia linfoblástica aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; LH, linfoma Hodgkin; LNH, linfoma no Hodgkin; AA, anemia aplásica; SMD, síndrome mielodisplásico; HCL, histiocitosis de células de Langerhans; MPS I, mucopolisacaridosis tipo I; LHH, linfocitosis hemofagocítica; CTCL, linfoma cutáneo de células T; AF, anemia ferropénica; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; CMV, citomegalovirus.

Tabla 3. Datos clínicos y evolución.	
Variable	n=114
Prendimiento en días, mediana (rango)	
Mieloide	14 (10-24)
Plaquetario	14 (10-29)
Requerimientos transfusionales, mediana (rango)	
Concentrado eritrocitario	2 (1-43)
Concentrado plaquetario	9 (2-119)
Aféresis plaquetaria	2 (1-21)
Polis transfundidos, n (%)*	
Si	32 (28.1)
No	82 (71.9)
admisión hospitalaria, n (%)	
	80 (70.1)
Días de hospitalización, mediana (rango)	
	13.5 (1-90)
EICHa, n (%)	
Presente	76 (66.7)
Ausente	38 (33.3)
Grado de EICHa, n (%)	
0-2	59 (77.6)
3-4	17 (22.4)
EICHc, n (%)	
Presente	26 (22.8)
Ausente	88 (77.2)
Infecciones, n (%)	
	53 (46.5)
Seguimiento en meses, mediana (rango)	
	7 (1-52)
* Se tomó en cuenta como politransfundidos aquellos que recibieron ≥ 20 transfusiones.	
Abreviaturas: EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica.	

La supervivencia global a los 2 años fue del 64.9 %. La sobrevida libre de progresión a los 2 años fue del 54.5%. (Figura 7-A,B). En el análisis univariado la variable con mayor impacto ($p = 0.002$) en la supervivencia del paciente fue la necesidad de requerimientos transfusionales de hemocomponentes (Figura 8). Se consideró como politransfundidos aquellos pacientes que hayan requerido ≥ 20 transfusiones en el periodo descrito. La supervivencia global de los pacientes que no han sido poli transfundidos fue del 71.8% a diferencia de los que recibieron más de 20 transfusiones con una sobrevida del 46.5%.

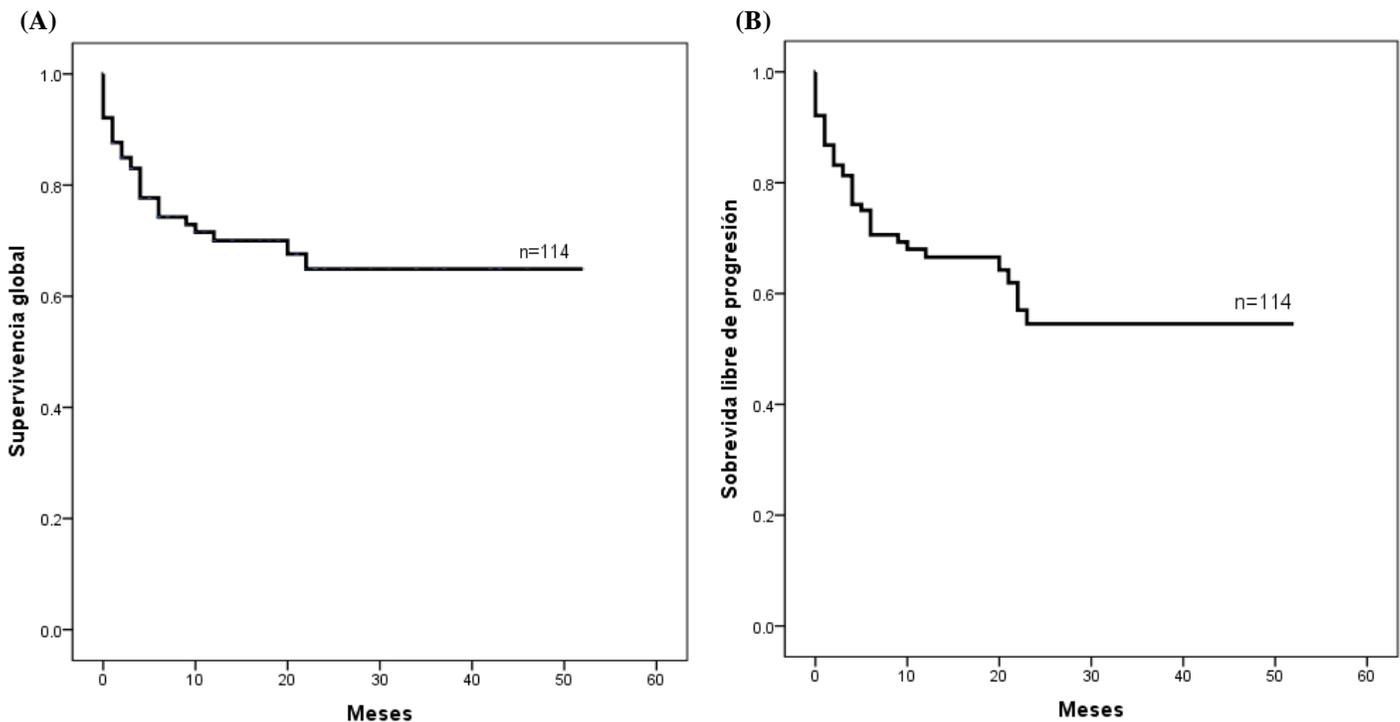


Figura 7. (A) Supervivencia global y (B) sobrevida libre de progresión a 24 meses de 114 pacientes que recibieron un trasplante periférico haploidéntico de progenitores hematopoyéticos en el periodo de 2019-2024.

