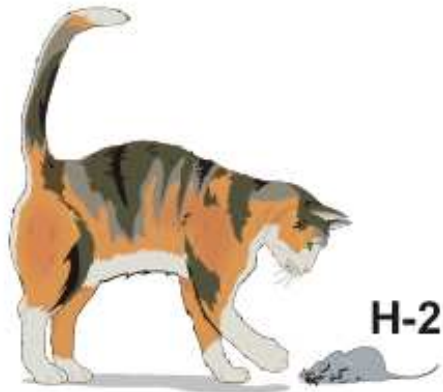


# CMH

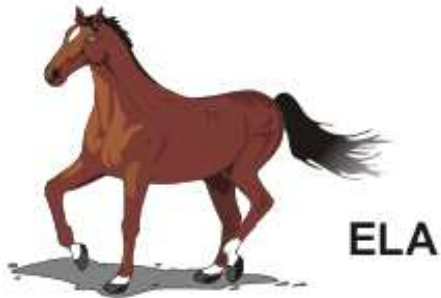
## Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Inmunología Clínica 2009  
Bioq. Susana Soto de Ferrini

SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD



¿ CLA ?



**DLA** perros domésticos

**FLA** gatos domésticos

**BOLA** bovinos

**NHP** primates no humanos

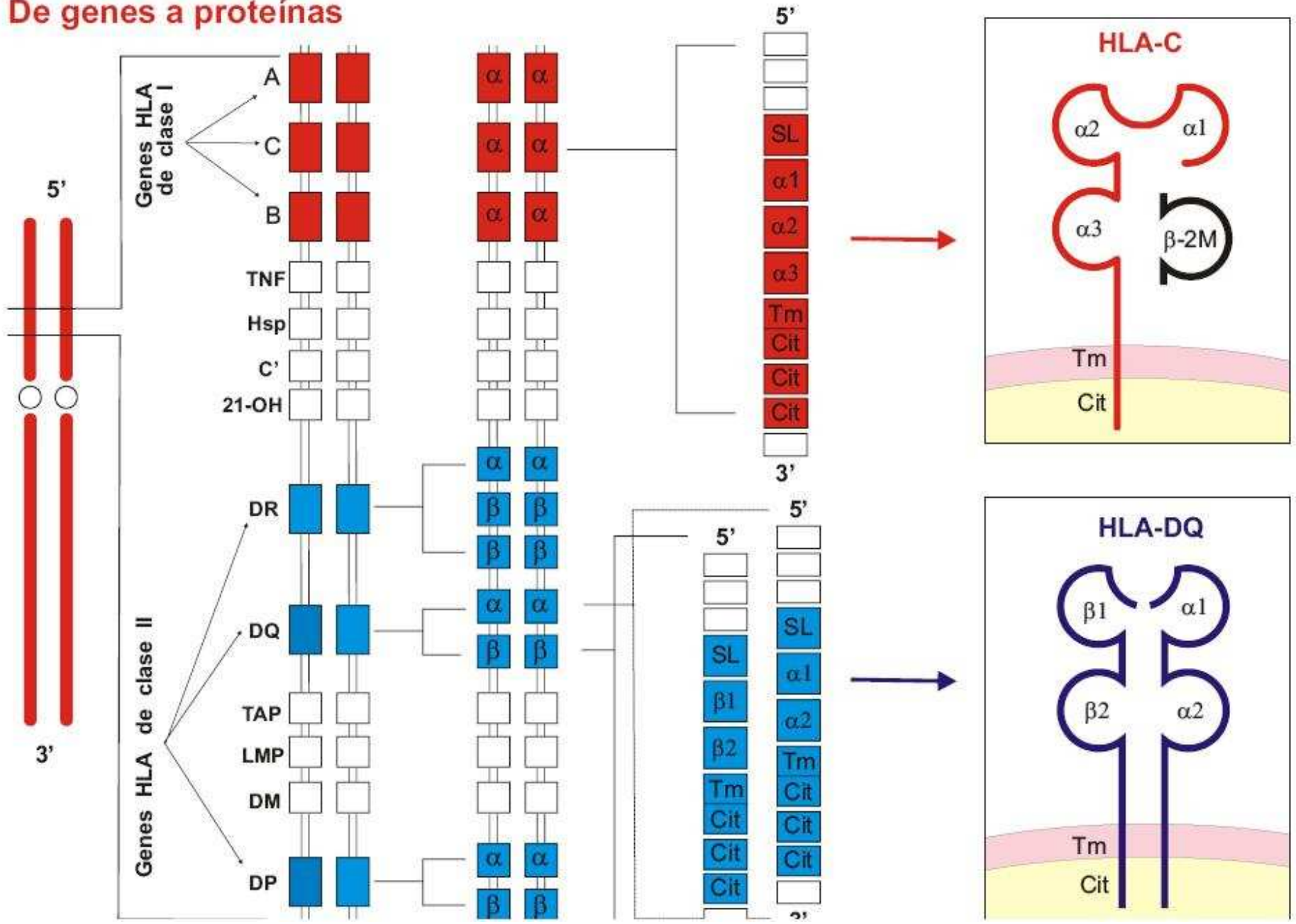
**RTI** ratas

**SLA** cerdo

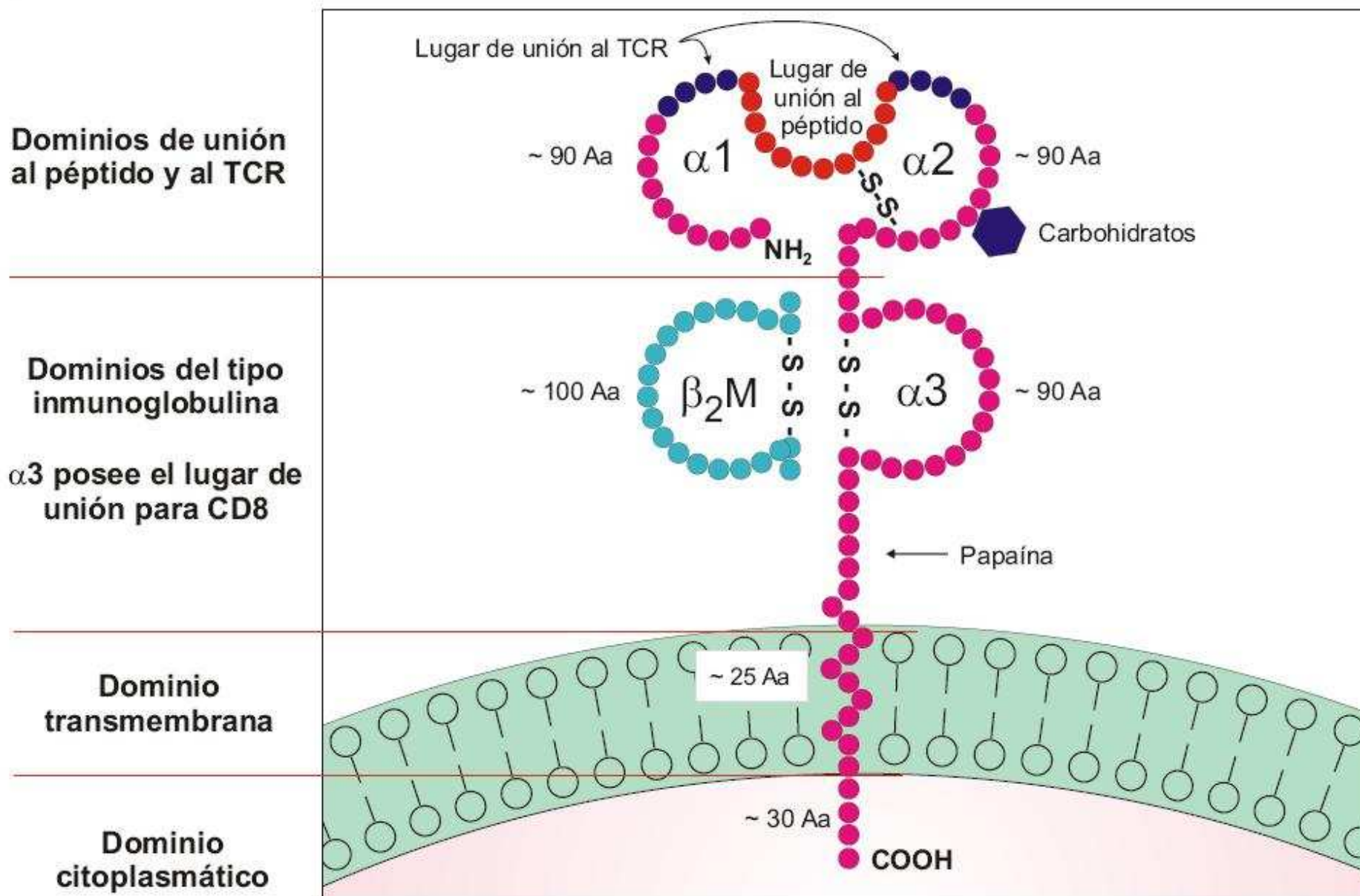
**HLA** humanos → **HLA-I**  
→ **HLA-II**

