

ESTUDIO DEL IMPACTO DE UGT₂B₁₇ Y PD-1 EN
EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS A PARTIR
DE DONANTE EMPARENTADO HLA IDÉNTICO

Nazly Santos Carvajal



<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento

This work is licensed under a Creative Commons Attribution licence



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL IMPACTO DE UGT2B17 Y PD-1 EN EL
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS A PARTIR DE DONANTE
EMPARENTADO HLA IDÉNTICO

Nazly Santos Carvajal

Any 2022



TESIS DOCTORAL:

ESTUDIO DEL IMPACTO DE UGT2B17 Y PD-1 EN EL
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS A PARTIR DE DONANTE
EMPARENTADO HLA IDÉNTICO

Nazly Santos Carvajal

2022

Línea de investigación en Ciéncias Médicas

Programa de doctorat en Biologia molecular, biomedicina y salud

Dirigida por: David Gallardo Giralt

Tutora: Elisabeth Pinart Nadal

Memoria presentada para optar al título de doctora por la
Universidad de Girona



Dr. David Gallardo Giralt

Cap del Servei d'Hematologia de l'Institut Català d'Oncologia de Girona, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta de Girona.

Professor agregat vinculat del Departament de Ciències Mèdiques de la Universitat de Girona.

CERTIFICO:

Que Nazly Santos Carvajal ha dut a terme sota la meva direcció el treball titulat: ESTUDIO DEL IMPACTO DE UGT2B17 Y PD-1 EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS A PARTIR DE DONANTE EMPARENTADO HLA IDÉNTICO, que es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per a optar al Grau de Doctora per la Universitat de Girona (UdG).

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Dedicatoria y Agradecimientos

Dedicatoria

A Olivia mi hija e Iván que me han motivado para seguir adelante.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas que me han acompañado durante todo el proceso.

En primer lugar, al doctor David Gallardo Giralt por su labor como director de tesis, su extenso trabajo y conocimientos en el área del trasplante de progenitores hematopoyéticos ha facilitado enormemente el desarrollo de esta tesis doctoral, agradezco también su comprensión y empatía durante todo mi proceso de acoplamiento con los proyectos que él viene desarrollando y del cual esta tesis hace parte.

Agradezco también a mis compañeros del servicio de hematología del Institut Català d'Oncologia (ICO-Girona) en el Hospital Dr. Josep Trueta de Girona y, muy especialmente a Rocío Rodríguez Romanos compañera y colaboradora del Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI), por toda su ayuda en el proceso de aprendizaje y desarrollo del trabajo de laboratorio que se llevó a cabo en el proyecto.

Agradezco a los miembros del Grupo Español de Trasplante de progenitores hematopoyéticos (GETH) por permitirme el acceso y uso de las muestras y las bases de datos disponibles.

A mi pareja por su paciencia, pues convivir con un doctorando no es tarea sencilla.

A todos aquellos que durante este tiempo han ayudado a que esta tesis sea hoy una realidad.

Publicaciones
derivadas de la tesis

Artículos:

Nazly Santos, Rocio Rodríguez-Romanos, Carlos Vallejo, Ismael Buño, Jose B. Nieto, Antonio Jiménez-Velasco, Salut Brunet, Elena Buces, Javier López-Jiménez, Marcos González, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Carmen Martínez, David Gallardo, on behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH).

UGT2B17 minor histocompatibility mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2016 Jan;51(1):79-82. PMID: 26367234 DOI: 10.1038/bmt.2015.207

Nazly Santos, Rocío Rodríguez-Romanos, Rafael de la Cámara, Salut Brunet, Jose B. Nieto, Ismael Buño, Carmen Martínez, Antonio Jiménez-Velasco, Carlos Vallejo, Marcos González, Carlos Solano, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Jose A. Pérez-Simón, Javier López-Jiménez, José L. Díez, David Gallardo. *On behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH)*.

El genotipo de PD-1 del donante, se asocia a la enfermedad injerto contra receptor en el trasplante alogénico a partir de donante emparentado HLA idéntico. *Annals of Hematology* 2018 Nov;97(11):2217-2224. PMID: 30019128 DOI: 10.1007/s00277-018-3438-y

Comunicaciones a congresos:

IMPACTO DE LA DISPARIDAD DEL ANTIGENO MENOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD UGT2B17 EN EL TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE DONANTE FAMILIAR HLA IDENTICO.

Nazly Santos, Rocio Rodríguez-Romanos, Carlos Vallejo, Ismael Buño, Jose B. Nieto, Antonio Jiménez-Velasco, Salut Brunet, Elena Buces, Javier López-Jiménez, Marcos González, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Carmen Martínez, David Gallardo, on behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH).

Comunicación oral. Congreso Español de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Valencia, España.2015

Comunicaciones a congresos:

UGT2B17 MINOR HISTOCOMPATIBILITY MISMATCH AND CLINICAL OUTCOME AFTER HLA-IDENTICAL SIBLING DONOR STEM CELL TRANSPLANTATION.

Nazly Santos, Rocio Rodríguez-Romanos, Carlos Vallejo, Ismael Buño, Jose B. Nieto, Antonio Jiménez-Velasco, Salut Brunet, Elena Buces, Javier López-Jiménez, Marcos González, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Carmen Martínez, David Gallardo, on behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH).

Poster. European society for blood and marrow transplantation congress. (EBMT), Estambul, Turkia. 2015.

PD-1 GENOTYPE OF THE DONOR AND ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE AFTER HLA-IDENTICAL SIBLING DONOR STEM CELL TRANSPLANTATION.

Nazly Santos, Rocío Rodríguez-Romanos, Rafael de la Cámara, Salut Brunet, Jose B. Nieto, Ismael Buño, Carmen Martínez, Antonio Jiménez-Velasco, Carlos Vallejo, Marcos González, Carlos Solano, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Jose A. Pérez-Simón, Javier López-Jiménez, José L. Díez, David Gallardo. *On behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH).*

Oral communication. European Hematology Association congress. (EHA), Copenage, Dinamarca. 2016

Abreviaturas,
figuras y tablas

Lista de abreviaturas

Aa: Aminoácido

AMiH: Antígeno/s menor/es de histocompatibilidad

alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

allo-HSCT: del inglés "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation "

auto-TPH: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

alo-TPH DE HLA idéntico: Trasplante de donante emparentado HLA idéntico

CAR T-cells: Terapia celular adoptiva de células T

CD4+: Proteína transmembrana característica de los linfocitos T reguladores.

CD8+: Proteína transmembrana característica de los linfocitos T citotóxicos.

CD34+: Proteína transmembrana característica de los progenitores hematopoyéticos.

CD28: Proteína expresada en la superficie del linfocito T, junto a las moléculas CD80 o CD86 de la superficie de la célula presentadora de antígeno.

CD40: Proteína que actúa como receptor, se expresa en células presentadoras de antígenos.

CD154 o CD40L: Proteína también conocida como TRAP (proteína de activación relacionada con el factor de necrosis tumoral).

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CPA: Célula presentadora de antígenos

CTLA-4: del inglés "Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4"

Cy: Ciclofosfamida

DE: Donante emparentado

DnE: Donante no emparentado

DLI: Infusión de linfocitos del donante

EICL: Efecto del injerto contra leucemia (beneficio antitumoral mediado por las células T)

EICR: Enfermedad injerto contra el receptor

EICRa: Enfermedad injerto contra el receptor aguda

EICT: Efecto injerto contra el tumor (beneficio antitumoral mediado por las células T)

FNT o TNF: Factor de necrosis tumoral

GVHD: del inglés "Graft-versus-host disease" o "Graft-versus-recipient disease"

Lista de abreviaturas

aGVHD: del inglés "Acute graft-versus-host disease"

cGVHD: del inglés "Chronic graft-versus-host disease"

GVTI: del inglés "graft-versus-tumor effect"

HLA: del inglés "Human Leukocyte Antigen"

HR: del inglés "Hazard ratio"

HSC: Células madre hematopoyéticas

HSCT: del inglés "hematopoietic stem cell transplantation"

IC: Intervalo de confianza

ICOS: del inglés "inducible co-stimulator"

Ig: Inmunoglobulinas

IL: Interleucina

ins/del: Tipos de polimorfismos inserción/delección

ITAM del inglés "immunoreceptor tyrosine-based activation motif"

kB: Kilobases

LTC: Linfocito T

LFA-1 del inglés "leukocyte function-associated antigen 1"

LPS: Lipopolisacaridos,

mHag: del inglés "minor histocompatibility antigens"

MRT: Mortalidad relacionada con el trasplante.

OS: del inglés "overall survival"

PCR: de inglés "polymerase chain reaction"

PCR-SSP: del inglés "polymerase chain reaction with sequence specific primers"

PCR-SSOP: del inglés "polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe"

PD-1: del inglés "Programmed cell-death 1 gen"

PFS: del inglés "progression-free survival"

PBSC: Progenitores hematopoyéticos de sangre periférica

Runx1: Factor de transcripción Runx1,

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SNP: del inglés "Single nucleotide polymorphism"

SNPs: del inglés "Single nucleotide polymorphisms"

TAP: Proteínas transportadoras intracitoplasmáticas.

TBI: Irradiación corporal total, del inglés "Total body irradiation"

TCR: Receptor de célula T

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

UFC: Unidades formadoras de colonias

UGTs: UDP-glucuronosiltransferasas

UGT2B17: del inglés "Uridine diphospho-glucuronosyltransferase 2B17 gen"

Lista de figuras

Figura1. Incremento progresivo en el número de trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH).....	6
Figura2. Médula ósea, hematopoyesis y células madre o progenitores hematopoyéticos.....	8
Figura3. Inmunidad innata mediada por células NK (Natural Killer).....	11
Figura4. Inmunidad adaptativa.....	12
Figura5. Representación esquemática de la sinapsis inmunológica.....	14
Figura6. Fuentes de progenitores hematopoyéticos.....	15
Figura7. Proceso de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH).....	19
Figura 8. Modelo de presentación de antígenos a los linfocitos T, mediante HLA tipo II.....	20
Figura 9. Modelo de presentación de antígenos a través de las moléculas de HLA tipo I.....	21
Figura10. Región del brazo corto del cromosoma 6 que codifica para el CMH.....	22
Figura11. Proceso de selección del donante para el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH).....	25
Figura12. Fuentes de progenitores hematopoyéticos. Progenitores Hematopoyéticos de sangre periférica (PBSC).....	26
Figura13. Selección y preservación de HSC. Proceso de realización del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH).....	29
Figura14. Lugar de acción de los inmunosupresores de la respuesta inmune.....	31
Figura15. Fisiopatología de la Enfermedad injerto contra receptor aguda.....	34
Figura16. Presencia de polimorfismos (SNPs) y Enfermedad injerto contra Receptor (EICR) vs Efecto injerto contra tumor (EICT).....	36
Figura17. Relación entre restricción de expresión de AMiH en los tejidos y la presentación de EICR (Enfermedad injerto contra receptor) y el efecto injerto contra tumor o leucemia (EICT / EICL).....	39
Figura18. Nomenclatura y función del polimorfismo de los principales antígenos menores de histocompatibilidad.	42
Figura19. Sinapsis inmunológica.....	45

Lista de Tablas

Tabla 1. Inmunosupresores más usados en los regímenes de profilaxis de la EICR.....	30
Tabla 2. Antígenos menores de histocompatibilidad humanos.....	41

Indice

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	i
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	v
ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	xiii
INDICE.....	xvi
RESUMEN.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	xxx
1. INICIOS Y EVOLUCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA Y EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	1
2. HISTORIA DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE TEJIDOS Y DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	2
2.1. Conceptos y evolución del trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	5
3. MÉDULA ÓSEA, HEMATOPOYESIS Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (HSC).....	6
3.1. Médula ósea y hematopoyesis.....	6
3.2. Células madre (Stem Cells) y trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	7
4. SISTEMA INMUNE, PATRONES DE RECONOCIMIENTO INMUNE E INMUNOBIOLOGÍA DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	9
4.1. Sistema inmune innato y adaptativo.....	10
4.2. Sinapsis inmunológica.....	13
4.3. Inmunobiología del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.....	14
5. GENERALIDADES DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	15
5.1. Definición.....	15
5.2. Tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	16
5.2.1. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH).....	16
5.2.2. Trasplante singénico de progenitores hematopoyéticos.....	17
5.2.3. Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH).....	17
6. Elementos clínicos del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.....	19
6.1. Histocompatibilidad y selección del donante.....	19
6.1.1. Complejo mayor de histocompatibilidad CMH y sistema HLA.....	19
6.1.2. Selección del donante.....	22

6.1.2.1. Trasplante alogénico a partir de donante no emparentado.....	22
6.1.2.2. Trasplante alogénico a partir de sangre de cordón umbilical.....	23
6.1.2.3. Trasplante de donante haploidéntico.....	24
6.2. Fuentes de células madre hematopoyéticas (HSC).....	25
6.2.1. Médula ósea.....	26
6.2.2. Progenitores hematopoyéticos derivados de sangre periférica (PBSC).....	26
6.2.3. Sangre de cordón umbilical.....	27
6.3. Proceso de realización del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.....	27
6.3.1. Acondicionamiento.....	27
6.3.2. Procesamiento, preservación e infusión de las HSC.....	28
6.3.3. Prevención de la enfermedad injerto contra receptor (EICR).....	30
6.4. Complicaciones del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos....	31
6.4.1. Generalidades de las complicaciones.....	31
7. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR (EICR).....	32
7.1. Fisiopatología de la enfermedad del injerto contra el receptor.....	32
7.2. Determinantes genéticos de la enfermedad injerto contra receptor.....	35
7.2.1. Papel de las disparidades del sistema HLA.....	36
7.2.2. Antígenos menores de Histocompatibilidad.....	37
7.2.3. Polimorfismos en genes que codifican para moléculas de coestimulación – inhibición de la respuesta inmune.....	44
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	48
METODOLOGIA Y RESULTADOS.....	52
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAGIA.....	86

Resumen

RESUMEN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), precursor de la terapia celular y la inmunoterapia, es un tratamiento considerado curativo en neoplasias hematológicas, aplasia medular severa, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias severas, hemoglobinopatías o errores congénitos del metabolismo, entre otras patologías. La mayor limitación del alo-TPH es el desarrollo de enfermedad injerto contra receptor (EICR) severa, como resultado de una reacción alogénica mediada por los linfocitos T del donante contra antígenos del receptor. Esta reacción es especialmente importante ante disparidades en el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA o CMH I y II) entre donante y receptor. Sin embargo, se ha observado en todas las series que a pesar de la disponibilidad de un donante emparentado histocompatible (HLA idéntico), entre un 25-50% de estos pacientes desarrollan EICR. Esta complicación es la principal causa de morbi-mortalidad asociada con el procedimiento.

Se han descrito diversos factores genéticos que pueden favorecer la aparición de la EICR a pesar de la compatibilidad HLA entre donante y receptor. En esta tesis exploraremos el papel de la disparidad en antígenos menores de histocompatibilidad (AMiH) y de los polimorfismos (SNPs) en genes que codifican moléculas de coestimulación/inhibición, capaces de modular la aloreactividad ante las disparidades en AMiH. Esto podría traducirse una incidencia variable de EICR y por tanto un impacto diferencial en la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de progresión (SLP) o en las recidivas.

En la primera publicación que compone la tesis, se discute el papel de las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs), enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas y fármacos liposolubles. UGT2B17 es la principal enzima involucrada en la glucuronización de la testosterona, siendo además una de las principales enzimas implicadas en la segunda fase del metabolismo de fármacos. Se ha descrito que los hombres expresan niveles 4 veces más elevados de UGT2B17 que las mujeres, lo cual contribuiría a una mayor actividad de glucoronidación de sus sustratos. El gen de UGT2B17 está en el cromosoma 4q13, y dicho gen puede tener 0, 1 o 2 copias en función de la presencia o no de un polimorfismo ins/del que condiciona la delección de 129 kilobases (kB). La presencia de al menos una copia

de UGT2B17 en el receptor puede actuar como AMHi cuando el donante presenta dicha delección en homocigosis. En este sentido se ha descrito que la disparidad UGT2B17 se asocia a mayor riesgo de EICR aguda tras alo-TPH de donante emparentado (DE) HLA idéntico. En la cohorte retrospectiva de 1127 pacientes estudiados que recibieron un alo-TPH DE HLA idéntico, 69 casos (6,1%) presentaron la disparidad de UGT2B17 entre donante y receptor, con una elevada incidencia de EICR aguda severa en este grupo (22,7% vs 14,6%), pero sin diferencias estadísticamente significativas ($p: 0,098$). Sin embargo, analizando el subgrupo de pacientes cuyo donante era hombre (616) casos, la incidencia de EICR aguda severa en parejas con la disparidad de UGT2B17 fue significativamente mayor (25,1% vs 12,8%; $p: 0.005$), esta asociación se confirmó en el análisis multivariante ($p: 0.043$; Hazard ratio: 2.16, IC 95%: 1.03–4.57). La supervivencia global fue peor en el grupo de pacientes con disparidad UGT2B17 ($P: 0.005$). Por tanto, concluimos que la disparidad de UGT2B17 tiene un impacto negativo en el alo-TPH de DE HLA idéntico especialmente cuando el donante es hombre.

En la segunda publicación que compone la tesis, se discute la relevancia de la modulación de la respuesta inmune mediada por SNPs de genes que codifican moléculas de coestimulación/inhibición. Programmed cell-death 1 (PD-1) es un gen que codifica una molécula inhibidora de la activación linfocitaria T. La expresión de PD-1 desencadena una señal inhibitoria sobre la activación de los linfocitos T, lo cual genera un proceso de tolerancia inmune. Algunos SNPs de PD-1 muestran una clara asociación con el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes o alto riesgo de desarrollo de neoplasias. Sin embargo, pocos datos se han publicado acerca del impacto de estos SNPs en el desarrollo del EICR en pacientes sometidos a alo-TPH.

Se realizó un estudio retrospectivo en una cohorte de 1485 parejas donante-receptor, sin tener en cuenta la restricción HLA. Se analizaron los genotipos de dos SNPs: el primero, PD-1.1G/A ubicado en la región promotora y segundo, PD-1.3G/A en el intron 4. En el estudio se detectó un incremento del riesgo de EICR grados II a IV en pacientes que recibieron injertos de donantes homocigotos para los alelos PD-1.1G ($p: 0.027$) y PD-1.3AA ($p: 0.003$), en el análisis multivariante estos dos alelos fueron identificados como factores de riesgo independientes para EICR aguda grado II-IV ($p: 0.033$; HR 2.2; 95%CI: 1.1-4.8 y $p < 0.001$; HR 4.5; 95%CI: 2-10.1 respectivamente). Por el contrario, el genotipo de PD-1 no mostró

asociación con la SG o recaída. Los resultados sugieren que el genotipo de PD-1 juega un importante papel en el desarrollo de EICR en pacientes sometidos a alo-TPH de donante emparentado (DE) HLA idéntico.

En resumen, esta tesis doctoral pretende continuar el estudio del impacto de algunos factores genéticos que parecen ser una barrera al trasplante de tejidos, sobre todo en trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Se analizaron locus de AMiH y SNPs de genes relacionados con moléculas de coestimulación/inhibición de la respuesta inmune que son capaces de modular la capacidad aloreactiva de los linfocitos T frente a las disparidades de AMiH.

La tesis puede aportar principalmente una mayor cohorte de parejas donante receptor que intente aclarar los estudios contradictorios que existen sobre el potencial terapéutico en la inducción de un efecto injerto contra tumor (EICT) con una controlada enfermedad injerto contra receptor (EICR) que es la principal complicación, potencialmente mortal en el trasplante alogénico.

RESUM

El trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (alo-TPH), precursor de la teràpia cel·lular i la immunoteràpia, és un tractament considerat curatiu en neoplàsies hematològiques i malalties no neoplàsiques autoimmunes, immunodeficiències severes, hemoglobinopaties o errors congènits del metabolisme. La limitació més important del alo-TPH és el desenvolupament de la malaltia de l'empelt contra l'hoste severa, com a resultat d'una alo-reacció mediada pels limfòcits T de l'empelt contra el receptor mediada principalment per una disparitat en els complexos majors d'histocompatibilitat (HLA o CMH I i II). Tot i així, s'ha observat en totes les sèries que malgrat la disponibilitat d'un donant emparentat histocompatible (HLA idèntic), entre un 25 a 50% d'aquests pacients desenvolupen la malaltia de l'empelt contra l'hoste. Aquesta complicació és la principal causa de morbimortalitat associada amb el procediment.

S'han descrit diversos factors genètics que poden afavorir l'aparició de la malaltia de l'empelt contra l'hoste, malgrat la compatibilitat de l'HLA entre donant i receptor; en aquesta tesi explorarem, el paper de la disparitat en antígens menors d'histocompatibilitat (AMiH) i els polimorfismes (SNPs) de gens que codifiquen molècules de coestimulació/inhibició de la resposta immune, capaços de modular la capacitat aloreactiva davant de les disparitats d'AMiH, això podria traduir-se en incidència variable d'EICR, supervivència global (SG), supervivència lliure de progressió (SLP) o recidives.

A la primera publicació que fa part de la tesi, es discuteix el paper de les UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), enzimes implicades en el metabolisme d'hormones esteroides i fàrmacs liposolubles. UGT2B17 és la principal enzima involucrada en la glucuronització de la testosterona, a més és la principal a la segona fase el metabolisme de fàrmacs i s'ha descrit que els homes expressen 4 vegades els nivells d'UGT2B17 que les dones amb el consegüent elevat nivell de glucoronidació dels seus substrats. El gen d'UGT2B17 és al cromosoma 4q13, i aquest gen pot tenir 0, 1 o 2 còpies en funció de la presència o no d'un polimorfisme ins/del, el que condiciona la deleció de 129 kB. La presència d'almenys una còpia d'UGT2B17 al receptor pot actuar com a AMiH quan el donant presenta aquesta deleció en homocigosi. En aquest sentit s'ha descrit que la

disparitat UGT2B17 s'associa a un risc més gran de malaltia empelt contra l'hoste aguda després de alo-TPH de donant emparentat (DE) HLA idèntic. A la cohort retrospectiva de 1127 pacients estudiats que van rebre un alo-TPH D'HLA idèntic, 69 casos (6,1%) van presentar la disparitat d'UGT2B17 entre donant i receptor, amb una elevada incidència de la malaltia empelt contra l'hoste aguda severa en aquest grup (22, 7% vs 14,6%), però sense diferències estadísticament significatives ($p: 0,098$). No obstant això, analitzant el subgrup de pacients que van rebre un injert de donant home (616 casos), la incidència de la malaltia de l'empelt contra l'hoste aguda severa en parelles amb la disparitat de UGT2B17 va ser significativament elevada (25,1% vs 12,8%; $p:0.005$), aquesta associació es va confirmar al anàlisi multivariant ($p: 0.043$; Hazard ratio: 2.16, IC 95%: 1.03–4.57). La supervivència global va ser pitjor al grup de pacients amb disparitat UGT2B17 ($P: 0.005$). Per tant, concloem que la disparitat d'UGT2B17 té un impacte negatiu al alo-TPH de donant HLA idèntic especialment quan el donant és home.

A la segona publicació que fa part de la tesi, es discuteix la rellevància de la modulació de la resposta immune mediada per SNPs de gens que codifiquen molècules de coestimulació/inhibició. Programmed cell-death 1 (PD-1) és un gen que codifica molècules coinhibidores de receptors. L'activació de PD-1 desencadena la inhibició de l'activació dels limfòcits T, cosa que genera un procés de tolerància immune. L'expressió d'alguns SNPs de PD-1 mostren una clara associació amb el desenvolupament de diverses malalties autoimmunes o alt risc de desenvolupament de neoplàsies. Tot i això, poques dades s'han publicat sobre l'impacte d'aquests SNPs en el desenvolupament de la malaltia de l'empelt contra l'hoste en pacients sotmesos a alo-TPH. Es va fer un estudi retrospectiu en una cohort de 1485 parelles donant-receptor, sense tenir en compte la restricció HLA. Es van analitzar els genotips de dos SNPs: PD-1.1G/A, ubicat a la regió promotora i PD-1.3G/A a l'intron 4. A l'estudi es va detectar un increment del risc la malaltia de l'empelt contra l'hoste aguda graus II a IV en pacients que van rebre empelts de donants homozigots per a al·lels PD-1.1G ($p: 0.027$) i PD-1.3AA ($p: 0.003$), en l'anàlisi multivariant aquests dos al·lels van ser identificats com a factors de risc independents per a la malaltia empelt contra l'hoste aguda grau II-IV ($p: 0.033$; HR2.2; 95% CI: 1.1 - 4.8 i $p<0.001$; HR4.5; 95% CI: 2 - 10.1 respectivament). Per contra, el genotip de PD-1 no va mostrar associació amb la SG o la recaiguda. Els resultats suggereixen que el genotip de PD-1 juga un paper important el

desenvolupament de la malaltia de l'empelt contra l'hoste en pacients sotmesos a alo-TPH de donant emparentat (DE) HLA idèntic.

Resumint, aquesta tesi doctoral pretén continuar l'estudi de l'impacte d'alguns factors genètics que semblen ser una barrera al trasplantament de teixits, sobretot al trasplantament de progenitors hematopoètics (TPH). Es van analitzar locus d'AMiH i SNPs de gens relacionats amb molècules de coestimulació/inhibició de la resposta immune que són capaces de modular la capacitat aloreactiva dels limfòcits T davant de les disparitats d'AMiH.

La tesi pot aportar principalment una cohort més gran de parelles donant receptor que intenti aclarir els estudis contradictoris que existeixen sobre el potencial terapèutic en la inducció d'un efecte empelt contra tumor amb una controlada malaltia empelt contra receptor que és l'efecte advers més important i potencialment mortal al trasplantament alogenic.

SUMMARY

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), a precursor to cell therapy and immunotherapy, is a treatment considered curative in hematological neoplasms and non-neoplastic autoimmune diseases, severe immunodeficiencies, hemoglobinopathies or inborn errors of metabolism, among others. The major limitation of allo-HSCT is the development of severe graft-versus-host disease (GVHD), as a result of a graft-versus-host T-cell-mediated alloreaction mediated primarily by a disparity in major histocompatibility complexes (HLA or CMH I and II). However, it has been observed in all the series that despite the availability of a histocompatibility (HLA identical) related donor, between 25-50% of these patients develop GVHD. This complication is the main cause of morbidity and mortality associated with the procedure.

Several genetic factors have been described that can favour the appearance of GVHD despite the HLA compatibility between donor and recipient. In this dissertation, we will explore the role of the disparity in minor histocompatibility antigens (mHag) and polymorphisms (SNPs) of genes encoding co-stimulation/inhibition molecules of the immune response, capable of modulating the alloreactive capacity against mHag disparities, this could translate into a variable incidence of GVHD, overall survival (OS), progression-free survival (PFS) or relapse.

In the first publication that makes up the dissertation, the role of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), enzymes involved in the metabolism of steroid hormones and fat-soluble drugs, is discussed. Uridine diphospho-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17) is the main enzyme involved in the glucuronidation of testosterone, it is also the main enzyme in the second phase of drug metabolism and it has been described that, men express 4 times the levels of UGT2B17 than women with a consequent high level of glucuronidation of their substrates. The UGT2B17 gene is on chromosome 4q13, and that gene can have 0, 1 or 2 copies depending on the presence or absence of an ins/del polymorphism that determines the 129 kB deletion. The presence of at least one copy of UGT2B17 in the recipient can act as mHag when the donor has such a homozygous deletion. In this sense, UGT2B17 and its association with acute GVHD (aGVHD) has been described. We retrospectively studied the clinical impact of a UGT2B17 mismatch in a cohort of 1127

patients receiving a HSCT from an HLA-identical sibling donor. UGT2B17 mismatch was present in 69 cases (6.1%). Incidence of severe aGVHD was higher in the UGT2B17 mismatched pairs (22.7% vs 14.6%), but this difference was not statistically significant (P: 0.098). We did not detect differences in chronic GVHD, overall survival, relapse-free survival, transplant-related mortality, or relapse. Nevertheless, when we analysed only those patients' receiving grafts from a male donor (616 cases), aGVHD was significantly higher in the UGT2B17 mismatched group (25.1% vs 12.8%; P: 0.005) and this association was confirmed by the multivariate analysis (P: 0.043; hazard ratio: 2.16, 95% confidence interval: 1.03–4.57). Overall survival was worse for patients mismatched for UGT2B17 (P: 0.005). We conclude that UGT2B17 mismatch has a negative clinical impact in allogeneic HSCT from HLA-identical sibling donors only when a male donor is used. These results should be confirmed by other studies.

In the second publication that makes up the dissertation, the relevance of the modulation of the immune response mediated by SNPs of genes that encode co-stimulation/inhibition molecules is discussed. Programmed cell-death 1 (PD-1) is a gene that encodes receptor co-inhibitory molecules. PD-1 activation triggers an immune checkpoint resulting in inhibition of T cells that leads to peripheral tolerance. Some PD-1 polymorphisms have been described and associated with the development of autoimmune diseases or cancer predisposition, but there are few data concerning the relevance of such polymorphisms on the clinical outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). We analysed the distribution of the SNPs PD-1.1G/A (rs36084323) and PD-1.3G/A (rs11568821) genotypes of the donor, in a cohort of 1485 allo-HSCT from HLA-identical sibling donors. A retrospective study was performed in a cohort of 1,485 donor-recipient pairs, without taking HLA restriction into account. The genotypes of two SNPs were analysed: PD-1.1G/A located in the promoter region and PD-1.3G/A in intron 4. We found an increased risk of grades II to IV graft-versus-host disease (GvHD) in patients receiving grafts from homozygous donors for the G allele at the rs36084323 SNP (P = 0.033; hazard ratio [HR] 2.2; 95% confidence interval [CI] 1.1 to 4.8) and from homozygous donors for the A allele at the rs11568821 position (P < 0.001; HR 4.5, 95%CI 2.0 to 10.1). In contrast, the PD-1 genotype of the donor did not show association with overall survival or relapse incidence. These results suggest that the PD-1 genotype of the

donor plays an important role for the development of acute GvHD after allo-HSCT from HLA-identical sibling donors.

To sum up, this dissertation aims to continue the study of the impact of some genetic factors that seem to be a barrier in tissue transplantation, especially in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Minor histocompatibility loci and SNPs of genes related to co-stimulation/inhibition molecules of the immune response that are able of modulating the alloreactive capacity of T lymphocytes against mHag disparities were analysed.

The dissertation can mainly provide a larger cohort of donor-recipient couples that tries to clarify the contradictory studies that exist about the therapeutic potential in the induction of a graft-versus-tumor effect (GVTI) with a controlled graft-versus-host disease (GVHD) that is the effect most important and life-threatening adverse event in allogeneic transplantation.

Introducción

1. INICIOS Y EVOLUCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA Y EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

El creciente conocimiento acerca de los diferentes roles que juega el sistema inmune, ha mostrado que este no solo nos defiende frente a invasores como bacterias o virus, sino que también puede cumplir un papel en el control del crecimiento de células malignas. El sistema inmune entonces tiene una enorme complejidad, está compuesto por células equipadas de diversas armas, que trabajan como un ejército, actuando ya sea directamente (inmunidad celular) o a través de proteínas llamadas anticuerpos (inmunidad humoral) sobre elementos extraños al organismo (Aly 2020), esta respuesta inmunitaria se desencadena mediante vías activadoras y/o inhibitoras complejas, mediadas por células, anticuerpos, receptores y citoquinas.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos es precursor de la terapia celular y la inmunoterapia, estas terapias se basan en introducir elementos celulares alogénicos y/o moléculas como anticuerpos o proteínas no propias del organismo, saltando o limitando los controles que puedan desencadenar la activación del sistema inmune frente a estos antígenos; con el objetivo de restablecer o aumentar la respuesta inmune del receptor (Inogés 2004).

La inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento de las neoplasias mostrando respuestas duraderas en aquellos pacientes que responden y, en otras enfermedades no neoplásicas está demostrando su potencial, sin embargo, su eficacia es variable en muchos grupos de pacientes donde se está investigando cuales son los factores o mecanismos que determinan la evasión de las células tumorales a la acción del sistema inmune (Chu 2020).

La inmunoterapia comprende un amplio grupo de tratamientos que ayudan o potencian la capacidad del sistema inmune para combatir las células neoplásicas, incluyendo la terapia celular, las vacunas, inhibidores de check-point, anticuerpos monoclonales y terapias mediadas por citoquinas. La terapia celular adoptiva de células T (CAR T-cells), el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y la infusión de linfocitos del donante; estas tres últimas terapias consisten en formas de inmunoterapia que modifican genéticamente o

reemplazan el sistema inmune enfermo o ineficaz del paciente por uno que le permita combatir la enfermedad (Aly 2020).