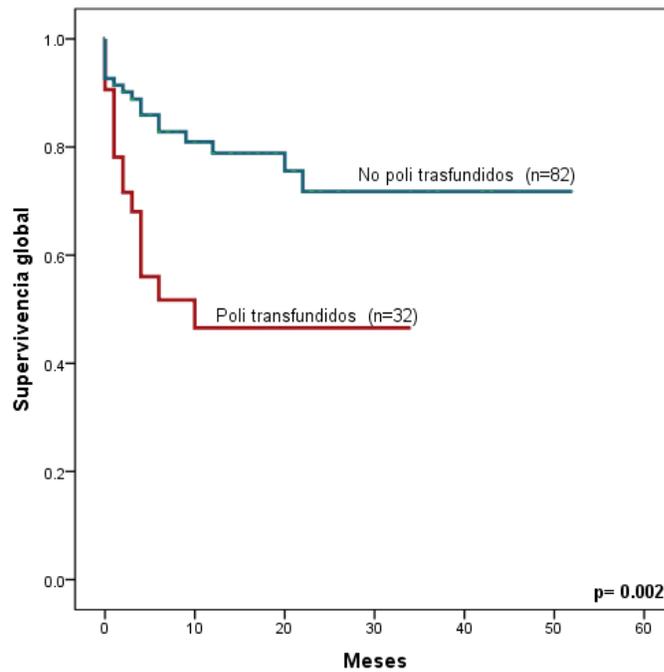


Figura 8. Supervivencia global de 114 paciente en base a requerimientos transfusionales de hemocomponentes.

Se cuantificaron los eplets discordantes de HLA de clase I (tabla 4) y los de HLA de clase II (tabla 5). Se separaron en 5 grupos, dependiendo del número de discordancias para realizar el análisis. Encontrando que la mayor parte de los pacientes tiene de 0-10 discrepancias en cada locus.

Tabla 4. Discordancia de Eplets entre 114 pacientes y sus donadores.	
Clase I MM, n (%)	
0-5	15 (13.2)
6-10	6 (5.3)
11-15	27 (23.7)
16-20	24 (21.1)
>20	42 (36.8)
Eplets MM Locus A, n (%)	
0-5	55 (48.2)
6-10	28 (24.6)
11-15	19 (16.7)
16-20	11 (9.6)
>20	1 (0.9)
Eplets MM Locus B, n (%)	
0-5	56 (49.1)
6-10	40 (35.1)
11-15	14 (12.3)
16-20	3 (2.6)
>20	1 (0.9)
Eplets MM Locus C, n (%)	
0-5	57 (50)
6-10	45 (39.5)
11-15	12 (10.5)
16-20	0
>20	0
Abreviatura: MM, mis match.	

Tabla 5. Discordancia de Eplets entre 114 pacientes y sus donadores.	
Clase II MM, n (%)	
0-5	38 (33.3)
6-10	38 (33.3)
11-15	20 (17.5)
16-20	15 (13.2)
>20	3 (2.6)
Abreviatura: MM, mis match.	

En el análisis estadístico univariado en las moléculas de HLA clase I, se observa que aquellos pacientes con una discordancia de Eplets ≥ 11 tuvieron una menor sobrevida que los que tuvieron ≤ 10 , con un valor de significancia del 0.049. Los que tuvieron discordancia en ≥ 20 de Eplets tuvieron una sobrevida del 54.4% a 2 años después del trasplante, los que tuvieron discordancia en 11 a 15 Eplets lograron una sobrevida del 57.3% y los que tuvieron 16 a 20 Eplets discordantes sobrevivieron el 66.9%, (Figura 9A).

En cuanto a las moléculas de HLA clase II, podemos observar que no hubo diferencia significativa ($p= 0.226$) estadísticamente hablando entre discordancia de Eplets y la sobrevida. Un hallazgo particularmente llamativo es que los pacientes que tuvieron discordancia de ≥ 6 a ≤ 15 tuvieron una menor sobrevida que aquellos que tuvieron igual o más de 20 Eplets discordantes. Los pacientes con mejor sobrevida a 2 años (81.9%) fueron los que tuvieron discordancia en menos de 5 Eplets, mientras que los que tuvieron discordancia de 11 a 15 Eplets tuvieron la menor sobrevida de toda la cohorte (51.6%). (Figura 9B); estos datos deben interpretarse con cautela debido al número reducido de pacientes en el grupo de >20 MM con solo 3.

