

HLA-A, -B, -DR en receptores de trasplante de médula ósea en Uruguay.

Sistema nacional de registro, tipificación y búsqueda de donantes de médula ósea y progenitores hematopoyéticos (SINDOME)

Dres. Milka Bengochea¹, Inés Álvarez², Pedro C. Hidalgo³, Lic. Adriana Cabrera⁴, As. Soc. Olga Senatore⁵, Dres. Roberto Toledo⁶, Elena Carreto⁷, Tec. Hem. Martha Sosa⁸, Lics. Doris Abilleira⁴, Ely Silva⁴

Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del Banco Nacional de Órganos y Tejidos. Facultad de Medicina. UDELAR. Ministerio de Salud Pública. Uruguay

Resumen

Introducción: Uruguay posee un sistema solidario de financiación de trasplante a través del Fondo Nacional de Recursos y del Banco Nacional de Órganos y Tejidos (BNOT).

En el trasplante alogénico de médula ósea la compatibilidad HLA es una barrera biológica importante. Las frecuencias alélicas y haplotípicas HLA son utilizadas para determinar la probabilidad de encontrar un donante con un fenotipo particular HLA y para predecir el efecto de diversos esquemas de adjudicación basados en la compatibilidad en este sistema. El Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad tipifica a todos los receptores y donantes del país. En este marco se ha iniciado un programa cuyo objetivo central es organizar un sistema de registro, tipificación y búsqueda de donantes no relacionados a nivel nacional (SINDOME).

Los objetivos del presente trabajo han sido analizar los receptores tipificados para trasplante de médula ósea (TMO) alogénico en nuestro servicio en el período enero 1997 - mayo 2002, y caracterizar la constitución genética del sistema HLA para 298 receptores.

Material y método: en el lapso indicado se estudiaron 346 receptores y 1.083 donantes. Se realizó la tipificación HLA clase I por reacción de microlinfocitotoxicidad con anticuerpos monoclonales y la tipificación de clase II por reacción en cadena de la polimerasa con hibridización (PCR-SSO) reversa, con nivel de resolución intermedio-alta. Se estimaron las frecuencias alélicas y haplotípicas en una muestra de 298 receptores.

Resultados: de los 346 receptores de TMO estudiados en el marco del SINDOME, 58% es menor de 30 años. La relación donante/receptor fue de 3,13 pero sólo 45% de los candidatos a trasplante tuvo un donante histocompatible.

En el análisis del polimorfismo de HLA-A,-B,-DR en la muestra de 298 receptores se encontró que los alelos más prevalentes fueron A2 (28,97%), B35 (12,49%) y DR04 (15,24%). Sólo para el locus HLA-DRB1 la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg fue altamente significativa. Los haplotipos

1. Prof. Adjunta del BNOT. Facultad de Medicina. Universidad de la República.

2. Profesora del Banco Nacional de Órganos y Tejidos (BNOT). Facultad de Medicina. Universidad de la República.

3. Genetista. BNOT.

4. Licenciadas de Laboratorio Clínico del Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del BNOT. Hospital de Clínicas.

5. Asistente Social del programa SINDOME. BNOT.

6. Prof. Agregado del BNOT. Facultad de Medicina. Universidad de la República.

7. Ex asistente del BNOT. Facultad de Medicina. Universidad de la República.

8. Técnico en Hemoterapia del Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del BNOT. Hospital de Clínicas.

Correspondencia: Dra. Milka Bengochea.

Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad. Banco Nacional de Órganos y Tejidos. Hospital de Clínicas. Av. Italia s/n, CP 11.600, Montevideo. Uruguay. E-mail: bengo@netgate.com.uy

Recibido: 13/1/03.

Aceptado: 6/6/03.

más comunes fueron A2-B51 y A2-B7 para HLA-A,-B, A2-DR11 y A2-DR04 para HLA-A -DRB1, y el haplotipo B8-DR03 para HLA-B -DR. De los haplotipos HLA-A -B -DRB1, HLA-A1 -B8 -DR03 y HLA-A2 -B51 -DR13 fueron los más frecuentes.

Conclusión: nuestros resultados demuestran que el sistema HLA presenta una considerable heterogeneidad, con un enorme polimorfismo y una amplia distribución de haplotipos. La posibilidad de encontrar donantes compatibles para un subgrupo de jóvenes con enfermedades malignas sin donantes familiares es muy baja en el contexto de nuestra población. En estos casos la búsqueda en los registros internacionales de donantes puede ser la única alternativa a fin de encontrar un donante histocompatible para un trasplante alogénico.

Palabras clave: ANTÍGENOS HLA-A - genética.
ANTÍGENOS HLA-B - genética.
ANTÍGENOS HLA-DR - genética.
HISTOCOMPATIBILIDAD.
TRASPLANTACIÓN DE MÉDULA ÓSEA.
TRASPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRES HEMATOPOYÉTICAS.
URUGUAY.