2. HISTORIA DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE TEJIDOS Y DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

En el antiguo Egipto ya existían los trasplantes de piel, con una barrera recurrente, si se trasplantaba tejido de otra persona, el tejido moría o causaba reacciones de rechazo en el receptor. La inmunidad entonces era conocida, como la capacidad de algunos animales de no verse afectados por procesos clínicos que mataban o enfermaban a otros similares. El posterior avance en el estudio de la inmunidad llevó al desarrollo de la vacunación por Pasteur en 1885. Carl Jensen en 1903 intuyó que los homoinjertos fracasaban a causa de una reacción inmune, el cuerpo atacaba el tejido injertado como si se tratara de una infección. Hacia 1912, Georg Schöne observó que, si los homoinjertos de piel fracasaban y si se intentaba un segundo injerto del mismo donante, este fracasaba aún más rápido. Schöne determinó que el organismo del receptor aprendía a reconocer las características del injerto y así los destruía rápidamente (Barker 2013).

Los progresos en el estudio de la respuesta inmune al trasplante, se realizaron a partir de 1920, cuando James B. Murphy demostró que los linfocitos jugaban un papel en el proceso de rechazo de los injertos, entonces razonó que al destruir los linfocitos conseguiría la tolerancia del injerto, la supresión del sistema inmune la intentó mediante radiación, agentes químicos o extirpando el bazo (Barnes 1953). Peter Medawar demostró que el rechazo de los injertos de piel realizados entre conejos y ratones genéticamente diferentes mostró especificidad y memoria, características atribuidas previamente a la respuesta inmune frente a patógenos (Medawar 1944). Mitchinson comprobó que el rechazo de injertos de piel es mediado por células y no por anticuerpos (Mitchinson 1953). En 1947 Peter Medawar, mediante su trabajo en cultivo de tejidos, descubrió que el rechazo de tejidos trasplantados de una persona genéticamente distinta ocurría mediante un mecanismo inmunológico, sin embargo, este mecanismo era independiente de los entonces conocidos antígenos que se producían mediante la vacunación (Billingham 2010). Burnet y Fener en 1949, complementaron los estudios de Medawar, al descubrir que el cuerpo podía distinguir entre lo propio y lo no propio; sin embargo, los injertos trasplantados entre vacas gemelas eran

tolerados, teorizaron entonces, que esta capacidad del cuerpo de diferenciar entre lo propio y lo no propio ocurría en el período embrionario (Billingham 2010).

En 1953 Peter Medawar publicó finalmente que mediante el uso de ratones "quimera", estos ratones podían donar o recibir trasplantes de los ratones que les daban origen. Las investigaciones de Medawar sobre la tolerancia inmunológica adquirida fueron la llave que abrió paso al campo de la trasplantología (Billingham 2010). Posteriormente, se comprobó que se podía reconstituir el tejido hematopoyético de animales irradiados, a partir de elementos celulares obtenidos a partir del bazo o la médula ósea y, que estas células más adelante conocidas como células madre hematopoyéticas (HSC) pueden sobrevivir a la criopreservación. A fines de la década de los 80 y 90s Weissman demostró que la médula ósea de ratón contenía una alta proporción de células madre hematopoyéticas (HSC) que podrían repoblar todos los linajes hematopoyéticos.

Eventualmente los experimentos de Medawar sobre tolerancia inmune a trasplantes, se extendieron a mamíferos y aves, comprobando que se podría reconstituir el tejido hematopoyético únicamente cuando se infundían injertos con HSC histocompatibles, sin embargo, esos animales luego morían debido a diversas reacciones inmunomediadas. Estos estudios mostraron que inducir tolerancia inmune en animales adultos era más difícil, debido a las reacciones inmunes bidireccionales entre tejido y receptor, como el rechazo a las células o tejido del donante o el rechazo del receptor contra el injerto y otras reacciones inmunomediadas de las células o tejido injertado contra el receptor; en este último caso encontramos dos fenómenos inmunes; el primero hoy conocido como: el efecto injerto contra tumor (EICT) considerado uno de los objetivos del alo-TPH donde los linfocitos T del injerto identifican antígenos provenientes de las células neoplásicas y desencadenan una respuesta inmune para su control (efecto benéfico antitumoral); el segundo fenómeno inmune es la enfermedad injerto contra receptor (EICR), esta reacción ocurre cuando el injerto desencadena una respuesta inmune contra los tejidos del huésped de manera indiscriminada incluyendo células tumorales y tejidos normales, este fenómeno provocó tasas altas de morbilidad y mortalidad durante los primeros años de historia del trasplante de médula ósea.

Los avances en la comprensión de los mediadores implicados en la aparición de la EICR se acompañaron de la observación de que la administración de metotrexate era efectiva tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la EICR; esto ofreció las herramientas necesarias para intentar alo-TPH en humanos.

Los esfuerzos de investigadores por controlar el EICR y potenciar el EICT para el control de las células neoplásicas, llevaron a que en la década de los 60 y 70s se determinara que los linfocitos se componían de diferentes cepas de células con diferentes funciones (linfocitos T, B, etc), y se encontró que niveles bajos de linfocitos T contaminantes en fuentes parcialmente purificadas de células madre hematopoyéticas pueden causar EICR, pero si las células T se eliminan por completo, la recaída leucémica es más probable, aunque ese riesgo podría reducirse significativamente mediante la infusión de linfocitos del donante (DLI) (Barker 2013).

A partir de 1957, con el desarrollo de anticuerpos monoclonales por Milstein y Kohler, se facilitó el uso de reactivos altamente específicos para identificar y separar tipos celulares mediante sus moléculas de superficie y, entre 1970 y 1980 Len Herzenberg mediante el uso de activadores de fluorescencia activados fue crucial para definir un fenotipo y las funciones de los subconjuntos de células linfoides y en general hematopoyéticas (Kohler 1957) (Hardy 2013) (Uchida 1992).

El origen del trasplante de tejido hematopoyético, basado en los trabajos de Medawar, vino de la mano de dos investigadores, en primer lugar, Loutit en 1953, quien mostró que era posible la restauración de la hematopoyesis en ratones sometidos a radiación, mediante la infusión de células esplénicas obtenidas de cepas consanguíneas (Barnes and Loutit 1953); en segundo lugar, Donnall Thomas quien en 1957, informó por primera vez, que 6 pacientes quienes habían sufrido ablación o destrucción de su médula ósea por radiación y quimioterapia, recibieron trasplantes de médula ósea de donantes sanos, lo cual le mereció el premio nobel (Thomas 1957).

En 1959, se reportaron dos alo-TPH en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, tratados con irradiación corporal total (TBI), utilizando injertos de sus gemelos idénticos, la recuperación de la hematopoyesis se consiguió en semanas, pero, posteriormente los dos fallecieron por progresión de la enfermedad. La primera serie exitosa de 3 pacientes

sometidos a alo-TPH debido a inmunodeficiencia congénitas se reportaron por Holland entre 1968 a 1969 (Barker 2013).

2.1. Conceptos y evolución del trasplante de progenitores hematopoyéticos.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), es una transferencia de células progenitoras hematopoyéticas (HSC) y linfocitos a partir de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical, con el objetivo de restablecer la producción de células sanguíneas funcionales en pacientes que presentan una médula ósea y/o sistema inmune disfuncionales o ineficientes (Davis 2000) (Bleakley 2004). A partir de 1980 el trasplante de progenitores hematopoyéticos ha pasado de ser un tratamiento experimental, a ser el tratamiento estándar en un creciente número de enfermedades, porque ha demostrado ser una terapia efectiva, muchas veces la única, para pacientes con leucemias agudas de alto riesgo. Después de 60 años de investigación, el alo-TPH, ha mejorado la supervivencia de los pacientes con neoplasias hematológicas y otras enfermedades no neoplásicas como enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias severas en las cuales se emplea (Niederwieser 2019).

La disponibilidad de un registro internacional de donantes no emparentados alrededor del mundo con ascendentes posibilidades de encontrar un donante compatible, el avance en las técnicas de genotipificación y preservación de las células, el progreso de los cuidados de soporte, el uso de inmunosupresores y uso de nuevas fuentes de progenitores hematopoyéticos, han estimulado el creciente uso de este procedimiento en mayor cantidad de patologías y pacientes de mayor edad (Gooley 2010) (E. D. Carreras 2019). Anualmente se realizan en el mundo cerca de 40.000 alo-TPHs, según el World Wide Network of Blood and Marrow Transplantation, y su número continúa incrementándose anualmente entre un 10 a 20% (Niederwieser 2019)(Figura1).

HSCT 1957 - 2016

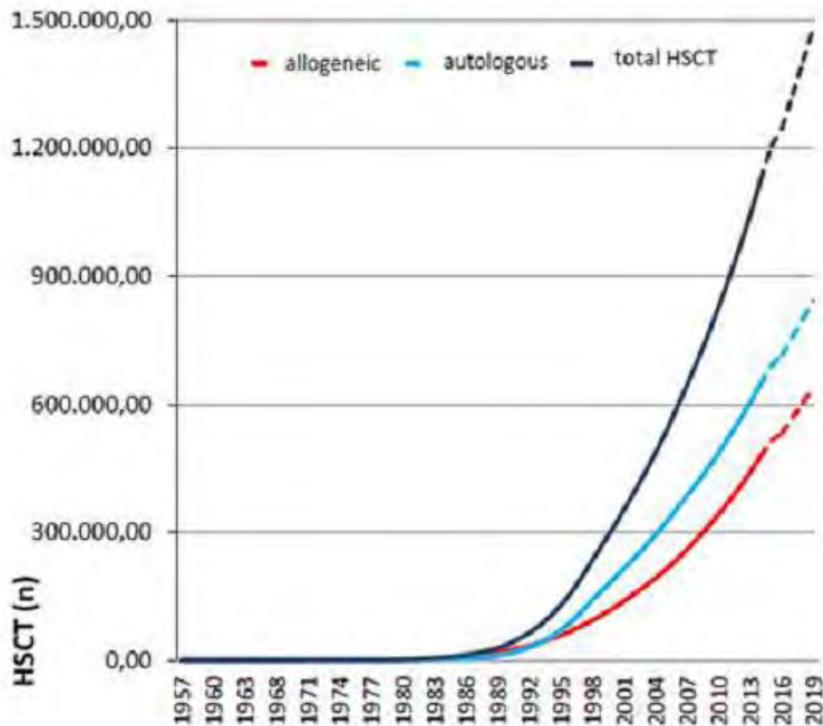


Figura1. Incremento progresivo en el número de trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH), allogenic: alogénico; autologous: autólogo; HSCT:TPH. Extraído de "One and Half Million Hematopoietic Stem Cell Transplants (HSCT). Dissemination, Trends and Potential to Improve Activity By Telemedicine from the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT)." Niederwieser D, et al, 2019, Blood 134 (Supplement_1): 2035. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-125232>.

3.MÉDULA ÓSEA, HEMATOPOYESIS Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.

3.1 Médula ósea y hematopoyesis.

La médula ósea es un órgano que se encuentra en la cavidad interna y esponjosa de los huesos largos y en los espacios trabeculares de los huesos planos. Esta cavidad está formada por un compartimiento vascular y un compartimiento hematopoyético. El compartimiento hematopoyético está compuesto por islotes de células de diferentes linajes celulares en diferentes estados madurativos, que conforman la hematopoyesis (eritroblástica, granulocitaria, monocítica, linfoide, megacariocítica como las más destacadas), la matriz extracelular y las células del estroma medular (macrófagos, osteoblastos, fibroblastos, células adiposas y endoteliales) que funcionan como sistema de sostén de las células

hematopoyéticas, pero que también participan en la creación de un microambiente mediante la secreción de citoquinas, moléculas de adhesión celular y factores de maduración que permiten y mantienen la hematopoyesis (Figura2).

La hematopoyesis es el proceso de formación, renovación, maduración y diferenciación de las células que conforman el tejido sanguíneo (Taichman 2005). La médula ósea tiene una enorme capacidad de producción células, las células sanguíneas maduras, son continuamente producidas por los llamados progenitores hematopoyéticos o Unidades formadoras de colonias (UFC), que son células menos diferenciadas, comprometidas con un linaje celular (ejemplo UFC mieloides o linfoideas), a su vez esas UFC provienen de progenitores hematopoyéticos multipotentes (con el potencial de diferenciarse en varios linajes celulares), los cuales en última instancia son progenie de las llamadas células madre hematopoyéticas (HSC) o progenitores totipotentes (Sieff 2022).

3.2 Células madre (Stem Cells) y trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Las células madre de un tejido (Stem cells), son células indiferenciadas que aún no han desarrollado estructuras o proteínas que identifican a ese tejido o linaje celular en particular, sin embargo, poseen todo el potencial para desarrollarlas. Por lo tanto, las células madre contribuyen a la creación de todas las células maduras del cuerpo humano y son la base de cada tejido y órgano. Las células madre en general, deben tener dos características importantes, en primer lugar, capacidad de autorenovación (capacidad de proliferación) y en segundo lugar, gran potencial de diferenciarse en diferentes tipos celulares para conformar todo tipo de tejidos, en el caso de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas (HSC) son capaces de repoblar todos los linajes celulares que conforman el tejido hematopoyético, a partir de la generación de progenitores multipotentes y estos a su vez se diferencian en UFC (Figura2). Por tanto, las HSC son capaces de restaurar un sistema hematopoyético entero en un animal que ha sido irradiado de manera letal (Charitos 2021).

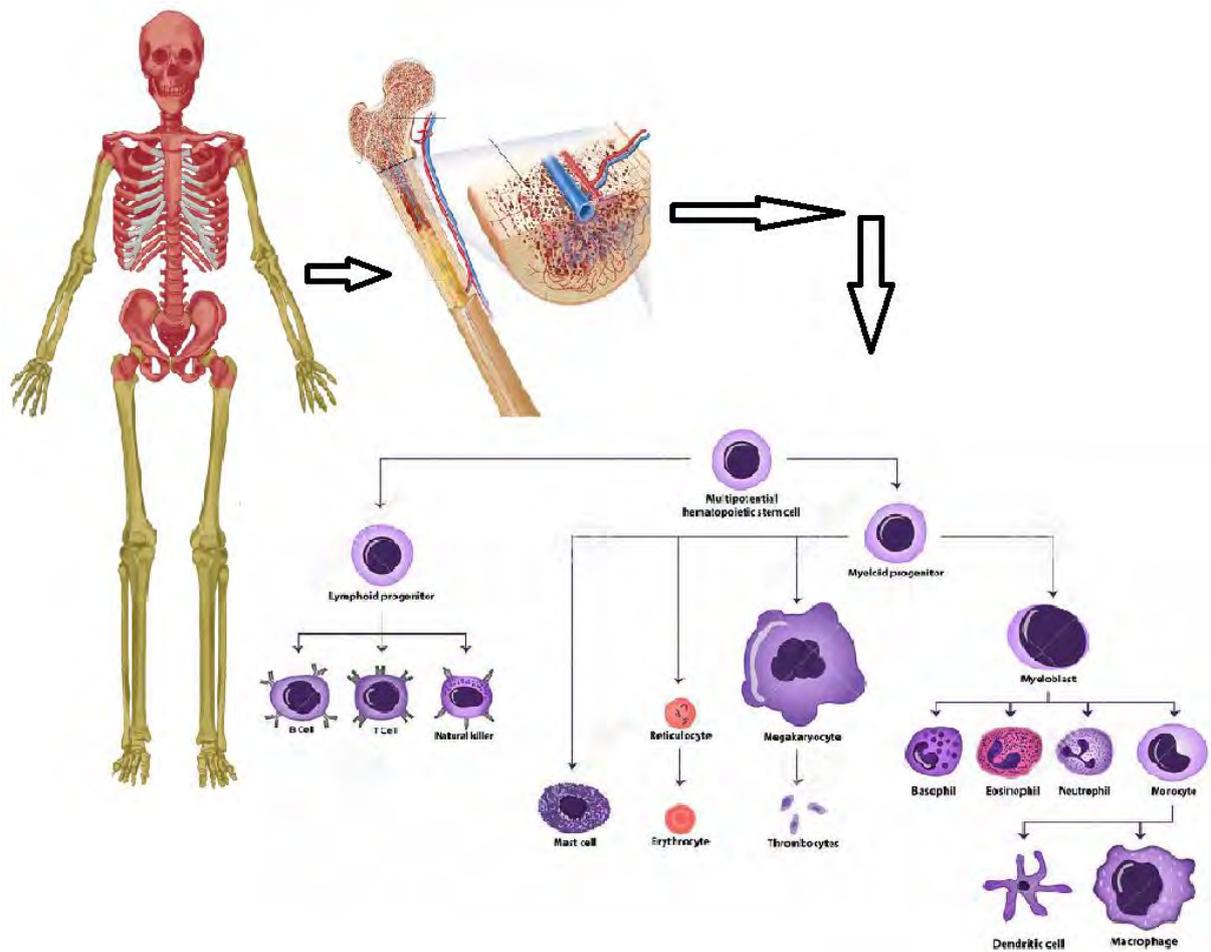


Figura2. Médula ósea, hematopoyesis y células madre o progenitores hematopoyéticos. Adaptado de " La diferenciación de células de la hematopoyesis tipos de vectores ilustración" de Vit Krajicek, 123rf.com.

La célula madre hematopoyéticas (HSC), representa menos de un 1% de toda la celularidad de la médula ósea, es la primera célula madre adulta aislada y ampliamente estudiada, ese conocimiento acumulado ha sido trasladado para su utilización clínica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, para la conseguir la completa restitución de la hematopoyesis y el sistema inmune en un receptor (Skulimowska 2021).

Las HSC no son identificables morfológicamente, por lo cual se han utilizado marcadores de superficie para identificarlas y purificarlas; en los humanos el marcador más empleado es el antígeno CD34 que no solo se expresa en las HSC, sino también en progenitores hematopoyéticos más diferenciados. En el campo del trasplante de progenitores hematopoyéticos, el conteo de células CD34+ es utilizado clínicamente para determinar si el

injerto contiene suficiente volumen de HSC para lograr una correcta recuperación de la hematopoyesis.

La base teórica de la utilidad del trasplante se cimenta en el potencial que tienen las HSC de diferenciarse y generar progenie capaz de retener esta capacidad de autorenovación bajo los estímulos adecuados para restaurar la hematopoyesis después de recibir quimioterapia y/o radioterapia a altas dosis (Copelan 2006). Sin embargo, a pesar del efecto antitumoral que supone la quimioterapia y/o radioterapia a altas dosis usadas como acondicionamiento, aún existe la posibilidad de recurrencia de la enfermedad, es entonces aquí, donde reside el beneficio del uso de las HSC y los linfocitos obtenidos de un donante alogénico, el objetivo es conseguir que las células tumorales residuales del paciente puedan ser reconocidas, controladas o incluso eliminadas mediante la activación de los elementos del sistema inmune presentes en el injerto del donante (Bleakley 2004).

4. SISTEMA INMUNE, PATRONES DE RECONOCIMIENTO INMUNE E INMUNOBIOLOGÍA DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

El funcionamiento del sistema inmune se ha estudiado desde un modelo que entiende el reconocimiento antigénico como su propiedad fundamental (Chaplin 2010) (Flajnik 2010). A través de la historia de la inmunología, se ha mantenido el patrón "propio/no propio", como principio de estudio del reconocimiento inmune. Entendiendo el sistema inmune como el mecanismo implicado en el mantenimiento de la integridad del organismo y su defensa frente a amenazas externas como patógenos y toxinas, así como internas, como tumores y metabolitos tóxicos generados de forma endógena.

El sistema inmune requiere estrategias de reconocimiento celular y molecular dinámicas, a su vez estas estrategias son moduladas por la naturaleza del estímulo antigénico, la integridad de los componentes del sistema inmune y el microambiente, lo cual determinará la generación de una respuesta de tolerancia o una activación del sistema inmune que desencadenará una respuesta inmune de protección (Flajnik 2010).

La tolerancia inmune, se refiere a la existencia de mecanismos reguladores, que permitan la generación de una respuesta inmune eficiente frente a antígenos, al tiempo que coexista una

estricta regulación de la activación inmune para prevenir daños; el objetivo de la tolerancia inmune es en primer lugar, evitar una respuesta inmunológica frente a antígenos propios y, en segundo lugar, evitar que una respuesta exagerada a antígenos induzca daño tisular colateral. Por tanto, la respuesta inmune debe ser capaz de activarse frente a un antígeno externo (no propio) y al mismo tiempo generar una tolerancia a lo propio (Iwasaki 2010).

Sin embargo, el patrón propio/no propio en el marco del reconocimiento inmunológico se ha mostrado insuficiente para comprender como y qué desencadena la respuesta inmunológica, ya que, el sistema inmunitario debe equilibrar la capacidad de generar la respuesta inmune contra amenazas "reales" al organismo, sean externas (patógenos, toxinas) o internas (células neoplásicas o metabolitos internos), al tiempo que debe ser tolerante con aquellos antígenos internos (derivados del propio organismo sano o embriones) y externos con los cuales convivimos o entramos en contacto cada día en un sistema abierto como: el aire, los alimentos, medicamentos o la flora bacteriana. Por tanto, se han usado otros patrones o modelos en donde las categorías "inmunógeno" y "exógeno" no son equivalentes (Flajnik 2010) (Liu 2016).

4.1. Sistema inmune innato y adaptativo.

El sistema inmune es la maquinaria desarrollada por los seres vivos a lo largo de años de evolución para defender al organismo de los patógenos externos. Existen dos tipos de inmunidad: mientras que el sistema inmune innato actúa como primera línea de defensa, usando para ello células constitutivas e inespecíficas, el sistema inmune adaptativo es aquel que permite una respuesta de alta especificidad antigénica, facilitando además una eficaz protección contra reexposiciones al mismo patógeno, mediante un mecanismo de memoria inmunológica (Cunningham 2021).

Los mediadores de la respuesta innata representan la primera línea de defensa, pero poseen una especificidad limitada, lo conforman: las barreras cutáneo-mucosas, el sistema del complemento y células con función fagocítica (polimorfonucleares y macrófagos) y células con capacidad citotóxica (células NK y linfocito T CD8+). Todos estos mediadores van a dar lugar a una respuesta rápida pero no específica frente a cualquier patógeno, este tipo de respuesta implica por lo general, un proceso inflamatorio citotóxico que no involucra

reconocimiento de antígenos necesariamente, sin embargo, se requieren mecanismos de reconocimiento de antígenos propios que permitan evitar un ataque indiscriminado contra elementos propios; en este sentido, la activación de la células NK son un claro ejemplo, son capaces de reconocer células infectadas por patógenos y tienen importante actividad antitumoral porque identifican en ellas la pérdida de expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I (Toche 2012) (Regueiro JR. 2011)(Figura3).

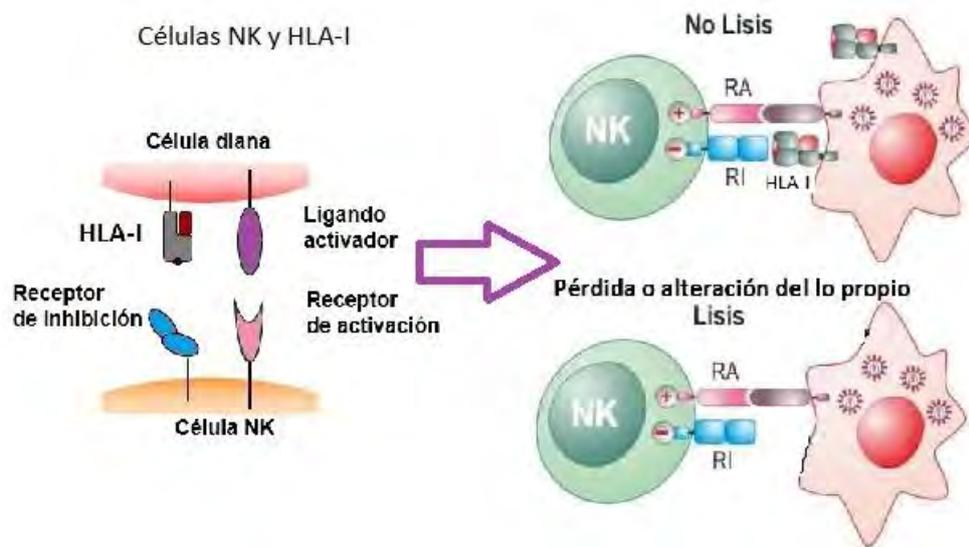


Figura3. Inmunidad innata mediada por células NK (Natural Killer). Adaptado de " Biología y patología del sistema inmune" Regueiro J.R. et al, Inmunología, 2011, Ed. Panamericana. Madrid.

Por otro lado, la inmunidad adaptativa vendrá mediada por linfocitos B y T reguladores (CD4+), el proceso de activación de la inmunidad adaptativa requiere el reconocimiento de antígenos, este proceso confiere capacidades de especificidad y memoria de las células involucradas (linfocitos T y B), con el objetivo de mejorar la capacidad defensiva frente a exposiciones sucesivas. La inmunidad adaptativa posee dos tipos de respuestas inmunes: inmunidad celular e inmunidad humoral (Figura4).

La activación de los linfocitos T, requiere la presentación del antígeno por parte de una célula especializada, como son las células dendríticas o los macrófagos tisulares, la presentación del antígeno requiere su unión a moléculas de histocompatibilidad tipo I o tipo II. Esta interacción entre célula presentadora de antígeno y linfocito T se produce en lo que llamamos la sinapsis inmunológica (Shape 2009). En esta sinapsis, la célula presentadora de antígeno expresa en

su superficie una serie de péptidos procedentes de la degradación de proteínas endógenas. Este sistema de presentación de antígenos endógenos forma parte del “control de calidad” del organismo, de manera que aquellas células que expresen péptidos que no son reconocidos como propios por el sistema inmune sean eliminadas. Este es el mecanismo que ayudará a eliminar células infectadas por virus o incluso células que hayan sufrido una transformación tumoral y presenten antígenos tumorales en su superficie (Toche 2012).

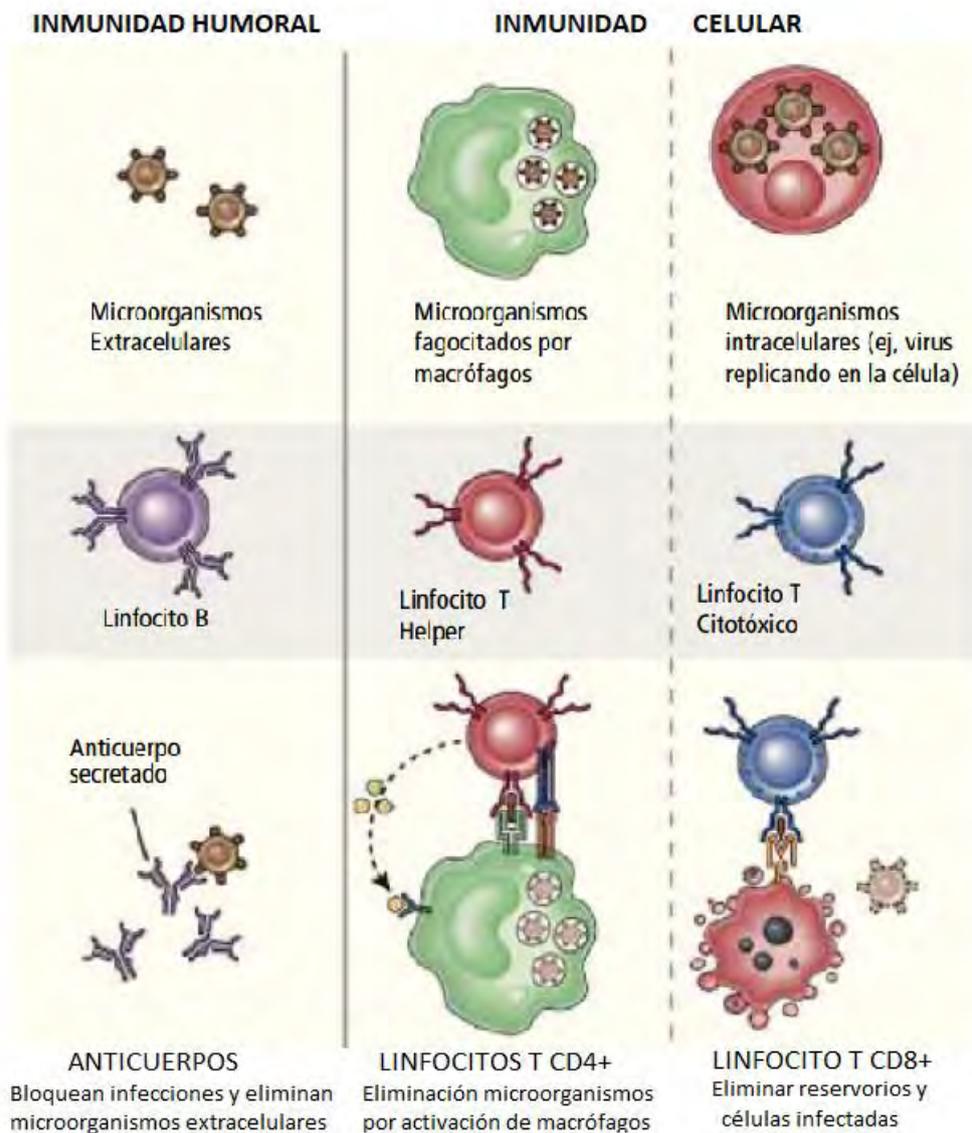


Figura4. Inmunidad adaptativa. Adaptado de "Visión panorámica del sistema inmune." Toche Paola. 2012. *Revista de medicina clínica Condes*. 23:446-457. DOI: 10.1016/S0716-8640(12)70335-8

4.2. Sinapsis inmunológica.

El proceso de presentación antigénica requiere que los péptidos lleguen a la superficie celular. Para ello y tras la degradación de las proteínas en el proteasoma, los péptidos son translocados al retículo endoplasmático a través de proteínas transportadoras (como es el caso de TAP) y cargados en la zona de unión peptídica de las moléculas HLA de clase I (HLA-A, -B o -C), estabilizadas tras la unión a beta-2 microglobulina. Una vez cargados los péptidos en la molécula HLA, éste complejo es transportado hasta la membrana citoplasmática de la célula presentadora de antígenos. En el otro lado de la sinapsis, el linfocito T citotóxico expresa en su superficie el receptor de célula T (TCR), que será el encargado de reconocer al complejo péptido-HLA. En caso de que el antígeno no sea reconocido como propio, se desencadena una señal de activación del linfocito T. Sin embargo, es necesaria la presencia de una segunda señal para que la activación del linfocito T sea efectiva. Esta segunda señal (o señal de coestimulación) vendrá dada por la unión de la molécula CD28, expresada en la superficie del linfocito T con las moléculas CD80 o CD86 de la superficie de la célula presentadora de antígeno. Otras moléculas coestimuladoras presentes en el reconocimiento antigénico son CD40 y su ligando CD154 (Figura5).

Una vez activado el linfocito T, se liberará interleucina 2, así como enzimas responsables de permeabilizar la membrana de la célula presentadora de antígeno (perforina) y de estimular la apoptosis de dicha célula (granzima).

Debido al fenómeno de amplificación de la respuesta, más células efectoras serán reclutadas, y los linfocitos T CD4 activarán la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. El mecanismo por el que la activación linfocitaria cesa está relacionado con la inhibición de la señal de coestimulación: transcurridas unas horas desde la activación, se empieza a expresar en la superficie del linfocito T la molécula CTLA-4, una molécula que compite con CD28 para su unión a CD80 y CD86, pero con mayor afinidad. Así, CTLA-4 desplaza a CD28 y esto genera una segunda señal que ya no es activadora, sino inhibidora. De esta manera, el sistema inmune consigue que la activación no sea perpetua y que la amplificación de la respuesta no llegue a producir daños tisulares en células vecinas o fenómenos de autoinmunidad (Sherman 1993).