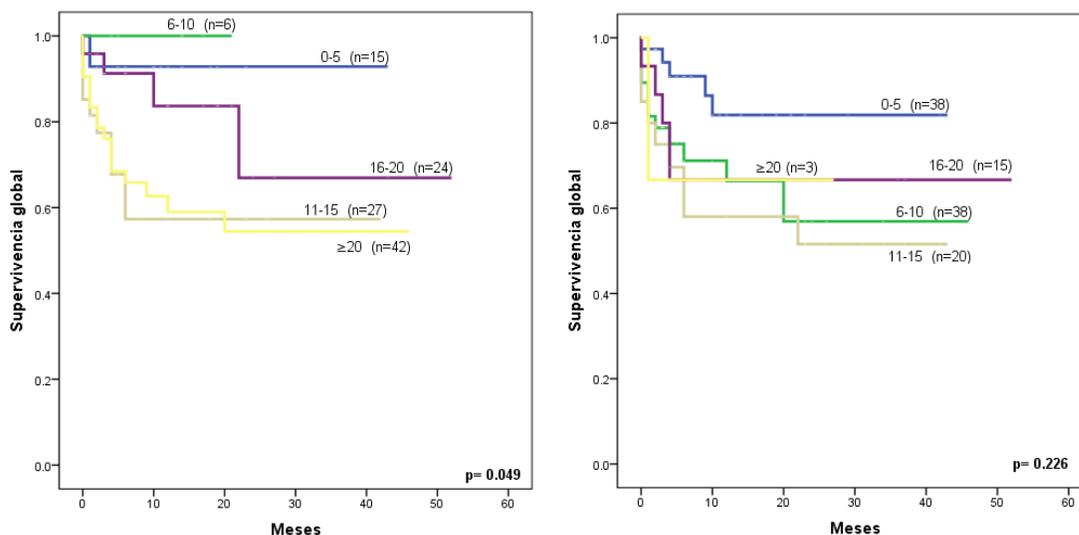


Figura 9. Supervivencia global del total de la cohorte en base al número de discordancia de eplets en moléculas HLA clase I (A) y moléculas HLA clase II (B).

En el análisis estadístico incluyendo las variables clínicas de interés se encontró una asociación significativa entre la SG y la EICHa en el análisis uni y multivariado, $p= 0.033$ y $p= 0.018$, respectivamente. En cuanto a la SLE, los valores fueron $p= 0.018$ en el univariado, y $p= 0.007$, en el multivariado. Con relación a la influencia de las infecciones en la SG, se encontró una asociación significativa con un mayor número de MM, $p=0.014$ en el análisis univariado y $p= 0.016$ en el multivariado. Los pacientes poli transfundidos tuvieron una menor SG, con $p=0.004$, sin mantener significado en el multivariado, $p=0.097$; estos datos se muestran en la Tabla 6.

Al analizar el número de eplets discordantes entre donador y receptor (MM, por sus siglas en inglés Mismatch) (tabla 7) y su relación con la SG se observó que los MM del locus B se asociaron significativamente a la misma en el análisis univariado, $p=0.28$, sin embargo después del ajuste multivariado no se retuvo la significancia, $p=0.055$; es importante resaltar que este valor está cerca del punto de corte para ser significativo, lo que sugiere que con un número mayor de pacientes analizados el número de MM en el locus B de clase I pudiera retener su significado estadístico en el análisis multivariado.

En contraste con la SG, en la SLE si se encontró una asociación significativa con la carga de discrepancias de eplets en el locus B, $p=0.034$, misma que se mantuvo significativa en el análisis multivariado, $p= 0.013$.

Tabla 6. Hazard ratios (HR) para Muerte (Sobrevida Global, SG) y (Sobrevida Libre de Eventos, SLE) según el análisis de regresión proporcional de Cox y su asociación con características epidemiológicas y clínicas de pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico.

	n	SG				SLE			
		Univariado		Multivariado		Univariado		Multivariado	
		HR	(95% CI)	HR	p	HR	p	HR	p
Género del receptor	114	0.912	0.799			1.014	0.966		
Masculino	71	(0.45-1.84)				(0.53-1.93)			
Femenino	43								
Edad	114	1.434	0.062			1.412	.052		
1-20	58	(0.98-2.09)				(0.99-1.99)			
21-40	44								
41-60	7								
>60	5								
Compatibilidad de género del donador/receptor	114	0.979	0.894			0.982	0.899		
MM	49	(0.72-1.32)				(0.74-1.29)			
MF	21								
FM	22								
FF	22								
Incompatibilidad ABO	25	0.443	0.239			0.502	0.261		
Menor	12	(0.11-1.71)				(0.15-1.67)			
Mayor	13								
Poli-trasfusiones	114	2.804	0.004	1.871	0.097	2.813	0.001	2.051	.035
<20	82	(1.39-5.63)		(0.89-3.92)		(1.49-5.30)		(1.05-3.99)	
>20	32								
EICHa	114	0.466	0.033	2.452	0.018	0.463	0.018	2.532	0.007
Presente	76	(0.23-0.94)		(1.16-5.16)		(0.24-0.87)		(1.29-4.94)	
Ausente	38								
Infecciones	114	2.5 (1.2-5.19)	0.014	0.391	0.016	2.083	.026	0.452	0.021
Presentes	53			(0.18-0.83)		(1.09-3.97)		(0.23-0.88)	
Ausentes	61								
CMV-IgG donador/receptor	114	0.982	0.915			0.971	0.855		
(+)(+)	65	(0.69-1.38)				(0.71-1.32)			
(+)(-)	18								
(-)(+)	22								
(-)(-)	9								