Introducción

El trasplante de médula ósea, progenitores hematopoyéticos de sangre periférica o sangre de cordón⁽¹⁻³⁾ constituye un recurso terapéutico en expansión para enfermedades malignas y no malignas. Leucemias agudas y crónicas, linfomas, aplasias, síndromes mielodisplásicos, errores congénitos del metabolismo, hemoglobinopatías, pueden ser motivo de indicación de un trasplante alogénico^(4,5).

Existen diversas modalidades de trasplante. De acuerdo al origen de las células a trasplantar se pueden distinguir los trasplantes autólogos (del propio individuo) y los alogénicos (de otro donante, emparentado o no).

En nuestro país los trasplantes autólogos y alogénicos son realizados por cuatro equipos clínicos cuyos resultados son referidos al Registro Internacional de Trasplantes de Médula Ósea (IBMTR)⁽⁶⁾.

La morbimortalidad de estos trasplantes ha disminuido en los últimos años aquí⁽⁷⁾ y en el mundo⁽⁸⁾.

Uruguay posee un sistema solidario de financiación de trasplante a través del Fondo Nacional de Recursos.

El Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del Banco Nacional de Órganos y Tejidos (BNOT) tipifica a todos los receptores y donantes del país.

La respuesta inmune desencadenada en el trasplante alogénico (respuesta alogénica) sigue siendo el principal obstáculo biológico a controlar. La falla del injerto, la enfermedad injerto versus huésped (EIVH)⁽⁹⁾ y las infecciones son complicaciones importantes del trasplante de células progenitoras de cualquier origen.

La médula sana del donante es inmunocompetente. Esto posibilita la respuesta del tejido trasplantado frente a las "moléculas antigénicas" del receptor iniciando la reacción injerto versus huésped. La magnitud de esta reacción determina la gravedad de la temida EIVH. Los grados controlables de esta reacción pueden ejercer un efecto

positivo en el control inmunológico de las células neoplásicas por parte de las células inmunocompetentes del donante. Este fenómeno es conocido como efecto injerto versus leucemia y es especialmente buscado en el caso de los trasplantes alogénicos no mieloablativos⁽¹⁰⁾.

Los mecanismos básicos de la tolerancia, el rechazo y la enfermedad injerto versus huésped tienen como eje la alorreactividad de los linfocitos T y son motivo de diversos modelos de estudio. El quimerismo -total y mixto^(11,12) - representa estados de tolerancia donante/receptor muy particulares.

El sistema HLA (Human Leukocyte Antigen) codificado en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), juega un rol protagónico en los fenómenos de presentación y reconocimiento antigénico^(13,14), instancias iniciales de la respuesta alogénica.

Su componente genético, ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, revela un alto grado de complejidad y polimorfismo⁽¹⁵⁾. Se hereda siguiendo un patrón mendeliano simple y se expresa en forma codominante.

El desarrollo de los métodos de tipificación molecular^(16,17), sobre todo después de la descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido identificar numerosas variantes del sistema HLA. Hasta octubre de 2002 las variantes moleculares identificadas⁽¹⁸⁾ de los loci que habitualmente se consideran en TMO (HLA A, B, C, DR, DQ) son: 263 para HLA-A, 501 para HLA-B, 125 para HLA-C, 397 para HLA-DRB, 53 para HLA-DQB1.

Las frecuencias y distribuciones de estos alelos varían en los diferentes grupos étnicos⁽¹⁹⁻²²⁾.

El rol de la disparidad HLA donante/receptor en la gravedad de la EICH ha sido estudiado con profundidad en los últimos años⁽²³⁻²⁶⁾.

Las exigencias de histocompatibilidad en el trasplante de médula ósea son máximas^(27,28).

El donante ideal es un hermano HLA idéntico al pa-

ciente, aquel que comparte ambos haplotipos HLA. En algunas situaciones se hace necesario el uso de donantes emparentados parcialmente compatibles⁽²⁹⁾ o la búsqueda de donantes compatibles no emparentados.

El trasplante alogénico de médula ósea con donante no relacionado exige condiciones de compatibilidad que sólo es posible ofrecer a través de sistemas internacionales integrados de donantes⁽³⁰⁻³²⁾. Estos sistemas facilitan encontrar un donante compatible aun para aquellos pacientes con variantes HLA no frecuentes.

La propuesta para enfrentar esta situación aprovechando los recursos disponibles ha sido la implementación de un programa que tiene como objetivo principal el funcionamiento de un sistema nacional de registro, tipificación y búsqueda de donantes de médula ósea al que denominamos SINDOME.

Conocer las características de los pacientes con indicación de trasplante de células progenitoras de cualquier origen y sus potenciales donantes resulta un requisito para emprender este programa.

Fueron objetivos de este trabajo el análisis de las características generales de los receptores tipificados en nuestro servicio en el período comprendido entre enero de 1997 y mayo de 2002 y la caracterización de la constitución genética del sistema HLA para 298 receptores.

Material y método

Se analizó edad, sexo y lugar de nacimiento de los pacientes candidatos a trasplante de médula ósea que concurrieron a nuestro servicio en el período enero 1997 - mayo 2002, provenientes de los cuatro equipos clínicos habilitados en nuestro país. Se determinó el número de familiares estudiados y la disponibilidad de donantes compatibles dentro del núcleo familiar correspondiente.

