

Respuesta inmune contra antígenos menores de histocompatibilidad en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Claudio Pérez N.^(1,2), Ramón Rabanales T.^(1,2), Milton Larrondo L.⁽²⁾, Jorge Alfaro L.^(1,2)

⁽¹⁾Laboratorio de Terapia Celular, HCUCh.

⁽²⁾Banco de Sangre, HCUCh.

SUMMARY *Patients who receive allo hematopoietic stem cell transplantation (SCT) could develop graft versus host disease and/or graft versus tumour effect. These immunological responses can happen even with perfect fully HLA matched haematopoietic stem cells. Moreover, the engraftment of the donor's cells depends on the immunological conditions of both donor and recipient. The development of alloreactivity occurs in the context of the polymorphisms of the human genome, these genomic differences results in proteins with antigenic properties which trigger immune responses. Considering this, the SCT is a powerful tool to heal the patient disease, because all of them become chimeras. In other words, into individuals with two different genomic sets, which will develop a strong immunological response that cannot exist in natural conditions.*

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de respuestas inmunológicas entre individuos HLA compatibles requiere de la existencia de polimorfismos genéticos que conduzcan a la expresión de péptidos inmunogénicos denominados antígenos menores de histocompatibilidad (mHAgs). En el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH), los mHAgs son necesarios para desencadenar procesos

inmunológicos mediados por linfocitos T (LT) del donante. Este efecto puede ser beneficioso cuando sirve para erradicar el tumor, en un proceso denominado injerto contra tumor (ICT) o intensamente deletéreo cuando desarrolla la denominada enfermedad injerto contra huésped (EICH).

Dada la relevancia de estos antígenos, es necesario profundizar en la comprensión de los mecanismos inmunológicos originados por estas diferencias

genómicas. Este conocimiento podría permitirnos la predicción de eventos inmunes asociados al trasplante, potenciar los efectos benéficos y disminuir la morbilidad originada por el nuevo sistema inmunohematológico. Además existe la posibilidad de utilizar los mHAgs como pivotes específicos en inmunoterapia, es decir, induciendo o suprimiendo la respuesta inmune celular.

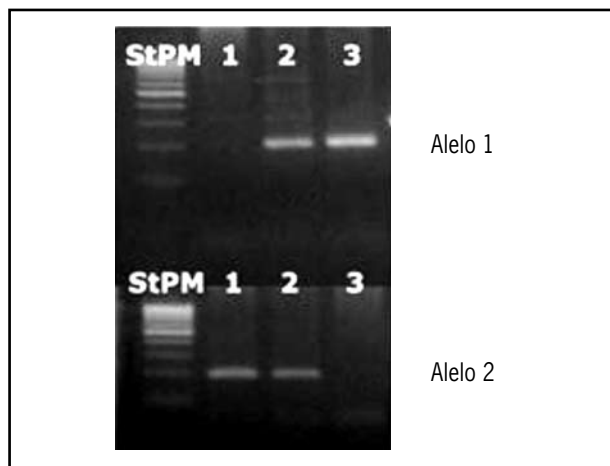
Revisaremos el rol que tienen los mHAgs en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; cómo estos son determinados en el laboratorio y los mecanismos de la respuesta inmune que desarrollan.

ANTÍGENOS MENORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD (mHAgs)

Los mHAgs son péptidos derivados de proteínas normales del organismo y presentadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T citotóxicos del donante (dTLC)⁽¹⁾, en un contexto alo específico, es decir, en pacientes alo trasplantados. Los mHAgs son la consecuencia normal de las variaciones genéticas entre los individuos. Estas variaciones pueden ser polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*), deleciones, inversión de secuencias, duplicaciones o variantes con alto número de copias (CNVs) cuando el segmento amplificado es mayor a un kilo base. Cualquiera sea el mecanismo, éste genera modificaciones en la estructura proteica que va a significar una alteración en la fragmentación proteosómica, en el transporte peptídico, en la unión a moléculas HLA o en el reconocimiento por el LTC. De estas alteraciones, la más estudiada es la SNP. Existen alrededor de 1×10^7 SNPs en el genoma humano⁽²⁾. Estos polimorfismos pueden originar variaciones o sustituciones aminoacídicas a nivel proteico, generando