Tabla 7. Hazard ratios (HR) para Sobrevida Global, (SG) y Sobrevida Libre de Evento, (SLE) según el análisis de regresión proporcional de Cox y su asociación con el número de eplets discordantes (MM) en los antígenos HLA de Clase I y Clase II de pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico.

	n	SG			SLE			p
		Univariado		Multivariado	Univariado		Multivariado	
		HR	(95% CI)	HR	HR	(95% CI)	HR	
MM eplets locus A	114	1.169	0.322		1.173	0.261		
		(0.85-1.59)			(0.88-1.54)			
0-5	55							
6-10	28							
11-15	19							
16-20	11							
>20	1							
MM eplets locus B	114	1.488	0.028	1.576	0.055	1.426	0.034	1.605
		(1.04-2.11)		(0.99-2.5)		(1.02-1.97)		(1.10-2.32)
0-5	56							
6-10	40							
11-15	14							
16-20	3							
>20	1							
MM eplets locus C	114	0.988	0.964		0.845	0.498		
		(0.58-1.65)			(0.51-1.37)			
0-5	57							
6-10	45							
11-15	12							
16-20	0							
>20	0							
MM eplets locus DRB1	114	1.263	0.111		1.078	0.584		
		(0.94-1.68)			(0.82-1.41)			
0-5	38							
6-10	38							
11-15	20							
16-20	15							
>20	3							
MM HLA Clase-I		1.355	0.049	1.11	0.539	1.297	0.057	
		(1-1.83)		(0.79-1.54)		(0.99-1.69)		
0-5	15							
6-10	6							
11-15	27							
16-20	24							
>20	42							
MM HLA Clase-II		1.263	0.111		1.078	0.584		
		(0.94-1.68)			(0.82-1.41)			
0-5	38							
6-10	38							
11-15	20							
16-20	15							
>20	3							

10. Discusión

Comprender el riesgo o beneficio asociado con la aloinmunidad debido a la incompatibilidad en un haplotipo HLA es esencial para la selección de donadores y la estratificación del riesgo del TCHP. En este estudio se evaluó la asociación entre las discordancias de eplets de antígenos del sistema HLA entre donador-receptor y los resultados clínicos, en pacientes que recibieron un TCPH haploidéntico basado en acondicionamiento de intensidad reducida.

Los objetivos que se establecieron al inicio de la investigación fueron evaluar el impacto de la discordancia de eplets de moléculas HLA de clase I y clase II en el tiempo de recuperación del injerto, plaquetas y neutrófilos, tiempo de hospitalización, recaída o progresión y muerte, e indagar el impacto de la discordancia de eplets de moléculas HLA de clase I y clase II en la sobrevida general y la sobrevida libre de evento después del TCPH.

Las variables que disminuyeron la SG y se asociaron a la recaída fueron las infecciones, la EICH aguda, y los requerimientos transfusionales mayores a 20 episodios, incluyendo la transfusión de paquetes de glóbulos rojos y de plaquetas obtenidas por aféresis o concentrados plaquetarios.

Al evaluar las discordancias de los eplets de clase I se encontró que entre los MM del locus HLA-B existió asociación con la SLE, no así con la SG; esto posiblemente se debió al tamaño de muestra relativamente pequeño. Tanto Iwasaki M et al. (70) y nuestro estudio mostró una tendencia a un mayor riesgo de EICH aguda en presencia de incompatibilidad en antígenos HLA de clase I. Estudios anteriores han encontrado que las discrepancias entre antígenos HLA-B afectan significativamente los resultados del trasplante, como en una cohorte japonesa en la que se estudiaron 779 pacientes con enfermedades hematológicas (71). En dicho reporte, Kanda et al. demostraron que una falta de compatibilidad en las moléculas

HLA-B contribuyó en gran medida a la baja tasa de supervivencia en pacientes de riesgo estándar, se asoció significativamente con un tiempo para injerto de neutrófilos prolongado, y a una mayor incidencia de mortalidad relacionada al trasplante.

A diferencia de lo encontrado en nuestro estudio, en el que se documentó una menor SLE en receptores con discordancia de eplets en el locus B, Duquesnoy et al. no encontraron una relación entre la coincidencia de tripletes HLA de clase I definida por HLAMatchmaker y los resultados clínicos en una cohorte de 744 pacientes que recibieron un TCHP alogénico no relacionado (72). Cabe destacar que el presente estudio difiere del de Duquesnoy et al. en varios aspectos. Ellos utilizaron la primera generación del software HLAMatchmaker, que solo consideró secuencias lineales de aminoácidos como posibles epítopes inmunogénicos, mientras que en el presente estudio utilizamos HLA Eplet Registry, que también considera secuencias de aminoácidos discontinuas, además de las secuencias lineales, para formar un epítope.