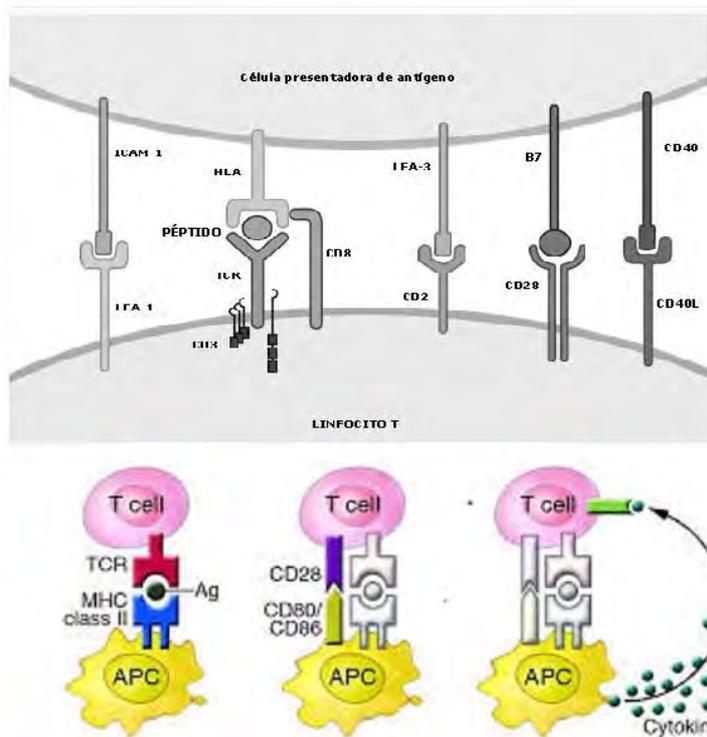


Figura5. Representación esquemática de la sinapsis inmunológica. Adaptado de "JCI0731720.f1.jpg" de http://josedondarza.com/Bio406/Handouts/notes_05.htm.

4.3. Inmunobiología del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

En las últimas décadas los mecanismos de control inmunológico encargados de iniciar y mantener una respuesta inmune efectiva son mejor entendidos y por tanto actualmente es posible saber que las células T del donante pueden inducir una respuesta antitumoral efectiva (efecto injerto contra tumor EICT) (Davis 2000) (Bleakley 2004).

El interés actual del campo relacionado con la inmunología tumoral es intentar que el sistema inmune tenga una potente acción antitumoral igual de efectiva que cuando actúa contra microorganismos; hoy en día conocemos que este potente efecto mediado por las células T CD8+ y CD4+ del donante está dirigido hacia antígenos presentados por las células neoplásicas que son reconocidas como extrañas, sin embargo, el sistema inmune del receptor en la mayoría de casos no es capaz de activar una respuesta contra estos antígenos tumorales, previsiblemente por una deficiencia del mismo que puede ser causada por varios factores: el primero, que al emerger las células neoplásicas de los tejidos propios del receptor, aunque expresan antígenos tumorales estos no sean particularmente inmunógenos y el segundo que el paciente tenga alterados los mecanismos que activan la maquinaria encargada del

procesamiento y presentación de antígenos o de la migración de células efectoras al lugar de localización de la neoplasia, en muchos casos como consecuencia de la producción de moléculas inhibitoras por las células neoplásicas (Storb 2001).

5. GENERALIDADES DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

5.1. Definición.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos es la infusión por vía endovenosa de células progenitoras hematopoyéticas (HSC) a un paciente para restaurar una hematopoyesis y sistema inmune deficiente, generalmente empleado para tratar neoplasias generalmente derivadas del tejido hematopoyético. Estas HSC pueden ser obtenidas a partir de la sangre periférica, por extracción directa mediante aspiración de la médula ósea o a partir de la sangre de cordón umbilical (Thomas 1975) (Figura6).

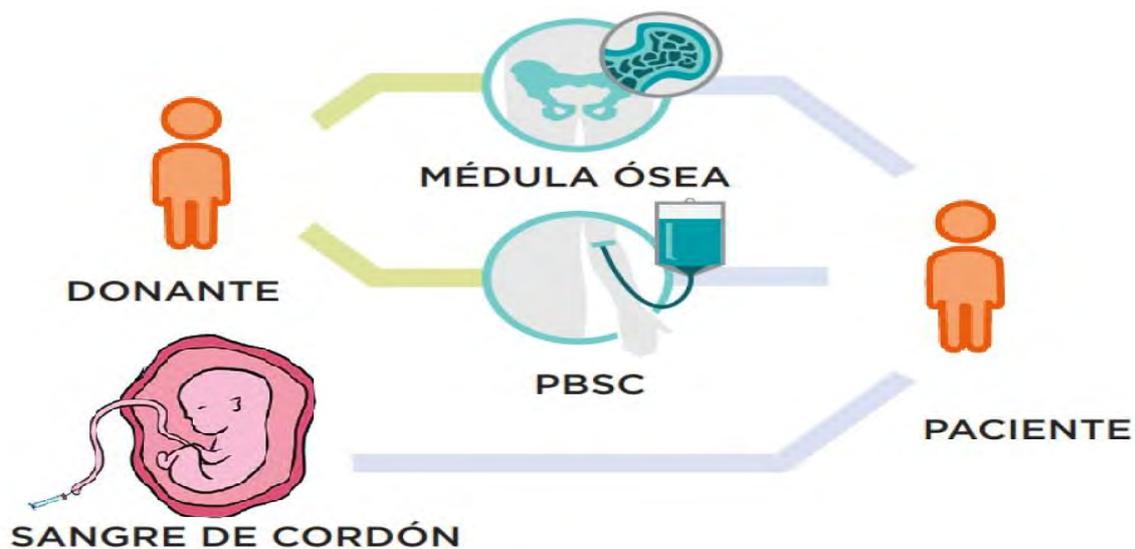


Figura6. Fuentes de progenitores hematopoyéticos. PBSC: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. Adaptada de "HSCT (haematopoietic stem cell transplantation)" de <https://www.mssociety.org.uk/about-ms/treatments-and-therapies/disease-modifying-therapies/hsct>

5.2 Tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos.

5.2.1. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH).

El alo-TPH implica la transferencia o infusión de progenitores hematopoyéticos obtenidos a partir de un donante sano, que sea compatible genéticamente con el receptor. La compatibilidad HLA es el principal determinante, por lo que inicialmente se intenta usar un donante emparentado HLA idéntico, pero si esto no es posible se puede buscar un donante no emparentado con una compatibilidad genética HLA elevada.

El alo-TPH tiene dos características distintivas, en primer lugar, el inóculo no está contaminado con células malignas y, en segundo lugar, contiene linfocitos T capaces de mediar una reacción inmunitaria contra antígenos extraños, como los que expresan las células neoplásicas (Balassa 2019).

La base teórica de la utilidad del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos se fundamenta en el potencial que tienen las HSC del donante de diferenciarse y generar progenitores capaces de retener esta capacidad de autorenovación y diferenciación bajo los estímulos adecuados para restablecer todo el tejido hematopoyético (Copelan 2006). Del mismo modo, las células neoplásicas emergen también de células progenitoras que probablemente pierden el control sobre sus mecanismos de replicación y diferenciación (Lessard 2003). Por esta razón nos encontramos que, en muchas neoplasias derivadas del tejido hematopoyético, a pesar de conseguir una remisión de la enfermedad mediante el uso de la quimioterapia, persisten células progenitoras neoplásicas con el potencial de permitir la recurrencia de la enfermedad. Este concepto se conoce como enfermedad mínima residual (EMR). Se ha planteado que estas células neoplásicas residuales pueden ser controladas o incluso eliminadas mediante la activación del sistema inmune transferido al paciente a partir del injerto de un donante sano (Bleakley 2004).

Por tanto, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, como terapia antineoplásica, consiste en reemplazar el tejido hematopoyético defectuoso y con potencial tumoral del paciente, por el de un donante sano a través de la transferencia de progenitores hematopoyéticos capaces de generar en el paciente (receptor) un tejido hematopoyético sano, pero, además este injerto aportará linfocitos T capaces de activar una respuesta inmune

contra las células tumorales residuales, causando el denominado efecto injerto contra tumor o injerto contra leucemia (EICT o EICL). Para conseguir este objetivo es indispensable primero controlar o disminuir al mínimo la carga tumoral o la EMR. Este EICT busca erradicar la enfermedad y disminuir el riesgo de recaída. Sin embargo, cuando la respuesta inmunitaria se dirige contra antígenos presentados en tejidos sanos del receptor, puede causar daño colateral y destrucción de estos tejidos, este efecto en la clínica se describe como enfermedad de injerto contra receptor (EICR) (Balassa 2019).

5.2.2. Trasplante singénico de progenitores hematopoyéticos.

Su principal característica es, el uso de HSC a partir de un donante gemelo idéntico, esto garantiza una compatibilidad genéticamente idéntica a las del receptor, sus principales ventajas son, en primer lugar, que no se asocia a EICR o rechazo del injerto, lo cual determina un riesgo relativamente bajo de morbilidad y mortalidad asociada al procedimiento. En segundo lugar, como en el trasplante alogénico convencional se garantiza la ausencia de contaminación del injerto con células neoplásicas residuales. Su principal desventaja es la poca capacidad de generar activación del sistema inmune para conseguir el efecto injerto contra tumor o leucemia (EICT o EICL) transferido al paciente a partir del injerto de un donante sano. Sin embargo, menos del 1% de pacientes tienen un gemelo idéntico, por tanto, no es una opción terapéutica disponible en muchos casos (Balassa 2019).

5.2.3. Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH).

En el auto-TPH se utilizan células madre hematopoyéticas extraídas del propio paciente; este procedimiento se realiza principalmente para tratar neoplasias malignas como linfomas, mielomas y algunas neoplasias derivadas de tejido germinal.

El fundamento principal del uso del auto-TPH es que estas las células cancerosas exhiben una pronunciada curva dosis-respuesta a la quimioterapia y a la radiación, pero la principal limitación de la administración de altas dosis de quimioterapia o radioterapia es su efecto mielosupresor que en algunos casos puede ser mortal. El auto-TPH permite la administración de quimioterapia y/o radioterapia a altas dosis, (llamada durante el proceso de trasplante, acondicionamiento) que provoca una aplasia o mielosupresión severa que dificulta la restauración de la hematopoyesis y del sistema inmune. Esta situación es rescatada mediante

la subsiguiente infusión de HSC obtenidas previamente del paciente y criopreservadas. Dichas células madre, infundidas por vía endovenosa permiten restablecer la hematopoyesis y la inmunidad (Saijo 1997) (Figura7).

El auto-TPH también es un tratamiento prometedor para algunas enfermedades autoinmunitarias, en las que se administra un tratamiento en dosis altas con el objetivo de atenuar o reiniciar la respuesta inmunitaria autorreactiva y reconstituir la inmunidad a partir de las HSC obtenidas del propio paciente (Burt 2002).

Las principales características del auto-TPH son: el paciente es su propio donante y puede emplearse en pacientes mayores con una morbimortalidad significativamente baja debido a la ausencia de reacciones inmunomediadas de rechazo como la EICR, que se presentan en trasplantes alogénicos. Sin embargo, las desventajas del auto-TPH son dos: a) la administración de quimioterapia a altas dosis puede asociarse a mayor toxicidad que la administración de quimioterapias a dosis convencionales y b) se asocia a una mayor frecuencia de recidivas que el trasplante alogénico por la falta del efecto antitumoral mediado por los linfocitos T del donante (Balassa 2019).

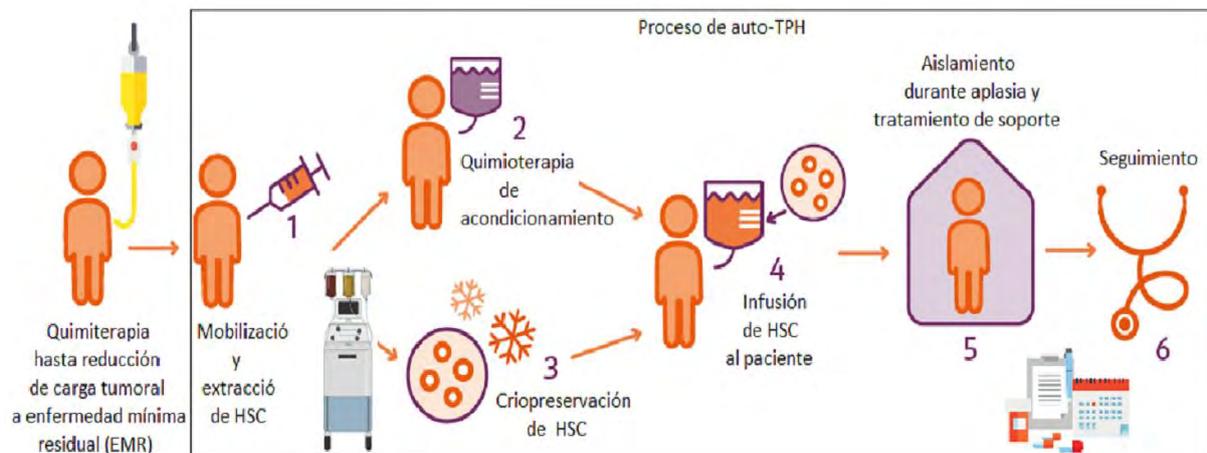


Figura7. Proceso de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH), HSC: progenitores hematopoyéticos. Adaptada de "HSCT (haematopoietic stem cell transplantation)" de <https://www.mssociety.org.uk/about-ms/treatments-and-therapies/disease-modifying-therapies/hsct>.

6. Elementos clínicos del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

6.1. Histocompatibilidad y selección del donante

6.1.1. Complejo mayor de histocompatibilidad CMH y sistema HLA.

El descubrimiento a finales de los años 50, del sistema de compatibilidad leucocitaria antigénica humana CMH o HLA, supuso un eje fundamental en la historia del trasplante de tejidos y le valió el premio nobel a Benacerraf, Dausset y Snell. A partir de los primeros trasplantes de médula ósea publicados en 1957 por Donnall Thomas (Thomas 1957), se desarrollaron estudios primero en animales luego trasladados a humanos, que llevaron a la identificación y reconocimiento del papel central, que juega la compatibilidad genética entre donante y receptor en el éxito del trasplante de tejidos. (Juan 2012) (Snell 2014).

El trasplante alogénico involucra a un donante y un receptor que no son genéticamente idénticos, por tanto, las células linfocitarias del donante trasplantadas pueden reaccionar contra los tejidos del paciente, causando reacciones inmunomediadas diversas, tanto beneficiosas para el control de la enfermedad tumoral residual (EICT), así como reacciones inmunitarias contra los tejidos sanos del donante que provocan un alto riesgo de morbimortalidad relacionada con el procedimiento o EICR. El control de estas reacciones de EICR no deseadas, requieren tratamiento inmunosupresor en su mayoría en el período peri-trasplante.

El riesgo de aparición de la EICR está determinado principalmente por el grado de paridad genética entre donante y receptor en el sistema HLA.

Las moléculas del sistema HLA son codificadas por una región genómica que incluye múltiples genes responsables de la coordinación de la respuesta inmunitaria, esta región, se denomina complejo mayor de histocompatibilidad CMH, pero, su importancia va más allá de sus funciones relacionadas con histocompatibilidad (Munshi 2020).

Las moléculas pertenecientes al sistema HLA son proteínas polimórficas expresadas en la superficie celular, que regulan respuestas inmunes frente a antígenos mediante un proceso de unión, transporte a la superficie celular y presentación de péptidos derivados de proteínas endógenas o exógenas, procedentes por ejemplo de patógenos o de células neoplásicas. La

expresión de las moléculas del sistema HLA se puede dar en cualquier célula nucleada del organismo y es de gran importancia su expresión en las células presentadoras de antígenos. Por tanto, las moléculas del sistema HLA desempeñan una función central en la inmunidad adaptativa, cuya función principal es la presentación de péptidos o antígenos al receptor de los linfocitos T para su reconocimiento y para la estimulación de una respuesta inmune (Yewdell JW 2003)(Figura8).

Adicionalmente también participan en el proceso de la activación de la inmunidad innata mediante la interacción con receptores dispuestos en la superficie de las células citolíticas Natural Killer (NK) (Regueiro JR. 2011) (Figura9).

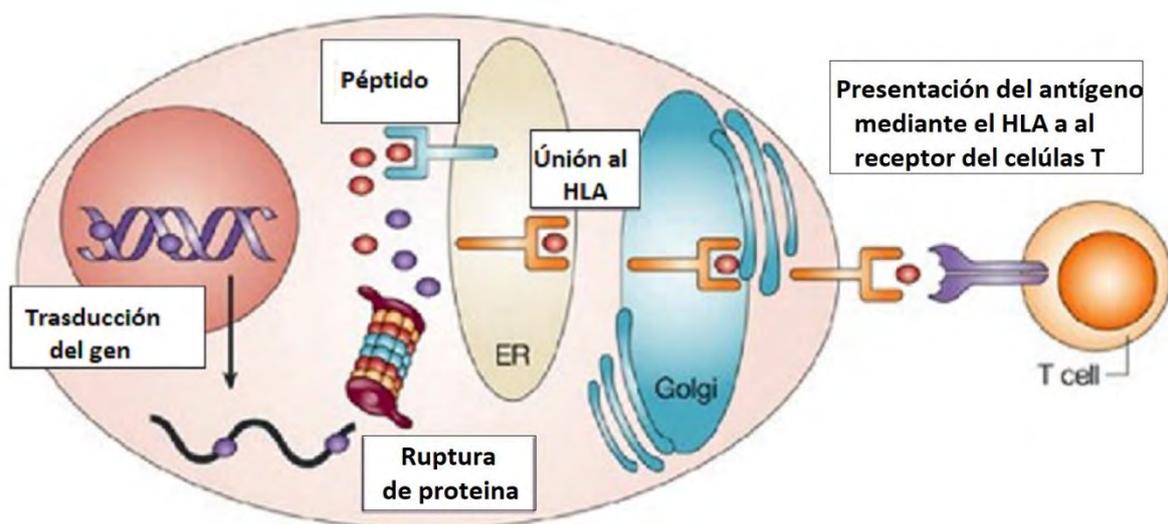


Figura8. Modelo de presentación de antígenos a los linfocitos T, mediante HLA tipo II. Adaptado de "Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation". Yewdell JW, 2003, Nature Reviews Immunology , 952–961 (2003). Doi: 10.1038/nri1250.

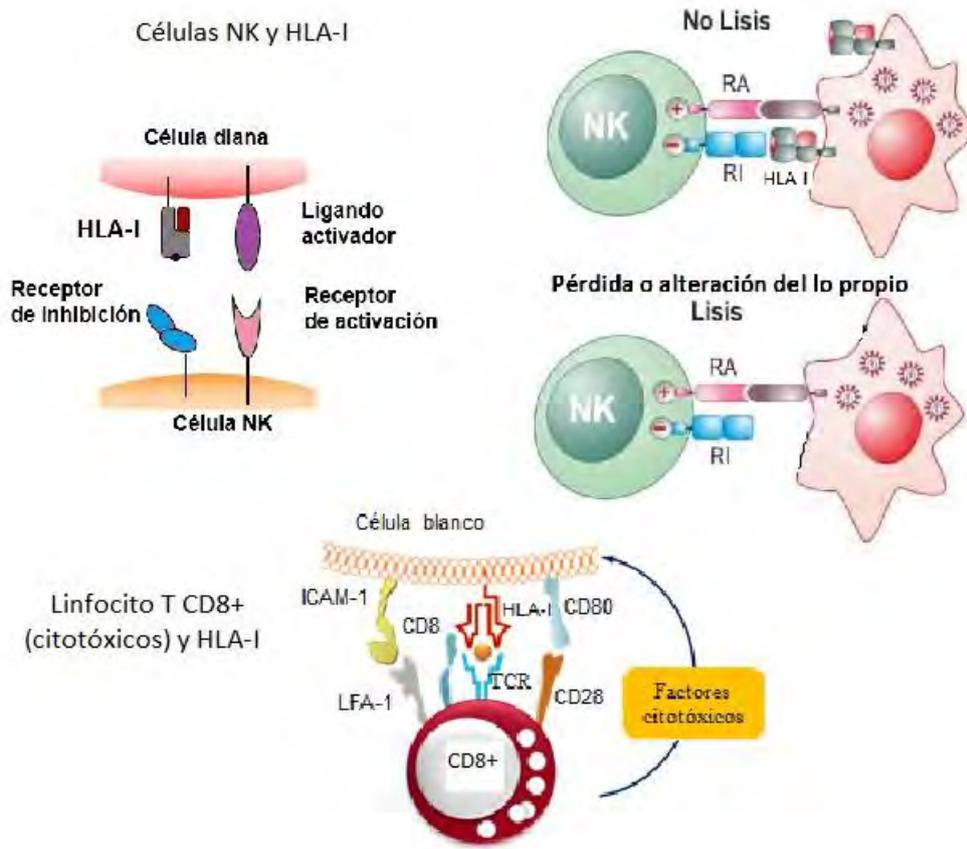


Figura9. Modelo de presentación de antígenos a través de las moléculas de HLA tipo I. Adaptado de " Biología y patología del sistema inmune" Regueiro J.R. et al, Inmunología, 2011, Ed. Panamericana. Madrid.

En el brazo corto del cromosoma 6 se localiza la zona génica que conforma el CMH, estando esta región compuesta por cerca de 200 genes relacionados con el sistema HLA. Esta zona del cromosoma que codifica el sistema HLA está subdividida en tres regiones según la clase de HLA: clase I, clase II y clase III. La región que codifica para el HLA clase I contiene genes que codifican los antígenos HLA clásicos, siendo los más importantes HLA-A, HLA-B y HLA-C por su alta tasa de polimorfismo (Moalic. 2008). Estas moléculas HLA de clase I son expresadas en prácticamente todas las células nucleadas del organismo, encargadas de la presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y células NK, por tanto, las moléculas de HLA clase I intervienen tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa.

La región que codifica para HLA de clase II contiene genes que codifican las moléculas, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Los genes de la clase II se expresan de forma constitutiva en un número muy restringido de tipos celulares especializados en la presentación de antígenos (células

presentadoras de antígenos y linfocitos B), como los son las células dendríticas y los linfocitos B, encargados de presentar antígenos a los linfocitos T reguladores (CD4+), sin embargo, pueden inducirse en otros tipos de celulares. La región que codifica para el HLA de la clase III tiene genes menos conocidos, pero incluye una serie de genes relacionados con la respuesta inmunitaria (Neefjes 2011) (Figura10).

La región codificante para las moléculas de HLA, se hereda como un solo conjunto de alelos del CMH, descrito como haplotipo, de cada progenitor, lo cual resulta en agrupaciones de genes del sistema HLA que tienden a heredarse y expresarse juntas. Los haplotipos se preservan por selección natural para dar ventajas de supervivencia, además los haplotipos frecuentes dentro de una población determinada parecen reflejar interdependencias funcionales entre los mismos. Los haplotipos pueden ser diferentes en poblaciones diferentes.

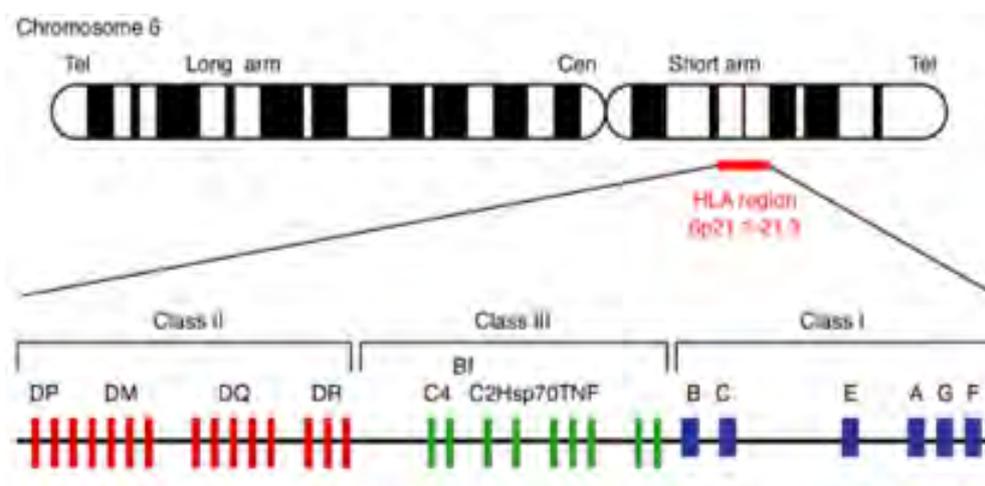


Figura10. Región del brazo corto del cromosoma 6 que codifica para el CMH. Tomado de "Comment est réalisé un typage HLA? How is HLA typing performed?" Moalic V., Réanimation (2008) 17, 407—411. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.03.006>

6.1.2. Selección del donante.

6.1.2.1 Trasplante alogénico a partir de donante no emparentado.

Los mejores resultados del TPH alogénico se producen cuando el donante es un hermano o familiar (DE) con los mismos haplotipos de HLA, asociándose el procedimiento a un menor riesgo de rechazo del injerto y de EICR. Sin embargo, la probabilidad de que un hermano sea HLA compatible es sólo del 25%. Por tanto, en ausencia de un familiar compatible, la

alternativa clásica la constituyen los donantes voluntarios no emparentados (DnE). Estos donantes pueden localizarse gracias a su inscripción en los registros de donantes. El registro oficial en España es el Registro de Donantes de Médula Ósea (REDMO), creado en 1991 por la Fundación Josep Carreras contra la leucemia. Este registro cuenta con más de 200.000 donantes voluntarios, procedentes de todas las comunidades autónomas, y más de 60.000 unidades de sangre de cordón almacenadas en nuestro país. Adicionalmente, el REDMO tiene acceso a los más de 27 millones de donantes voluntarios internacionales, existentes en 75 registros de donantes repartidos en 53 países de todo el mundo, y a las 680.000 unidades de sangre de cordón existentes en 53 bancos de cordón de 36 países (Carreras 2022) (Figura11).

Las mejoras en las técnicas de genotipado del HLA, han permitido disponer de tipificación HLA de alta resolución y poder identificar así disparidades entre paciente y donante no emparentado que habían pasado desapercibidas históricamente, contribuyendo así a una mejor selección de donantes.

Además de la compatibilidad HLA donante-receptor como requisito principal para llevar a cabo el TPH, existen otra serie de valoraciones que deben ser consideradas para establecer la idoneidad de un donante. Así priorizamos donantes jóvenes, si existen donantes compatibles de distintas edades, priorizamos los donantes de sexo masculino y en caso de disponer de donantes de sexo femenino priorizaremos donantes sin gestaciones previas que hayan podido dar lugar a sensibilización antigénica HLA.

6.1.2.2. Trasplante alogénico a partir de sangre de cordón umbilical.

En 1989 la doctora Eliane Gluckman realizó en París el primer trasplante a un niño de 8 años con Anemia de Fanconi, empleando sangre de cordón umbilical de una hermana compatible. La evidencia sobre la disponibilidad de células madre hematopoyéticas (HSC) en la sangre de cordón umbilical había llevado a un interés sobre estas fuentes como potencial fuente para restablecer la hematopoyesis tras administración de quimioterapia a altas dosis. Las primeras experiencias sugerían además que los linfocitos T presentes en la sangre de cordón umbilical podrían ser especialmente tolerantes ante disparidades HLA, por lo que históricamente se aceptan un número moderado de disparidades HLA entre paciente y la unidad de sangre de cordón umbilical como donante. La disponibilidad de unidades de sangre de cordón

criopreservadas en bancos específicos y la flexibilidad en la exigencia de compatibilidad HLA llevó a la expansión de dichos bancos de sangre de cordón umbilical (Niederhuber 2020).

Sin embargo, la principal desventaja de esta fuente de progenitores representa la dificultad de disponer de una unidad con suficiente cantidad de HSC, si el receptor es una persona adulta (Carreras 2022). Asimismo, la recuperación hemoperifèrica e inmunológica más lenta que cuando se usan donantes adultos ha hecho que el uso de esta fuente esté actualmente en declive.

6.1.2.3. Trasplante de donante haploidéntico.

Es una modalidad de TPH realizado a partir de un donante con una compatibilidad del 50 % en el HLA (por tanto: receptor y donante comparten un haplotipo).

Las primeras experiencias llevadas a cabo por el grupo de Perugia se basaban en la administración de una “megadosis” de células madre y una intensa depleción de linfocitos T del inóculo. Además del elevado riesgo de EICR severa, dicha estrategia se asociaba a una intensa inmunosupresión post-TPH que daba lugar a múltiples infecciones oportunistas, por lo que inicialmente no trascendió el uso de este tipo de donantes. Sin embargo, actualmente se han generalizado este tipo de trasplantes usando el modelo propuesto por el grupo de Baltimore, consistente en usar ciclofosfamida post-trasplante para conseguir la eliminación de los linfocitos T altamente reactivos causantes de la EICR. Estos avances han hecho que los resultados del trasplante haploidéntico mejoren de manera progresiva y por esta razón, su empleo es cada vez más frecuente en pacientes que no cuentan con un donante compatible o en casos en los que no hay tiempo suficiente para realizar una búsqueda internacional o no se dispone de una unidad de sangre de cordón adecuada (Carreras 2022).

Considerados en su conjunto, hermanos histocompatibles, una red internacional de donantes no emparentados compatibles disponibles, unidades de sangre de cordón umbilical y trasplantes haploidénticos hacen que hoy en día, prácticamente el 100 % de los pacientes que tengan la indicación, puedan recibir el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

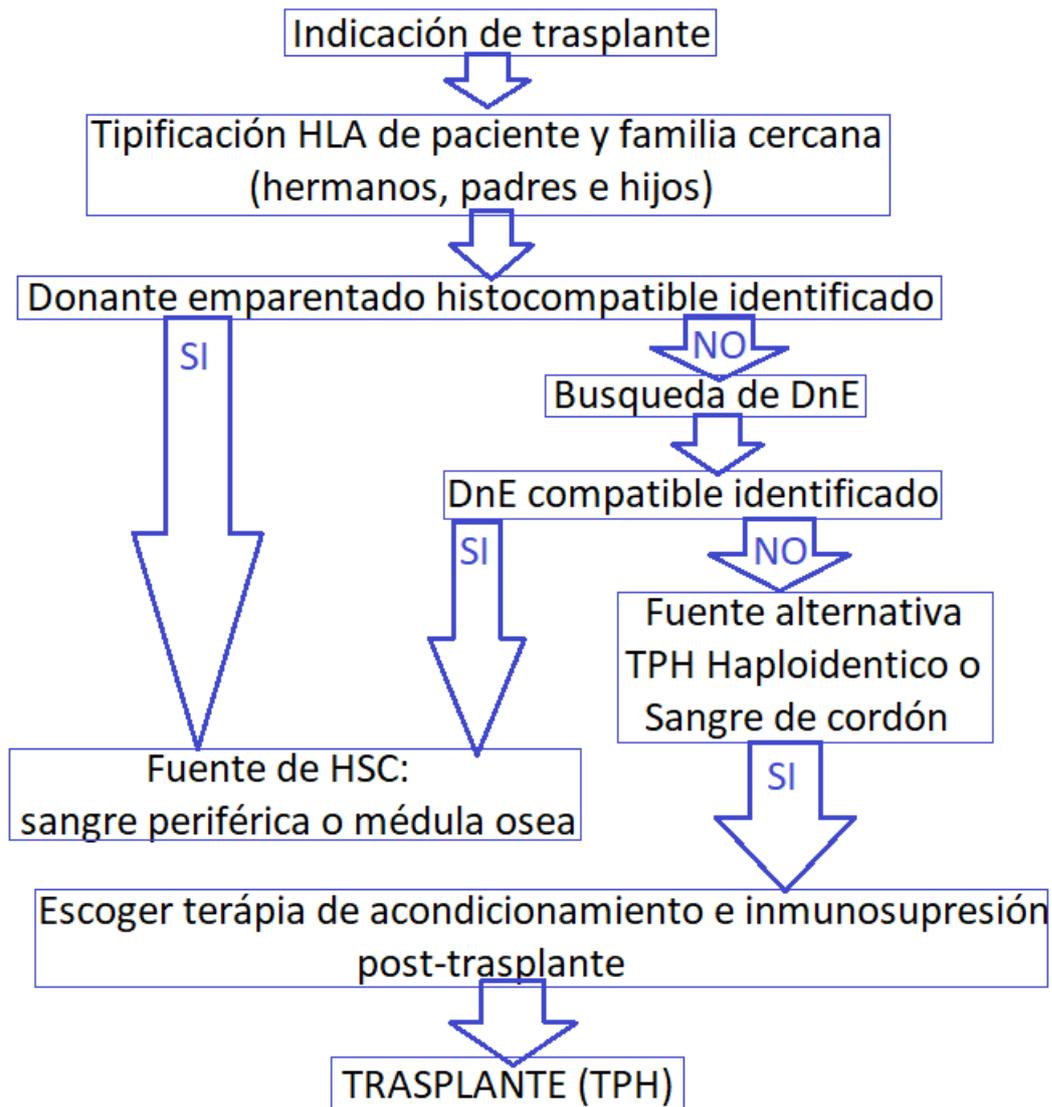


Figura11. Proceso de selección del donante para el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH). Elaboración propia.