Se realizó la tipificación de los antígenos HLA clase I (HLA-A, -B) y alelos HLA clase II (HLA-DR) en muestras de sangre periférica de 298 receptores.

Para la tipificación HLA clase I se usaron linfocitos totales separados por gradiente de Ficoll-Hypaque, protocolo clásico de microlinfocitotoxicidad⁽³³⁾, con placa de anticuerpos monoclonales como sueros tipificadores (placa comercial One Lambda). Estas placas permiten identificar 12 especificidades amplias y 15 splits para HLA-A y 29 especificidades amplias y 30 splits para HLA-B. Se realizó lectura en microscopio de inmunofluorescencia e interpretación y asignación antigénica con apoyo de software LMT (One Lambda).

Para la tipificación alélica HLA clase II, se realizó extracción de ADN genómico a partir de sangre total periférica, utilizando un método de digestión con proteinasa K y precipitación salina (salting out)⁽³⁴⁾.

Se realizó reacción de amplificación en cadena (PCR) utilizando el protocolo y los reactivos (iniciadores, amor-

tiguador y enzima) del kit comercial Dynal RELI SSO HLA-DRB test. Este protocolo incluye una amplificación genérica de los genes DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5. Los productos de amplificación fueron analizados por reacción de hibridización con sondas prefijadas en tiras de nailon (ASO reverso)⁽³⁵⁾ y el revelado de esta hibridización por una reacción de desarrollo de color.

La asignación alélica fue realizada por interpretación del patrón de hibridización con apoyo de software. Esta técnica es de resolución intermedio-alta e identifica alelos o grupos de alelos.

La técnica utilizada para tipificación HLA-DR (PCR-ASO reversa) permite identificar todos los grupos alélicos o alelos reconocidos por el comité de nomenclatura⁽³⁶⁾.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas fueron calculadas por la estimación máximo verosímil descrita por Gjersten y colaboradores⁽³⁷⁾ y los errores típicos se calcularon como la variación de muestreo de una distribución multinomial⁽³⁸⁾. Las frecuencias haplotípicas y los desequilibrios de ligamiento (DL) entre dos loci fueron estimados por el paquete de análisis genético Arlequín v.2.0⁽³⁹⁾. Los DL entre tres loci fueron calculados siguiendo la formulación de Weir⁽³⁸⁾. Los valores normalizados de DL (D') se calcularon de acuerdo a Lewontin⁽⁴⁰⁾ y Thomson y Baur⁽⁴¹⁾. La significación estadística de las asociaciones de los DL se comprobó por la prueba de chi cuadrado para dos y tres loci⁽³⁸⁾. La desviación de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada locus fue calculada por el método de Guo y Thompson⁽⁴²⁾. Para todas las pruebas estadísticas se consideró un valor de $p < 0,001$ como muy significativo y un valor de $p < 0,0001$ como altamente significativo.

Resultados

En el período enero 1997 - mayo 2002 fueron estudiadas en nuestro servicio 1.429 personas para el "motivo" trasplante de médula ósea correspondiente a 346 pacientes (receptores).

En la tabla 1 se presentan las características generales de los receptores de médula ósea registrados en el laboratorio.

En la tabla 2 se muestran las frecuencias alélicas de los loci HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1. La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg fue altamente significativa para el locus HLA-DRB1 ($p = 0,0001$).

Las frecuencias estimadas de los haplotipos HLA-A - B, HLA-A -DRB1 y HLA-B -DRB1 se presentan en la tabla 3. De las combinaciones haplotípicas posibles para cada par de loci solamente se consideraron aquellos haplotipos con una frecuencia superior a 1% para el análisis de los resultados. Los haplotipos más comunes (ma-

Tabla 1. Características generales de los receptores de trasplante de médula ósea tipificados en el Banco Nacional de Órganos y Tejidos			
		<i>n</i>	%
Edad	< 10	68	19,6
	10-19	70	20,2
	20-29	62	17,9
	30-39	63	18,1
	40-49	59	17,1
	50 o más	23	6,5
	sin datos	1	0,6
Sexo	Masculino	190	55,0
	Femenino	156	45,0
Lugar de nacimiento	Montevideo	170	49,2
	Interior	172	49,8
	Extranjero	3	0,9
	Sin datos	1	
Cobertura asistencial *	MSP	76	46,6
	Mutualistas	72	44,2
	Sanidad militar y policial	12	7,4
	Seguro privado	2	1,2
	Sin datos	1	0,6
Donantes estudiados		1.083	
Relación donantes/receptores	3,13		
Relación hermanos donantes/receptores	2,3		
Receptores con donantes compatibles		156	45,0

*Año 2000 a 2002

yores a 4,0%) fueron A2-B51 y A2-B7 para HLA-A –B; A2-DR11 y A2-DR04 para HLA-A –DRB1. En el caso de HLA-B –DRB1 sólo el haplotipo B8-DR03 tuvo una frecuencia superior a 3,0%. Los valores de los desequilibrios de ligamiento (tabla 3) fueron altamente significativos de acuerdo a la prueba de chi cuadrado, en 7 de los 21 haplotipos para HLA-A –B, en 3 de los 27 haplotipos para HLA-A –DRB1 y en 6 de los 25 haplotipos para HLA-B –DRB1. Los valores de D' de los DL muy significativos fueron superiores a 50,0% de su máximo en cuatro de los haplotipos de HLA-A –B, en uno de los haplotipos de HLA-A –DRB1 y en ocho de los haplotipos HLA-B –DRB1 (tabla 3).