En relación con la discordancia de eplets de HLA clase II, en comparación con un estudio previo que mostró una asociación entre la incompatibilidad del antígeno HLA-DRB1 y un menor riesgo de recaída (HR, 0,65;P = .04) (73), en nuestro estudio no se encontró asociación entre los MM y la sobrevida general y/o la sobrevida libre de evento. Tampoco se asoció a una mayor o menor recuperación mieloide y plaquetaria, mientras que en el estudio de Kasamon et al. se encontró que un mayor MM de clase II se asoció con un retraso en el tiempo de prendimiento del injerto tanto de neutrófilos como de plaquetas; en ese estudio la principal asociación fue con la discordancia en DQB1. (74) En nuestro estudio no se incluyó el análisis de la carga de MM del locus HLA-DQ debido a que no se determina de rutina en nuestro centro.

Resulta interesante señalar que las distribuciones de frecuencia alélica y de haplotipos del sistema HLA en la población japonesa, en la que se han realizado la mayoría de los estudios mencionados, son diferentes de las de Europa y el Pacífico (74), y se podría asumir que también difieren de manera importante de las poblaciones de Latinoamérica. Datos del CIBMTR muestran incidencias más bajas de EICH aguda de grado III-IV y de recaída en la población japonesa que en los caucásicos estadounidenses (75), lo que muestra que las características étnicas y la diversidad de prácticas clínicas pueden generar discrepancias en los resultados. Adicionalmente, es necesario complementar con herramientas de predicción de reconocimiento indirecto, donde los aloantígenos, incluidos los péptidos derivados del HLA del injerto se internalizan, procesan y presentan en la superficie de la APC del receptor, provocando así un rechazo crónico mediado por células T. En general, la importancia clínica e inmunológica de la discordancia de eplets en el TCHP se encuentra en su fase inicial, por lo que aún no se comprende completamente y existen variaciones en los resultados encontrados en los trabajos reportados y con los de nuestra investigación.

Entre las limitaciones del presente estudio se incluyen un tamaño de muestra reducido, que limitó el análisis estadístico, su diseño retrospectivo, y el hecho de que en nuestros pacientes solo se contó con la tipificación HLA de los loci A, B, C y DRB1, ya que en este centro no se tipifican de manera rutinaria los loci DQ Y DP por limitaciones presupuestales.

La prevalencia de DSA en el TCPH haploidéntico en nuestro centro es del 24% (76), probablemente debido al embarazo y al historial de transfusiones, y la presencia de DSA se ha asociado con un riesgo significativamente mayor de fracaso y/o retraso en el injerto (77). Esta variable no fue incluida en el trabajo, es probable que un mayor número de MM se asocie con una mayor incidencia de DSA, lo que podría ser el factor relevante para un retraso del injerto observado en algunos pacientes y deberá ser explorado en las etapas subsecuentes

de este esfuerzo por documentar el impacto de la discordancia de eplets en las tasas de éxito del TCPH.

La hipótesis de este trabajo fue que una mayor concordancia de eplets entre donador y receptor está asociada a una mayor velocidad de recuperación hematopoyética, a una tasa menor de complicaciones postrasplante, y una mayor supervivencia, encontrando que una mayor concordancia de eplets en el locus B, el más polimórfico, se asoció de manera significativa.

11. Conclusión

La evaluación de la discordancia de eplets es una estrategia en evolución para mejorar la selección de donadores y predecir el resultado clínico del TCPH haploidéntico. El análisis del grado de discordancia también puede permitir una mejor detección del impacto de la disparidad HLA en los resultados del trasplante haploidéntico. Se documentó una asociación entre la discordancia de eplets del locus B de la clase I y la SLE. Finalmente, la determinación de la carga de discordancia de eplets tiene el potencial de ser un biomarcador más sofisticado del grado de compatibilidad HLA en el trasplante alogénico que permita una mejor selección de las parejas donador-receptor.

10. Referencias

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;15:1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
3. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354:1813–26. doi: 10.1056/NEJMra052638.
4. Locatelli F, Merli P, Pagliara D, et al. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after $\alpha\beta$ T-cell and B-cell depletion. *Blood*. 2017;130:677-685. doi: 10.1182/blood-2017-04-779769.
5. Kreidieh F, Abou Dalle I, Moukalled N, et al. Relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: an overview of prevention and treatment. *Int J Hematol*. 2022;116:330-340. doi: 10.1007/s12185-022-03416-7.
6. Hahn T, McCarthy PL Jr, Hassebroek A, et al. Significant improvement in survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation during a period of significantly increased use, older recipient age, and use of unrelated donors. *J Clin Oncol*. 2013;31:2437-49. doi: 10.1200/JCO.2012.46.6193.
7. Dehn J, Spellman S, Hurley CK, et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR. *Blood*. 2019;12:924-934. doi: 10.1182/blood.2019001212.
- 8.- Gragert L, Eapen M, Williams E, et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med*. 2014;371:339-48. doi: 10.1056/NEJMs1311707.
- 9.- Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, et al. Japan Marrow Donor Program. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. 2015;125:1189-97. doi: 10.1182/blood-2014-10-604785.
- 10.- Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:641–50. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.03.005
- 11.- Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 2006;38:291–7. doi: 10.1038/sj.bmt.1705445