6.2. Fuentes de células madre hematopoyéticas (HSC).

En general se dispone de tres fuentes de progenitores hematopoyéticos CD34+, aspiración intraósea directa, movilización de HSC a sangre periférica con posterior aféresis para su aislamiento y los progenitores obtenidos de la sangre de cordón umbilical (Figura12).



Figura12. Fuentes de progenitores hematopoyéticos. Progenitores Hematopoyéticos de sangre periférica (PBSC). Adaptada de "HSCT (haematopoietic stem cell transplantation)" de <https://www.mssociety.org.uk/about-ms/treatments-and-therapies/disease-modifying-therapies/hstc>.

6.2.1. Médula ósea.

Los progenitores se obtienen mediante aspiraciones de médula ósea seriadas realizadas con aguja intraósea a nivel de cresta iliaca. Como ventaja se considera que el injerto es rico en un repertorio directo de progenitores hematopoyéticos diversos y muy bajo contenido en linfocitos T maduros, por tanto, se considera que el riesgo de EICR es más bajo. Es la fuente de elección para pacientes con aplasia medular severa.

6.2.2. Progenitores hematopoyéticos derivados de sangre periférica (PBSC).

La circulación de progenitores hematopoyéticos CD34+ en sangre periférica es extremadamente baja, por lo que no es suficiente para conseguir la celularidad necesaria para un trasplante. Sin embargo, un gran volumen de progenitores hematopoyéticos CD34+

pueden ser movilizados desde la médula ósea, mediante la administración de medicamentos que son factores estimulantes de las colonias granulocitarias. Posteriormente se realiza una aféresis de la sangre periférica mediante un catéter venoso central y un separador celular, consiguiendo obtener una cantidad adecuada de progenitores hematopoyéticos para llevar a cabo un trasplante. La desventaja de este tipo de fuente de progenitores radica en su mayor contenido de linfocitos T maduros, con el consiguiente mayor riesgo de desarrollo de EICR.

6.2.3. Sangre de cordón umbilical.

Tal y como ya se ha mencionado, la sangre de cordón umbilical presenta una alta concentración de progenitores hematopoyéticos CD34+, además de contener linfocitos T naive, menos reactivos que los linfocitos T maduros. Su principal desventaja radica en el volumen limitado de HSC contenido en cada unidad de sangre de cordón, en el caso de receptores adultos.

6.3. Proceso de realización del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

6.3.1. Acondicionamiento.

Una vez elegido el donante, obtenidas y criopreservadas las HSC CD34+, se procede a la administración del acondicionamiento. Se trata de la administración al paciente de quimioterapia en combinación o no con radioterapia e inmunosupresores a altas dosis, en los días previos a la infusión de los HSC.

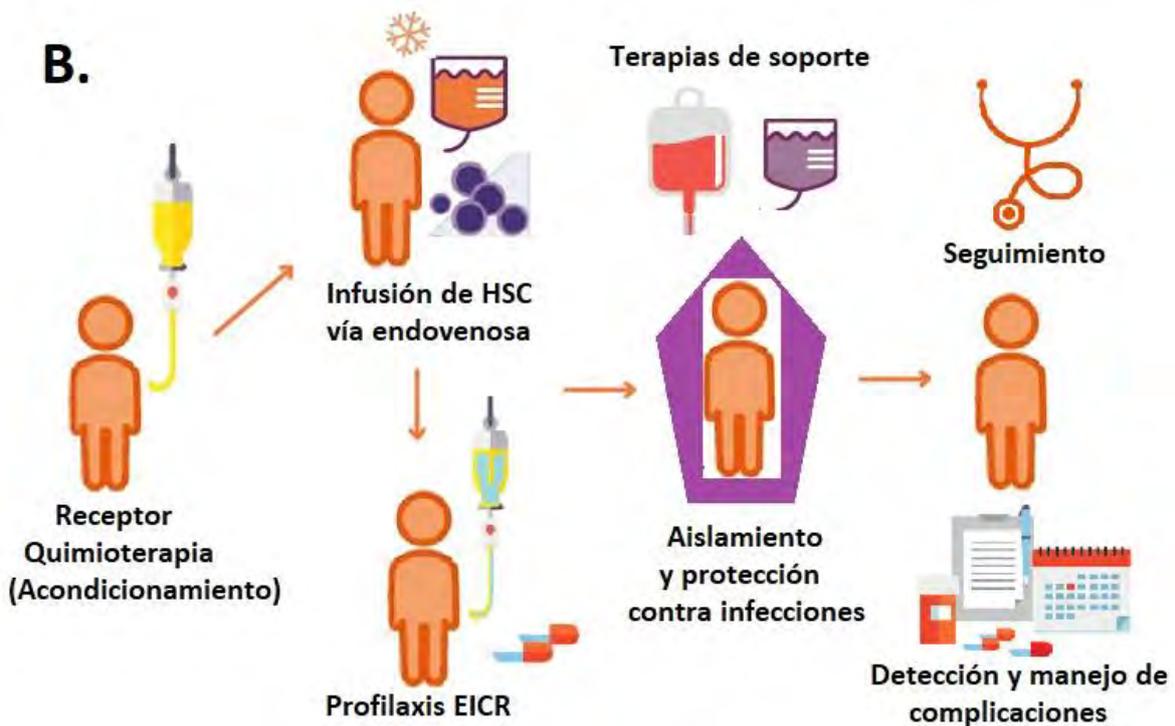
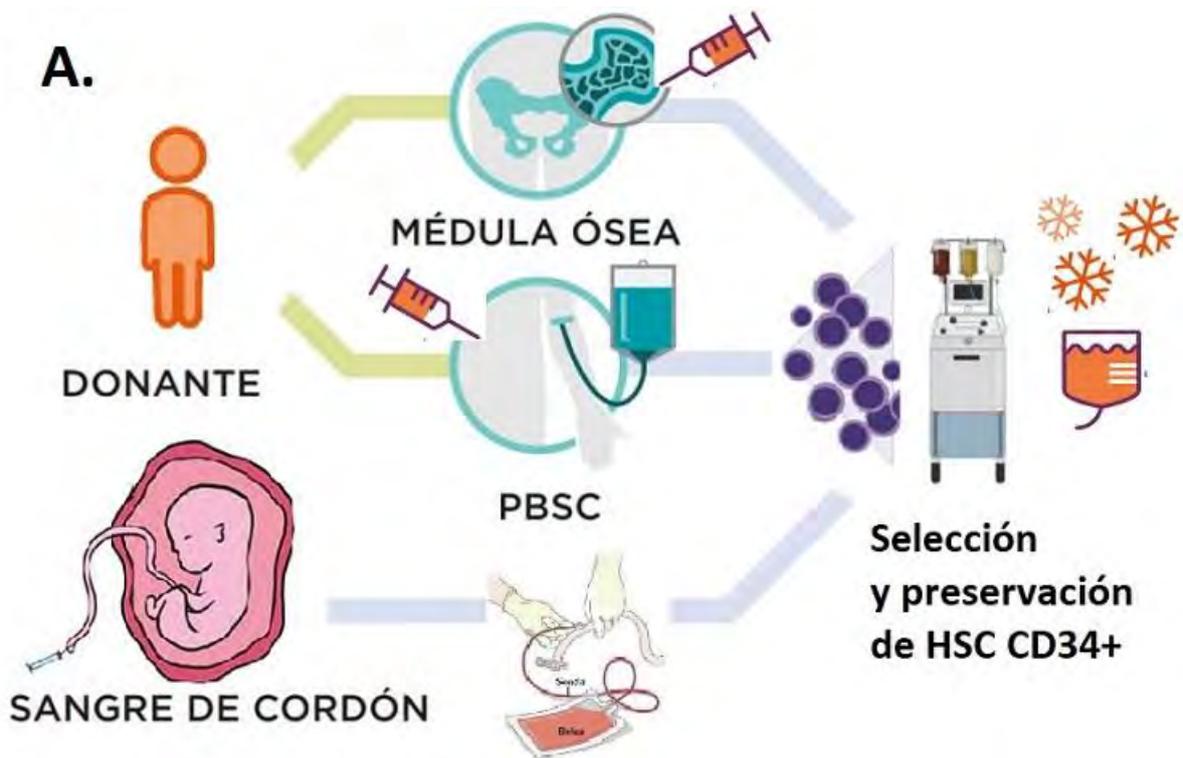
El acondicionamiento tiene varios objetivos:

- Crear espacio dentro de la médula ósea para que los nuevos progenitores hematopoyéticos puedan arraigarse, proliferar y diferenciarse.
- Eliminar las células tumorales residuales (Enfermedad mínima residual o EMR).
- Inmunosuprimir o eliminar el restante sistema inmune competente del receptor para permitir el prendimiento de la nueva hematopoyesis y adicionalmente prevenir la reacción inmune o rechazo del injerto.

Los regímenes de acondicionamiento tienen diferentes intensidades de mielosupresión para la erradicación de EMR y de inmunosupresión para la prevención del rechazo del injerto. Hablamos de regímenes denominados mieloablativos cuando la intensidad de la quimioterapia y/o radioterapias utilizadas son capaces de erradicar todas las células madre hematopoyéticas. Los regímenes mieloablativos se asocian a mayor toxicidad y mortalidad relacionadas con el trasplante (MRT). Por el contrario, los regímenes de acondicionamiento no mieloablativos provocarán citopenias de menor intensidad, pero linfopenia significativa. Estos regímenes no mieloablativos (también llamados “de intensidad reducida”) permiten realizar un alo-TPH en pacientes de mayor edad, aprovechando el efecto inmunitario del injerto contra el tumor que provocan los linfocitos del donante y, por tanto, no sería necesaria siempre la erradicación completa del tejido hematopoyético del receptor. Los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida se asocian a una disminución de la morbilidad y la mortalidad, pero se reservan para pacientes que no tolerarían el acondicionamiento mieloablativo y para pacientes que reciben trasplantes alogénicos por enfermedades no neoplásicas (Niederhuber 2020)(Figura13).

6.3.2. Procesamiento, preservación e infusión de las HSC.

El procesamiento y manipulación de la HSC incluye, reducción de volumen, filtración para remover impurezas, hematíes, para la posterior criopreservación mediante la adición de 10% de dimetilsulfóxido. Una vez administrado el régimen de acondicionamiento las HSC son infundidas por vía endovenosa idealmente mediante una vía central (Figura 13).



Figuras13. A. Selección y preservación de HSC (Progenitores hematopoyéticos). B. Proceso de realización del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). EICR: Enfermedad injerto contra receptor. Adaptada de "HSCT (haematopoietic stem cell transplantation)" <https://www.mssociety.org.uk/about-ms/treatments-and-therapies/disease-modifying-therapies/hsc>.

6.3.3. Prevención de la enfermedad injerto contra receptor (EICR).

La selección del donante más idóneo posible, la mejor fuente de progenitores hematopoyéticos y el régimen de acondicionamiento lo más personalizado posible, constituyen las primeras medidas de control de factores de riesgo para evitar la EICR, que es la principal responsable de la morbilidad del alo-TPH. La administración de un régimen de profilaxis de la EICR es el otro componente fundamental para mejorar el resultado del alo-TPH, consiste en la administración de medicamentos inmunosupresores de manera prolongada iniciando los días posteriores a la infusión de los HSC.

La profilaxis farmacológica de la EICR fundamentalmente busca disminuir o debilitar la aloreactividad hacia los tejidos del receptor a diferentes niveles de la respuesta inmune linfocitaria del sistema inmune del injerto, desde el proceso de presentación antigénica, pasando por la activación linfocitaria y hasta la proliferación celular (Carreras 2022)(Tabla 1) (Figura14).

Tabla1. Inmunosupresores más usados en los regímenes de profilaxis de la EICR.

Medicamento	Vía administración	Monitorización
Corticoides -Metilprednisolona / Prednisona	EV endoveosa VO vía oral	NO
Inhibidores de la calcineurina -Ciclosporina o Tacrolimus	EV o VO	SI
Inhibidores del mTOR (Mammalian target of rapamycin) -Sirolimus	VO	SI
Inhibidores de la IMD (Inosina monofosfato deshidrogenasa) -Micofenolato mofetil	EV o VO	NO/SI
Agentes alquilantes -Ciclofosfamida	EV	NO
Antimetabolitos -Metotrexate	EV	NO/SI
Inmunoglobulinas -Inmunoglobulina antitimocítica (ATG)	EV	NO

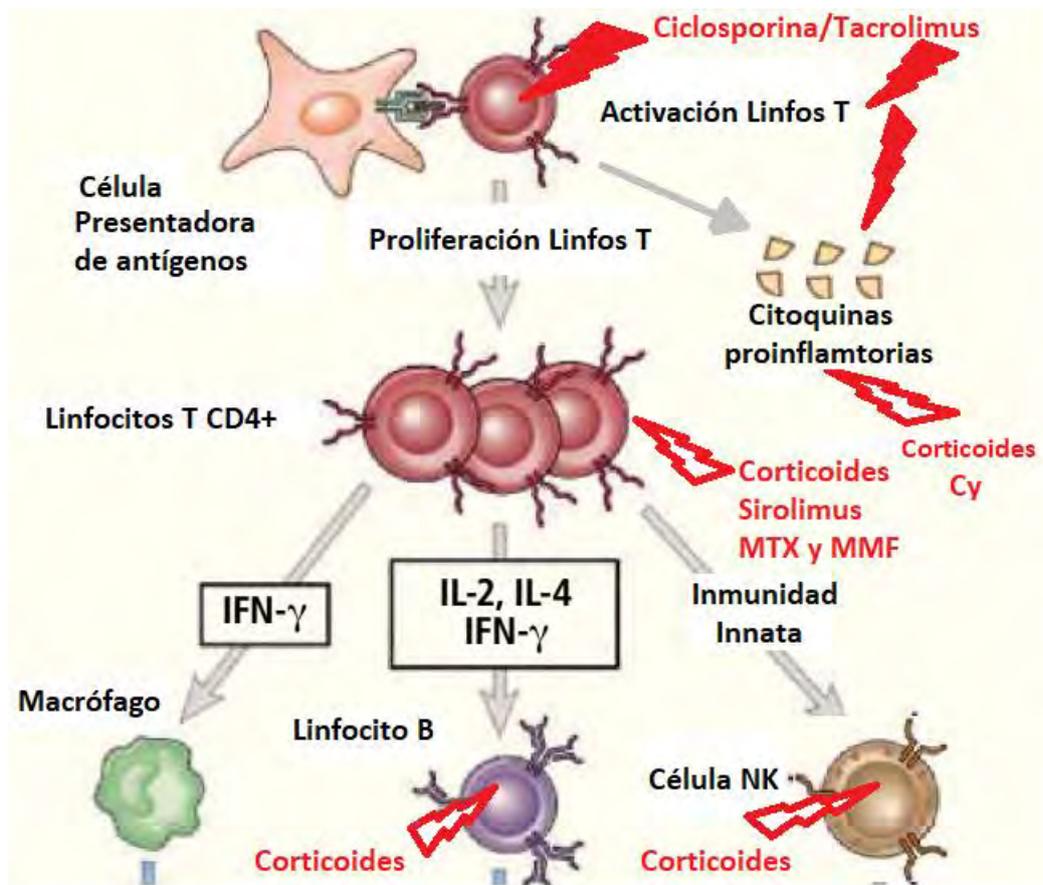


Figura14. Lugar de acción de los inmunosupresores de la respuesta inmune. MMF (Micofenolato mofetil), MTX (metotrexate), Cy (ciclofosfamida). Adaptada de "Visión panorámica del sistema inmune", Toche Paola, 2012, Revista de medicina clínica Condes. 23:446-457. DOI: 10.1016/S0716-8640(12)70335-8.

6.4. Complicaciones del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

6.4.1. Generalidades de las complicaciones.

El proceso de presentación de complicaciones generales y frecuentes que sufre el receptor a partir del día de la infusión de las HSC del donante considerado como el día 0 del procedimiento, sigue un patrón temporal predecible, como se muestra en la Figura 15. De manera general, se considera que los primeros 100 días del procedimiento son el momento de mayor riesgo de complicaciones relacionadas con un elevado riesgo de mortalidad, posteriormente el riesgo disminuye progresivamente. Durante las primeras semanas el escenario clínico está dominado por las consecuencias derivadas de la toxicidad directa sobre el organismo del régimen de acondicionamiento e inmunosupresor empleado para la

profilaxis de la EICR, adicionalmente las complicaciones infecciosas debido a la intensa mielosupresión granulocitaria, a la necesidad de dispositivos invasivos como catéteres y la disrupción de las barreras mucosas, son el segundo factor de mortalidad en este primer período. La amplia experiencia adquirida en el intenso manejo de soporte en régimen de hospitalización y aislamiento del paciente durante este período ha logrado que la mortalidad durante este período no represente una barrera para la realización del procedimiento (Niederhuber 2020).

En un segundo período del trasplante aparecen las complicaciones que son la principal barrera para el éxito del trasplante, son las relacionadas con la aparición de reacciones inmunitarias que provocan, el fallo y/o rechazo de implante del injerto por parte del receptor o bien la enfermedad injerto-contra receptor. Si estas complicaciones se presentan se puede extender el tiempo de administración del régimen inmunosupresor para la profilaxis y/o tratamiento de la EICR, lo cual se asocia a complicaciones infecciosas causadas por microorganismos oportunistas y por la reactivación de infecciones virales, como la infección por citomegalovirus (Carreras 2022).

La tercera etapa ocurre más allá del día 100 del trasplante y se extiende hasta que hay evidencia de recuperación de la inmunidad adaptativa con tolerancia inmune, momento en el cual es posible reducir o incluso suspender de manera definitiva el régimen de profilaxis de la EICR. Las complicaciones que aparecen en esta etapa son de carácter más crónico y requieren un manejo multidisciplinar por su complejidad.

7. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR (EICR).

7.1. Fisiopatología de la enfermedad del injerto contra el receptor.

La enfermedad injerto contra receptor (EICR) es la principal complicación del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). Está condicionada por diferencias antigénicas entre donante y receptor que provocan una reacción inflamatoria de intensidad variable que puede llegar a comprometer la vida del paciente. Tiene dos formas de presentación, aguda y crónica, con características clínicas, inmunológicas e histológicas particulares. Se caracteriza por una reacción inmune selectiva que afecta preferentemente a

la piel, el tracto gastrointestinal y el hígado, y ocasionalmente a las glándulas exocrinas y los bronquios (Von Domarus 2020).

En la fisiopatología de la EICH aguda se distinguen tres fases: la tormenta de citocinas provocada por el régimen de acondicionamiento, la activación de células T y la fase efectora.

Los procesos que van a desencadenar la EICR aguda comienzan en la fase de preparación pre-trasplante. Durante este período, el daño tisular provocado por la quimioterapia y/o radioterapia de acondicionamiento induce la producción por parte de células activadas, de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 y IL-6 y factores de crecimiento como el GM-CSF, promoviendo el aumento en la expresión de moléculas de adhesión y complejos mayores de histocompatibilidad. En una segunda fase, se produce la activación de las células T del donante. Esta fase incluye la presentación antigénica, la activación de los linfocitos T del injerto y la proliferación y diferenciación de estas células activadas. Cuando las células CD4+ y CD8+ ingresan al torrente sanguíneo, interactúan con las células presentadoras de antígeno (Zeiser 2004) (Visentainer 2003). Si existen diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad, las células del injerto desencadenan una EICR. En el lecho capilar, las células T del injerto interactúan con las células endoteliales y se exponen a nuevos aloantígenos. Las células T activadas secretan citocinas tipo Th1, especialmente IL-2 e IFN- γ . La IL-2 es producida por las células CD4+ del injerto ya en los primeros días post-trasplante. La IL-2 produce la activación de las células CD8+ del injerto y el IFN estimula la producción de múltiples citocinas en los macrófagos, amplificando de esta manera la cascada de eventos inmunológicos que desencadenan la EICR. El balance entre citocinas Th1 y Th2 es crítico para la presentación de la EICR aguda. El incremento de citocinas Th2 como la IL-4, se relaciona con una menor frecuencia de EICR. A igual número de linfocitos T infundidos, la utilización de progenitores hematopoyéticos movilizados con G-CSF disminuye el riesgo de EICR y reduce el fallo de injerto al cambiar el perfil de citocinas por aumento de las de tipo Th2. Altos niveles de citocinas inmunosupresoras como la IL-10 (Ju 2003), o el pretratamiento de las células CD4+ con esta citocina (MacDonald 2003), se relacionan con modulación y regulación de la respuesta inmune en la EICR. En la tercera fase, o fase efectora, los linfocitos grandes granulares (células NK) son responsables de los efectos citolíticos que se incrementan por los mediadores inflamatorios y las citocinas. La respuesta inflamatoria amplifica el daño celular

al estimular la síntesis de TNF- α , IL-1 α e incrementar las moléculas HLA clase II y de adhesión ICAM-1, en la piel y el tracto digestivo. (Ferrara 2009)(Figura15).

Durante el régimen de acondicionamiento, pueden producirse grandes cantidades de lipopolisacárido (LPS, endotoxina), especialmente a nivel de piel y mucosas del tracto gastrointestinal; en la fase efectora, el LPS estimula en la piel a los queratinocitos y en la dermis y el tracto gastrointestinal a los fagocitos mononucleares para la producción de TNF- α , que produce daño directo del tejido al inducir la muerte celular por apoptosis. Los agentes virales también agravan la EICR y son factores predisponentes para su presentación; entre estos destaca la infección por citomegalovirus, el cual estimula el fenómeno inflamatorio y la producción de citocinas tipo Th1.

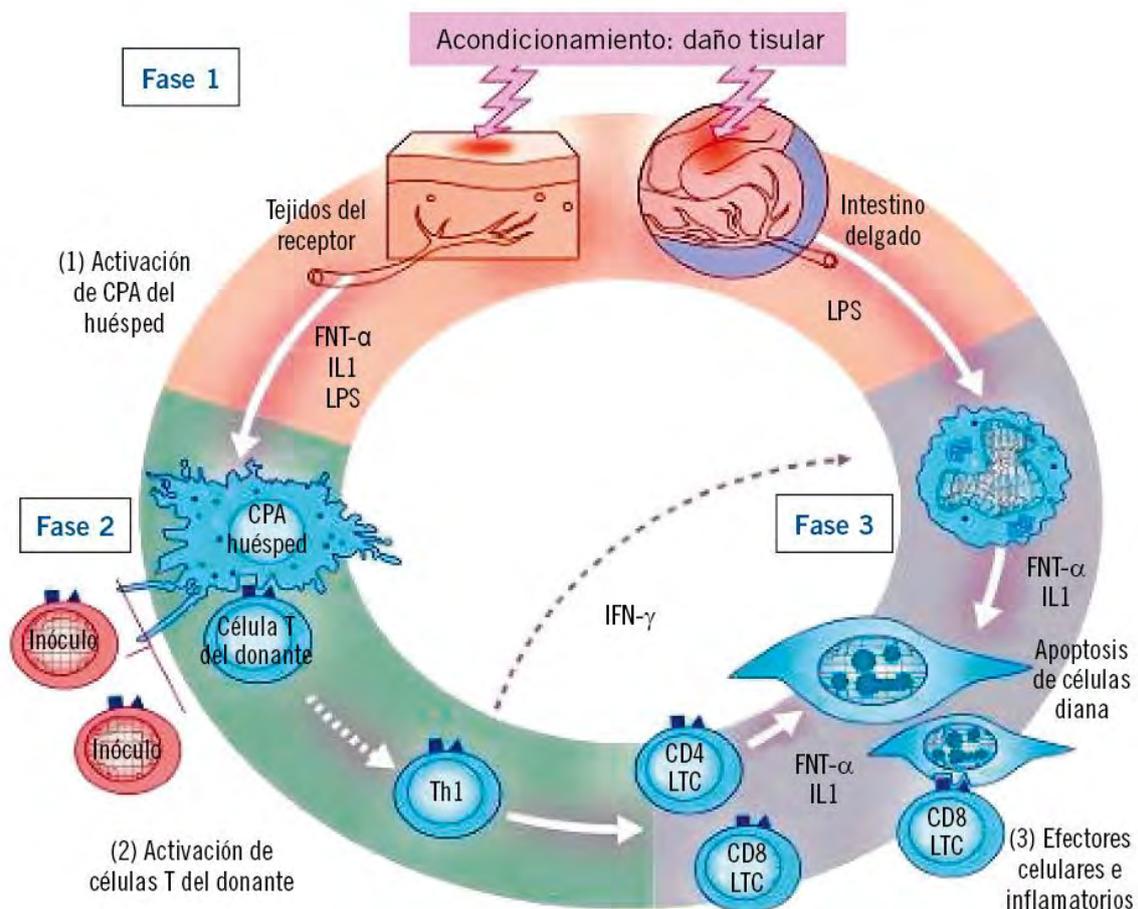


Figura15. Fisiopatología de la Enfermedad injerto contra receptor aguda. CPA: células presentadoras de antígeno. FNT o TNF: Factor de necrosis tumoral, IL1: interleuquina 1, LPS: Lipopolisacáridos, Th1: T helper, LTC: Linfocito T citotóxicos. Adaptada de "Graft-versus-host disease." Ferrara JLM et al, 2009. "Graft-versus-host disease." *The Lancet* 373:1550-61. DOI:10.1016/S0140-6736(09)60237-3.

7.2. Determinantes genéticos de la enfermedad injerto contra receptor.

En un modelo de trasplante de tejidos, el grado de activación del sistema inmune del donante está determinado por varios factores, pero el determinante fundamental es el grado de histocompatibilidad donante-receptor determinado por estas polimórficas moléculas de histocompatibilidad (MHC o HLA) tipo I y II, que presentan péptidos (antígenos) a las células T del donante en la superficie celular. Estos péptidos son obtenidos a partir de proteínas intracelulares o extracelulares previamente degradadas. Las células T del donante pueden entonces desencadenar una reacción de rechazo ante antígenos propios del receptor. Este rechazo a los antígenos del receptor es el causante tanto del efecto clínico injerto contra tumor, resultado antitumoral (buscado para el control de la neoplasia), así como de la enfermedad injerto contra receptor (EICR) (Bleakley 2004) efecto no deseado y principal causante de mortalidad.

Entre un 25 y un 50% de los pacientes que reciben un trasplante alogénico a partir de un donante familiar HLA idéntico desarrollan enfermedad injerto contra receptor, siendo este porcentaje superior cuando el donante es no relacionado. Esta complicación es la principal causa de mortalidad asociada con el procedimiento.

Conocemos que el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EICR en el trasplante alogénico es la incompatibilidad HLA de donante-receptor, razón por la cual es mayor su incidencia en trasplantes de donante no emparentado (DnE). En menor medida intervienen otros factores como la alosensibilización previa del donante, relación de género donante-receptor, edad del paciente, el régimen de acondicionamiento, la fuente de progenitores, la cantidad de linfocitos T del producto infundido, el tipo de profilaxis para la EICR recibido durante el procedimiento o la serología de citomegalovirus (CMV) (Ferrara 2009) (Carreras 2022).

Se han descrito diversos factores genéticos que pueden favorecer la aparición de la EICR a pesar de la compatibilidad HLA entre donante y receptor, tales como la presencia de disparidades HLA no detectadas por métodos de tipificación convencional, la disparidad en antígenos menores de histocompatibilidad, la existencia de polimorfismos en genes productores de citocinas o el metabolismo de fármacos y en los últimos años cada vez con mayor interés, los polimorfismos de genes relacionados con la sinapsis inmune que implica a

moléculas que participan en el proceso de coestimulación/inhibición de la respuesta inmune del linfocito T (Lin 2003) (Holler 2006) (Oostvogels 2016)(Figura16).

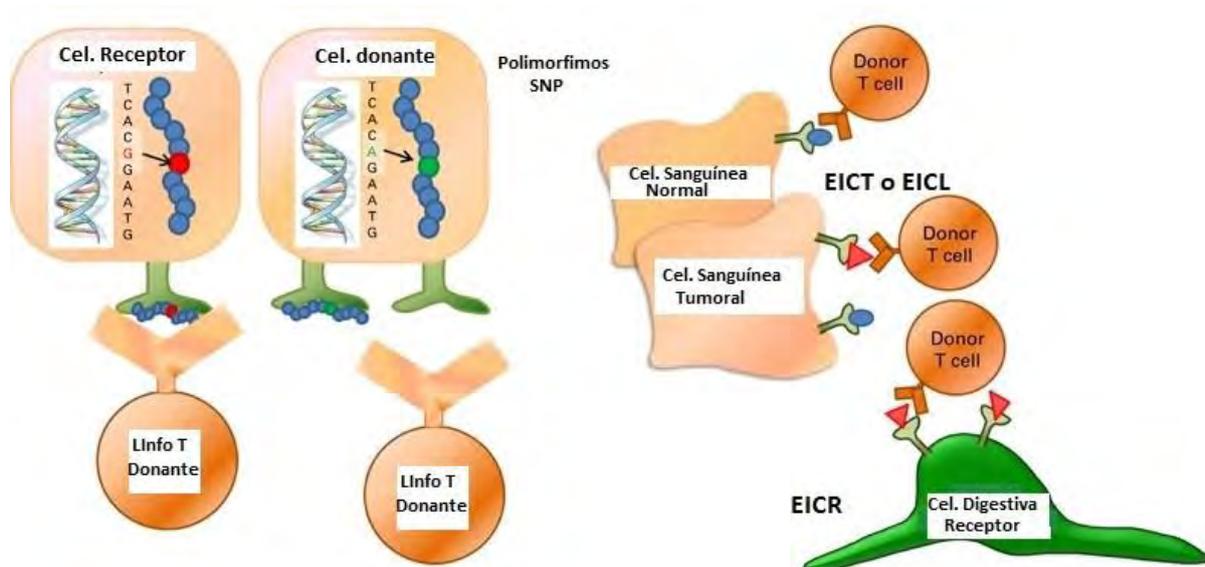


Figura16. Presencia de polimorfismos (SNPs) y Enfermedad injerto contra Receptor (EICR) vs Efecto injerto contra tumor (EICT). Tomado de "Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives." Oostvogels O, et al, 2016, Bone Marrow Transplantation 51:163-71. DOI: 10.1038/bmt.2015.256.

7.2.1. Papel de las disparidades del sistema HLA.

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA) es el sistema genético más polimórfico que existe. Consta de moléculas de clase I (HLA-A, -B y -C) y de clase II (HLA-DRB1, -DQB1 y -DPB1)2. Cada individuo expresará dos moléculas distintas de cada uno de los loci de clase I en todas sus células nucleadas en caso de heterocigosidad, añadiendo la expresión de dos moléculas de cada uno de los loci de clase II en aquellas células con capacidad de presentación de antígenos. Actualmente hay descritos 1193 alelos de HLA-A, 1800 de HLA-B, 829 de HLA-C, 902 de HLA-DRB1, 112 de HLA-DQB1 y 141 de HLA-DPB1, en base al número de secuencias descritas (Mackay 2000). Cuando un paciente tributario de trasplante alogénico no dispone de un donante familiar HLA idéntico debe iniciarse una búsqueda de donante no emparentado. La primera limitación para el éxito de esta búsqueda vendrá dada por las características étnicas del paciente: mientras un paciente caucásico puede encontrar un donante HLA-A-B-DRB1 idéntico con relativa facilidad, no ocurre lo mismo cuando el paciente pertenece a poblaciones étnicas con escasa representación en los registros nacionales e

internacionales de donantes voluntarios. Esto se debe a la distinta frecuencia de distribución de alelos y haplotipos HLA que se observa en poblaciones genéticamente dispares.