El análisis de los haplotipos HLA-A –B –DRB1 con una frecuencia superior a 0,95% (tabla 4), mostró que el haplotipo HLA-A1 –B8 –DR03 y el haplotipo HLA-A2 –B51 –DR13 son los más frecuentes en la muestra. Se en-

contraron valores muy significativos ($p < 0,001$) de los DL en dos de los diez haplotipos.

Discusión

Nuestros resultados muestran frecuencias de las especificidades amplias y de los blancos más bajas que las reportadas por Álvarez y colaboradores para los loci HLA-A y HLA-B⁽⁴³⁾. Esto se explica por las características del conjunto de anticuerpos monoclonales utilizados en la microlinfocitotoxicidad, que han permitido discriminar mejor los splits y cubrir mayor número de especificidades antigénicas.

El análisis de las combinaciones alélicas observadas en los receptores de trasplante de médula ósea nos permite examinar algunos de los aspectos sustanciales de la estimación de las frecuencias haplotípicas y de su distri-

Tabla 3. Haplotipos más comunes HLA-A-B, HLA-A-DR y HLA-B-DR con sus frecuencias estimadas en la muestra de receptores de trasplante de médula ósea					
Haplotipo		Frecuencia haplotipo (%)	Desequilibrio ligamiento (%)	DL estandarizado (D')	Chi cuadrado
A	B				
A2	B51	5,30	2,51	0,37	20,95*
A2	B7	4,23	1,73	0,28	11,00
A1	B8	3,47	2,97	0,66	123,53*
A2	B44	3,21	0,39	0,06	0,51
A24	B35	2,75	1,56	0,19	15,25*
A3	B7	2,25	1,54	0,21	23,79*
A3	B35	2,18	1,15	0,16	9,59
A29	B44	2,12	1,63	0,36	37,55*
A2	B18	1,84	0,50	0,15	1,60
A2	B35	1,77	-1,85	-0,51	9,03
A2	B15	1,62	0,65	0,27	3,80
A30	B13	1,49	1,36	0,53	95,33*
A11	B35	1,48	0,70	0,13	4,60
A2	B60	1,39	0,63	0,34	4,55
A1	B57	1,36	1,05	0,37	24,57*
A31	B35	1,33	0,73	0,17	6,24
A11	B51	1,20	0,60	0,11	4,19
A2	B49	1,15	0,07	0,02	0,03
A24	B44	1,15	0,22	0,03	0,37
A24	B27	1,05	0,77	0,30	14,87†
A2	B39	1,02	0,06	0,03	0,03
Haplotipo		Frecuencia haplotipo (%)	Desequilibrio ligamiento (%)	DL estandarizado (D')	Chi cuadrado
A	DR				
A2	DR11	4,90	1,85	0,25	10,54
A2	DR04	4,09	-0,32	-0,07	0,23
A2	DR13	3,80	0,35	0,04	0,34
A2	DR07	3,26	-0,47	-0,13	0,58
A1	DR03	3,06	2,34	0,36	54,83*
A2	DR15	2,99	0,81	0,15	2,74
A24	DR04	2,58	1,12	0,14	6,73
A2	DR02	2,13	0,04	0,01	0,01
A30	DR07	2,07	1,47	0,36	25,60*
A2	DR14	1,81	0,45	0,14	1,33
A2	DR08	1,78	0,28	0,08	0,46
A1	DR04	1,77	0,27	0,03	0,37
A24	DR13	1,73	0,59	0,07	2,29
A2	DRXX	1,72	-0,42	-0,20	0,75
A3	DR02	1,65	1,06	0,16	13,23†
A3	DR11	1,49	0,63	0,09	3,32
A3	DR13	1,49	0,51	0,07	1,95
A1	DR07	1,43	0,15	0,02	0,14
A1	DRXX	1,40	0,67	0,10	4,43
A31	DR04	1,29	0,55	0,13	2,98
A29	DR11	1,28	0,75	0,17	7,51
A29	DR07	1,22	0,57	0,13	3,66
A32	DR15	1,19	0,83	0,18	12,66†