proteínas denominadas no sinónimas, de las cuales hay 3×10^4 descritas⁽²⁾. Una proteína no sinónima corresponde a la que se genera cuando existe un cambio en un nucleótido que genera una sustitución aminoacídica. Aunque algunos cambios alteran la función de la proteína, muchos otros no influyen en su actividad biológica. Las sustituciones aminoacídicas darán origen a péptidos antigénicos que pueden ser reconocidos por LT del donante en el contexto de moléculas HLA. Los mHAgs se definen entonces como péptidos derivados de proteínas polimórficas que son presentados en un contexto HLA, siendo reconocidos por LT alogénicos en individuos HLA compatibles⁽³⁾. Estos mHAgs juegan un papel fundamental en el rechazo o prendimiento del injerto, la inducción de EICH y el desarrollo de actividad de ICT luego del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos⁽⁴⁾. Actualmente se han descrito alrededor de 20 mHAgs, estableciéndose la frecuencia genotípica e inmunofenotípica en diversas etnias⁽⁵⁾.

Figura 1. Tipificación de mHAgs mediante PCR alelo específico.



Los productos obtenidos de la reacción de PCR son resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el individuo posee ambos alelos, se observará una banda de amplificación para ambos alelos (individuo 2) y será heterocigoto para el gen. Los individuos 1 y 3 son homocigotos para el alelo 2 y 1 respectivamente.

GENOTIPIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE MHAGS

Se pueden emplear varios métodos para la tipificación de mHAGs. Entre ellos, la técnica de PCR alelo específico⁽⁶⁾. Un esquema de este procedimiento se puede observar en la Figura 1. Un mHAG puede expresarse en algunos tejidos más que en otros: esto explicaría por qué la EICH afecta más a piel, hígado e intestino que a otros órganos⁽⁷⁻⁸⁾. A su vez, la expresión génica puede ser modificada por el tratamiento oncológico⁽⁹⁾, el silenciamiento génico⁽¹⁰⁾, el envejecimiento celular⁽¹¹⁾ y/o por los mecanismos de evasión tumoral a la respuesta inmunológica⁽¹²⁻¹³⁾.

LA RESPUESTA INMUNE CONTRA ANTÍGENOS MENORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD

La respuesta inmunológica requiere de la presentación del antígeno por células presentadoras de antígeno profesionales (CPA), del reconocimiento

antigénico, de la activación del LTC y del desarrollo de la respuesta inmune efectora. En el contexto de disparidad HLA, los LTC se activarán frente a la inmunogenicidad del receptor HLA por sí mismo. Sin embargo, cuando estas moléculas son iguales en dador y receptor, la respuesta aloinmune depende en su génesis de los mHAGs. Estos mHAGs serán inmunogénicos en el caso de presentar polimorfismo entre dador y receptor, que implique una diferencia en al menos un aminoácido en la proteína final, siempre restringidos a un HLA determinado. Por ejemplo, el antígeno menor HA-1, será inmunogénico solamente en un contexto HLA-A*02, pero en otra molécula HLA (por ejemplo HLA-A*015) no será presentado y no generará una respuesta inmunológica.

La presentación antigénica de proteínas polimórficas endógenas involucra un mecanismo de desintegración proteica. Ello ocurre en un complejo