Clásicamente, la identificación de un donante no emparentado “HLA-idéntico” se realizaba mediante serología para HLA-A y -B y por técnicas de PCR de alta resolución para HLA-DRB1 (PCR-SSP, PCR-SSOP o secuenciación directa). Posteriormente, al poder disponer de métodos de tipificación HLA que nos permitían disponer de alta resolución tanto para HLA de clase I como de clase II, se puso de manifiesto en estudios retrospectivos que muchos de los trasplantes no emparentados realizados se habían llevado a cabo a través de disparidades HLA no detectadas, tanto por diferencias en subtipos moleculares de una misma especificidad serológica de HLA-A o -B (ej: A*02:01 versus A*02:05; ambos son tipificados como HLA-A2), como en loci HLA no tipificados rutinariamente (HLA-Cw, -DQB1 o -DPB1). Diversos estudios pusieron de manifiesto la importancia de la identidad molecular tanto en HLA de clase I (HLA-A, -B, -C) (Davies 1995) (Speiser 1996) (Sasazuki 1998) (Petersdorf 1997) (Nagler 1996) como en HLA de clase II (HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1) entre paciente y donante no emparentado para el éxito del trasplante (Petersdorf 1995). Actualmente, la tipificación de HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1 de alta resolución se practica rutinariamente antes de la realización de un trasplante no emparentado. Por el contrario, la tipificación de HLA-DPB1 se considera optativa, ya que hasta un 80% de los individuos no emparentados considerados “HLA-idénticos” presentarán disparidad en este locus, por la existencia de una elevada posibilidad de recombinación en este punto del genoma (Petersdorf 1996) (Petersdorf 1993). De hecho, el Grupo español de trasplante hematopoyético (GETH) identificó que incluso un 6% de los hermanos HLA-A-B-DRB1 idénticos presentan disparidad en HLA-DPB1, asociándose dicha disparidad con mayor incidencia de EICH aguda (Gallardo 2004).

7.2.2. Antígenos menores de Histocompatibilidad

Si un elevado porcentaje de pacientes que reciben un trasplante a partir de un hermano HLA-idéntico aún presentan grados severos de EICR. Una de las posibles explicaciones para ello sería la presencia de disparidades en un grupo de antígenos distinto al HLA o complejo mayor

de histocompatibilidad (CMH). Esta independencia del CMH ha motivado el nombre de “antígenos menores de histocompatibilidad”.

Los AMiH fueron descritos como moléculas peptídicas de 8-10 aminoácidos (Aa) obtenidas a partir de la degradación de proteínas endógenas altamente polimórficas. Estos pequeños péptidos son presentados al sistema inmune a través de moléculas HLA y que proceden del procesamiento de proteínas endógenas. Estos polimorfismos en su mayoría son de tipo SNP (single nucleotide polymorphism) y suelen tener dos alelos, uno de los cuales resulta inmunogénico cuando es presentado a los linfocitos T del donante. Dichos SNPs generalmente provocan un cambio en la secuencia de la proteína, de tal manera que, cuando el receptor es portador del alelo inmunogénico y el donante no lo es, se desencadena un reconocimiento de dicho antígeno por las células T del donante y por tanto activación de la respuesta inmune (Goulmy 1996) (Chao 2004)(Figura16).

Los mecanismos que hacen un alelo inmunogénico son diversos: mayor afinidad por la molécula HLA de restricción, procesamiento diferencial por parte del proteasoma, déficit de transporte intracelular por TAP o incluso por delección del propio gen (Brickner 2006). Por el contrario, la no inmunogenicidad de un alelo se da como consecuencia de que las proteínas resultantes, no generan ninguna respuesta inmune porque el polimorfismo introducido no les permite ser presentadas por las moléculas HLA, otras en cambio son presentadas con éxito; teniendo la posibilidad de ser reconocidas y toleradas por el sistema inmune.

Otra característica importante de los antígenos menores de histocompatibilidad es su distribución tisular: algunos como HA-1 o HA-2 están restringidos a células de estirpe hematopoyética incluyendo aquellas de las cuales derivan las neoplasias hematopoyéticas, por lo cual están en el punto de mira de todos aquellos grupos que trabajan en inmunoterapia de neoplasias hematológicas, mientras que otros como HA-8 o H-Y se expresan en todas las células del organismo. (Summers 2020)(Figura17).

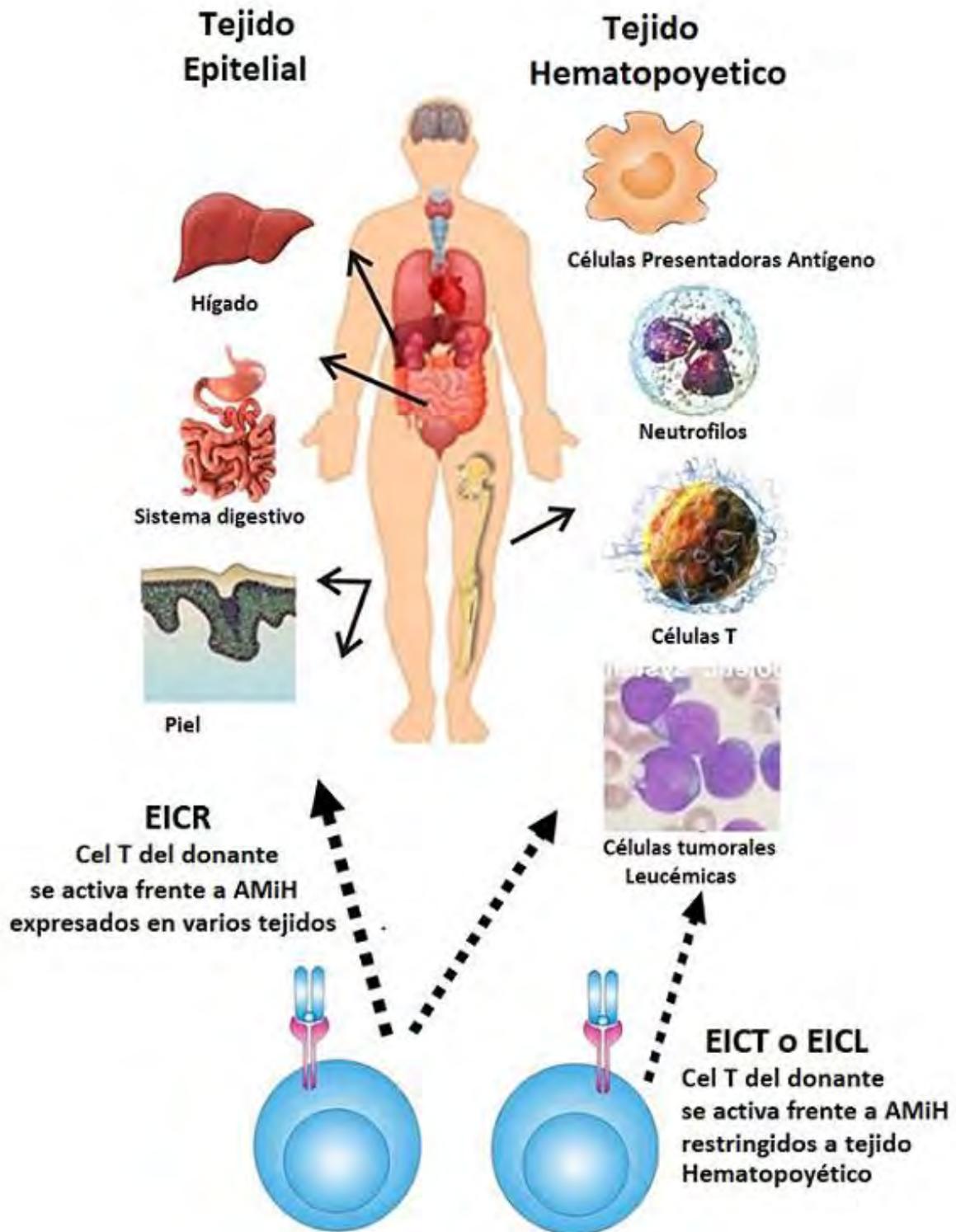


Figura17. Relación entre restricción de expresión de AMiH en los tejidos y la presentación de EICR (Enfermedad injerto contra receptor) y el efecto injerto contra tumor (EICT o EICL). Tomado de "Minor Histocompatibility Antigen-Specific T Cells" Summers C., 2020, *Frontiers in Pediatrics*. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00284>

HA-1 es posiblemente el antígeno menor de histocompatibilidad mejor estudiado: se trata de un nonapéptido con 2 alelos (HA-1H y HA-1R) que procede de la degradación de una proteína codificada por el cromosoma 19. El alelo H es el inmunogénico, gracias a una mayor afinidad por la molécula de HLA-A*02:01, que es su elemento de restricción. Se ha descrito la correlación de una disparidad en este antígeno menor con un aumento de incidencia de EICR aguda en trasplante alogénico de donante familiar HLA idéntico sin manipulación del injerto (Gallardo 2001).

Otro antígeno menor es, HA-8 que también se expresa en todas las células del organismo y está restringido por HLA-A*02:01. Se ha descrito una correlación entre la disparidad en este antígeno con EICR aguda y con una peor supervivencia (Akatsuka 2003) (Pérez-García 2005).

También son antígenos menores de histocompatibilidad los genes del cromosoma Y que codifican proteínas polimórficas, como SRY, SMCY, TMSB4Y, UTY, RPS4Y o DBY. Serán los responsables de la mayor incidencia de EICR aguda cuando el receptor es varón y el donante es mujer.

Otros antígenos menores humanos menos estudiados son HA-2, HA-3, HB-1, ACC-1, ACC-2, ACC-6, SP110, PANE1, UTA2-1 y UGT2B17. La disparidad en los antígenos menores ACC-1 y UGT2B17 se han relacionado con la aparición de EICR aguda (Nishida 2004) (McCarroll 2009). En cambio, no hay actualmente estudios clínicos fiables que nos indiquen la relevancia clínica de otros antígenos menores como HA-2, HA-3, HB-1, ACC-2, SP110 o PANE1. La Tabla2 y Figura18, muestran la nomenclatura y restricción tisular de los principales antígenos menores de histocompatibilidad (Akatsuka 2007).

Tabla 2. Antígenos menores de histocompatibilidad humanos.

Nombre	Péptido inmunogénico	Restricción HLA	Cromosoma	Proteína	Expresión
HA-1	VLHDDLLEA	HLA-A*0201	19p13.3	HA-1	T. hematopoyético
HA-1 / B60	KECVLHDDL	HLA-B60	19p13.3	HA-1	T. hematopoyético
HA-2	YIGEVLVSV	HLA-A*0201	7p12–p13	Miosina 1G	T. hematopoyético
HA-3	VTEPGTAQY	HLA-A*0101	15q24-q25	Lymphoid Blast Crisis Oncogene	Ubicua
HA-8	RTLDKVLEV	HLA-A*0201	9p24.2	KIAA0020	Ubicua
HB-1	EEKRGS�HVW	HLA-B*44	5q32	Desconocida	Linfocitos B
ACC-1	DYLQYVLQI	HLA-A*24	15q24.3	BCL2A1	T. hematopoyético
ACC-2	KEFEDDIINW	HLA-B*44	15q24.3	BCL2A1	T. hematopoyético
SP110	SLPRGTSTPK	HLA-A*0301	2q37	SP110 nuclear body protein	T. hematopoyético
PANE1	RVWDLPGVLK	HLA-A*0301	22q13	PANE1	Células linfoides
UGT2B17/A29	AELLNIPFLY	HLA-A*2902	4q13	UGT2B17	Cél. dendríticas y linfocitos B
UGT2B17/B44	AELLNIPFLY	HLA-B*44	4q13	UGT2B17	Cél. dendríticas y linfocitos B
LRH-1	TPNQRQNVС	HLA-B*0702	17p13.2	P2X5	T. hematopoyético
LB-ECGF-1H	RPHAIRRPLAL	HLA-B*07	22q13	ECGF-1	T. hematopoyético
CTSH/A31	ATLPLLCAR	HLA-A*31	15q24-q25	Catepsina H	Linfocitos B
CTSH/A33	WATLPLLCAR	HLA-A*33	15q24-q25	Catepsina H	Linfocitos B
LB-ADIR-1F	SVAPALALFPA	HLA-A*02	1q25.2	TOR3A	Desconocida
ACC-6	MEIFIEVFSHF	HLA-B*44	18q21.33	HMSD	Desconocida
A1/HY	IVDCLTEMY	HLA-A*01	Yq11	USP9Y	Ubicua
A2/HY	FIDSYICQV	HLA-A*02	Yq11.1	SMCY	Ubicua
A33/HY	EVLLRPGLHFR	HLA-A*33	Yq11	TMSB4Y	Ubicua
B7/HY	SPSVDKARAEL	HLA-B*07	Yq11.1	SMCY	Ubicua
B8/HY	LPHNHTDL	HLA-B*08	Yq11	UTY	Ubicua
B52/HY	TIRYPDPVI	HLA-B*52	Yq11.3	RPS4Y1	Ubicua
B60/HY	RESEESVSL	HLA-B60	Yq11.1	UTY	Ubicua

T. hematopoyético*: Tejido hematopoyético.

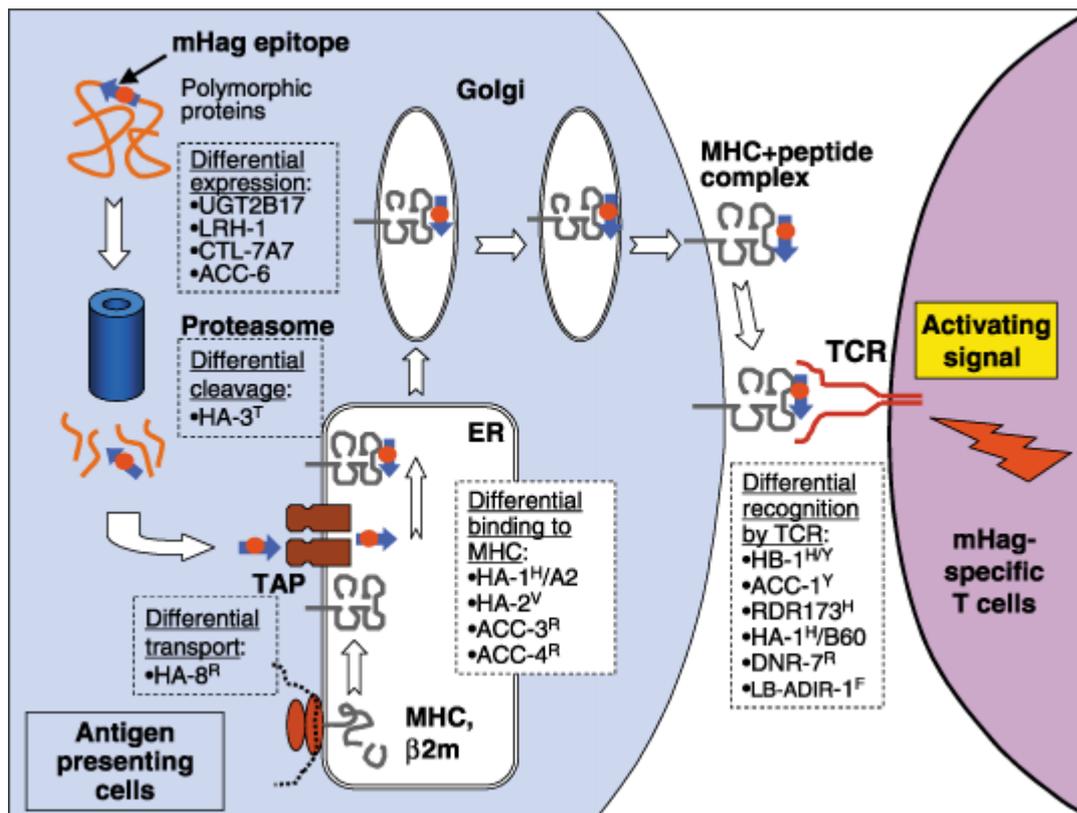


Figura18. Nomenclatura y función del polimorfismo de los principales antígenos menores de histocompatibilidad. mHag: antígenos menores de Histocompatibilidad. CMH, Complejo mayor de Histocompatibilidad, TAP: proteína transportadora. Tomado de "Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions." Akatsuka Y, et al, 2007, Cancer Science 98:1139-46. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00521.x

Se ha descrito y probado en diseños experimentales, el papel de los antígenos menores de histocompatibilidad, su inmunogenicidad y por tanto su capacidad de generar respuesta inmune inducida por linfocitos T CD8+ y CD4+ con un potente potencial efecto injerto contra tumor, en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH); sin embargo la disparidad de estos antígenos entre donante y receptor puede inducir a la par una fuerte respuesta tipo EICR, ya que como ya se mencionó, estos péptidos restringidos y presentados por determinados antígenos HLA no solo se encuentran en el tejido hematopoyético y su contrapartida neoplásica, sino que también se pueden expresar en los tejidos sanos del receptor. Por esta razón, a pesar tener un donante emparentado histocompatible, los pacientes que reciben este tipo de trasplante, tienen una incidencia elevada de enfermedad injerto contra receptor (EICR), considerada la principal causa de mortalidad en este tipo de procedimientos.

La comprensión y análisis del impacto de los AmiH y la activación del sistema inmune en respuesta a estos, pueden conducirnos a una mejor predicción del resultado clínico tras el trasplante, además de proveer un blanco para el desarrollo eficaz de la inmunoterapia.

Un reciente estudio multicéntrico del European Bone Marrow Transplantation EBMT16 mostró una asociación entre la disparidad de sexo (donante mujer / receptor varón) y la disparidad HA-8 con una mayor incidencia de EICH aguda (Spierings 2013). Por el contrario, la disparidad en antígenos menores de histocompatibilidad restringidos a tejido hematopoyético parece asociarse a mejor supervivencia libre de enfermedad y mejor supervivencia global, pero sólo en pacientes que presentan EICR.

Aún queda mucho trabajo por hacer en lo que respecta a determinar la relevancia clínica de la presencia de disparidades en antígenos menores de histocompatibilidad, pero principalmente se está explorando la posibilidad de usar como diana terapéutica aquellos antígenos menores con expresión restringida a tejido hematopoyético.

El grupo español de trasplante (GETH) desde 1999 está trabajando en identificar la relevancia de las disparidades entre donante-receptor de los antígenos menores de histocompatibilidad y su impacto en el resultado del trasplante de progenitores de donante emparentado HLA idéntico (Aróstegui 2000). En 2001 el grupo español publicó la relación entre la disparidad de HA-1 y una elevada incidencia de EICR (Gallardo 2001). El mismo grupo, en 2004 describió el efecto de la disparidad en HLA-DPB1 como factor independiente de EICR (Gallardo 2004) y por tanto peor pronóstico del trasplante. En el mismo sentido en 2005 encontraron la misma relación para HA-8 (Pérez-García 2005).

Actualmente se han descrito cerca de diecinueve genes con sus correspondientes moléculas CMH de restricción, implicados en la expresión de antígenos menores de histocompatibilidad aislados a partir de linfocitos T aloreactivos de pacientes con EICR. (Tabla2). Existen numerosas publicaciones en las cuales se ha intentado relacionar la disparidad donante-receptor en uno o varios de estos genes y la aloreactividad específica de las células T del donante con el resultado final del trasplante y el desarrollo o no de la EICR en el trasplante alogénico a partir de donante emparentado HLA idéntico.

Así se ha reportado que disparidades en AMiH como HY, HA-1, HA-2 y HA-8 están asociadas a mayor incidencia de EICR y por tanto mayor control de la enfermedad, pero los estudios son

contradictorios, probablemente debido a la mezcla de donantes relacionados y no relacionados en algunos, en otros a la poca cantidad de pacientes, o a que se han analizado pocos genes en cada caso (Goulmy 1996) (Lin 2001) (Akatsuka 2003) (Heinemann 2004).

Un análisis retrospectivo del impacto de un panel conformado por diecisiete 17 AMiH en una cohorte de pacientes sometidos a alo-TPH de DE, reportó que una o más disparidades en AMiH autosómicos mejora la SLP de estos pacientes, sin encontrar asociación con la incidencia de EICR aguda o crónica, contrario a lo que ocurría con la disparidad HY; sin embargo la población de este estudio se refería únicamente a alo-TPH DE deplecionado de células T (Hobo 2013); en el cual como se puede entender la depleción T del injerto hace que el impacto de los antígenos menores de histocompatibilidad sea difícil de comprobar.

Recientemente se publicó un análisis multicéntrico retrospectivo donde se analizaron 10 AMiH autosómicos y 10 AMiH del cromosoma Y, en el cual solo se halló una significación estadística: la disparidad HA-8 con el incremento de EICR, para todos los demás antígenos estudiados no fue posible establecer su significación estadística, únicamente se confirmó una menor probabilidad de recaída de la enfermedad en aquellos que presentan EICR (E. K. Spierings 2013). En resumen, no se ha logrado demostrar que disparidades donante-receptor en AMiH, aparte de las ya establecidas por el cromosoma Y, HA-1 y posiblemente HA-2 y HA-8, juegan un papel relevante y podrían ser objeto de desarrollo de terapias farmacológicas o vacunas dirigidas, posiblemente por la poca cantidad de muestras y la baja frecuencia de la disparidad. La tabla 2, muestra los AMiH descritos hasta ahora que podrían tener un impacto en el desarrollo de complicaciones aloreactivas en el alo-TPH.

7.2.3. Polimorfismos en genes que codifican para moléculas de coestimulación – inhibición de la respuesta inmune.

En el proceso de reconocimiento inmune, se requieren 2 señales para la activación. La inicial, unión del receptor TCR al complejo HLA-péptido, va seguida de una señal coestimuladora antígeno independiente provocada por la interacción de moléculas B7 (las mejor caracterizadas son CD80 y CD86), en la superficie de la célula presentadora de antígeno con su receptor (CD28) en la superficie del linfocito T. El antígeno 4 citotóxico de linfocitos T (CTLA-4) es una molécula homóloga de CD28 que es un antagonista competitivo de B7. CTLA-4 tiene

mayor afinidad por B7 que CD28, y su translocación a la superficie celular tras la activación T provoca un secuestro de B7 y una señal negativa responsable de la inhibición de la activación (Drake C.G. 2014).

El desarrollo de la EICR precisa de distintos pasos que son necesarios para que se produzca el fenómeno de alorreconocimiento. La participación de distintas moléculas en cada uno de estos pasos hace que cualquier modificación en los genes que las codifican pueda interferir con dicho proceso. Así, para que este se produzca, primero debe producirse la interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T. La célula presentadora de antígeno ofrece un péptido anclado a una molécula HLA para su reconocimiento por el receptor del linfocito T (TCR). Si el péptido es inmunogénico y es reconocido como extraño, se producirá una señal de activación del linfocito T. Sin embargo, para que el linfocito T se active se precisa de una segunda señal coestimuladora. Esta señal vendrá dada por la unión de CD28 con B7. El mecanismo fisiológico para detener esta activación linfocitaria y evitar una activación linfocitaria indefinida es la expresión de CTLA-4 por el linfocito T en condiciones de activación. Esta molécula tiene una mayor afinidad por B7, por lo que desplaza a CD28 interrumpiendo la señal de coestimulación y dando lugar a un estado de anergia, facilitando así el carácter temporal de la activación inmunológica ante un antígeno (Figura19).

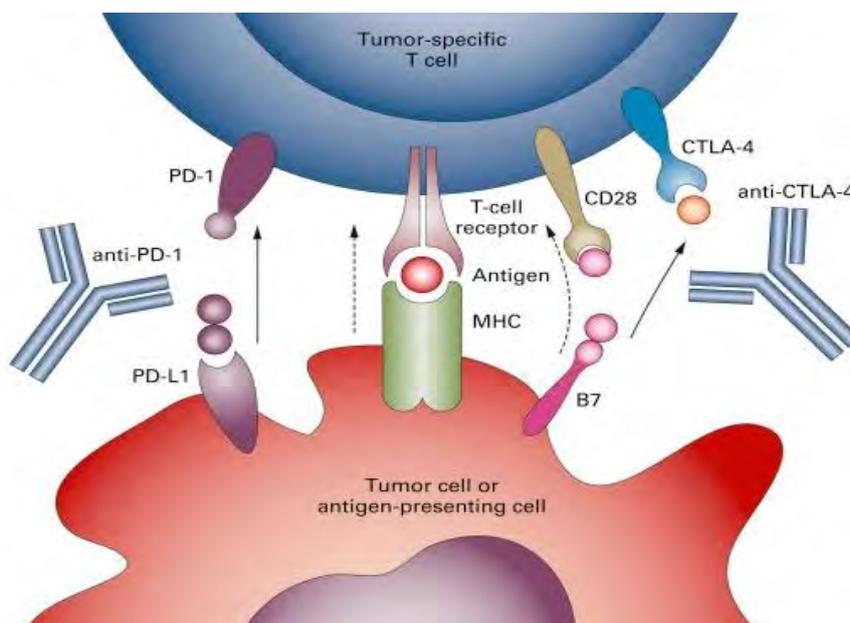


Figura19. Sinapsis inmunológica. Tomada de "Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer". Drake CG, 2014, Nat Rev Clin Oncol. Doi: 10.1038/nrclinonc.2013.208

Existen polimorfismos en el gen de CTLA-4 consistentes en un único cambio de base (SNP), que dan lugar a una mayor o menor capacidad de expresión del gen y, por lo tanto, suponen una mayor o menor duración de la activación de los linfocitos T ante una activación antigénica. Así, diversos estudios han correlacionado la existencia de polimorfismos que condicionan una menor expresión de CTLA-4 con enfermedades autoinmunes (Peterson 2018) (Ueda 2003).

En una corte de donante-receptor de alo-TPH, el grupo GETH detectó una implicación del polimorfismo CT60 (A/G) del gen de CTLA-4 del donante, con una mayor incidencia de recidivas, peor supervivencia global y una menor incidencia de EICH aguda en relación con un aumento o disminución de la forma soluble de la proteína (Pérez-García 2007).

Lógicamente, éste es un campo en continua expansión y el estudio de los polimorfismos de las moléculas de coestimulación/inhibición como PD-1, CD200, BTLA, etc, y su influencia en el resultado del alo-TPH y de su papel en el desarrollo de EICR, está aún poco explorado, su estudio permitirá en un futuro diseñar estrategias de prevención individualizadas para cada pareja de receptor-donante.

En conclusión, el proceso mediante el cual nuestro sistema inmune adaptativo es capaz de reconocer un antígeno como extraño es un proceso complejo y que requiere la intervención de distintas moléculas que se expresan en los linfocitos T y en las células presentadoras de antígeno. Los polimorfismos en los genes que codifican para estas moléculas, así como las posibles variantes de los péptidos presentados serán especialmente relevantes en la capacidad de desarrollar enfermedad del injerto contra el huésped y de controlar enfermedad mínima residual tras un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Hipotesis y Objetivos

Mientras el HLA continúa siendo la principal barrera en el trasplante de tejidos, la disparidad en locus de antígenos menores de histocompatibilidad tiene un papel importante cuando existe compatibilidad HLA entre donante y receptor.

Adicionalmente, modelos experimentales han demostrado que polimorfismos (SNPs) de genes relacionados con moléculas de coestimulación/inhibición de la respuesta inmune son capaces de modular la capacidad aloreactiva de los linfocitos T frente a las disparidades de AMiH, pero no existe información disponible sobre el impacto de algunas de ellas en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Nuestra hipótesis, se basa en considerar que factores genéticos como la disparidad en el antígeno menor de histocompatibilidad UGT2B17 y el genotipo de la molécula de inhibición de respuesta PD-1 pueden tener un impacto en la evolución clínica de los pacientes sometidos a alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico, afectando principalmente a la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor (EICR) o de recidivas de la enfermedad de base.

Objetivos principales:

1. Analizar el impacto clínico de la disparidad en el antígeno menor UGT2B17 entre donante y receptor en la evolución clínica de los pacientes post-alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico.
2. Determinar si los polimorfismos (SNPs) del gen PD-1 impacta en la evolución clínica de los pacientes que reciben un alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico.

Objetivos secundarios:

1. Determinar si existe asociación de la disparidad entre donante y receptor del AMHi UGT2B17 con la incidencia de EICR aguda o crónica.
2. Determinar si hay una asociación entre la disparidad del AMHi UGT2B17 y la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en el modelo de alo-TPH a partir de donante familiar HLA-idéntico.
3. Conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del gen de PD-1 en nuestra cohorte de donantes.
4. Determinar si el genotipo de PD1 del donante muestra una asociación con la incidencia de la EICR aguda o crónica.
5. Establecer si el genotipo de PD1 del donante muestra una asociación con la supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad o la mortalidad relacionada con el trasplante

Metodología y Resultados

La presente tesis es un compendio de los siguientes artículos publicados, por tanto, en el siguiente apartado se describirá la metodología y resultados del Proyecto, mediante la inclusión de los artículos publicados fruto de la investigación realizada.

1. UGT2B17 minor histocompatibility mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation.

Nazly Santos, Rocío Rodríguez-Romanos, Carlos Vallejo, Ismael Buño, Jose B. Nieto, Antonio Jiménez-Velasco, Salut Brunet, Elena Buces, Javier López-Jiménez, Marcos González, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Carmen Martínez, David Gallardo.

Bone Marrow Transplantation 2016 Jan;51(1):79-82. DOI: 10.1038/bmt.2015.207 PMID: 26367234

2. PD-1 genotype of the donor is associated with acute graft-versus-host disease after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation.

Nazly Santos, Rocío Rodríguez-Romanos, Rafael de la Cámara, Salut Brunet, Jose B. Nieto, Ismael Buño, Carmen Martínez, Antonio Jiménez-Velasco, Carlos Vallejo, Marcos González, Carlos Solano, Christelle Ferrá, Antonia Sampol, Jose A. Pérez-Simón, Javier López-Jiménez, José L. Díez, David Gallardo.

Annals of Hematology 2018 Nov;97(11):2217-2224. DOI: 10.1007/s00277-018-3438-y PMID: 30019128

1. Artículo 1. Impacto de la disparidad en el antígeno menor de Histocompatibilidad UGT2B17 en el trasplante alogénico a partir de donante emparentado HLA idéntico.

Los antígenos menores de histocompatibilidad son péptidos que pueden desencadenar respuestas inmunes en el contexto de una disparidad entre donante y receptor tras un trasplante alogénico (aloTPH), por eso su estudio es de gran interés sobre todo en el ámbito del trasplante de donante emparentado HLA idéntico.

Las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) son enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas y fármacos liposolubles. UGT2B17 es la principal enzima involucrada en la glucuronización de la testosterona, además es la principal en la segunda fase del metabolismo de fármacos y se ha descrito que los hombres expresan niveles 4 veces mayores de UGT2B17 que las mujeres, lo cual se asociaría a una mayor capacidad de detoxificación por glucuronización (Hum 1999) (Gallagher 2010).

El gen de UGT2B17 está en el cromosoma 4q13, y puede tener 0, 1 ó 2 copias en función de la presencia o no de un polimorfismo inserción/delección (ins/del) que condiciona la delección de 129 kB (Beaulieu 1997). La presencia de al menos una copia o alelo de UGT2B17 en el receptor (UGT2B17+) puede actuar como antígeno menor de histocompatibilidad cuando el donante presenta dicha delección en homocigosis (UGT2B17-/-) la expresión y procesamiento del este AMiH está restringida por HLA-A*29 o por HLA-B*44, alelos especialmente frecuentes en población caucásica (Murata 2003); sin embargo, se ha descrito que la disparidad UGT2B17 se asocia a mayor riesgo de EICR aguda tras alo-TPH de donante familiar HLA idéntico, independientemente de la tipificación HLA del paciente (Wilson 2004) (Xue 2008) (Jakobsson 2006).

Pacientes y métodos: Estudiamos retrospectivamente el impacto clínico de la disparidad UGT2B17 en una cohorte de 1127 pacientes que recibieron un alo-TPH de donante familiar HLA idéntico con una profilaxis homogénea de enfermedad de injerto contra receptor. Se correlacionó la presencia de la disparidad con EICR aguda, mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y tasa de recidiva mediante incidencia acumulada considerando riesgos

competitivos. La supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) se calcularon mediante curvas de Kaplan-Meier y comparación con el test log-rank. El análisis multivariante se hizo mediante regresión de Cox.

Resultados: La disparidad UGT2B17 se identificó en 69 casos (6.1%). La incidencia de EICR aguda severa (estadios III-IV) fue ligeramente mayor en los pacientes con disparidad UGT2B17, sin alcanzar significación estadística (22.7% vs 14.6%; p: 0.098) y el análisis multivariante tampoco mostró significación. No encontramos asociación de la disparidad con ninguna otra de las variables clínicas analizadas.