Tabla 3. Continuación					
Haplotipo		Frecuencia haplotipo (%)	Desequilibrio ligamiento (%)	DL estandarizado (D')	Chi cuadrado
A	DR				
A3	DR01	1,16	0,68	0,13	6,65
A68	DR04	1,12	0,43	0,11	1,97
A31	DR08	1,03	0,78	0,17	15,76*
A23	DR07	1,03	0,57	0,19	5,10
A24	DR08	1,01	0,51	0,11	3,63
Haplotipo		Frecuencia haplotipo (%)	Desequilibrio ligamiento (%)	DL estandarizado (D')	Chi cuadrado
B	DR				
B8	DR03	3,19	2,82	0,60	148,33*
B7	DR15	2,74	2,09	0,30	47,25*
B44	DR07	2,45	1,19	0,14	8,56
B35	DR04	2,37	0,47	0,04	0,92
B51	DR13	2,22	1,07	0,13	7,50
B13	DR07	2,17	1,82	0,78	67,56*
B35	DR11	2,02	0,70	0,08	2,85
B57	DR07	1,79	1,38	0,51	33,56*
B44	DR13	1,68	0,52	0,06	1,78
B44	DR04	1,68	0,19	0,02	0,20
B7	DR02	1,66	1,04	0,16	12,13
B35	DRXX	1,62	0,70	0,11	3,87
B51	DR07	1,51	0,27	0,03	0,44
B35	DR14	1,47	0,89	0,22	9,60
B35	DR01	1,42	0,68	0,13	4,62
B18	DR11	1,41	0,92	0,22	11,99†
B44	DR11	1,39	0,36	0,04	0,94
B27	DR04	1,34	0,91	0,38	13,72†
B51	DR02	1,34	0,65	0,10	4,30
B51	DR11	1,26	0,24	0,03	0,43
B18	DR03	1,26	0,93	0,21	17,21*
B18	DR13	1,22	0,67	0,16	5,69
B38	DR13	1,17	0,97	0,62	30,74*
B62	DR04	1,16	0,72	0,30	8,66
B51	DRXX	1,14	0,43	0,06	1,82
B39	DR04	1,02	0,52	0,19	3,93

* p < 0,0001, † p < 0,001

bución muestral. Si consideramos que el número de haplotipos posibles está dado por el producto de las frecuencias alélicas en cada locus, el número de haplotipos teóricamente esperados sería de 1.034 para HLA-A –B, de 330 para HLA-A –DR, de 705 para HLA-B –DR, y de 15.510 para HLA-A –B –DR. Dado que el tamaño de la muestra estudiada es muy pequeño, para observar todos los haplotipos posibles, en la misma sólo se puede estimar una fracción de dichos haplotipos.

El número de los diferentes haplotipos estimados para la muestra de receptores con valores superiores a cero fueron para HLA-A –B de 210, para HLA-A –DR de 137, y para HLA-A –B –DR de 201, los cuales representan una fracción del número de haplotipos teóricamente espera-

dos. Esto está dado por lo menos por dos factores, por una parte, por el tamaño de la muestra y, por otra, porque en la población no están presentes determinadas combinaciones haplotípicas. Las estimaciones de las frecuencias haplotípicas en grandes muestras evidencian que es muy poco probable que todas los haplotipos posibles puedan estar representados en una población particular^(21,44,45), lo cual se debe en gran medida a las características de la constitución y de la estructura genética propias de cada población. Nuestros resultados pueden considerarse como característicos de la muestra estudiada y solamente pueden ser extendidos a la población asumiendo la hipótesis de homogeneidad en la distribución de los haplotipos en la misma. Estos datos son útiles para el

Tabla 4. Haplotipos HLA-A, -B, -DR con frecuencias mayor a 0,95% y estimados del desequilibrio de ligamiento en la muestra de receptores de trasplante de médula ósea						
A	Haplotipo		Frecuencia haplotipo (%)	Desequilibrio ligamiento (DL) (%)	DL estandarizado (D ²)	Chi cuadrado
	B	DR				
A1	B8	DR03	2,35	1,70	0,4628	12.37*
A2	B51	DR13	1,86	1,10	0,1639	7,12
A2	B7	DR15	1,68	1,07	0,2030	10.97*
A2	B18	DR11	1,51	0,96	0,3037	10,77
A30	B13	DR07	1,50	1,19	0,5580	9,20
A2	B44	DR04	1,45	0,93	0,1099	10,77
A2	B35	DR11	1,31	0,69	0,0918	6,75
A2	B51	DR07	1,17	0,45	0,0882	2,76
A3	B7	DR02	1,00	0,66	0,1323	4,30
A1	B57	DR07	0,96	1,18	0,2979	4,46

* p < 0,001

asesoramiento al paciente sobre las probabilidades de encontrar donantes no emparentados compatibles y para las estrategias de registro y elección de donantes.

El Programa de Trasplante de Médula Ósea del Banco Nacional de Órganos y Tejidos (Facultad de Medicina - UDELAR - Ministerio de Salud Pública) oportunamente aprobado en el ámbito ministerial, constituye uno de los objetivos estratégicos de la institución para el quinquenio 2001-2005. Tiene como objetivos brindar apoyo integral a receptores y familiares que concurren a estudiarse al BNOT así como promover la posibilidad de acceso de los uruguayos a los beneficios de los avances científico-técnicos, mejorando sus alternativas de tratamiento.

Desde este programa se coordinan las distintas instancias de asistencia y se trabaja en la gestación de un "Sistema nacional de registro, tipificación y búsqueda de donantes de médula ósea y progenitores hematopoyéticos de otros orígenes - SINDOME" para que aquellos pacientes sin familiar compatible con indicación de trasplante alogénico no emparentado puedan acceder al mismo.