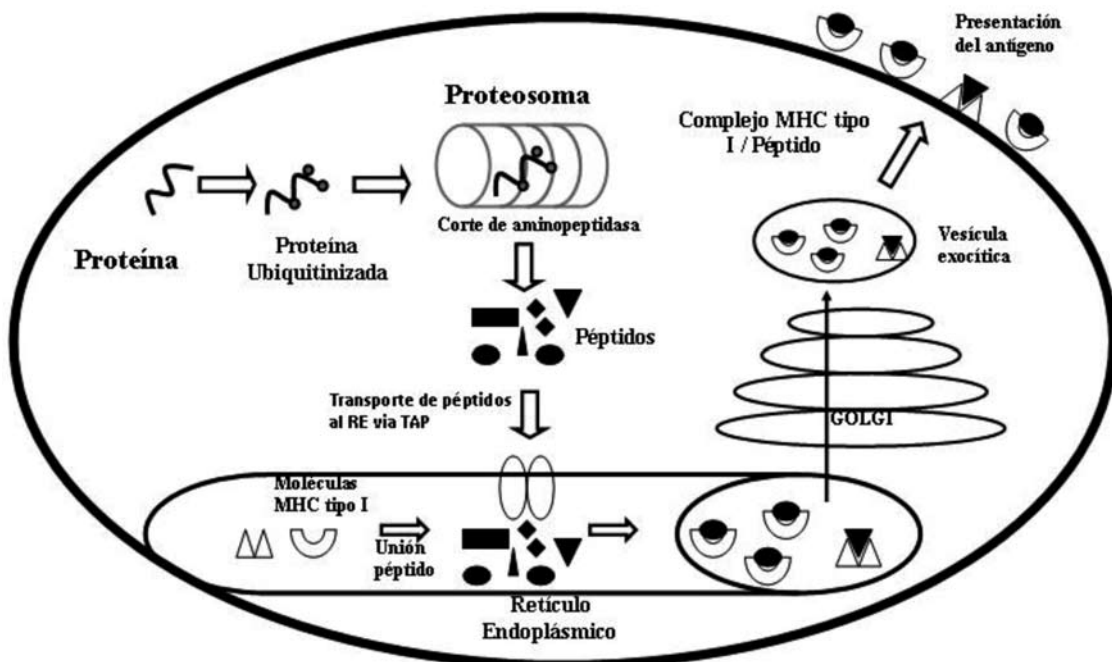


Figura 2. La proteína es ubiquitinizada y luego fraccionada en el proteosoma, generando péptidos, los cuales son internalizados al retículo endoplasmático vía proteína TAP. El péptido se une a la molécula HLA y migra a través del aparato de Golgi hasta alcanzar la membrana plasmática donde es presentada a los linfocitos T.

intracelular llamado proteosoma, el que dará origen a pequeños péptidos que son llevados al retículo endoplasmático (RE) por proteínas transportadoras (TAP)⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Una vez en el RE, los péptidos son ensamblados dentro de moléculas de HLA clase I y este complejo HLA- péptido viaja hacia la superficie celular de la CPA. El reconocimiento antigénico en un contexto HLA adecuado activa al LTC capacitándolo para ejercer su acción inmunológica (Figura 2). Una alternativa a la presentación clásica es ofrecida por células dendríticas, las cuales pueden capturar antígenos menores derivados de células necróticas o apoptóticas, procesarlos y presentarlos en moléculas HLA clase I (presentación cruzada)⁽¹⁶⁾.

En el TAPH, la respuesta inmune efectora contra mHAgS es mediada por los LT del donante que promueven efectos benéficos como la aceptación del injerto eliminando células hematopoyéticas residuales y la actividad ICT dirigida contra la enfermedad tumoral de base⁽¹⁷⁾. Del mismo modo, el sistema inmune efector puede ocasionar un efecto nocivo tipo EICH, donde LTC aloreactivos reconocen antígenos menores que se expresan en los tejidos sanos del huésped⁽¹⁷⁾. Alternativamente células hematológicas residuales pueden rechazar el injerto⁽⁴⁾. Por lo tanto, la dirección de la respuesta inmune contra mHAgS en individuos HLA compatibles dependerá de la presencia o ausencia del antígeno en el donante o en el receptor (Tabla 1). La respuesta es similar a la que

ocurre frente a una disparidad del sistema Rh. Al trasplantar a individuos Rh (+) con médula ósea de un individuo Rh (-), las células inmunes maduras provenientes del injerto eliminarán a células Rh (+), pero no al revés.