Sin embargo, cuando seleccionamos solo aquellos pacientes que recibieron un trasplante de un donante varón (616 casos), encontramos una incidencia significativamente mayor de EICH III-IV en presencia de la disparidad UGT2B17 (25.1% vs 12.8%; p: 0.005), en el análisis multivariante en este grupo de pacientes se identificó a UGT2B17 como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de EICR aguda severa (p: 0.024; HR: 2.25, 95%CI: 1.11 - 4.57). Esta mayor incidencia de EICR aguda se asoció a una tendencia a la significación estadística con una mayor mortalidad relacionada con el trasplante a los 2 años en el análisis univariante (30,7% vs. 20% a los 2 años; p: 0,082). En esta cohorte, la SG también fue peor en el grupo con disparidad UGT2B17 (mediana 1.1 años vs no alcanzada; p: 0.005). No se detectó impacto sobre la incidencia de recaídas de la enfermedad de base ni en la incidencia de la EICR crónica (41,9% vs. 40%; p: 0,835)

ORIGINAL ARTICLE

UGT2B17 minor histocompatibility mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation

N Santos¹, R Rodríguez-Romanos¹, JB Nieto², I Buño³, C Vallejo⁴, A Jiménez-Velasco⁵, S Brunet⁶, E Buces³, J López-Jiménez⁷, M González⁸, C Ferrá⁹, A Sampol¹⁰, R de la Cámara¹¹, C Martínez¹², D Gallardo¹ on behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH)

Minor histocompatibility Ags (mHags) have been implicated in the pathogenesis of GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Uridine diphospho-glucuronosyltransferase 2B17 (*UGT2B17*) gene deletion may act as a mHag and its association with acute GVHD (aGVHD) has been described. We retrospectively studied the clinical impact of a *UGT2B17* mismatch in a cohort of 1127 patients receiving a HSCT from an HLA-identical sibling donor. *UGT2B17* mismatch was present in 69 cases (6.1%). Incidence of severe aGVHD was higher in the *UGT2B17* mismatched pairs (22.7% vs 14.6%), but this difference was not statistically significant ($P: 0.098$). We did not detect differences in chronic GVHD, overall survival, relapse-free survival, transplant-related mortality or relapse. Nevertheless, when we analyzed only those patients receiving grafts from a male donor (616 cases), aGVHD was significantly higher in the *UGT2B17* mismatched group (25.1% vs 12.8%; $P: 0.005$) and this association was confirmed by the multivariate analysis ($P: 0.043$; hazard ratio: 2.16, 95% confidence interval: 1.03–4.57). Overall survival was worse for patients mismatched for *UGT2B17* ($P: 0.005$). We conclude that *UGT2B17* mismatch has a negative clinical impact in allogeneic HSCT from HLA-identical sibling donors only when a male donor is used. These results should be confirmed by other studies.

Bone Marrow Transplantation (2016) 51, 79–82; doi:10.1038/bmt.2015.207; published online 14 September 2015

INTRODUCTION

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are enzymes involved in the metabolism of steroid hormones and lipid-soluble drugs. Uridine diphospho-glucuronosyltransferase 2B17 (*UGT2B17*) is the most active enzyme in testosterone glucuronidation, acting as a detoxification enzyme, which catalyzes the glucuronidation of lipophilic compounds. The *UGT2B17* gene is mapped to chromosome 4q13.¹ *UGT2B17* is highly expressed in the liver and gastrointestinal tract, but also in extrahepatic steroid target tissues such as the prostate.² Interestingly, it has been described that men have higher *UGT2B17* expression and activity than women.³

The human *UGT2B17* gene varies in copy number from zero to two per individual because of the presence of a polymorphism that consists of a 129-kb deletion.⁴ The incidence of this gene deletion varies among populations on the basis of their ethnic background.^{5,6}

In 2003, Murata *et al.*⁷ described a novel minor histocompatibility Ag (mHag) encoded by *UGT2B17*, identifying a cytotoxic T-cell clone derived from a patient with GVHD that recognized the peptide AELLNIPFLY, derived from *UGT2B17* and presented by HLA-A*29:02 and also by HLA-B*44:03.⁸ New data revealed that CVATMIFMI, a different peptide derived from *UGT2B17*, is presented by the HLA allele HLA-A*02:06, frequently detected in Asiatic and Central American populations.

The Japanese group explored the impact of *UGT2B17* on clinical outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from unrelated donors,⁹ and although they did not find a significant association between *UGT2B17* mismatch and the incidence of acute GVHD (aGVHD), they suggested that the use of a *UGT2B17*-positive donor was an independent risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after transplantation. In contrast, McCarroll *et al.*¹⁰ analyzed three different cohorts of allogeneic HSCT from HLA-identical sibling donors and they found that the risk of aGVHD was greater when patient and donor were mismatched for *UGT2B17* (donor *UGT2B17* negative and recipient *UGT2B17* positive) independent of the presence of the described HLA restriction alleles, suggesting that the gene deletion polymorphisms should be considered as potential targets for immune recognition after allogeneic transplantation.

The main objective of our study was to confirm the association of *UGT2B17* mismatch with the incidence of aGVHD and the clinical outcome after allogeneic HSCT from an HLA-identical sibling donor.

PATIENTS AND METHODS

Patients

We retrospectively studied a cohort of 1127 patients receiving an allogeneic HSCT from an HLA-identical sibling donor between 1991 and

¹Clinical Hematology Department, Institut Català d'Oncologia, IDIBGi, Girona, Spain; ²Hematology Department, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; ³Hematology Department, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁴Hematology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; ⁵Hematology Department, Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain; ⁶Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁷Hematology Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ⁸Hematology Department, Hospital Universitario, Salamanca, Spain; ⁹Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain; ¹⁰Hematology Department, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Spain; ¹¹Hematology Department, Hospital La Princesa, Madrid, Spain and ¹²Hematology Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr D Gallardo, Clinical Hematology Department, Institut Català d'Oncologia, IDIBGi, Hospital Josep Trueta, Avda. França s/n, Girona, 17007, Spain. E-mail: dgallardo@iconcologia.net

Received 13 May 2015; revised 16 July 2015; accepted 23 July 2015; published online 14 September 2015

2012 in Spanish Centers. All patients received a non-T-cell-depleted graft. The conditioning regimen was myeloablative in 65.8% of cases and peripheral blood was the most frequently used source of stem cells (70.2%). Clinical characteristics of the studied cohort are summarized in Table 1. Written informed consent was obtained from patients and donors before DNA storage.

UGT2B17 genotyping

DNA samples were obtained from patients' and donors' peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C until use. UGT2B17 genotype was determined for both patients and donors by PCR with sequence-specific primers with allele-specific primers and conditions described by Spierings *et al.*¹¹ in a multiplex PCR reaction including primers specific for the HLA-DRB1 locus as an internal positive control. The amplified products were analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel. Samples demonstrating the expected 353-bp band size were considered UGT2B17 positive, whereas the absence of this band in the presence of positive control amplification was considered as deletion of the gene (UGT2B17 negative). This PCR with sequence-specific primers method allows us to detect the UGT2B17 $-/-$ genotype (deletion of both alleles) or the presence of at least one allele (UGT2B17 $+/-$ or $+/+$).

Statistical analysis

Homogeneity between UGT2B17 mismatched and non-mismatched donor-patient pairs was evaluated using the chi-square test for qualitative variables and Student's *T*-test for continuous variables.

A two-sided *P*-value of 0.05 or lower was considered to be statistically significant. Kaplan-Meier curves were derived to determine overall survival and disease-free survival, and were compared by means of the log-rank test. Cumulative incidence estimates were used to explore differences in aGVHD, transplant-related mortality and relapse incidence. aGVHD was defined by clinical criteria and late onset beyond day 100 was included if documented, mainly in patients receiving a non-myeloablative conditioning regimen. Death without signs of GVHD was considered as a competitive risk for aGVHD. The competing risk for relapse was death in CR.

Multivariate analysis was performed using the Cox regression model. All the variables with a *P*-value at or below 0.2 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis.

Table 1. Clinical characteristics of the studied cohort (*n*: 1127)

Patient's age (median (range))	41 (1-72)
Donor's age (median (range))	41 (2-79)
Patient's sex (male/female)	683 (60.6%)/444 (39.4%)
Donor's sex (male/female)	620 (55%)/507 (45%)
Male recipient-female donor	294 (26.1%)
<i>Diagnosis</i>	
ALL	161 (14.3%)
AML	325 (28.8%)
CML	161 (14.3%)
Non-Hodgkin's lymphoma	164 (14.6%)
Myelodysplastic syndrome	96 (8.5%)
Multiple myeloma	89 (7.9%)
Severe aplastic anemia	50 (4.4%)
Hodgkin's disease	41 (3.6%)
Other	40 (3.5%)
Source of stem cells (PB/BM)	823 (70.2%)/349 (29.8%)
Conditioning regimen (myeloablative/RIC)	742 (65.8%)/385 (34.2%)
TBI	283 (25.1%)
<i>GVHD prophylaxis</i>	
Cyclosporine+methotrexate	926 (82.2%)
Cyclosporine+mycophenolate mofetil	81 (7.2%)
Other combinations	120 (10.6%)

Abbreviations: BM = bone marrow; PB = peripheral blood; RIC = reduced intensity conditioning regimen.

RESULTS

UGT2B17 genotype

We detected the 'null' genotype (UGT2B17 $-/-$) in 7.4% of the individuals studied. The UGT2B17 mismatch (defined by the presence of at least one UGT2B17 allele in the patient and the 'null' phenotype in the donor) was detected in 69 patient-donor pairs, representing 6.1% of the study cohort. The clinical characteristics of the UGT2B17 mismatched cohort and the non-mismatched patient-donor pairs are presented in Table 2. All variables were comparable between the two groups.

Clinical outcome according to the UGT2B17 mismatch

The cumulative incidence of grades II-IV aGVHD was comparable between the patients receiving a UGT2B17 mismatched graft and those without this mismatch (35.3% vs 34.4%; *P*: 0.854). When considering only severe (grades III-IV) aGVHD, we detected a trend toward an increased incidence of this complication in the presence of a UGT2B17 mismatch (22.7% vs 14.6%; *P*: 0.098) (Figure 1a), but the multivariate analysis failed to detect statistical significance to consider the UGT2B17 mismatch as an independent risk factor for grades III-IV aGVHD (*P*: 0.336).

Similarly, we did not detect statistical differences between the UGT2B17 mismatched or matched pairs in the incidence of chronic GVHD (49.1% vs 45.1%; *P*: 0.573), relapse incidence (22.2% vs 25.1% at 2 years; *P*: 0.986) or transplant-related mortality (19.9% vs 19.7% at 1 year and 23.7% vs 22.3% at 2 years; *P*: 0.654). As expected, given the above-mentioned results, there were no differences in overall survival (median 8.2 years for patients with UGT2B17 mismatch vs 7.4 years for those without mismatch; *P*: 0.779) (Figure 1c) or disease-free survival (median 2.3 vs 2.5 years; *P*: 0.781).

We also explored whether the UGT2B17 genotype of the donor conditioned the clinical outcome after allogeneic transplant from HLA-identical sibling donors as Terakura *et al.* suggested. However, we failed to find any clinical correlation with the presence of at least one UGT2B17 allele in the donor.

UGT2B17 mismatch and gender of the donor

As has been described, the combination of female donor and male recipient is associated with an increased risk of aGVHD and worse survival, mainly due to the presence of several Y-chromosome codified mHags (H-Y mismatches). As the effect of these mismatches seem to be immunodominant after allogeneic HSCT, we attempted to establish whether or not the UGT2B17 mismatch had any impact on clinical outcome in the absence of such mismatches. Thus, from the entire cohort we selected 828 patient-donor pairs without the H-Y mismatch. From these pairs, 53 cases (6.4%) were UGT2B17 mismatched and we detected a statistically significant increase in incidence of grades III-IV aGVHD in these patients (25.1% vs 12.8%; *P*: 0.031) and a trend toward a worse overall survival (median 3.1 vs 14.6 years; *P*: 0.107).

However, we found that this worse clinical outcome was not conditioned by the H-Y mismatch but by the use of a male donor, independently of the gender of the recipient. When analyzing the 616 transplants performed from a male sibling donor, we detected a statistically significant increase in aGVHD grades III-IV (29.9% vs 12.8%; *P*: 0.005) (Figure 1b). The multivariate analysis in this group of patients identified the UGT2B17 mismatch as an independent risk factor for developing grades III-IV aGVHD (*P*: 0.043; hazard ratio (HR): 2.16, 95% confidence interval (CI): 1.03-4.57). This increase in severe aGVHD was associated with a trend toward an increased transplant-related mortality in univariate analysis (24.8% vs 17.3% at 1 year, 30.7% vs 20% at 2 years and 37.9 vs 22.1% at 5 years after transplant; *P*: 0.082). No significant differences were found in the incidence of either disease relapse (*P*: 0.466) or chronic GVHD (41.9% vs 40%; *P*: 0.835). In this cohort of patients,

Table 2. Homogeneity between the studied groups

Variable	UGT2B17 mismatch (n: 69)	No UGT2B17 mismatch (n:1058)	P-value
Patient's age (median (range))	40.5 (2-76)	41 (1-69)	0.719
Donor's age (median (range))	40 (2-76)	41 (3-79)	0.377
Patient's sex (male/female)	60.9%/39.1%	60.6%/39.4%	0.963
Male recipient-female donor	23.2%	26.3%	0.566
Diagnosis = acute leukemia/MDS	51.6%	51%	0.921
Disease status (early/advanced)	52.5%/47.5%	61.1%/38.9%	0.191
Patient CMV+	75%	79.7%	0.384
Donor CMV+	76.4%	74.5%	0.764
Source of stem cells (PB/BM)	65.2%/34.8%	70.5%/29.5%	0.348
Myeloablative conditioning regimen	66.2%	65.7%	0.946
TBI	31.3%	24.7%	0.243

Abbreviations: BM = bone marrow; MDS = myelodysplastic syndrome; PB = peripheral blood; UGT2B17 = uridine diphospho-glucuronosyltransferase 2B17. Advanced disease was considered for patients with acute leukemia beyond the first CR, CML beyond the first chronic phase, and progressive disease for patients with MDS, multiple myeloma or lymphoma. Patient/donor CMV⁺ indicates positive IgG CMV serology.

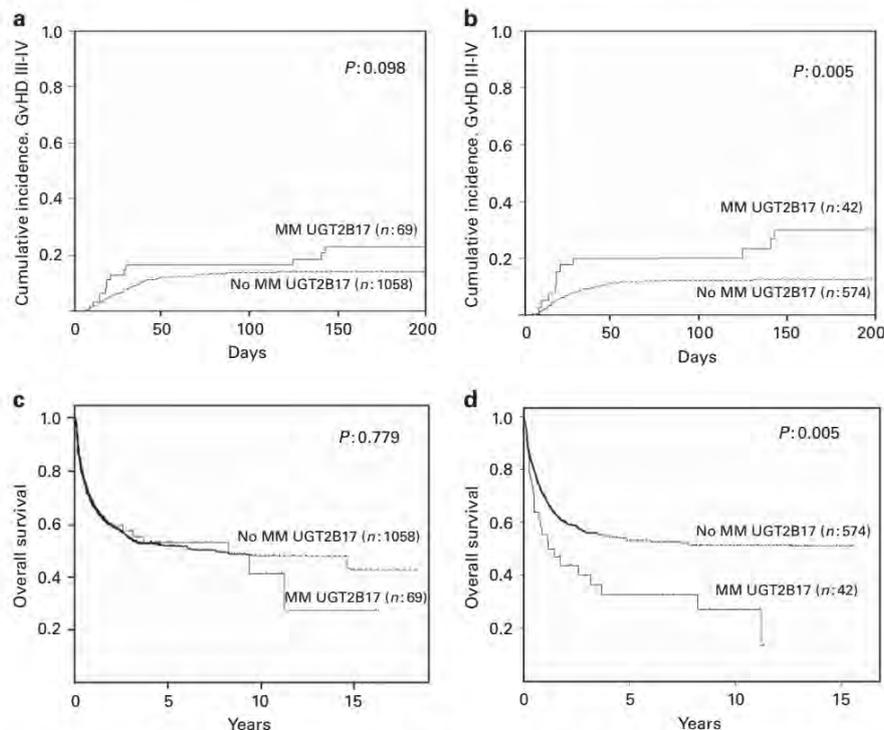


Figure 1. Cumulative incidence of grades III-IV aGVHD according to the presence or absence of a UGT2B17 mismatch considering the complete cohort (a) or only those patients receiving grafts from a male donor (b). Overall survival according to the presence or absence of a UGT2B17 mismatch considering the complete cohort (c) or only those patients receiving grafts from a male donor (d).

overall survival was significantly worse in the presence of a UGT2B17 mismatch (median 1.1 years vs not reached; $P: 0.005$) (Figure 1d). Disease-free survival was also statistically inferior in the UGT2B17 mismatched transplants (median 0.8 vs 2.1 years; $P: 0.031$). However, this deleterious impact on overall or disease-free survival was not confirmed in the multivariate analysis. Tables reflecting the univariate and multivariate analyses in the different analyzed cohorts are available as Supplementary Material.

DISCUSSION

mHags are MHC-associated peptides, which trigger T-cell responses that mediate GVHD and GVL effect.^{12,13}

The majority of mHags result from diallelic single-nucleotide polymorphisms that generate amino-acid sequence differences or variability in protein expression levels. In contrast, the UGT2B17 immunogenicity results from differential expression in donor and recipient cells as a consequence of a homozygous deletion of the *UGT2B17* gene. Moreover, as UGT2B17 is a large protein (530 amino acids), it has been hypothesized that it may give rise to multiple antigenic epitopes, increasing the potential immunogenicity of the UGT2B17 mismatch in an allogeneic setting.

The potential immunogenicity of the UGT2B17 mismatch has been a focus of interest in the context of allogeneic HSCT. In 2005, Terakura *et al.*⁹ described the clinical outcome of 435 patients receiving an allogeneic HSCT from HLA-identical unrelated donors,

and they failed to detect significant association between UGT2B17 mismatch and the incidence of aGVHD, chronic GVHD, relapse or survival. Nevertheless, they found that the use of a UGT2B17-positive donor was an independent risk factor for higher transplant-related mortality and lower overall survival.

In contrast, McCarroll *et al.*¹⁰ analyzed three HSCT cohorts (424, 336 and 595 HLA-identical sibling donor–recipient pairs), and they found that risk of aGVHD was greater in the presence of a UGT2B17 mismatch considered as an insertion–deletion polymorphism, without considering HLA restriction. Although the exact number of mismatched pairs was not reported, given an expected incidence of 5–6% the analysis was likely carried out on approximately 20–35 mismatched pairs in each cohort. Analysis of smaller cohorts of patient–donor pairs by other groups have detected a similar association.^{14,15}

More recently, Spierings *et al.*¹⁶ carried out a multicenter analysis exploring the clinical impact of several mHags on GVHD in a cohort of 639 patients receiving an allogeneic HSCT from an HLA-identical related donor and 210 from an unrelated donor. Although they tried to explore the role of mismatches for the mHags UGT2B17/A29 and UGT2B17/B44, the analysis could not be addressed because of the low numbers of relevant mismatched pairs, and they did not assess the impact on clinical outcome of the UGT2B17 mismatch regardless of the MHC restriction.

In our experience, the UGT2B17 mismatch, defined as the presence of homozygous UGT2B17 deletion in the donor but not in the patient, shows no significant association with any of the clinical variables analyzed. Similarly, we did not find any clinical differences when the donor was UGT2B17+ in contrast with Terakura *et al.* However, we found that the UGT2B17 mismatch was an independent risk factor for severe aGVHD only when a male donor was used.

This observation may be related to several factors. The use of a male donor excludes the presence of the H-Y mismatches conditioned by the combination male recipient–female donor. As the presence of many immunogenic peptides derived from the Y-chromosome may be immunodominant, the clinical relevance of the autosomal mHags could be impaired in the presence of H-Y mismatches.

Moreover, the observation that the effect of the UGT2B17 mismatch is even more evident when considering only male donors may suggest that the H-Y immune dominance effect could extend to female donors having their T-cell repertoire narrowed by H-Y sensitization. In this context, the clinical relevance of other null allele disparities remains to be explored.

Gallagher *et al.*³ showed that there are sex differences in UGT2B expression and activity, with men exhibiting a higher level of expression of UGT2B17 and a higher level of glucuronidation activity than women. Moreover, the condition of UGT2B17 mismatch by itself assumes the presence of at least one UGT2B17 allele in the recipient. As UGT2B17 is involved in glucuronation activity in liver microsomes and it has been described that cyclosporine A metabolism may be partially mediated by glucuronation by members of the UGT2B family, one hypothesis to consider is that the metabolism of cyclosporine A may be faster in recipients expressing UGT2B17, increasing the risk of GVHD in the presence of immunogenic mismatches. Unfortunately, gel analysis of PCR products is not able to distinguish UGT2B17 heterozygous +/- from homozygous +/+ and this technical limitation does not allow us to determine if the allelic burden is relevant in this context.

Owing to the low frequency of the UGT2B17 mismatch, only studies analyzing large cohorts of homogeneous HSCT from

HLA-identical sibling donors can be helpful in clarifying its clinical relevance. Our results seem to contradict previous reports and the UGT2B17 mismatch has only a marginal effect on aGVHD, when a male donor is used, however, these results should be considered as a preliminary and need to be confirmed by other studies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been partially financed by grants PI11/01690 and PI14/01646 from the Instituto de Salud Carlos III, co-financed by FEDER (Fondo Europeo de desarrollo regional) and by grant MTV3/120210 from Fundació Marató TV3.

REFERENCES

- 1 Beaulieu M, Levesque E, Tcherno A, Beatty BG, Belanger A, Hum DW. Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme. *DNA Cell Biol* 1997; **16**: 1143–1154.
- 2 Hum DW, Belanger A, Levesque E, Barbier O, Beaulieu M, Albert C *et al.* Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1999; **69**: 413–423.
- 3 Gallagher CJ, Balliet RM, Sun D, Chen G, Lazarus P. Sex differences in UDP-glucuronosyltransferase 2B17 expression and activity. *Drug Metab Dispos* 2010; **38**: 2204–2209.
- 4 Wilson W 3rd, Pardo-Manuel de Villena F, Lyn-Cook BD, Chatterjee PK, Bell TA, Detwiler DA *et al.* Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15. *Genomics* 2004; **84**: 707–714.
- 5 Xue Y, Sun D, Daly A, Yang F, Zhou X, Zhao M *et al.* Adaptive evolution of UGT2B17 copy-number variation. *Am J Hum Genet* 2008; **83**: 337–346.
- 6 Jakobsson J, Ekstrom L, Inotsume N, Garle M, Lorentzon M, Ohlsson C *et al.* Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *J Clin Endocr Metab* 2006; **91**: 687–693.
- 7 Murata M, Warren EH, Riddell SR. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med* 2003; **197**: 1279–1289.
- 8 Terakura S, Murata M, Warren EH, Sette A, Sidney J, Naoe T *et al.* A single minor histocompatibility antigen encoded by UGT2B17 and presented by human leukocyte antigen-A*2902 and -B*4403. *Transplantation* 2007; **83**: 1242–1248.
- 9 Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Riddell SR *et al.* A UGT2B17-positive donor is a risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2005; **129**: 221–228.
- 10 McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, Chileski SD *et al.* Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nat Genet* 2009; **41**: 1341–1344.
- 11 Spierings E, Drabbels J, Hendriks M, Pool J, Spruyt-Gerritse M, Claas F *et al.* A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS One* 2006; **1**: e42.
- 12 Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 1997; **157**: 125–140.
- 13 Warren EH, Gavin M, Greenberg PD, Riddell SR. Minor histocompatibility antigens as targets for T-cell therapy after bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol* 1998; **5**: 429–433.
- 14 Jervis S, Collins P, Tate D, Foster L, Bowman V, Adhern C *et al.* Increased severity of acute graft versus host disease as a result of differential expression following a homozygous gene deletion. *Int J Immunogenet* 2013; **40**: 116–119.
- 15 Martínez-Bravo MJ, Calderón-Cabrera C, Márquez-Malaver FJ, Rodríguez N, Gujjarro M, Espigado I *et al.* Mismatch on glutathione S-transferase T1 increases the risk of graft-versus-host disease and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 1356–1362.
- 16 Spierings E, Kim YH, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A *et al.* Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**: 1244–1253.

Supplementary Information accompanies this paper on Bone Marrow Transplantation website (<http://www.nature.com/bmt>)

2.Artículo 2. El genotipo de PD-1 del donante, se asocia a la enfermedad injerto contra receptor en el trasplante alogénico a partir de donante emparentado HLA idéntico.

La irrupción con gran éxito en el mundo de la oncología de los anticuerpos monoclonales contra moléculas cohibidoras de la respuesta inmune, expresadas por los linfocitos T tales como los anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab), como herramientas terapéuticas en diferentes grupos de neoplasias, ha despertado interés en el estudio de del papel de PD-1 en el trasplante hematopoyético. Programmed cell-death 1 (PD-1) es un gen que codifica una molécula que vehiculiza señales de inhibición de respuesta en los linfocitos T, lo cual genera un proceso de tolerancia inmune.

La expresión de algunos SNPs de PD-1 muestran una clara asociación con el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes o alto riesgo de desarrollo de neoplasias. Sin embargo, pocos datos se han publicado acerca del impacto de estos SNPs en el desarrollo de EICR en pacientes sometidos a alo-TPH. Por esta razón se ha determinado si el genotipo de PD-1 condiciona o no una mayor incidencia de EICR aguda en el alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico.

Pacientes y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo en una cohorte de 1485 parejas donante-receptor sometidos a trasplante alogénico de donante emparentado HLA idéntico sin depleción de linfocitos T del injerto, sin tener en cuenta la restricción HLA. Se determinó el genotipo del donante para los SNPs PD-1.1 (G/A) ubicado en la región promotora y PD-1.3 (G/A) ubicado en el intrón 4. Se correlacionó la presencia del genotipo de PD-1 del donante con la incidencia de EICR aguda, mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y tasa de recidiva mediante incidencia acumulada considerando riesgos competitivos. La supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) se calcularon mediante curvas de Kaplan-Meier y comparación con el test log-rank. El análisis multivariante se hizo mediante regresión de Cox.

Resultados: Las frecuencias de los alelos y haplotipos de PD-1 fueron similares a las descritas previamente en población caucásica. El haplotipo PD-1.1G/PD-1.3G (G-G) fue el predominante (86,3%).

La incidencia acumulada de EICR aguda grados II-IV fue elevada en pacientes con e donantes homocigotos para alelos PD-1.1G (p: 0.027) y PD-1.3AA (p: 0.003); en el análisis multivariante estos dos alelos fueron identificados como factores de riesgo independientes para EICR aguda grado II-IV (p:0.033; HR2.2; 95%CI: 1.1-4.8 y p<0.001; HR4.5; 95%CI: 2-10.1 respectivamente). Analizando la incidencia acumulada de EICR aguda II-IV en la cohorte, se pudieron diferenciar tres grupos de pacientes en base al genotipo PD-1: la incidencia de EICR aguda II-IV fue del 64% en el grupo de pacientes con donantes con genotipo de alto riesgo (PD-1.1GG/PD1.3AA), 32,6% para aquellos con donantes con genotipo intermedio (PD-1.1GG/PD-1.3AG o GG) y un 18% per los que recibieron injerto de donantes con genotipo de PD-1 de bajo riesgo (al menos un alelo A en posición PD-1.1). El análisis estadístico mostró que dichas diferencias eran significativas tanto cuando se compara el grupo de alto riesgo con el de riesgo intermedio (p: 0.001) como cuando la comparación se realiza entre el grupo de riesgo intermedio y el grupo de bajo riesgo (p: 0.029).

Adicionalmente considerando la incidencia sólo de formas severas de EICR aguda (grados III o IV), el genotipo PD-1.3AA continuó siendo un factor de riesgo independiente: 41,9% vs. 14,4% (p <0,001; HR 7,22; IC95%: 2,6-19,7).

A pesar del riesgo incrementado de EICR aguda, no se detectó influencia del genotipo de PD-1 en los objetivos secundarios (EICR crónica, mortalidad relacionada con trasplante (MRT), SG o recaídas)



PD-1 genotype of the donor is associated with acute graft-versus-host disease after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation

Nazly Santos¹ · Rocío Rodríguez-Romanos¹ · Rafael de la Cámara² · Salut Brunet³ · Jose B. Nieto⁴ · Ismael Buño⁵ · Carmen Martínez⁶ · Antonio Jiménez-Velasco⁷ · Carlos Vallejo⁸ · Marcos González⁹ · Carlos Solano¹⁰ · Christelle Ferrá¹¹ · Antonia Sampol¹² · Jose A. Pérez-Simón¹³ · Javier López-Jiménez¹⁴ · José L. Díez⁵ · David Gallardo¹ · On behalf of the GvHD/Immunotherapy Working Party of the Spanish Group of Hematopoietic Transplant (GETH)

Received: 17 February 2018 / Accepted: 9 July 2018 / Published online: 17 July 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Programmed death 1 (PD-1) activation triggers an immune checkpoint resulting in inhibition of T cells that leads to peripheral tolerance. Some *PD-1* polymorphisms have been described and associated with the development of autoimmune diseases or cancer predisposition, but there are few data concerning the relevance of such polymorphisms on the clinical outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplant (alloHSCT). We analyzed the distribution of the SNPs PD-1.1G/A (rs36084323) and PD-1.3G/A (rs11568821) genotypes of the donor in a cohort of 1485 alloHSCT from HLA-identical sibling donors. We found an increased risk of grades II to IV graft-versus-host disease (GvHD) in patients receiving grafts from donors homozygous for the G allele at the rs36084323 SNP ($P = 0.033$; hazard ratio [HR] 2.2; 95% confidence interval [CI] 1.1 to 4.8) and also from donors homozygous for the A allele at the rs11568821 position ($P < 0.001$; HR 4.5, 95%CI 2.0 to 10.1). In contrast, the *PD-1* genotype of the donor did not show association with overall survival or relapse incidence. These results suggest that the *PD-1* genotype of the donor plays an important role for the development of acute GvHD after alloHSCT from HLA-identical sibling donors.

Keywords PD-1 · Graft-versus-host disease · Allogeneic transplantation

Introduction

Graft-versus-host disease is still the main complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

Many studies have been directed to ascertain the genetic determinants that drive the susceptibility to develop this immune reaction beyond the HLA compatibility: minor histocompatibility antigens have been associated with the alloreactive

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00277-018-3438-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Gallardo
dgallardo@iconcologia.net

¹ Clinical Hematology Department, Institut Català d'Oncologia (ICO Girona), IDIBGi, Avda França s/n, 17007 Girona, Spain

² Hospital La Princesa, Madrid, Spain

³ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁴ Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

⁵ Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

⁶ Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁷ Hospital Regional Universitario, Málaga, Spain

⁸ Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain

⁹ Hospital Universitario, Salamanca, Spain

¹⁰ Hospital Clínico, Valencia, Spain

¹¹ Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain

¹² Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Spain

¹³ Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

¹⁴ Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

responses between HLA-identical sibling patient-donor pairs, as well as other polymorphisms affecting genes that encode proteins participating in the immune response, mainly cytokines or innate immunity molecules [1–3].

Many genetic polymorphisms in costimulatory molecules have been associated with autoimmune diseases or with susceptibility to tumors. This observation has promoted some scientific groups to explore the correlation between these polymorphisms and the appearance of GvHD after allogeneic stem cell transplant. Two of the SNPs in the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (*CTLA4*) gene, CT60A > G (rs3087243), and 49A > G (rs231775) have been associated with autoimmune diseases by modifying the production of the soluble form of CTLA4 or by reducing the amount of cell-surface CTLA4 respectively [4]. Both polymorphisms have been also associated with differences on acute GvHD incidence and even on overall survival after allogeneic stem cell transplantation [5–7].

The programmed cell death 1 (*PD-1*) gene, located on chromosome 2q37, encodes the PD-1 molecule, which is another inhibitory immune receptor member of the B7/CD28 family. PD-1 is inducibly expressed on activated T cells and can be engaged by their ligands PD-L1 and PD-L2, which are expressed on antigen presenting cells. The PD-1 intracellular tail contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM), and after activation, tyrosine phosphorylation at the ITIM recruits SH2 domain-containing phosphatases (SHP1 and SHP2) and negatively regulates cell activity.

Due to their ability to modulate the PD-1 expression, many SNPs within the *PD-1* gene have been related with an increased risk of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, or rheumatoid arthritis [8–11].

We explored the clinical impact of these PD-1 polymorphisms on clinical outcome in a large cohort of patients receiving an allogeneic stem cell transplant from HLA-identical sibling donors.

Methods

Patients

We retrospectively studied a cohort of 1485 patients receiving an allogeneic HSCT from an HLA-identical sibling donor between 1991 and 2013 in Spanish centers. The conditioning regimen was myeloablative in 70% of cases and peripheral blood was the most used stem cell source (71%). Clinical characteristics of the studied cohort are summarized in Table 1. Samples and data from patients included in this study were provided by the IDIBGI Biobank (Biobanc IDIBGI, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network, and they were processed following standard

operating procedures with the appropriate approval of the Ethics and Scientific Committees. All patients and donors signed the informed consent, and the study met with the recommendations of the Helsinki declaration.