Avanzar en la dirección indicada supone esfuerzos convergentes. El Laboratorio de Inmunogenética e Histo-compatibilidad ha podido calificar para el VII Taller Latinoamericano de Histo-compatibilidad a realizarse en el año 2003, cuyo objetivo es crear un registro latinoamericano de donantes y trabaja actualmente en el ajuste a los estándares internacionales de tipificación HLA para TMO no relacionado (American Society for Histo-compatibility - European Federation for Immunogenetics), de modo de acceder a la acreditación formal.

A nivel de la sociedad se ha impulsado en forma asociada con el Sindicato Médico del Uruguay, la Cátedra de Medicina Legal de la Facultad de Medicina, juristas y legisladores de todos los partidos políticos (ateneo conjunto sobre Flexibilización de la ley de trasplantes N° 14.005, junio de 2000) la modificación de la normativa, en orden a autorizar la donación entre no relacionados, constatándose el respaldo de todos los actores involucrados.

A nivel de gestión, además de remodelar la planta física del laboratorio, se ha procedido a la incorporación de recursos humanos que permiten un trabajo interdisciplinario. Se promueve la coordinación con los cuatro equipos clínicos existentes, con el Fondo Nacional de Recursos y con los propios trasplantados.

Desde el año 2000, el BNOT está suscrito a un registro internacional (Bone Marrow Donors Worldwide) que cuenta con más de ocho millones de donantes. Esta suscripción evolucionará hacia un situación de membresía plena, una vez que el país esté en condiciones de proporcionar a la red un primer grupo de donantes voluntarios.

La articulación y cooperación de los diversos actores resulta imprescindible para llevar a buen término este emprendimiento.

Summary

Background and Objective: as starting point Uruguay has as starting point a transplant solidarity system based upon the *Fondo Nacional de Recursos* and the *Banco Nacional de Organos y Tejidos* (BNOT). HLA compatibility is a biological boundary in allogenic bone marrow transplantation (BMT). HLA allele and haplotype frequencies are used to determine the probability to find a donor with a particular HLA phenotype and to predict the degree of HLA mismatching in a bone marrow donation scheme. In Uruguay, all potential donors are typified in the Immunogenetic and Histo-compatibility Laboratory of the BNOT are typified all potential bone marrow recipients and donors from all the country. In this context a program was developed for the register, to register, evaluate, and procure the non-related evaluation and procurement of non-related potential bone marrow donors at national level known as SINDOME. Our aim was to analyzed bone marrow donors and recipients for allogenic transplantations registered in our register from January 1997 to May 2002. We also determined the genetic constitution of HLA system for 298

bone marrow recipients.

Method: 346 recipients and 1083 donors were analyzed. Allele and haplotype frequencies were determined in a sample of 298 recipients. HLA class I alleles were typing by standard complement-dependent microcytotoxic assays. HLA class II alleles were determined by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) technique, with medium-high resolution.

We analyzed allele and haplotype frequencies in a sample of 298 recipients.

Results: among the 346 bone marrow recipient subjects recorded in the SINDOME, 58% were younger than 30 years. Donor/recipient rate was 3.13 but only 45% of potential receptors matched with a compatible donor. HLA-A, -B, -DR polymorphism analysis of the sample showed that prevalent alleles were A2 (28.97%), B35 (12.49%) and DR04 (15.24%). Only the HLA-DRB1 locus showed a highly significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Most common haplotypes were A2-B51 and A2-B7 for HLA-A, -B, A2-DR11 and A2-DR04 for HLA-A -DRB1, and haplotype B8-DR03 for HLA-B-DR. Highest frequencies were observed in HLA-A1-B8-DR03 and HLA-A2-B51-DR13 for haplotypes HLA-A-B-DRB1.

Conclusion: our findings showed that HLA system is heterogeneous, with a wide range of polymorphisms and haplotype distribution. The possibility to find compatible donors for a group of patients with malignant diseases without sibling donors is low in our country. In these cases, searching in international donor records might be an alternative to find potential suitable marrow donors for allogenic transplantations.

Résumé

Introduction: en Uruguay la greffe de moelle osseuse est prise en charge par la Sécurité Sociale à travers le Fonds National de Ressources et la Banque Nationale d'Organes et de Tissus (BNOT). En ce qui concerne l'allogreffe de moelle osseuse la compatibilité HLA est une barrière biologique importante. Les fréquences alléliques et haplotypiques sont utilisées afin de déterminer la probabilité de trouver un donneur ayant un phénotype HLA particulier et dans le but de prédire l'effet des schémas d'adjudication établis selon la compatibilité pour ce système. Dans notre pays tous les receveurs et tous les donneurs sont typés par le Laboratoire d'Immunogénétique et d'Histocompatibilité de la BNOT. Dans ce cadre, on a mis en place un programme dont le but est d'organiser un système national d'enregistrement, de typage et de recherche de donneurs non apparentés (SINDOME)

L'objectif de ce travail est d'analyser les receveurs typés pour allogreffe de moelle osseuse de janvier 1997 à mai 2002 ainsi que de caractériser la constitution génétique du système HLA pour 298 receveurs.