Es necesario señalar que individuos que han sido expuestos a un péptido determinado a nivel tímico en el desarrollo inmune fetal, no generarán una respuesta inmunológica a ese péptido debido al desarrollo de tolerancia a antígenos propios (autoantígenos) mediante mecanismos de anergia o delección de LT específicos⁽¹⁸⁾. Es decir, si el donante y el receptor no presentan diferencias alélicas en los mHAgS, no habrá una respuesta inmunológica frente a la proteína.

En relación a lo anterior, existen dos tipos de tolerancia: una natural donde las células reguladoras CD4 CD25 FoxP3 mantienen inhibida la respuesta efectora a tejidos propios y una adquirida en la cual células CD4 CD25 inducen tolerancia a través de la secreción de citoquinas⁽¹⁹⁾. En el TAPH, la tolerancia natural podría deberse al traspaso de LT regulatorios provenientes del dador e incluiría el reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad y otros antígenos compartidos, mientras que la tolerancia adquirida a un mHAgS debe ocurrir por la generación *de novo* de células reguladoras en el receptor. La supresión farmacológica (uso de dexametasona o ciclosporina) puede inducir la aparición de células de naturaleza tolerogénica⁽²⁰⁾.

Tabla 1. Direccionalidad de la respuesta inmune en relación al genotipo mHAgS del dador y el receptor

	Presencia de mHAgS		Dirección esperada de la respuesta inmune anti mHAgS
	Genotipo del donante	Genotipo del receptor	
Situación 1	-	+	Donante contra células del receptor
Situación 2	+	-	Receptor contra células del donante
Situación 3	-	-	Sin respuesta inmunológica
Situación 4	+	+	Sin respuesta inmunológica

INMUNOTERAPIA CONTRA mHAgs

La intervención terapéutica en pacientes trasplantados con una recaída de su enfermedad tumoral o con afectación de tejidos sanos por alo inmunidad, está orientada a reestablecer la condición de normalidad del individuo, ya sea exacerbando la respuesta contra el tumor o inmunosuprimiendo la reacción contra células sanas; de ahí que la comprensión de los mHAgs nos permitiría diferenciar ambos efectos y desarrollar acciones más específicas en uno u otro sentido.

La inmunoterapia es un método específico que permite dirigir la respuesta inmune hacia mecanismos antitumorales o tolerogénicos. La utilización de células dendríticas (DCs) que estén capacitadas para activar LT *in vivo* o la generación de LT específicos *in vitro*, son alternativas disponibles para el tratamiento del cáncer o de patologías autoinmunes⁽²¹⁻²³⁾.

En el TAPH, la elección del antígeno y la plasticidad inmune de DCs o LT es fundamental para lograr independizar el efecto antitumoral de la EICH⁽¹⁷⁾. Algunos mHAgs reúnen varias características que los hace candidatos ideales para inducir una respuesta inmune adecuada y mantener la especificidad del sistema. Por ejemplo, el gen HA-1 es considerado un mHAgs y se expresa principalmente en células de origen hematopoyético y en algunos tumores^(7,24). Presenta una forma R (139arg) no inmunogénica y una forma H (139His) que genera el péptido antigénico HA-1^H, restringido al alelo HLA-A*201 y que es reconocido por LT. Individuos HLA-A*201, trasplantados con médula ósea compatible con diferencias genéticas con su donante en el gen HA-1 podrían desarrollar una respuesta inmunológica exclusiva contra células hematológicas, sanas o tumorales que expresen la forma inmunogénica sin dañar

órganos y tejidos sanos del receptor. La fabricación de vacunas específicas contra este antígeno podría favorecer el efecto de ICT minimizando los riesgos de EICH. Paralelamente, antígenos polimórficos restringidos a un tejido en particular pueden ser el blanco para desarrollar células reguladoras que inhiban específicamente la respuesta inmune efectora contra ese tejido.