PD-1 genotyping

DNA samples were obtained from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C until use.

We selected two previously described potentially functional polymorphisms within the *PD-1* gene: PD-1.1G/A (rs36084323) in promoter and PD-1.3G/A (rs11568821) in intron 4. The genotype of the donors for these two polymorphisms was determined via allelic discrimination plots on the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system by using TaqMan real-time PCR primers and probes obtained as commercially available AB Assay on Demand reagents (Life Technologies, Carlsbad, CA). The Assay on Demand reagents included both the necessary primers and fluorescently labeled (FAM and VIC) TaqMan MGB probes to amplify and detect each polymorphism.

The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 60 s. The presence of wild-type and variant alleles was defined by comparing the relative end-point fluorescence created by the degradation of each fluorescently labeled TaqMan probe, according to the manufacturer's instructions.

CTLA-4 genotyping

We genotyped two polymorphisms within the *CTLA-4* gene previously associated with the clinical outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplant: rs231775A > G (at position +49, in the first exon) and rs3087243 (CT60, in the 3' untranslated region). The genotype of the donor was determined by PCR with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis as previously described [5].

Statistical analysis

Allele frequencies, genotypes, and haplotypes were formulated by direct counting. Hardy-Weinberg equation ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) was used to measure whether the observed genotype frequencies in the studied population differ from the predicted frequencies.

Homogeneity between genotype groups was performed using the chi-square test or Fisher's exact test for qualitative variables and Student's *T* test for continuous variables.

The main objective of the study was to detect differences in the acute GvHD incidence according to the *PD-1* genotype of

Table 1 Clinical characteristics of the studied cohort (n: 1485)

Patient's age [median (range)]	41 (1–72)
Donor's age [median (range)]	41 (1–79)
Patient's sex (male/female)	902 (60.7%)/583 (39.3%)
Male recipient-female donor	379 (25.8%)
Diagnosis	
Acute lymphoblastic leukemia	223 (15.0%)
Acute myeloid leukemia	430 (29.0%)
Chronic myeloid leukemia	219 (14.7%)
Non-Hodgkin lymphoma	201 (13.5%)
Myelodysplastic syndrome	123 (8.3%)
Multiple myeloma	123 (8.3%)
Severe aplastic anemia	55 (3.7%)
Hodgkin disease	52 (3.5%)
Other	59 (3.9%)
Source of stem cells (PB/BM)	1054 (71%) / 431 (29%)
Conditioning regimen (myeloablative/RIC)	1044 (70.3%) / 441 (29.7%)
Total body irradiation	438 (29.5%)
GVHD prophylaxis	
Cyclosporine + methotrexate	1054 (71%)
Other combinations	431 (29%)
T-cell depletion	166 (11.2%)
Median follow-up (alive patients)	3.5 years (0.5–21.4)

the donor. Cumulative incidence estimates were used to explore differences in acute GVHD. Death without signs of GVHD was considered as a competitive risk for acute GVHD. Secondary objectives were overall survival, transplant-related mortality (TRM), and relapse incidence. The competing risk for relapse was death in complete remission. Kaplan-Meier curves were derived to determine overall survival (OS) and disease-free survival (DFS), and curves were compared by means of the log-rank test. A two-sided *P* value of 0.05 or lower was considered to be statistically significant.

Multivariate analysis was performed using the Cox regression model. All the variables with a *P* value at or below 0.2 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis.

Results

PD-1 genotype distribution

The PD-1 genotype at SNPs rs36084323 and rs11568821 could be determined in 1406 and 1433 donors respectively. Allele, overall genotype, and haplotype frequencies obtained at the two PD-1 loci are listed in Table 2. Genotypes corresponding to both PD-1 polymorphisms did not significantly deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium.

As previously described in Caucasian population, rs36084323 G allele was detected in the majority of the studied cases, being only 2.9% the incidence of the A allele. The rs11568821 SNP also showed the expected allele distribution (88.8% G; 11.2% A). The genotype distribution showed a low

Table 2 Allele, genotype, and haplotype distribution for the PD-1.1 and PD-1.3 SNPs

PD-1.1 (rs36084323) (<i>n</i> 1406)		
Allele distribution	Allele G	2735 (97.1%)
	Allele A	81 (2.9%)
Genotype distribution	GG	1335 (95.0%)
	AG	65 (4.4%)
	AA	8 (0.6%)
PD-1.3 (rs11568821) (<i>n</i> 1433)		
Allele distribution	Allele G	2545 (88.8%)
	Allele A	321 (11.2%)
Genotype distribution	GG	1133 (79.1%)
	AG	279 (19.5%)
	AA	21 (1.5%)
Haplotype distribution ^a	PD-1.1 (G)–PD-1.3 (G)	2338 (86.3%)
	PD-1.1 (G)–PD-1.3 (A)	297 (11.0%)
	PD-1.1 (A)–PD-1.3 (G)	71 (2.6%)
	PD-1.1 (A)–PD-1.3 (A)	2 (0.1%)

^a 1354 donors with available information at both SNPs

frequency of homozygosity for the rs36084323 A (only 8 cases 0.6%) and rs11568821 A alleles (21 cases 1.5%). The G-G haplotype (considered as rs36084323 G/rs11568821 G) was the predominant, being present in 86.3% of cases.

When comparing the clinical variables within each genotype group, we observed that patients with donors genotyped as rs36084323 AG or AA were younger (median 39 versus 42 years; P 0.001) and with a higher proportion of women (40.1 versus 23.9%; P 0.006). The remaining clinical variables (diagnosis, stage of the disease before transplant, source of stem cells, conditioning regimen, use of total body irradiation, T-cell depletion and pharmacological GvHD prophylaxis) were comparable between both genotype groups.

The comparison of clinical variables between rs11568821 genotypes did not show differences between the AA and the AG/GG cohorts, except for a higher proportion of myeloablative conditioning regimen in patients with donors genotyped as rs11568821 AA (69.6 versus 90%; P 0.049).

PD-1 polymorphisms and acute GvHD incidence

The cumulative incidence of grades II, III, or IV acute GvHD was higher in patients receiving grafts from donors homozygous for the rs36084323 G allele (32.7%) than for those with donors with the AG heterozygous genotype (18.8%) or homozygous for the A allele (12.5%). We found an increased risk of acute GvHD in patients receiving grafts from a donor with the rs36084323 GG genotype when compared with those whose donor presented the AG or AA genotypes (32.7 vs. 18%; P 0.027) (Fig. 1a). We also detected differences in grades II, III, or IV acute GvHD according to the rs11568821 genotype of the donor. Patients with donors genotyped as rs11568821 GG or AG had similar incidence of grades II, III, or IV acute GvHD (32.8 and 30.2% respectively), but those receiving grafts from homozygous rs11568821 AA donors showed an increased incidence of this complication (60.7%). The comparison between the rs11568821 AA versus the AG or GG

genotypes showed statistically significant differences (60.7 vs. 32.3%; P 0.003) (Fig. 1b).

Multivariate analysis identified both the rs36084323 GG (P 0.040; HR 2.2; 95%CI 1.04 to 4.6) and the rs11568821 AA (P < 0.001; HR 4.5; 95%CI 2.0 to 10.2) genotypes as independent risk factors for developing grades II-IV acute GvHD.

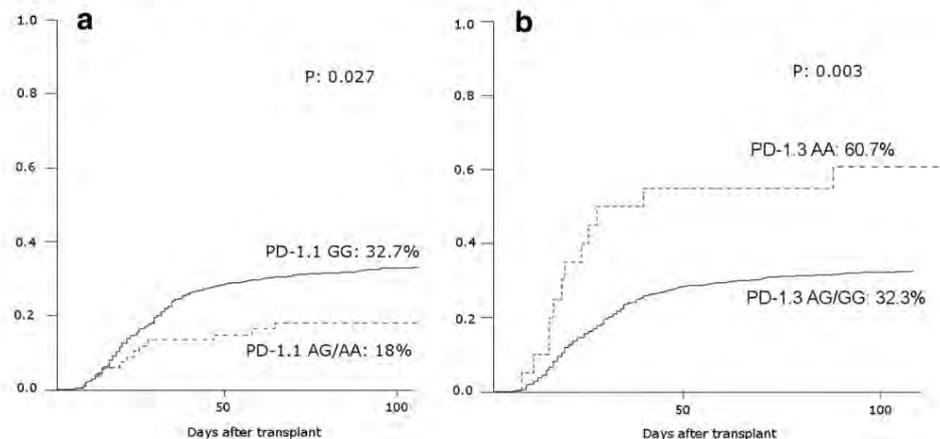
When considering only severe (grades III or IV) acute GvHD, the rs36084323 genotype of the donor was still associated with different incidences of this complication (GG 13.4%, AG 8.6%, AA 0%) but these differences did not reach statistical significance (P 0.169). In contrast, the rs11568821 AA genotype of the donor maintained its significant association with a higher incidence of grades III or IV acute GvHD (GG/AG 13.2% vs. AA 37.9%; P 0.004). Multivariate analysis demonstrates an independent association of the donor's rs11568821 AA genotype with grades III or IV acute GvHD (P < 0.001; HR 4.15; 95%CI 1.3–13.2).

PD-1 haplotypes and acute GvHD incidence

In basis to these results, we performed the analysis according to three genotype combinations: (1) patients homozygous for the G allele at the rs36084323 position and homozygous for the A allele at the rs11568821 position, thus, bearing exclusively the haplotype that contains the “high-risk” alleles (n 17); (2) patients homozygous for the G allele at rs36084323 position and genotyped as rs11568821 AG or GG (n 1271), and (3) any other combination containing at least one A allele at the rs36084323 SNP (n 66).

Figure 2 shows the cumulative incidence of grades II, III, or IV acute GvHD according to these genotype combinations. The first genotype combination (rs36084323 GG/rs11568821 AA) is associated with the highest risk of developing acute GvHD (64%), the second combination (rs36084323 GG/rs11568821 AG or GG) is associated with an intermediate risk (32.6%), and the presence of at least one

Fig. 1 Cumulative incidence of grades II, III, or IV acute graft-versus-host disease (GvHD) according to the rs36084323 (PD-1.1) (a) and the rs11568821 (PD-1.3) genotype of the donor (b)



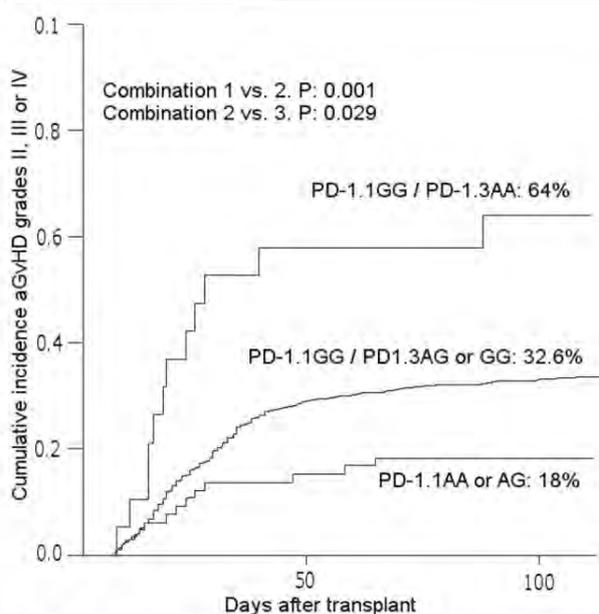


Fig. 2 Cumulative incidence of grades II, III, or IV acute graft-versus-host disease (GvHD) according to the PD-1 genotype of the donor when considering the rs36084323 (PD-1.1) and the rs11568821 (PD-1.3) genotype combination. The analysis is performed according to three genotype combinations: (1) patients homozygous for the G allele at the rs36084323 position and homozygous for the A allele at the rs11568821 SNP, thus, bearing exclusively the haplotype that contains the “high-risk” alleles; (2) patients homozygous for the G allele at rs36084323 position and genotyped as AG or GG at the rs11568821 SNP; and (3) any other combination containing at least one A allele at rs36084323 position

A allele at the rs36084323 SNP shows the lowest acute GvHD incidence (18%). These differences were statistically significant (combination 1 vs. 2: P 0.001; combination 2 vs. 3: P 0.029).

PD-1 genotype and secondary clinical endpoints

Despite the observed increased risk of acute GvHD, we did not detect any influence of the PD-1 genotype of the donor with other clinical variables.

Chronic GvHD incidence was not affected by the rs36084323 (GG 42.6%; AG 36.5%; AA: 57.1%; P : 0.505) or the rs11568821 genotype of the donor (GG 41.5%, AG 47.1%; AA 45.5%; P 0.333).

The rs36084323 AG/GG genotype of the donor showed a trend to reach statistical association with a lower incidence of transplant-related mortality at 2 years in univariate analysis (GG 25.6% vs AG/AA 15.9%; P 0.088), but this difference was not confirmed after multivariate analysis (P 0.248). Overall survival or disease-free survival did not show association with the PD-1 genotype. The incidence of relapse was neither associated with the PD-1 genotype of the donor, even when performing subgroup analysis considering homogeneous diagnosis stage of the disease at transplant. Table 3

summarizes the incidence of the analyzed clinical outcomes according to the *PD-1* genotype.

Interaction between PD-1 and CTLA-4 haplotypes

As the CTLA-4 genotype of the donor has been previously described to have an impact on clinical outcome after HLA-identical sibling donor, we inferred the relative frequencies of the possible CTLA-4/PD-1 haplotype combinations. This analysis was done in 883 donors with available genotype for the SNPs rs231775 A > G (+49) and rs3087243 A > G (CT60) in the CTLA-4 gene and also for the rs36084323 (PD-1.1) and rs11568821 (PD-1.3) SNPs within the *PD-1* gene. Table 4 shows the frequency of genotypes and also the more frequent haplotype combinations found in our study. The combination more frequently observed (42.6%) involves the A allele at both CTLA-4 SNPs coexisting with the G allele at both PD-1 polymorphisms. The rs11568821 A allele did not show a specific association with any CTLA-4 genotype. The observed frequencies did not differ from those previously reported in Caucasian population [12].

The interpretation of the impact of the combined CTLA-4/PD-1 genotype on acute GvHD incidence is difficult to determine because of the low number of cases remaining in each combination group.

Discussion

Many genetic and clinical factors have been related with the appearance of acute GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplants from HLA-identical sibling donors. However, it would be reasonable to argue that the ability of some inhibitor molecules to deliver negative signals that mediate the abrogation of T-cell responses may be so important to determine the strength and duration of the immune reaction against a specific antigen than the presence of one mismatch by itself. Despite several molecules with this inhibitory function, CTLA-4 and PD-1 are the best studied, and this knowledge has allowed the development of monoclonal antibodies directed against CTLA-4 (ipilimumab) or PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) that block the interaction of these molecules with their ligands, enhancing the immune response against several malignancies [13, 14].

Whereas CTLA-4 polymorphisms have been correlated with the clinical outcome after allogeneic hematopoietic transplant from HLA-identical sibling donors, there are no available data concerning the relevance of the PD-1 genotype of the donor and the incidence of acute GvHD. In this work, we have found that the G allele at position rs36084323 in promoter and the A allele at position rs11568821 in intron 4 are associated with a higher incidence of acute GvHD. Moreover, our results do not suggest an association between

Table 3 Summary of clinical outcomes associated with the PD-1 genotype of the donor

Clinical end point	PD-1 SNP	Genotype of the donor	Incidence of clinical end point	<i>P</i> value
Acute GvHD grades II, III, or IV	PD-1.1	GG	32.7%	
		AG	18.8%	^a <i>P</i> 0.058
		AA	12.5%	^b <i>P</i> 0.529
	PD-1.3	GG	32.8%	
		AG	30.2%	^a <i>P</i> 0.404
		AA	60.7%	^b <i>P</i> 0.002
Acute GvHD grades III or IV	PD-1.1	GG	13.4%	
		AG	8.6%	^a <i>P</i> 0.288
		AA	0%	^b <i>P</i> 0.398
	PD-1.3	GG	13.6%	
		AG	11.6%	^a <i>P</i> 0.565
		AA	37.9%	^b <i>P</i> 0.004
Extensive chronic GvHD	PD-1.1	GG	24.7%	
		AG	19.2%	^a <i>P</i> 0.372
		AA	42.9%	^b <i>P</i> 0.173
	PD-1.3	GG	24.2%	
		AG	26.9%	^a <i>P</i> 0.418
		AA	45.5%	^b <i>P</i> 0.185
Transplant-related mortality at 5 years	PD-1.1	GG	25.6%	
		AG	17.9%	^a <i>P</i> 0.187
		AA	0%	^b <i>P</i> 0.255
	PD-1.3	GG	25.2%	
		AG	25.7%	^a <i>P</i> 0.723
		AA	31.4%	^b <i>P</i> 0.682
Relapse incidence at 5 years	PD-1.1	GG	30.1%	
		AG	36.4%	^a <i>P</i> 0.404
		AA	16.7%	^b <i>P</i> 0.304
	PD-1.3	GG	30.2%	
		AG	30.3%	^a <i>P</i> 0.988
		AA	18.9%	^b <i>P</i> 0.364
Overall survival at 5 years	PD-1.1	GG	51.3%	
		AG	49.8%	^a <i>P</i> 0.641
		AA	100%	^b <i>P</i> 0.165
	PD-1.3	GG	52.4%	
		AG	48.1%	^a <i>P</i> 0.151
		AA	47.8%	^b <i>P</i> 0.916

Italicized *P* values indicate statistical significance

^a*P* value comparing GG vs. AG genotypes

^b*P* value comparing AG vs. AA genotypes

the PD-1 and the CTLA-4 genotype that could mask the real relevance of the PD-1 polymorphisms.

This observation is in concordance with previous studies that associate the PD-1 rs11568821 A allele with an increased susceptibility to develop systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, or rheumatoid arthritis [10, 11]. It has been hypothesized that this susceptibility is mediated by the disruption of the Runx1 transcription factor binding to the enhancer,

altering the regulation of the gene expression in the presence of the rs11568821 A allele [8].

The PD-1 rs36084323 A allele seems to be protective for acute GvHD in our study, as it has been described to be for the susceptibility to develop lupus nephritis [11]. This protective effect to autoimmune or alloimmune responses may be related with the previously published description of decreased levels

Table 4 CTLA-4 – PD-1 genotypes association

Genotype frequencies (<i>n</i> 883 donors)				
CTLA-4 + 49	CTLA-4 CT60	PD-1.1	PD-1.3	Frequency
AG	AG	GG	GG	20.2%
AA	AA	GG	GG	19.0%
AA	AG	GG	GG	14.4%
AG	GG	GG	GG	9.3%
GG	GG	GG	GG	6.5%
CTLA-4 and PD-1 haplotypes				
CTLA-4 + 49	CTLA-4 CT60	PD-1.1	PD-1.3	Frequency
A	A	G	G	42.6%
A	G	G	G	26.5%
G	G	G	G	18.0%
A	A	G	A	6.4%
G	A	G	G	2.2%
G	G	G	A	1.5%

of tumor necrosis factor alpha in the presence of this A allele [15].

There are few extended PD-1 haplotypes described to have a reasonable incidence in human studies. The only haplotype that carry the rs11568821 (PD-1.3) A allele corresponds to the combination PD-1.1G/PD-1.3A/PD-1.5C/PD-1.6G/PD-1.7C at the more frequently studied SNPs within the PD-1 gene. This haplotype should be considered to be of high risk to develop GvHD according to our results.

However, when considering the real impact of the PD-1 gene polymorphisms in allogeneic hematopoietic stem cell transplant, it should be reminded that the allele and haplotype distribution of this gene show an important geographical variation: whereas the rs11568821 A allele has an incidence between 10 and 15% in South European Caucasian population, this incidence falls to 5 to 7% in the North of Europe, becoming extremely rare in Asian or African American people. In contrast, the protective rs36084323 A allele is infrequent in Caucasian population but is much more represented in Asian population [16–18]. Based on these data, it seems very unlikely that the PD-1 genotype of the donor determines the transplant clinical outcome when studying Asian or African American patient cohorts, and this should be considered when attempting to validate these results in patients with a non-Caucasian genetic background.

Interestingly, despite the observed correlation between PD-1 genotype of the donor and acute GvHD, we did not find any impact on relapse incidence. This may be attributable to the heterogeneity of diagnosis, stage of the disease, and conditioning regimen, which is inherent to the analysis of very large cohorts. However, when performing sub-analysis of highly selected homogeneous cohorts according to the diagnosis and the stage of the disease before transplant, we also failed to detect any relationship. This fact suggests that the PD-1

molecule should be especially relevant in abrogating the initial process of allorecognition that leads to acute GvHD, but not in the prevention of relapses, which is consistent with the lack of correlation with chronic GvHD.

To date, only one study performed in a small cohort of 72 Iranian patients explored the possible impact of the PD-1 genotype on the development of acute GvHD after allogeneic stem cell transplant, but in this case, only the PD-1.9 SNP—which is not polymorphic in Caucasian population—showed a possible association. However, the small size of the analyzed cohort does not allow considering conclusive these results [19].

This is the first study that correlates the PD-1 genotype of the donor with the occurrence of acute GvHD after allogeneic transplant in a large cohort of Caucasian patients. Despite this finding, we must consider that the low frequency of the relevant PD-1 genotypes may be difficult to obtain solid conclusions; thus, validation of these results in other study cohorts needs to be done. Moreover, it would be interesting to consider the PD-1 genotype of the donor together with previously identified risk factors such as cytokine polymorphisms or minor histocompatibility antigen mismatches to develop genetic models to predict acute GvHD. Our approach suggests that not only the presence of antigenic mismatches between patient and donor would be relevant in an allogeneic context, but must also take in account the polymorphisms in genes of molecules responsible for the second signal that leads to the T-cell activation or inhibition.

Funding information This work has been partially financed by grants PI11/01690 and PI14/01646 from the Instituto de Salud Carlos III, FEDER (Fondo Europeo de desarrollo regional) and by grant MTV3/120210 from Fundació la Marató de TV3.

Compliance with ethical standards

All patients and donors signed the informed consent, and the study met with the recommendations of the Helsinki declaration.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Statement of informed consent Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

References

- Spierings E, Kim YH, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A, Oudshoorn M, Loiseau P, Dolstra H, Markiewicz M, Leffell MS, Pereira N, Kircher B, Turpeinen H, Eliaou JF, Gervais T, Laurin D, Enczmann J, Martinetti M, Thomson J, Oguz F, Santarone S, Partanen J, Siekiera U, Alessandrino EP, Kalayoglu S, Brand R, Goulmy E (2013) Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and

- GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 19:1244–1253
2. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA (2003) Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 349:2201–2210
 3. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Herfarth H, Greinix H, Dickinson AM, Socié G, Wolff D, Fischer G, Jackson G, Rocha V, Steiner B, Eissner G, Marienhagen J, Schoelmerich J, Andreesen R (2006) Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 107:4189–4193
 4. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Rønningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506–511
 5. Pérez-García A, De la Cámara R, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Encuentra M, Nieto JB, de la Rubia J, Urbano-Ispizúa A, Brunet S, Iriando A, González M, Serrano D, Espigado I, Solano C, Ribera JM, Pujal JM, Hoyos M, Gallardo D (2007) CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood* 110:461–467
 6. Piccioli P, Balbi G, Serra M, Morabito A, Lamparelli T, Gobbi M, Laurent S, Dozin B, Bruzzi P, Ferraris AM, Bacigalupo A, Notaro R, Pistillo MP (2010) CTLA-4 +49A>G polymorphism of recipients of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence. *Ann Hematol* 89:613–618
 7. Metaxas Y, Bertz H, Spyridonidis A, Spyropoulou-Vlachou M, Porzelius C, Finke J (2012) CT60 single-nucleotide polymorphism as a surrogate marker for donor lymphocyte infusion outcome after allogeneic cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 47:411–415
 8. Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdóttir H, Gröndal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jönsson A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R, Gyllenstein UB, Harley JB, Alarcón-Segovia D, Steinsson K, Alarcón-Riquelme ME (2002) A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32:666–669
 9. Ferreira-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, Liz M, Martin J, Ordi J, Vicario JL, Gonzalez A (2004) Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:2590–2597
 10. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, Alfredsson L, Klareskog L, Alarcón-Riquelme M (2004) Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 50:1770–1773
 11. Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, Seldin MF, Criswell LA, Alarcón-Riquelme ME (2004) The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD-1.3A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 50:327–328
 12. Juran BD, Atkinson EJ, Schlicht EM, Fridley BL, Petersen GM, Lazaridis KN (2008) Interacting alleles in the coinhibitory immunoreceptor genes cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell-death 1 influence risk and features of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 47:563–570
 13. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocho E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA (2015) Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 372:320–330
 14. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattray D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P (2015) PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 372:311–319
 15. Bennet AM, Alarcón-Riquelme M, Wiman B, de Faire U, Prokunina-Olsson L (2006) Decreased risk for myocardial infarction and lower tumor necrosis factor-alpha levels in carriers of variants of the PDCD1 gene. *Hum Immunol* 67:700–705
 16. Ferreira-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, Migliaresi S, Sebastiani GD, Endreffy E, Mavromati M, Kappou-Rigatou I, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A (2007) Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun* 8:138–146
 17. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K (2005) Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 50:264–266
 18. Thorburn CM, Prokunina-Olsson L, Sterba KA, Lum RF, Seldin MF, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA (2007) Association of PDCD1 genetic variation with risk and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort. *Genes Immun* 8:279–287
 19. Iravani-Saadi M, Karimi MH, Yaghobi R, Geramizadeh B, Ramzi M, Niknam A, Pourfathollah A (2014) Polymorphism of costimulatory molecules (CTLA4, ICOS, PD.1 and CD28) and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Iranian patients. *Immunol Investig* 43:391–404

Discusión

La enfermedad del injerto contra el receptor es la principal complicación del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. La ocurrencia de la EICR está determinada por la activación del sistema inmune del injerto debido a diferencias antigénicas entre donante y receptor que provocan una reacción inflamatoria de intensidad variable provocada por los linfocitos T del injerto y que puede llegar a comprometer la vida del paciente. Tiene dos formas de presentación, aguda y crónica, con características clínicas, inmunológicas e histológicas particulares. Se caracteriza por una reacción inmune selectiva que afecta preferentemente a la piel, el tracto gastrointestinal y el hígado, y ocasionalmente a las glándulas exocrinas y los bronquios.

El grado de activación del sistema inmune del donante está determinado principalmente por el grado de histocompatibilidad entre donante y receptor, que vendrá determinado principalmente por las altamente polimórficas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o HLA) tipo I y II, las cuales presentan péptidos (antígenos) a las células T del donante en la superficie de las células presentadoras de antígenos, estos péptidos son obtenidos a partir de proteínas degradadas.

En esta tesis hemos explorado dos posibles mecanismos que colaborarían a la aparición de EICR en el modelo del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos a partir de donante familiar HLA idéntico: por una parte hemos explorado el papel de la disparidad en antígenos menores de histocompatibilidad, focalizando el estudio en un antígeno menor poco estudiado como es UGT2B17 y por otra hemos querido analizar el impacto del genotipo de PD-1, gen que codifica moléculas de coinhibición de la respuesta inmune y que por tanto podría modular la capacidad aloreactiva frente a las disparidades en AMiH.

De esta manera, según los objetivos planteados se realizaron los trabajos anteriormente descritos que componen la tesis. A continuación, analizaremos los resultados de acuerdo con la bibliografía publicada si la hay, adicionalmente intentaremos extraer conclusiones que aporten nuevos conocimientos con una potencial aplicabilidad a la práctica clínica en un futuro.

Artículos 1. Impacto de la disparidad en el antígeno menor de Histocompatibilidad UGT2B17 en el trasplante alogénico a partir de donante emparentado HLA idéntico.

Los antígenos menores de histocompatibilidad (AMiH), son pequeños péptidos presentados a los linfocitos T del sistema inmune, por células presentadoras de antígenos a través de moléculas HLA. Estos AMiH proceden del procesamiento de proteínas endógenas, son péptidos polimórficos y suelen tener dos alelos, uno de los cuales resulta inmunogénico cuando es presentado a los linfocitos T del donante, de tal manera que, cuando el receptor es portador del alelo inmunogénico y el donante no lo es, se desencadena una activación de las células T del donante (injerto), esta activación media los fenómenos de EICR y EICT (McCarroll 2009) (Goulmy 1997) (Warren 1998).

La mayoría de estos AMiH son resultado de polimorfismos dialélicos de un solo nucleótido (SNPs), la inmunogenicidad de estos SNPs se puede dar por dos vías; diferencias en la secuencia de aminoácidos o variabilidad en los niveles de expresión proteica. En el caso de UGT2B17, dicho gen puede tener 0, 1 ó 2 copias en función de la presencia o no de un polimorfismo inserción/delección (ins/del) que condiciona la delección de 129 kB, por tanto, la inmunogenicidad o capacidad de UGT2B17 de actuar como AMiH, se debe a una expresión diferencial entre donante y receptor, es decir, si el receptor presenta al menos una copia o alelo de UGT2B17 (UGT2B17+/- o UGT2B17+/+) cuando el donante presenta delección de UGT2B17 en homocigosis (UGT2B17-/-) (Beaulieu 1997) (Wilson 2004). Adicionalmente, UGT2B17 es una proteína larga (520 aminoácidos), por tanto, se considera que tiene múltiples epitopes antigénicos, por lo cual su potencial inmunogénico en el escenario del alo-TPH es previsible si hay disparidad de UGT2B17 entre donante y receptor. En este sentido en 2005 Terakura et al, describió, el impacto clínico de una cohorte de 435 sometidos a alo-TPH de donante no emparentado HLA idéntico, en el cual no se detectó asociación entre la presencia de la disparidad de UGT2B17 y la incidencia EICR aguda o crónica o recaída, sin embargo, se detectó que el uso donante UGT2B17-/- fue un factor de riesgo independiente relacionado con elevada mortalidad relacionada con el trasplante y disminución de la supervivencia global (Terakura 2007).

En contraste, McCarroll et al, analizó tres cohortes de parejas de donante-receptor con alo-TPH de DE HLA idéntico, en el estudio encontraron elevado riesgo de EICR aguda en presencia de la disparidad de UGT2B17 como SNP de inserción/delección, sin tener en cuenta la restricción HLA (McCarroll 2009)(Spierings 2006); conociendo la incidencia esperada de la disparidad de UGT2B17 es del 5-6%, se estima que en cada cohorte presentó entre 20-35 parejas con la presencia de la disparidad. Análisis de otras cohortes más pequeñas de parejas de donante receptor detectaron una asociación similar (Jervis 2013) (Martínez-Bravo 2014).

De manera más reciente, Spierings et al, llevaron a cabo un análisis multicéntrico donde se exploró el impacto clínico de varios AMiH en la EICR en una cohorte de 639 pacientes sometidos a alo-TPH de DE HLA idéntico y 210 de un donante no emparentado (DNE) (Spierings 2013), no se logró realizar el estudio del impacto de la disparidad de UGT2B17, debido a la baja incidencia de la disparidad que se presentó en el estudio, porque únicamente se analizaron las disparidades restringidas por HLA: UGT2B17/A29 y UGT2B17/B44, no abordaron en impacto de la disparidad independiente de la restricción por HLA. En nuestro estudio de la disparidad UGT2B17, definida como la presencia de la delección homocigota de UGT2B17 en el donante, y la presencia de al menos un aleo en el paciente, inicialmente no se encontró asociación significativa con ninguna de las variables clínicas analizadas, de la misma manera, no encontramos diferencias considerando donantes UGT2B17+ a diferencia de Terakura et al. (Terakura 2007) Sin embargo, encontramos se detectó que la disparidad de UGT2B17 era un factor de riesgo independiente para EICR aguda grave, solo cuando se usaba un donante masculino. Esta observación puede estar relacionada con varios factores; el uso de un donante masculino excluye la presencia de las disparidades H-Y condicionados por la combinación receptor masculino-donante femenina, ya que se considera que la presencia de múltiples péptidos inmunogénicos derivados del cromosoma Y pueden ser inmunodominantes, por tanto, la relevancia clínica de los AMiH podría verse afectada por la presencia de las disparidades H-Y; en este contexto, queda por explorar la relevancia clínica de otras disparidades de alelos nulos.