Matériel et méthodes: pour ladite période on a étudié 346 receveurs et 1083 donneurs ; on a fait le typage HLA classe I par réaction de microlymphocytotoxicité avec anticorps monoclonaux et le typage classe II par réaction

en chaîne de la polymérase avec hybridisation (PCR-SSO) reverse, moyenne résolution.

On a estimé les fréquences alléliques et haplotypiques pour un échantillon de 298 receveurs.

Résultats: pour 346 receveurs de greffe de moelle osseuse étudiés par le SINDOME, le 58% a moins de 30 ans. Le rapport donneur/receveur a été de 3,13. Il n'y a que le 45% des candidats qui ont eu un donneur histocompatible.

D'après l'analyse du polymorphisme HLA-A, -B, -DR pour l'échantillon de 298 receveurs, on a trouvé que les allèles prévalents ont été A2 (28,97%), B35 (12,49%) et DR04 (15,24%). La déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg n'a été très significative que pour le locus HLA-DRB1. Pour HLA-A,-B les haplotypes les plus fréquents ont été A2-B51 et A2-B7; pour HLA-A-DRB1, A2-DR11 et A2-DR04. Parmi les haplotypes HLA-A-B-DRB1, les plus fréquents ont été HLA-A1- B8-DR03 et HLA-A2-B51-DR13.

Conclusions: nos résultats montrent que le système HLA présente une hétérogénéité importante, avec un grand polymorphisme et une ample distribution d'haplotypes. La probabilité de trouver parmi notre population des donneurs compatibles pour un sous-groupe de jeunes qui subissent des maladies malignes et qui n'ont pas de donneur apparenté est très faible.

En ce cas-là, la recherche au niveau des registres internationaux s'avère comme la seule possibilité d'obtenir un donneur histocompatible et parvenir à l'allogreffe.

Bibliografía

1. **Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al.** Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975; 292: 832-43.
2. **Remberger M, Ringdén O, Blau I, Ottinger H, Kremens B, Kiehl M, et al.** No difference in graft-versus-host disease, relapse, and survival comparing peripheral stem cells to bone marrow using unrelated donors. *Blood* 2001; 98: 1739-45.
3. **Kurtzberg J, Laughlin M, Graham L, Smith C, Olson J, Halperin E, et al.** Placental Blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Eng J Med* 1996; 335: 157-66.
4. **Rocha V, Cornish J, Sievers E, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al.** Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97: 2962-71.
5. **Molina A, Popplewell L, Kashyap A, Nademanee A.** Hematopoietic Stem cell transplantation in the new Millennium: Report from City of Hope National Medical Center. In: Cecka JN, Terasaki PI, eds. *Clinical Transplants 1999*. Los Angeles: UCLA Immunogenetics Center, 1999: 317-42.
6. **International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) and the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry.** 2001 IBMTR/ABMTR statistical center report of survival statistics for blood and marrow transplants. http://www.ibmtr.org/infoserv/info_rep.html (visited el 17/9/2003).
7. **Fondo Nacional de Recursos.** Medicina Altamente Especializada. Informe: Programa de Seguimiento Trasplante de Médula Ósea. Montevideo: FNR, 2002.
8. **National Marrow Donor Program.** 1999 Data & Scientific Report of the National Donor Program. U.S. Department of Health and Human Services. Health Resources and Services Administration Office of Special Programs. Division of Transplantation. Minneapolis: NMDP, 2000.