- 12.- Berrien-Elliott MM, Jacobs MT, Fehniger TA. Allogeneic natural killer cell therapy. *Blood*. 2023;141:856-868. doi: 10.1182/blood.2022016200.
- 13.- Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft- versus-tumor, and graftversus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:765–76. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.01.019
- 14.- Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*. 2010;11:321–7. doi: 10.1038/ni.1849
- 15.- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295:2097–100. doi: 10.1126/science.1068440
- 16.- Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110:433–40. doi: 10.1182/blood-2006-07-038687
- 17.- Van den Brink MR, Velardi E, Perales MA. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;215–9. doi: 10.1182/asheducation-2015.1.215
- 18.- Turcotte LM, Cao Q, Cooley SA, et al. Monocyte subpopulation recovery as predictors of hematopoietic cell transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25:883–90. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.01.003
- 19.- Pei X, Zhao X, Wang Y, et al. Comparison of reference values for immune recovery between event-free patients receiving haploidentical allografts and those receiving human leukocyte antigen-matched sibling donor allografts. *Front Med*. 2018;12:153–63. doi: 10.1007/s11684-017-0548-1
- 20.- Oltolini C, Greco R, Galli L, et al. Infections after Allogeneic Transplant with Post-Transplant Cyclophosphamide: Impact of Donor HLA Matching. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26:1179-1188. doi: 10.1016/j.bbmt.2020.01.013.
- 21.- Chang Y-J, Zhao X-Y, Huo M-R, et al. Immune reconstitution following unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical transplantation compared with HLA-identical sibling transplantation. *J Clin Immunol*. 2012;32:268–80. doi: 10.1007/s10875-011-9630-7
- 22.- Bertaina A, Zecca M, Buldini B, et al. Unrelated donor vs HLA-haploidentical alpha/beta T-cell- and B-cell-depleted HSCT in children with acute leukemia. *Blood*. 2018;132:2594–607. doi: 10.1182/blood-2018-07-861575
- 23.- Russo A, Oliveira G, Berglund S, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood*. 2018;131:247–62. doi: 10.1182/blood-2017-05-780668

- 24.- Chang Y-J, Zhao X-Y, Huo M-R, et al. Immune reconstitution following unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical transplantation compared with HLA-identical sibling transplantation. *J Clin Immunol*. 2012;32:268–80. doi: 10.1007/s10875-011-9630-7
- 25.- Kim DH, Sohn SK, Won DI, et al. Rapid helper T-cell recovery above $200 \times 10^6/l$ at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:1119–28. doi: 10.1038/sj.bmt.1705381
- 26.- Roberto A, Castagna L, Gandolfi S, et al. B-cell reconstitution recapitulates B-cell lymphopoiesis following haploidentical BM transplantation and post-transplant CY. *Bone Marrow Transplant*. 2014;50:317. doi: 10.1038/bmt.2014.266
- 27.- Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, et al. Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: A prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J Hematol Oncol*. 2015;8:1-10. doi:10.1186/s13045-015-0182-9
- 28.- Ciurea SO, de Lima M, Cano P, Korbling M, Giralt S, Shpall EJ, Wang X, Thall PF, Champlin RE, Fernandez-Vina M. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009;88:1019-24. doi: 10.1097/TP.0b013e3181b9d710.
- 29.- Sano H, Mochizuki K, Kobayashi S, et al. Two Occurrences of Leukemia Relapse Due to Mismatched HLA Loss After Haploidentical Stem Cell Transplantation From Different Family Donors With KIR Ligand Mismatch. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2020;42:e104-e106. doi: 10.1097/MPH.0000000000001443.
- 30.- Crucitti L, Crocchiolo R, Toffalori C, et al. Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2015;29:1143–52. doi: 10.1038/leu.2014.314
- 31.- Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med*. 2019;25:603–11. doi: 10.1038/s41591-019-0400-z
- 32.- Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E, et al. Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nat Commun*. 2019;10:1065. doi: 10.1038/s41467-019-08871-1
33. Nagai N, Tsuda K, Shimada M, Matsuo S. The Role of Clinical Laboratory Technicians at Bone Marrow Transplantation : Blood Test. *Rinsho Byori*. 2017;65:339-344.
34. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, et al. Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:1392-8. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.05.001.