**Ratón: H2**

# De genes a proteínas



## MOLECULA HLA DE CLASE I



## MOLECULA HLA DE CLASE II

Dominios de unión al péptido y al TCR

Lugar de unión al TCR

Lugar de unión al péptido

~ 90 Aa

$\alpha 1$

NH<sub>2</sub>

$\beta 1$

~ 90 Aa

Carbohidratos

Dominios del tipo inmunoglobulina

$\beta 2$  posee el lugar de unión para CD4

~ 90 Aa

$\alpha 2$

$\beta 2$

~ 90 Aa

Papaína

Papaína

Dominio transmembrana

~ 25 Aa

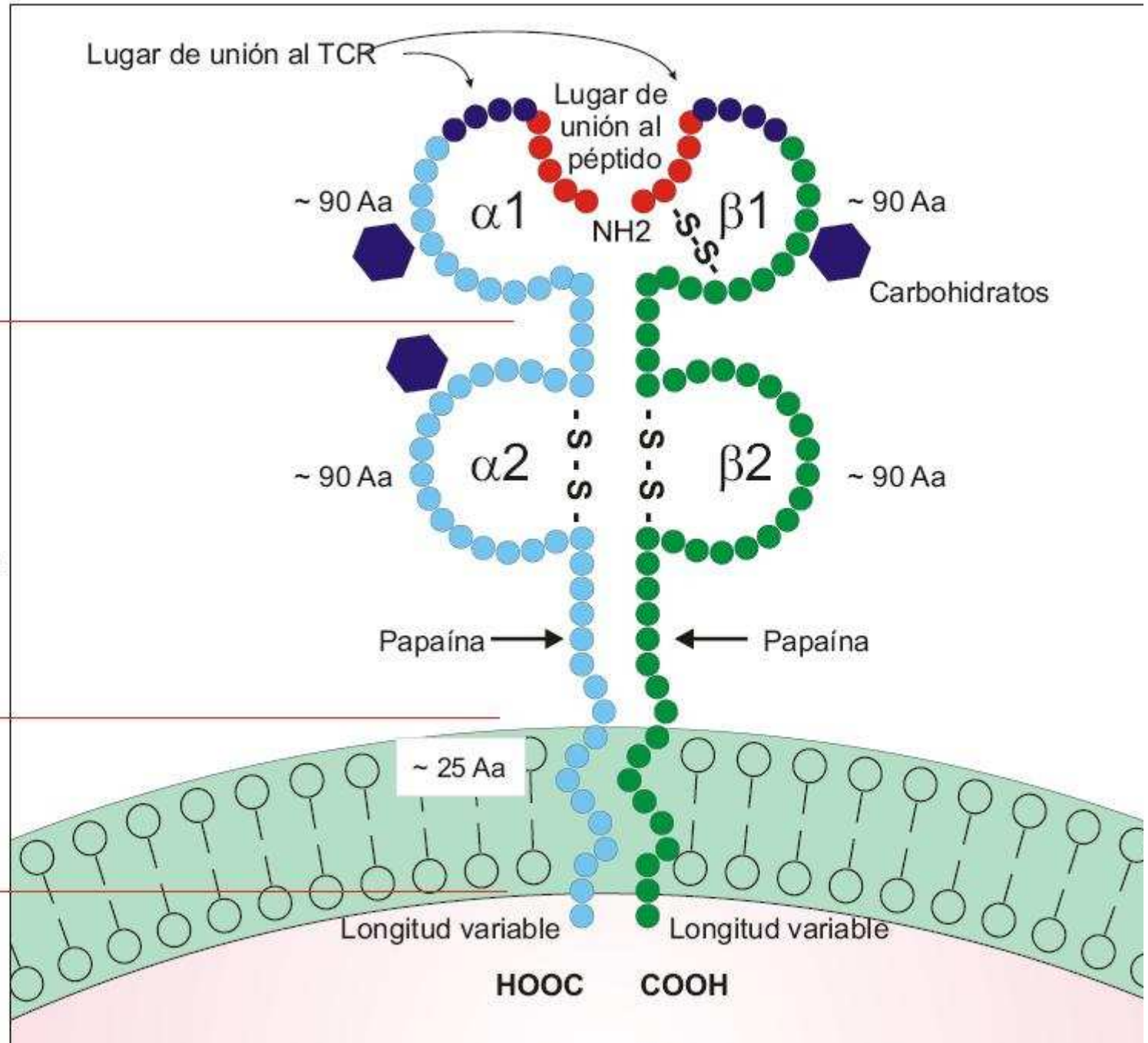
Dominio citoplasmático