9. **Bishop M, Flowers ME, Foss F, Couriel D.** Emerging Strategies in the treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Blood Marrow Transplant Rev* 2002; 12: 4-15.
10. **Vela Ojeda J.** Trasplante alogénico de células hematopoyéticas no mieloablatoivo. *Gac Méd Méx* 2002; 138: 142-4.
11. **Van Deerlin VMD, Leonard DGB.** Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantations. *Clin Lab Med* 2000; 20: 197-225.
12. **Wood K, Sachs DH.** Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today* 1996; 17: 584-9.
13. **Zinkernagel RM, Doherty PC.** Restriccion of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974; 248: 701-2.
14. **Newton-Nash D.** The molecular basis of allorecognition. *Hum Immunol* 1994; 41: 105-11.
15. **The MHC sequence consortium.** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; 40: 921-3.
16. **Jordan F, McWhinnie A, Turner S, Gavira N, Calvert A, Cleaver S, et al.** Comparison of HLA DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1995; 45: 103-10.
17. **Little A, Marsh S, Madrigal A.** Current methodologies of human leukocyte antigen typing utilized for bone marrow donor selection. *Curr Opin Hematol* 1998; 5: 419-28.
18. **Marsh SG.** The HLA Sequence Database. HLA Informatics group. <http://www.anthonynolan.com> (visto el 14/10/2002).
19. **Mori M, Beatty P, Graves M, Boucher K, Mildford E.** HLA gene and haplotype frequencies in the North American population. *Transplantation* 1987; 64: 1017-27.
20. **Shipper RF, D'Amario J, Bakker JT, Bakker J, Van Rood JJ, Oudshoorn M.** HLA gene and haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries. *Hum Immunol* 1997; 52: 54-71.
21. **Zachary AA, Steinberg AG, Bias WB, Leffell MS.** The frequencies of HLA alleles and haplotypes and their distribution among donors and renal patients in the UNOS registry. *Transplantation* 1996; 62: 272-83.
22. **Bengochea M, Álvarez I, Toledo R, Cabrera A, Abilleira D, Silva E, et al.** Frecuencias HLA A y B estudiadas con anticuerpos monoclonales. Libro de Resúmenes. Congreso Latinoamericano de Antropología Biológica, 4, Piriápolis: ALAB, 2000: 48.
23. **Petersdorf E, Longton G, Anasetti C, Mickelson E, McKinney S, Smith A.** Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated Donors. *Blood* 1997; 89: 1818-23.
24. **Petersdorf E, Longton G, Anasetti C, Mickelson E, Smith A, Martin P, et al.** Definition of HLA-DQ as a transplantation antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15358-63.
25. **Madrigal A, Scott I, Arguello R, Szydlo R, Little A, Goldman J, et al.** Factors influencing the outcome of bone marrow transplants using unrelated donors. *Immunol Rev* 1997; 157: 153-66.
26. **Petersdorf E, Mickelson E, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Hansen J.** Effect of HLA mismatches on the outcome of hematopoietic transplants. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 521-6.
27. **Scott I, O'Shea J, Bunce M, Tiercy J, Arguello J, Firman H, et al.** Molecular typing shows a high level of HLA class I incompatibility in serologically well matched donor/patient pairs: Implications for unrelated bone marrow donor selection. *Blood* 1998; 92: 4864-71.
28. **Petersdorf E, Gooley T, Anasetti C, Martin P, Smith A, Mickelson E, et al.** Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and Recipient. *Blood* 1998; 92: 3515-20.
29. **Henslee-Downe PJ, Abhyankar S, Parrish R, Pati A, Godder K, Neglia W, et al.** Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* 1997; 89: 3864-72.
30. **Barker JN, Krepski T, DeFor T, Davies S, Wagner J, Weisdorf D, et al.** Searching for unrelated donor haemopoietic stem cell: Availability and speed of umbilical cord blood versus Bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 257-60.
31. **Bone Marrow Donor Worldwide. Annual Reports 2001.** Leiden: Drukkerij Groen. <http://www.bmdw.org> (visto el 28/8/2002).
32. **O'Shea J, Cleaver S, Little A, Madrigal A.** Searching for an unrelated haemopoietic stem cell donor- A United Kingdom Perspective. In: Cecka JN, Terasaki PI, ed. *Clinical Transplants 1999*. Los Angeles: UCLA Immunogenetics Center, 1999: 129-37.
33. **Terasaki PI, Pernoco F, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y.** Microdroplet testing for HLA A,B,C and D antigens. *Am J Clin Pathol* 1978; 69: 103-20.
34. **Gustincich S, Manfiolett G, Del Sal G, Schneider C, Carminci P.** A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *BioTechniques* 1991; 11: 298.
35. **Bugawan T, Erlich H.** A method for typing polymorphism at HLA A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* 1994; 44: 137-47.
36. **Marsh SGE.** Nomenclature for factors of the HLA system. [http:// www.anthonynolan.com/HIG/nomenc.html](http://www.anthonynolan.com/HIG/nomenc.html) (visto el 30/12/2002).
37. **Gjertson DW, Geer L, Lee S-H, Kawata J, Sutrin R.** Populations studies. In: Terasaki PI, Gjertson DW, ed. *HLA 1997*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory. 1997: 171-3.
38. **Weir BS.** Genetic Data Analysis II. 2da. ed. Sunderland: Sinauer, 1996: 105-33.
39. **Schneider S, Roessli D, Excoffier L.** Arlequin ver. 2.000. A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. Geneva: University of Geneva, 2000.
40. **Lewontin RC.** On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988; 120: 849-52.
41. **Thomson G, Baur MP.** Third order linkage disequilibrium. *Tissue Antigens* 1984; 24: 250-5.
42. **Guo SW, Thompson EA.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361-72.
43. **Álvarez I, Sans M, Toledo R, Sosa M, Bengochea M, Salzano FM.** HLA gene and haplotype frequencies in Uruguay. *Int J Anthropol* 1993; 8: 163-8.
44. **Lonjou C, Clayton J, Cambon-Thomsen A, Raffoux C.** HLA -A, -B, -DR haplotype frequencies in France-Implications for recruitment of potential bone marrow donors. *Transplantation* 1995; 60: 375-83.
45. **Cao K, Hollenbach J, Shi X Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA.** Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution pattern in these populations. *Hum Immunol* 2001; 62: 1009-30.

Addendum

Recientemente la Asamblea General introdujo modificaciones en la Ley de Trasplantes de Órganos y Tejidos N° 14.005 y sancionó la Ley N° 17.668, de 15 de julio de 2003, que establece que para médula ósea y progenitores hematopoyéticos "los mayores de 18 años podrán ser donantes a favor de persona no determinada".