35. Rohan VS, Pilch N, Moussa O, et al. Virtual Crossmatching in Kidney Transplantation: The Wait Is Over. *J Am Coll Surg.* 2020;230:373-379. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2019.12.031.
36. Battipaglia G, Ruggeri A, Labopin M, et.al Refined graft-versus-host disease/relapse-free survival in transplant from HLA-identical related or unrelated donors in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2018;5310:1295-1303. doi: 10.1038/s41409-018-0169-6.
- 37.- Hurley CK. Naming HLA diversity: A review of HLA nomenclature. *Hum Immunol.* 2021;82:457-465. doi: 10.1016/j.humimm.2020.03.005.
- 38.- Gebel HM, Norin AJ, Bray RA. From antigens to eplets: The evolution of HLA. *Hum Immunol.* 2022;83:197-198. doi: 10.1016/j.humimm.2022.01.012.
- 39.- Tambur AR, Claas FHJ. HLA epitopes as viewed by antibodies: what is it all about? *J Am Soc Transplant Surg.* 2015;15: 1148-1154. doi:10.1111/ajt.13192
- 40.- Duquesnoy RJ, Marrari M, Tambur AR, et al. First report on the antibody verification of HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP epitopes recorded in the HLA epitope registry. *Hum Immunol.* 2014;75:1097-1103. doi:10.1016/j.humimm.2014.09.012
- 41.- Kubal CA, Mangus R, Ekser B, et al. Class II human leukocyte antigen epitope mismatch predicts de novo donor-specific antibody formation after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2018;24:1101-1108. doi:10.1002/lt.25286
42. Wiebe C, Rush DN, Nevins TE, et al. Class II eplet mismatch modulates tacrolimus trough levels required to prevent donorspecific antibody development. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28: 3353-3362. doi:10.1681/ASN.201703028720
- 43.- Tassone G, Santis DD, Vukovic I, et. al. Different eplet software programs give discordant and incorrect results: an analysis of HLAMatchmaker vs Fusion Matchmaker Eplet calling software. *HLA.* 2020;96:52-63. doi:10.1111/tan.13897
- 44.- Duquesnoy RJ, Marrari M, Tambur AR, et al. First report on the antibody verification of HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP epitopes recorded in the HLA epitope registry. *Hum Immunol.* 2014;75:1097-1103. doi:10.1016/j.humimm.2014.09.012
- 45.- Zou J, Ciurea SO, Kongtim P, et al. Molecular disparity in human leukocyte antigens is associated with outcomes in haploidentical stem cell transplantation. *Blood Adv.* 2020;4:3474-3485. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000797.
- 46.- El-Awar NR, Akaza T, Terasaki PI, et al. Human leukocyte antigen class I epitopes: update to 103 total epitopes, including the C locus. *Transplantation.* 2007;84:532-40. doi: 10.1097/01.tp.0000278721.97037.
- 47.- Tambur AR, Leventhal JR, Friedewald JJ, et al. The complexity of human leukocyte antigen (HLA)-DQ antibodies and its effect on virtual crossmatching. *Transplantation.* 2010;90:1117-24. doi: 10.1097/TP.0b013e3181f89c6d.

- 48.- Sousa LC, Filho HL, Von Glehn Cde Q, et al. EpHLA: an innovative and user-friendly software automating the HLA Matchmaker algorithm for antibody analysis. *Transpl Immunol.* 2011;25:210-6. doi: 10.1016/j.trim.2011.08.008.
- 49.- Duquesnoy RJ, Marrari M, da M Sousa LC, de M Barroso JR, de S U Aita KM, da Silva AS, do Monte SJ. 16th IHIW: a website for antibody-defined HLA epitope Registry. *Int J Immunogenet.* 2013;40:54-9. doi: 10.1111/iji.12017.
50. Takehiko S, Takeo J, Yasuo M, et al. Effect of Matching of Class I HLA Alleles on Clinical Outcome After transplantation of Hematopoietic Stem Cells From an Unrelated Donor. *N Engl J Med* 1998;99:1177–85. doi: 10.1056/NEJM199810223391701
- 51.- Lazaryan A, Wang T, Spellman SR, et al. Human Leukocyte Antigen Supertype Matching After Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation With 7/8 Matched Unrelated Donor allografts: A Report From the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Haematologica* 2016;101:1267–74. doi: 10.3324/haematol.2016.143271
- 52.- Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, et al. HLA Mismatch Combinations Associated With Decreased Risk of Relapse: Implications for the Molecular Mechanism. *Blood* 2009;113:2851–8. doi: 10.1182/blood-2008-08-171934
- 53.- Kawase T, Morishima Y, Matsuo, et al. High- Risk HLA Allele Mismatch Combinations Responsible for Severe Acute Graft-Versus-Host Disease and Implication for its Molecular Mechanism. *Blood* 2007;110:2235–41. doi: 10.1182/blood-2007-02-072405
- 54.- Morishima S, Kashiwase K, Matsuo K, et al. High-Risk HLA Alleles for Severe Acute Graft-Versus -Host Disease and Mortality in Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2016;101:491–8. doi: 10.3324/haematol.2015.136903
- 55.- Kramer CSM, Koster J, Haasnoot GW, et al. HLAEMMA: A User-Friendly Tool to Analyse HLA Class I and Class II Compatibility on the Amino Acid Level. *HLA* 2020;96:43–51. doi:10.1111/tan.13883
- 56.- Duquesnoy RJ. HLAMmatchmaker: A Molecularly Based Donor Selection Algorithm for Highly Alloimmunized Patients. *Transplant Proc* 2001;33:493–7. doi: 10.1016/S0041-1345(00)02108-4
- 57.- Ciurea SO, Zhang M-J, Bacigalupo AA, et al. Haploidentical Transplant With Posttransplant Cyclophosphamide vs Matched Unrelated Donor Transplant for Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 2015;126:1033–40. doi: 10.1182/blood-2015-04-639831
- 58.- Rimando J, Slade M, DiPersio JF, et al. HLA Epitope Mismatch in Haploidentical Transplantation is Associated With Decreased Relapse and Delayed Engraftment. *Blood Adv.* 2018;2:3590–601. doi: 10.1182/bloodadvances.2018025437
- 59.- Zou J, Wang T, He M, et al. Number of HLA-Mismatched Eplets Is Not Associated with Major Outcomes in Haploidentical Transplantation with Post-Transplantation