Longitud variable

Longitud variable

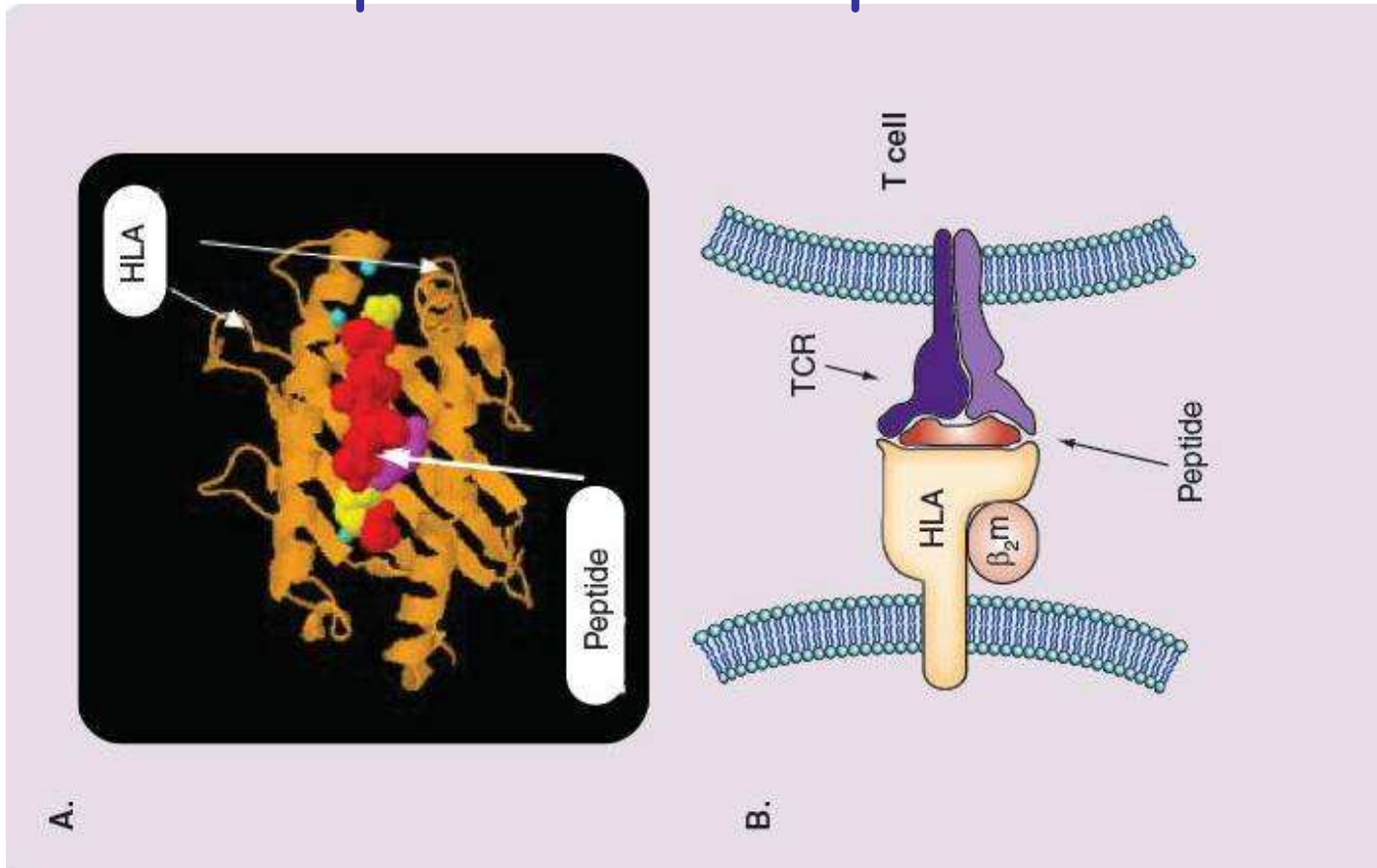
HOOC

COOH



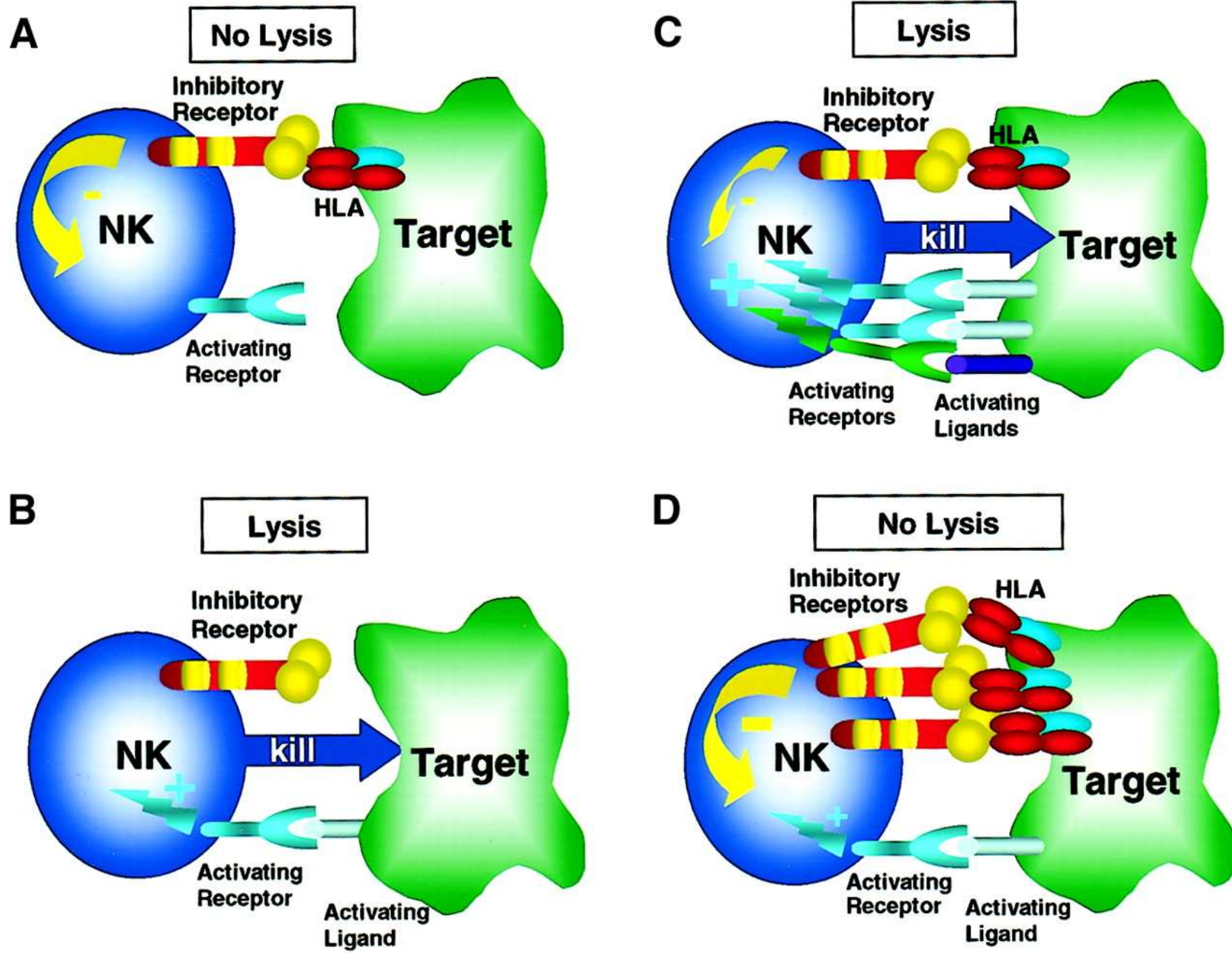
# ¿Función ?

- Presentar peptidos → Restricción CMH  
¿Todos los antígenos deben ser presentados por CMH ?