Gallagher et al. (Gallagher 2010) demostraron que existen diferencias relacionadas con el género en la expresión y actividad de UGT2B, los hombres muestran un mayor nivel de

expresión de UGT2B17 y un mayor nivel de actividad de glucuronidación que las mujeres. Además, el estado de disparidad de UGT2B17 supone por sí mismo la presencia de al menos un alelo de UGT2B17 en el receptor, dado que UGT2B17 participa en la actividad de glucuronidación en los microsomas hepáticos y se ha descrito que el metabolismo de la ciclosporina A puede estar parcialmente mediado por la glucuronidación de miembros de la familia UGT2B, una hipótesis a considerar es que el metabolismo de la ciclosporina A puede ser más rápido en los receptores que expresan UGT2B17, aumentando el riesgo de EICR en presencia de disparidades inmunogénicas, desafortunadamente, el análisis realizado mediante gel de agarosa de los productos de la PCR no pueden distinguir UGT2B17 heterocigoto +/- de homocigoto ++ y esta limitación técnica no nos permite determinar si la carga alélica es relevante en este contexto. Adicionalmente debido a la baja frecuencia de la disparidad de UGT2B17, solo los estudios que analizan grandes cohortes de alo-TPH homogéneos de donantes hermanos HLA idénticos pueden ser útiles para aclarar su relevancia clínica. Nuestros resultados parecen contradecir los informes anteriores y la disparidad de UGT2B17 tiene solo un efecto marginal en EICRa, cuando se usa un donante masculino; sin embargo, estos resultados deben considerarse preliminares y deben ser confirmados por otros estudios.

Artículo 2. El genotipo de PD-1 del donante, se asocia a la enfermedad injerto contra receptor en el trasplante alogénico a partir de donante emparentado HLA idéntico.

Diversos factores genéticos y clínicos se han relacionado con la aparición de EICRa después del alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico, en este sentido se puede hipotetizar, que la capacidad de algunas moléculas inhibitoras para enviar señales negativas que median en la supresión de la respuesta de las células T puede determinar la fuerza y la duración de la reacción inmunitaria contra un antígeno específico. Existen varias moléculas con esta función inhibitoria, pero CTLA-4 y PD-1 son las mejor estudiadas, y este conocimiento ha permitido desarrollar anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTLA-4 (ipilimumab) o PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) que bloquean la interacción de estas moléculas con sus

ligandos, mejorando la respuesta inmune contra varios tumores malignos (Robert 2015) (Ansell 2017).

Los polimorfismos de CTLA-4 se han correlacionado con el resultado clínico después del trasplante hematopoyético alogénico de donantes hermanos HLA idénticos (Piccioli 2010) (Metaxas 2012) (Juran 2008), pero, no hay datos disponibles sobre la relevancia del genotipo PD-1 del donante y la incidencia de EICR aguda. En este trabajo, hemos encontrado que el alelo G en la posición rs36084323 en el promotor y el alelo A en la posición rs11568821 en el intrón 4 están asociados con una mayor incidencia de EICR aguda, adicionalmente, nuestros resultados no sugieren una asociación entre el genotipo PD-1 y CTLA-4 que pudiera enmascarar la relevancia real de los polimorfismos de PD-1, esta observación concuerda con estudios previos que asocian el alelo PD-1 rs11568821 A, con una mayor susceptibilidad a desarrollar lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica o artritis reumatoide (L. P.-R. Prokunina 2004) (L. G.-R. Prokunina 2004). Se ha planteado la hipótesis de que esta susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes está mediada por la interferencia de la unión del factor de transcripción Runx1, alterando entonces la regulación de la expresión génica en presencia del alelo rs11568821 A (Prokunina 2002). El alelo PD-1 rs36084323 A parece ser protector para la EICR aguda en nuestro estudio, ya que se ha descrito que lo es para la susceptibilidad a desarrollar nefritis lúpica (Prokunina 2004), este efecto protector de las respuestas autoinmunes o aloinmunes puede estar relacionado con la descripción previamente publicada de niveles reducidos de factor de necrosis tumoral alfa en presencia de este alelo A (Bennet 2006).

Se han descrito pocos haplotipos extendidos de PD-1 que tengan una incidencia razonable en estudios en humanos, el único haplotipo que lleva el alelo rs11568821 (PD-1.3) A corresponde a la combinación PD-1.1G/PD-1.3A/PD-1.5C/PD-1.6G/PD-1.7C en los SNP estudiados con mayor frecuencia dentro del gen PD-1, este haplotipo debe considerarse de alto riesgo para desarrollar EICR según nuestros resultados. Sin embargo, al considerar el impacto real de los polimorfismos del gen PD-1 en el alo-TPH, se debe recordar que la distribución de alelos y haplotipos de este gen muestra una importante variación geográfica: mientras que el alelo rs11568821 A tiene una incidencia entre 10 y el 15% en la población caucásica del sur de Europa, esta incidencia desciende al 5-7% en el norte de Europa, siendo extremadamente

rara en personas asiáticas o afroamericanas (Mori 2005). Por el contrario, el alelo protector rs36084323 A es poco frecuente en la población caucásica, pero está mucho más representado en la población asiática (Ferreiros-Vidal 2007) (Thorburn 2007). Con base estos datos, parece poco probable que el genotipo PD-1 del donante determine el resultado clínico del trasplante cuando se estudian cohortes de pacientes asiáticos o afroamericanos, y esto debe tenerse en cuenta al intentar validar estos resultados en pacientes con antecedentes genéticos no caucásicos, a pesar de la correlación observada entre el genotipo PD1 del donante y la EICR aguda, no se detectó impacto en la incidencia de recaídas, esto puede atribuirse a la heterogeneidad del diagnóstico, el estadio de la enfermedad y el régimen de acondicionamiento, que es inherente al análisis de cohortes muy grandes.

Sin embargo, al realizar un subanálisis de cohortes homogéneas muy seleccionadas según el diagnóstico y el estadio de la enfermedad previos al trasplante, tampoco fue posible detectar ninguna asociación, este hecho sugiere que la molécula PD-1 debería ser especialmente relevante para suprimir el proceso inicial de aloreconocimiento que conduce a la EICR aguda, pero no en la prevención de recaídas, lo que es consistente con la falta de correlación con la EICR crónica. Hasta la fecha, solo un estudio realizado en una pequeña cohorte de 72 pacientes iraníes exploró el posible impacto del genotipo PD-1 en el desarrollo de la EICR aguda en el alo-TPH, pero en este caso, solo el PD-1.9 SNP, que no es polimórfico en la población caucásica, mostró una posible asociación. Sin embargo, el pequeño tamaño de la cohorte analizada no permite considerar concluyentes estos resultados (Iravani-Saadi 2014).

Este es el primer estudio que correlaciona el genotipo PD-1 del donante con la aparición de EICR aguda en el escenario del alo-TPH en una gran cohorte de pacientes caucásicos, a pesar de los hallazgos, debemos considerar que la baja frecuencia de los genotipos PD-1 relevantes puede dificultar la obtención de conclusiones sólidas; por lo tanto, es necesario realizar la validación de estos resultados en otras cohortes de estudio. Adicionalmente, se debería considerar el genotipo PD-1 del donante junto con factores de riesgo previamente identificados, como polimorfismos de citoquinas o las disparidades en antígenos menores de histocompatibilidad, para desarrollar modelos genéticos capaces de predecir la ocurrencia de EICR aguda. Nuestro enfoque sugiere que no solo la presencia de disparidades antigénicas entre el paciente y el donante serían relevante en un contexto alogénico, sino que también

se debe tener en cuenta los polimorfismos en los genes de las moléculas responsables de la segunda señal o coestimuladoras de la activación o inhibición de las células T.

Conclusiones

1. Impacto de la disparidad entre donante y receptor del antígeno menor UGT2B17 en la evolución clínica de los pacientes post-trasplante alogénico de donante emparentado HLA idéntico.

- La disparidad de UGT2B17 entre donante y receptor no parece tener impacto en la evolución clínica de los pacientes post-alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico. No se demostró asociación con la incidencia de EICR aguda o crónica en la cohorte estudiada.
- Sin embargo, el análisis de subgrupos mostró que la disparidad de UGT2B17 es un factor de riesgo independiente para EICR aguda en pacientes trasplantados a partir de un donante varón.
- Es posible que la elevada expresión de UGT2B17 en hombres respecto a mujeres pueda condicionar una diferencia significativa en el metabolismo de los medicamentos, lo cual podría generar un impacto en la evolución del alo-TPH.

2. Impacto de los polimorfismos (SNPs) del gen PD-1 del donante, en la evolución clínica de los pacientes que reciben un trasplante alogénico de donante emparentado HLA idéntico.

- En la cohorte de donantes analizada las frecuencias alélicas y genotípicas mostraron una distribución concordante con las previamente descritas en población caucásica. El alelo G fue el predominante en los dos polimorfismos de PD-1 estudiados. El haplotipo G-G (rs36084323 G/rs11568821 G) fue el predominante.
- El genotipo de PD-1 del donante es un factor de riesgo independiente para la incidencia de EICR aguda, estableciendo genotipos de riesgo alto, intermedio y bajo.
- No se pudo establecer una correlación significativa entre el genotipo de PD-1 del donante con la EICR crónica, así como tampoco con supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad o mortalidad relacionada con el procedimiento en el modelo de alo-TPH a partir de donante familiar HLA-idéntico.

Bibliografía

- Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. 2007. "Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions." *Cancer Science* 98:1139-46. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00521.x.
- Akatsuka Y, Warren EH, Gooley TA, Brickner AG, Lin MT, Hansen JA, Martin PJ, Madtes DK, Engelhard VH, Takahashi T, Riddell RS. 2003. "Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling." *British Journal of Hematology* DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04676.x.
- Aly Riham Mohamed. 2020. "Current state of stem cell-based therapies: an overview." *Stem Cell Investigation* May 15;7:8. DOI: 10.21037/sci-2020-001.
- Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattrly D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P. 2017. "PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma." *New England Journal of Medicine* 129:3071-3073. DOI: 10.1182/blood-2017-01-764209.
- Aróstegui JI, Gallardo D, Rodríguez-Luaces M, Querol S, Madrigal JA, García-López J, Grañena A. 2000. "Genomic typing of minor histocompatibility antigen HA-1 by reference strand mediated conformation analysis (RSCA)." *Tissue Antigens* 56:69-76. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2000.560109.x.
- Balassa K, Danby R, Rocha V. 2019. "Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications." *British Journal of Hospital Medicine (London)* 80:33-39. DOI: 10.12968/hmed.2019.80.1.33.
- Barker CF, Markmann JF. 2013. "Historical overview of transplantation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(4):a014977. DOI: 10.1101/cshperspect.a014977.
- Barnes DW, and JF. Loutit. 1953. "Protective effects of implantation of spleen tissue." *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 46:251-2. PMID: 13055877.
- Beaulieu M, Levesque E, Tchernof A, Beatty BG, Belanger A, Hum DW. 1997. "Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme." *DNA and Cell Biology* 16:1143-54. DOI: 10.1089/dna.1997.16.1143.
- Bennet AM, Alarcón-Riquelme M, Wiman B, de Faire U, Prokunina-Olsson L. 2006. "Decreased risk for myocardial infarction and lower tumor necrosis factor-alpha levels in carriers of variants of the PDCD1 gene." *Human Immunology* 67:700-5. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.05.005.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. 2010. "Actively acquired tolerance' of foreign cells. 1953." *The Journal of Immunology* 184:5-8. DOI: 10.4049/jimmunol.0990109.

- Bleakley M, Riddell SR. 2004. "Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect." *Nature Cancer Review* 4:371-80. DOI: 10.1038/nrc1365.
- Brickner AG. 2006. "Mechanisms of minor histocompatibility antigen immunogenicity: the role of infinitesimal versus structurally profound polymorphisms." *Immunologic Research* 36:33-41. DOI: 10.1385/IR:36:1:33.
- Burt RK, Slavin S, Burns WH, Marmont AM. 2002. "Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure?" *International Journal of Hematology* 76 Suppl 1:226-47. DOI: 10.1007/BF03165251.
- Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N. 2019. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook*. Cham, Switzerland: Springer open. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5>.
- Carreras E, Rovira M, Zeberio I, Valcárcel D. 2022. *Manual de trasplante hematopoyético*. Barcelona: Fundación Josep Carreras.
- Chao NJ. 2004. "Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease." *Biology of Blood Marrow Transplantation* 10:215-23. DOI: 10.1016/j.bbmt.2003.10.003.
- Chaplin DD. 2010. "Overview of the immune response." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2 Suppl 2):S3-23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Charitos IA, Ballini A, Cantore S, Boccellino M, Di Domenico M, Borsani E, Nocini R, Di Cosola M, Santacroce L, Bottalico L. 2021. "Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues." *Stem Cells International* Apr 29. DOI: 10.1155/2021/9978837.
- Chu DT, Nguyen TT, Tien NLB, Tran DK, Jeong JH, Anh PG, Thanh VV, Truong DT, Dinh TC. 2020. "Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications." *Cells* 9:563. DOI: 10.3390/cells9030563. .
- Copelan Edward A. 2006. "Hematopoietic Stem-Cell Transplantation." *New England Journal Medicine* 354:1813-26. DOI: 10.1056/NEJMra052638. .
- Cunningham KT, Mills KHG. 2021. "Trained Innate Immunity in Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplantation." *Transplantation* 105:1666-1676. DOI: 10.1097/TP.0000000000003673.
- Davies SM, Shu XO, Blazar BR, Filipovich AH, Kersey JH, Krivit W, McCullough J, Miller WJ, Ramsay NK, Segall M, et al. 1995. "Unrelated donor bone marrow transplantation: Influence of HLA A and B incompatibility on outcome." *Blood* 86:1636-42. PMID: 7632974.
- Davis Ian D. 2000. "An overview of cancer immunotherapy." *Immunology and Cell Biology* 78:179-95. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00906.x.

- Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. 2009. "Graft-versus-host disease." *The Lancet* 373:1550-61. DOI:10.1016/S0140-6736(09)60237-3.
- Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, Migliaresi S, Sebastiani GD, Endreffy E, Mavromati M, Kappou-Rigatou I, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. 2007. "Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe." *Genes & Immunity* 8:138-46. DOI: 10.1038/sj.gene.6364370.
- Flajnik MF, Kasahara M. 2010. "Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures." *Nature Reviews Genetics* 11:47-59.. DOI: 10.1038/nrg2703.
- Gallagher CJ, Balliet RM, Sun D, Chen G, Lazarus P. 2010. "Sex Differences in UDP-Glucuronosyltransferase 2B17 Expression and Activity." *Drug Metabolism & Disposition* 38:2204-9.. DOI: 10.1124/dmd.110.035345.
- Gallardo D, Aróstegui JI, Balas A, Torres A, Caballero D, Carreras E, Brunet S, Jiménez A, Mataix R, Serrano D, Vallejo C, Sanz G, Solano C, Rodríguez-Luaces M, Marín J, Baro J, Sanz C, Román J, González M, Martorell J, Sierra J, Martín C, de la Cámara R. 2001. "Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 associated with an increased risk of acute GvHD but not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival/overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling transplantation." *British Journal of Haematol.* 114:931-6. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.03013.x.
- Gallardo D, S Brunet, A Torres, M Alonso, C Vallejo, A Jiménez, M González, et al. 2004. "HLA-DPB1 mismatch in HLA-A-B-DRB1 identical sibling donor stem cell transplantation and acute graft-versus-host disease." *Transplantation* 77:1107-10. DOI: 10.1097/01.tp.0000122225.10296.10.
- Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr KA, Appelbaum FR, Storb R, McDonald GB. 2010. "Reduced mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation." *New England Journal of Medicine* 363:2091-101. DOI:10.1056/NEJMoa1004383. .
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. 1996. "Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." *New England Journal of Medicine* 334:281-5. DOI: 10.1056/NEJM199602013340501.
- Goulmy E. 1997. "Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy." *Immunology Reviews* 157:125-40. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1997.tb00978.x.

- Hardy RR, Roederer M, Herzenberg L. 2013. "(1931–2013): the life of FACS." *Immunity*. 39:989-91. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.008.
- Heinemann FM, Ferencik S, Ottinger HD, Beelen DW, Grosse-Wilde H. 2004. "Impact of disparity of minor histocompatibility antigens HA-1, CD31 y CD49b in haematopoietic stem cell transplantation of patients with chronic myeloid leukemia with sibling and unrelated donors." *Transplantation* 77:1103-6. DOI: 10.1097/01.tp.0000120175.25116.cb.
- Hobo W, Broen K, van der Velden WJ, Greupink-Draaisma A, Adisty N, Wouters Y, Kester M, Fredrix H, Jansen JH, van der Reijden B, Falkenburg JH, de Witte T, Preijers F, Schattenberg T, Feuth T, Blijlevens NM, Schaap N, Dolstra H. 2013. "Association of disparities in Known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host-disease after allogeneic stem cell transplantation." *Biology and Bone Marrow Transplantation* 19:274-82. DOI: 10.1016/j.bbmt.2012.09.008.
- Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Herfarth H, Greinix H, Dickinson AM, Socié G, Wolff D, Fischer G, Jackson G, Rocha V, Steiner B, Eissner G, Marienhagen J, Schoelmerich, AndreesenScho R. 2006. "Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination." *Blood* 107:4189-93. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3741.
- Hum DW, Bélanger A, Lévesque E, Barbier O, Beaulieu M, Albert C, Vallée M, Guillemette C, Tchernof A, Turgeon D, Dubois S. 1999. "Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 69:413-23. DOI: 10.1016/s0960-0760(99)00061-8. doi:DOI: 10.1016/s0960-0760(99)00061-8.
- Inogés S, Rodríguez M, López-Díaz A, Zabalegui N, Melero I, Sanchez Ibarrola A, Rocha E, Bendati M. 2004. "Inmunoterapia activa en el tratamiento de neoplasias hematológicas." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 27:45-62. DOI: 10.4321/s1137-66272004000100006.
- Iravani-Saadi M, Karimi MH, Yaghobi R, Geramizadeh B, Ramzi M, Niknam A, Pourfathollah A. 2014. "Polymorphism of costimulatory molecules (CTLA4, ICOS, PD.1 and CD28) and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Iranian patients." *Immunological Investigations* 43:391-404. DOI: 10.3109/08820139.2013.879594.
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2010. "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." *Science* 327:291-5. DOI: 10.1126/science.1183021.
- Jakobsson J, Ekström L, Inotsume N, Garle M, Lorentzon M, Ohlsson C, Roh HK, Carlström K, Rane A. 2006. "Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91:687-93. DOI: 10.1210/jc.2005-1643. doi:DOI: 10.1210/jc.2005-1643.

- Jervis S, Collins P, Tate D, Foster L, Bowman V, Adhern C, Bloor A, Yin J, Wynn R, Poulton K. 2013. "Increased severity of acute graft versus host disease as a result of differential expression following a homozygous gene deletion." *International Journal of Immunogenetics* 40:116-9 DOI: 10.1111/j.1744-313X.2012.01138.x.
- Ju X, Wang J, Xu B, Cao Y, Lü S. 2003. "Roles of interleukin-10 in acute graft-versus-host disease and graft rejection." *Chinese Medical Journal*. 116:534-7. PMID: 12875717.
- Juan Manel. 2012. "Inmunología y los Premios Nobel 2011." *Inmunologia* 31:1-3. DOI: 10.1016/j.inmuno.2012.01.001.
- Juran BD, Atkinson EJ, Schlicht EM, Fridley BL, Petersen GM, Lazaridis KN. 2008. "Interacting alleles of the coinhibitory immunoreceptor genes cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell-death 1 influence risk and features of primary biliary cirrhosis." *Hepatology* 47:563-70. DOI: 10.1002/hep.22048. .
- Kohler G, Milstein C. 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256:495-7. DOI: 10.1038/256495a0.
- Lessard J, Sauvageau G. 2003. "Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells." *Nature* DOI: 10.1038/nature01572. PMID: 12714970.
- Lin MT, Gooley T, Hansen JA, Tseng LH, Martin EG, Singleton K, Smith AG, Mickelson E, Petersdorf EW, Martin PJ. 2001. "Absence of statistically significant correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen-HA-1 and outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation." *Blood* 98:3172-3. DOI: 10.1182/blood.v98.10.3172.
- Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA. 2003. "Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation." *New England Journal of Medicine* 349:2201-10. DOI: 10.1056/NEJMoa022060.
- Liu J, Cao X. 2016. "Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses." *Cellular & Molecular Immunology* 3:711-721. DOI: 10.1038/cmi.2016.58.
- MacDonald KP, Rowe V, Filippich C, Thomas R, Clouston A, Welply JK, Hart DNJ, Ferrara JLM, Hill GR. 2003. "Donor pretreatment with progenipoietin-1 is superior to granulocyte colony-stimulating factor in preventing graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation." *Blood* 101:2033-42. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1529.
- Mackay I, Rosen FS. 2000. "The HLA System." *New England Journal of Medicine* 343:702-9. DOI: 10.1056/NEJM200009073431006.
- Martínez-Bravo MJ, Calderón-Cabrera C, Márquez-Malaver FJ, Rodríguez N, Guijarro M, Espigado I, Núñez-Roldán A, Pérez-Simón JA, Aguilera I. 2014. "Mismatch on glutathione S-transferase T1 increases the risk of graft-versus-host disease and mortality after allogeneic stem cell transplantation." *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 20:1356-62. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.05.008.

- McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, Chilewski SD, Antin JH, Lee SJ, Ruutu T, Storer B, Warren EH, Zhang B, Ping ZL, Ginsburg D, Soiffer RJ, Partanen J. 2009. "Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease." *Nature Genetics* 41:1341-4. DOI: 10.1038/ng.490.
- Medawar PB. 1944. "The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council." *Journal of Anatomy* 78(Pt 5):176-99. PMID: 17104960 .
- Metaxas Y, Bertz H, Spyridonidis A, Spyropoulou-Vlachou M, Porzelius C, Finke J. 2012. "CT60 single-nucleotide polymorphism as a surrogate marker for donor lymphocyte infusion outcome after allogeneic cell transplantation for acute leukemia." *Bone Marrow Transplantation* 47:411-5. DOI: 10.1038/bmt.2011.101.
- Mitchinson NA. 1953. "Passive transfer of transplantation immunity." *Nature* 171:267-8. DOI: 10.1038/171267b0.
- Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. 2005. "Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. ." *Journal of Human Genetics* 50:264-266. DOI: 10.1007/s10038-005-0246-8.
- Munshi PN, SD Rowley, and R Korndolj. 2020. *Inmunología Clínica: principios y práctica*. Barcelona, España: ELSEVIER.
- Murata M, Warren EH, Riddell SR. 2003. "A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion." *Journal of Experimental Medicine*. 197:1279-89. DOI: 10.1084/jem.20030044. doi:DOI: 10.1084/jem.20030044.
- Nagler A, Brautbar C, Slavin S, Bishara A. 1996. "Bone marrow transplantation using unrelated and family related donors: the impact of HLA-C disparity." *Bone Marrow Transplantation* 18:891-7. PMID: 8932842.
- Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. 2011. "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." *Nature Reviews Immunology* 11:823-36.. DOI: 10.1038/nri3084.
- Niederhuber J, Armitage J, Kastan M, Doroshow J, Tepper J. 2020. *Abeloff. Oncologia Clinica*. Chapen Hill, North Carolina: ELSEVIER.
- Niederwieser D, Baldomero H, Atsuta Y, Aljurf M, Seber A, Greinix HT, Koh M, Worel N, Galeano S, Jaimovich G, Martinez Rolon J, Kodera Y. 2019. "One and Half Million Hematopoietic Stem Cell Transplants (HSCT). Dissemination, Trends and Potential to Improve Activity By Telemedicine from the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT)." *Blood* 134 (Supplement_1): 2035. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-125232>.

- Nishida T, Akatsuka Y, Morishima Y, Hamajima N, Tsujimura K, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. 2004. "Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant." *British Journal of Haematology* 124:629-35. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.04823.x.
- Oostvogels O, Lokhorst HM, Mutis T. 2016. "Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives." *Bone Marrow Transplantation* 51:163-71. DOI: 10.1038/bmt.2015.256.
- Pérez-García A, and Torres A, González M, Jiménez A, Gallardo D, De la Cámara R. 2005. "Minor histocompatibility antigen HA-8 mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor allogeneic stem cell transplantation." *Hematologica* Dec;90(12):1723-4. PMID: 16330460.
- Pérez-García A, De la Cámara R, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Encuentra M, Nieto JB, de la Rubia J, Urbano-Ispizúa A, Brunet S, Iriando A, González M, Serrano D, Espigado I, Solano C, Ribera JM, Pujal JM, Hoyos M, Gallardo D. 2007. "CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors." *Blood* 110:461-7. DOI: 10.1182/blood-2007-01-069781.
- Petersdorf EW, GM Longton, C Anasetti, EM Mickelson, AG, Martin, PJ Smith, and JA. Hansen. 1996. "Definition of HLA-DQ as a transplantation antigen." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:15358-63. DOI: 10.1073/pnas.93.26.15358.
- Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, Hansen JA. 1995. "The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation." *Blood* 86:1606-13. PMID: 7632970.
- Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Mickelson EM, McKinney SK, Smith AG, Martin PJ, Hansen JA. 1997. "Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors." *Blood* 89:1818-23. PMID: 9057668.
- Petersdorf EW, Smith AG, Mickelson EM, Longton GM, Anasetti C, Choo SY, Martin PJ, Hansen JA. 1993. "The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation." *Blood* 81:1923-32. PMID: 8461476.
- Peterson LB, Bell CJM, Howlett SK, Pekalski ML, Brady K, Hinton H, Sauter D, Todd JA, Umana P, Ast O, Waldhauer I, Freimoser-Grundschober A, Moessner E, Klein C, Hosse RJ, Wicker LS. 2018. "Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease." *Journal of Autoimmunity* 95:1-14. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.10.017.

- Piccioli P, Balbi G, Serra M, Morabito A, Lamparelli T, Gobbi M, Laurent S, Dozin B, Bruzzi P, Ferraris AM, Bacigalupo A, Notaro R, Pistillo MP. 2010. "CTLA-4 +49A>G polymorphism of recipients of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence." *Annals of Hematology* 89:613-8. DOI: 10.1007/s00277-009-0885-5.
- Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdóttir H, Gröndal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jönssen A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R, et al. 2002. "A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans." *Nature Genetics* 32:666-9. DOI: 10.1038/ng1020.
- Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, Seldin MF, Criswell LA, Alarcón-Riquelme ME. 2004. "The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis." *Arthritis & Rheumatology* 50:327-8. DOI: 10.1002/art.11442.
- Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, Alfredsson L, Klareskog L, Alarcón-Riquelme M. 2004. "Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope." *Arthritis & Rheumatology* 50:1770-3. DOI: 10.1002/art.20280.
- Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocho E, et al. 2015. "Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation." *New England Journal of Medicine* 372:320-30. DOI: 10.1056/NEJMoa1412082.
- Saijo N. 1997. "Chemotherapy: the more the better? Overview." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 40 Suppl:S100-6. DOI: 10.1007/s002800051070.
- Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F. 1998. "Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program." *New England Journal of Medicine* 339:1177-85. DOI: 10.1056/NEJM199810223391701.
- Shape AH. 2009. "Mechanisms of costimulation." *Immunological Reviews*. 229:5-11. DOI:10.1111/j.1600-065X.2009.00784.x.
- Sherman LA, Chattopadhyay S. 1993. "The molecular basis of allorecognition." *Annual Review of Immunology* 11:385-402. DOI: 10.1146/annurev.iy.11.040193.002125.
- Sieff Colin A. 2022. *Uptodate*. Marzo 9. www.uptodate.com.
- Skulimowska I, Sosniak J, Gonka M, Szade A, Jozkowicz A, Szade K. 2021. "The biology of hematopoietic stem cells and its clinical implications." *The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) journal* Sep 8. DOI: 10.1111/febs.16192.

- Snell GD. 2014. "Pillars article: Methods for the study of histocompatibility genes. J. Genet. 1948. 49: 87-108." *The Journal of Immunology* 192:5-26. PMID: 24363431.
- Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grundschober C, Gratwohl A, Chapuis B, Helg C, Löliker CC, Siren MK, Roosnek E, Jeannet M. 1996. "High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation." *Blood* 87:4455-62. PMID: 8639808.
- Spierings E, Kim YH, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A, Oudshoorn M, Loiseau P, Dolstra H, Markiewicz M, Leffell MS, Pereira N, Kircher B, Turpeinen H, Eliaou JF, Gervais T, Laurin D, Enczmann J, Martinetti M, Thomson J, Oguz F, Santarone S, J Partanen J, Siekiera U, Alessandrino EP, Kalayoglu S, Brand R and Goulmy R. 2013. "Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation." *Biology of Blood Marrow Transplantation* 19:1244-53. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.06.001.
- Spierings E, Drabbels J, Hendriks M, Pool J, Spruyt-Gerritse M, Claas F, Goulmy E,. 2006. "uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications." *PLoS One* 20;1(1):e42. DOI: 10.1371/journal.pone.0000042. doi:DOI: 10.1371/journal.pone.0000042.
- Storb RF, Champlin R, Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. 2001. "Non-myeloablative transplants for malignant disease." *Hematology* DOI: 10.1182/asheducation-2001.1.375.
- Summers C, Sheth VS, Bleakley M. 2020. "Minor Histocompatibility Antigen-Specific T Cells." *Frontiers in Pediatrics* 8:284. DOI: 10.3389/fped.2020.00284.
- Taichman Russell S. 2005. "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." *Blood* 105:2631-9. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2480.
- Terakura S, Murata M, Warren EH, Sette A, Sidney J, Naoe T, Riddell SR. 2007. "A single minor histocompatibility antigen encoded by UGT2B17 and presented by human leukocyte antigen-A*2902 and -B*4403." *Transplantation* 83:1242-8. DOI: 10.1097/01.tp.0000259931.72622.d1.
- Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. 1975. "Bone-marrow transplantation (first of two parts)." *New England Journal of Medicine* 292:832-43. DOI: 10.1056/NEJM197504172921605.
- Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. 1975. "Bone-marrow transplantation (second of two parts)." *New England Journal of Medicine* 292:895-902. DOI: 10.1056/NEJM197504242921706.
- Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. 1957. "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy." *New England Journal of Medicine* 257:491-6. DOI: 10.1056/NEJM195709122571102.

- Thorburn CM, Prokunina-Olsson L, Sterba KA, Lum RF, Seldin MF, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA. 2007. "Association of PDCD1 genetic variation with risk and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort." *Genes & Immunity* 8:279-87. DOI: 10.1038/sj.gene.6364383.
- Toche Paola. 2012. "Visión panorámica del sistema inmune." *Revista de medicina clínica Condes*. 23:446-457. DOI: 10.1016/S0716-8640(12)70335-8.
- Uchida N, Weissman IL. 1992. "Searching for haematopoietic stem cells: evidence that Th1/1lo Lin-Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow." *Journal Of Experimental Medicine* 175:175-84. DOI: 10.1084/jem.175.1.175.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca, F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadi A, Nithiyanthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien D, Rønningen KS, Guja, C, Ionescu-Tîrgoviște C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. 2003. "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease." *Blood* 423:506-11. DOI: 10.1038/nature01621.
- Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, Vigorito AC, Aranha FJ, de Brito Eid KA, Oliveira GB, Miranda EC, de Souza CA. 2003. "Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation." *Experimental Hematology*. 31:1044-50. DOI: 10.1016/j.exphem.2003.08.005.
- Von Domarus A, Farreras A, Rozman C, Cardellach F, Nicolás JM, Cervera R, August A, Brugada J, Campistol JM, Carmena R, Carreres A, Castells A, De la Sierra A, Duró JC, Esteller M, Ferrándiz C, Gatell JM, Ginés P, Gomis R, Graus F, Nogué S, Prat A, et al. 2020. *Farreras Rozman. Medicina Interna*. Barcelona, España: ELsevier.
- Warren EH, Gavin M, Greenberg PD, Riddell SR. 1998. "Minor histocompatibility antigens as targets for T-cell therapy after bone marrow transplantation." *Current opinion Hematology* 5:429-33. DOI: 10.1097/00062752-199811000-00013.
- Wilson W 3rd, Pardo-Manuel de Villena F, Lyn-Cook BD, Chatterjee PK, Bell TA, Detwiler DA, Gilmore RC, Valladeras IC, Wright CC, Threadgill DW, Grant DJ. 2004. "Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15." *Genomics* 84:707-14. DOI: 10.1016/j.ygeno.2004.06.011.
- Xue Y, Sun D, Daly A, Yang F, Zhou X, Zhao M, Huang N, Zerjal T, Lee C, Carter NP, Hurler ME, Tyler-Smith CH. 2008. "Adaptive evolution of UGT2B17 copy-number variation." *The American Journal of Human Genetics* 83:337-46. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.08.004. doi:DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.08.004.

Zeiser R, Marks R, Bertz H, Finke J. 2004. "Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies." *Annals of Hematology* 83:551-65. DOI: 10.1007/s00277-004-0890-7.