Cyclophosphamide: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Transplant Cell Ther.* 2022;28:107.e1-107.e8. doi: 10.1016/j.jtct.2021.11.001.

60. Zou J, Kongtim P, Oran B, et al. Refined HLA-DPB1 mismatch with molecular algorithms predicts outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2022;107:844-856. doi: 10.3324/haematol.2021.278993.
61. Rutten CE, Van Luxemburg-Heijs SAP, Van Der Meijden ED, et al. Both permissive and nonpermissive HLA-DPB1 mismatches can induce polyclonal HLA-DPB1 specific immune responses in vivo and in vitro. *Blood.* 2010;115:151–3.
62. de Vere Hunt I, Kilgour JM, Danby R, Peniket A, et al. "Is this the GVHD?" A qualitative exploration of quality of life issues in individuals with graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplant and their experiences of a specialist multidisciplinary bone marrow transplant service. *Health Qual Life Outcomes.* 2021;19:11. doi: 10.1186/s12955-020-01651-2.
63. Miranda-Novales MG, Villasís-Keever MÁ. El protocolo de investigación VIII. La ética de la investigación en seres humanos. *Rev Alerg Mex.* 2019;66:115-122. doi: 10.29262/ram.v66i1.594.
64. Cornaby C, Weimer ET. HLA Typing by Next-Generation Sequencing: Lessons Learned and Future Applications. *Clin Lab Med.* 2022;42:603-612. doi: 10.1016/j.cll.2022.09.013.
65. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol.* 2012;882:9-25. doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_2.
66. Ciurea SO, Cao K, Fernandez-Vina M, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor-specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53:521-534. doi: 10.1038/s41409-017-0062-8.
67. McCaughan JA, Tinckam KJ. Donor specific HLA antibodies & allograft injury: mechanisms, methods of detection, manifestations and management. *Transpl Int.* 2018;31:1059-1070. doi: 10.1111/tri.13324.
- 68.- De Vos J, Baudoux E, Bay JO, et al. Injections de lymphocytes du donneur (DLI) : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC) [Donor Lymphocyte Infusions (DLI): Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)]. *Bull Cancer.* 2019;106(1):S35-S39. French. doi: 10.1016/j.bulcan.2018.10.002.
- 69.- Penack O, Marchetti M, Ruutu T, et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol.* 2020;7:e157-e167. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30256.

- 70.- Iwasaki M, Kanda J, Tanaka H, et al. Impact of HLA Epitope Matching on Outcomes After Unrelated Bone Marrow Transplantation. *Front Immunol.* 2022;13:811733. doi: 10.3389/fimmu.2022.811733.
- 71.- Kanda J, Saji H, Fukuda T, et al. Related transplantation with HLA-1 Ag mismatch in the GVH direction and HLA-8/8 allele-matched unrelated transplantation: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2012;119:2409-16. doi: 10.1182/blood-2011-08-372573.
- 72.- Duquesnoy R, Spellman S, Haagenson M, et al. HLAMatchmaker-defined triplet matching is not associated with better survival rates of patients with class I HLA allele mismatched hematopoietic cell transplants from unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:1064-1071. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.07.001.
- 73.- Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:482-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.11.011.
- 74.- Geneugelijk K, Thus KA, Spierings E. Predicting alloreactivity in transplantation. *J Immunol Res.* 2014;2014:159479. doi: 10.1155/2014/159479.
- 75.- Kanda J, Brazauskas R, Hu Z-H, et al. Graft-Versus-Host Disease After HLA-Matched Sibling Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Comparison of North American Caucasian and Japanese Populations. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22:744–51. doi: 10.1016/j.bbmt.
- 75.- Jaime-Pérez JC, Cruz MLR, Mendoza-Ibarra SI, et al. Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Are Associated to Infection and Not to the Engraftment Rate in Outpatient Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Rev Invest Clin.* 2023;75:249-258. doi: 10.24875/RIC.23000121.
- 77.- Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, et al Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: a prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J Hematol Oncol.* 2015;8:84. doi: 10.1186/s13045-015-0182-9.