CONSIDERACIONES FINALES

El sistema inmune puede generar una respuesta específica contra antígenos de células tumorales y al mismo tiempo evitar la acción contra células normales. En el contexto de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, esta respuesta sería la responsable de la curación del individuo. Por esto, el reconocimiento de mHAgs expresados exclusivamente en células neoplásicas le otorga especificidad al sistema, evitando daños en tejidos sanos por reacciones cruzadas. De esto se desprende que la identificación de nuevos mHAgs en el contexto HLA correcto, ampliaría el porcentaje de pacientes que podrían ser beneficiados por terapias inmunológicas y que conociendo en qué tipos celulares se expresan estas diferencias, se lograría un mejor manejo del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

A manera de resumen podemos decir que existen proyecciones para una variada aplicación del conocimiento de los mHAgs en el TAPH. Éstos involucran métodos predictivos de posibilidad de recaída, inmunoterapia con vacunas alo específicas, mHAgs como marcadores para el seguimiento de poblaciones celulares. Todo indica que la separación de los efectos inmunológicos de un alo trasplante dependen en una u otra medida de las características y distribución de estos pequeños péptidos denominados mHAgs, que representan ni más ni menos, nuestra diversidad genómica.

REFERENCIAS

1. Wallny HJ, Rammensee HG. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* 1990;343:275-8.
2. Mullally A, Ritz J. Beyond HLA. the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2007;109:1355-62.
3. Simpson E, Scott D, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F *et al.* Minor H antigens: genes and peptides. *Transpl Immunol* 2002;10:115-23.
4. Falkenburg JH, Van de Corput L, Marijt EW, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003;31:743-51.
5. Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, Crowley J *et al.* Phenotype Frequencies of Autosomal Minor Histocompatibility Antigens display Significant Differences among Populations. *PLoS Genet* 2007;3:e103.
6. 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;20:E42.
7. Wilke M, Dolstra H, Maas F, Pool J, Brouwer R, Falkenburg JH *et al.* Quantification of the HA-1 gene product at the RNA level; relevance for immunotherapy of hematological malignancies. *Hematol J* 2003;4:315-20.
8. Klein CA, Wilke M, Pool J, Vermeulen C, Blokland E, Burghart E *et al.* The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *J Exp Med* 2002;196:359-68.
9. Sorich MJ, Pottier N, Pei D, Yang W, Kager L, Stocco G *et al.* In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile. *PLoS Med* 2008;5:e83.
10. Oyer JA, Chu A, Brar S, Turker MS. Aberrant Epigenetic Silencing Is Triggered by a Transient Reduction in Gene Expression. *PloS One* 2009;4:e4832.
11. Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Bhatt K, Shah B *et al.* Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women. *Exp Gerontol* 2004;39:369-77.
12. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 2005;87:163-208.
13. Salazar F. El sistema immune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer *Rev Chil Pediatr* 2000;71:296-306.
14. VandeEynde B, Morel S. Differential processing of class- I- restricted epitopes by standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 2001;13:147-53.

15. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigens peptides. *Mol Immunol* 2002;39:147-64.
16. Lin ML, Zhan Y, Villadangos JA, Lew AM. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 2008;86:353-62.
17. Rezvani AR, Storb RF. Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Autoimmun* 2008;30:172-9.
18. Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 2006;7:338-43.
19. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:253-7.
20. Barshes NR, Goodpastor SE, Goss JA. Pharmacologic immunosuppression. *Front Biosci* 2004;9:411-20.
21. Roopenian D, Choi EY, Brown A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 2002;190:86-94.
22. Goulmy E. Minor histocompatibility antigens. Allo target molecules for tumor-specific immunotherapy. *Cancer J* 2004;10:1-7.
23. López MN, Pereda C, Segal G, Muñoz L, Aguilera R, González FE *et al.* Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* 2009;27:945-52.
24. Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Falkenburg JH, Moss P, Goulmy E. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 1999;5:839-42.

CORRESPONDENCIA

Dr. Jorge Alfaro Lucero
 Laboratorio de Terapia Celular, Banco de Sangre
 Hospital Clínico Universidad de Chile
 Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
 Fono: 978 8067
 Fax : 56-02-7777289
 E-mail: jalfaro@redclinicauchile.cl