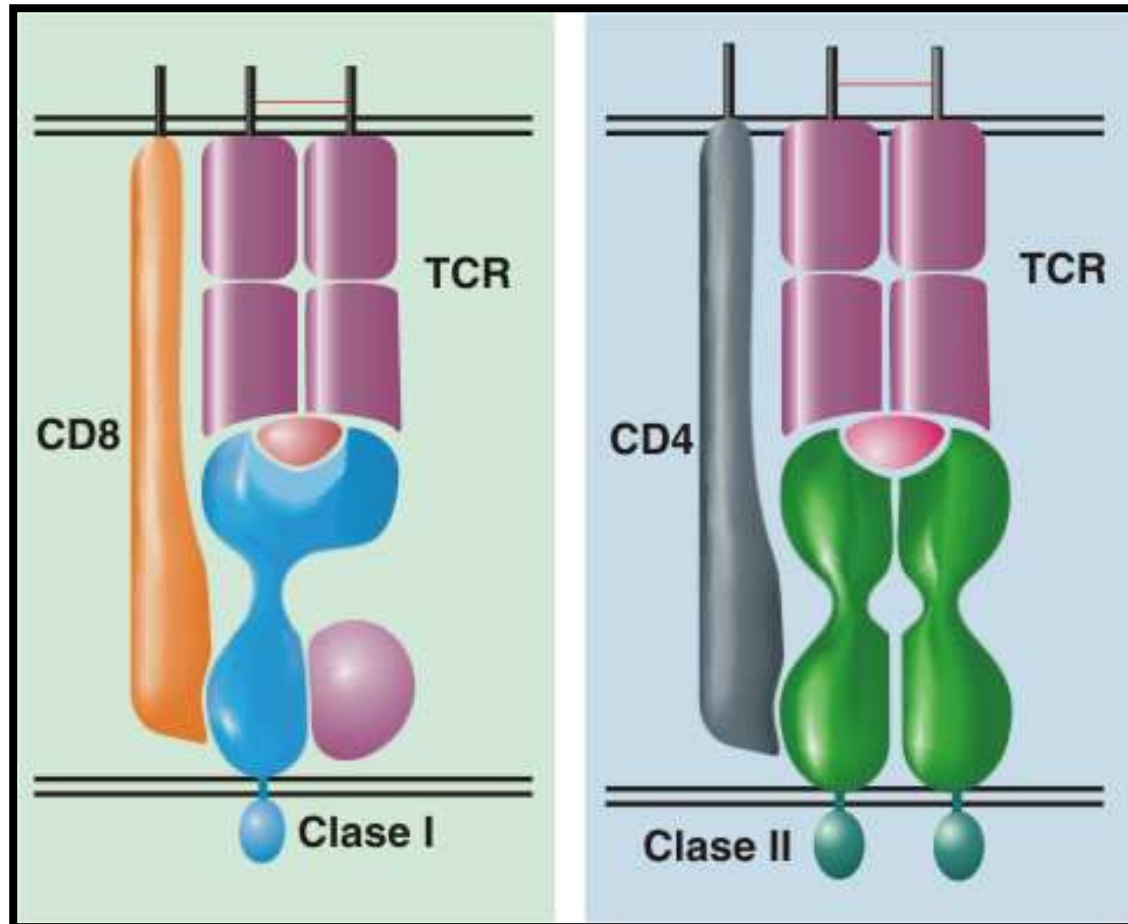
¿única función?

•Protección de células normales de la citotoxicidad de NK





# INTERACCIÓN LT- CPA



- HLA-I → CD8+ → Celular
- HLA-II → CD4+ → TH1  
→ TH2 → LB → Ac

¿Con que microorganismos una respuesta inmune celular con LTc es efectiva?

¿Con que microorganismos una respuesta inmune humoral con producción de Ac es efectiva?

## Distribución diferencial de las moléculas CMH

Tejido	CMH- I	CMH-II
LT	+++	+/-
LB	+++	+++
Macrofagos	+++	++
CD	+++	+++
Células epiteliales Tímicas	+	+++
Neutrofilos	+++	-
Hepatocito	+	-
Riñón	+	-
Cerebro (neurona no)	+	-
Eritrocito	-	-
Sincitio trofoblástico	-	-

- **CMH-I:**

se expresa constitutivamente en todos los tejidos

niveles altos: células linfoides

niveles moderados: mayoría

bajos: hígado

Se incrementa por IFN-I

¿Cuántas moléculas de CMH-I se expresan en cada célula nucleada ?

Más de 100.000 de cada CMH-I

- **CMH-II:**

Distribución restringida

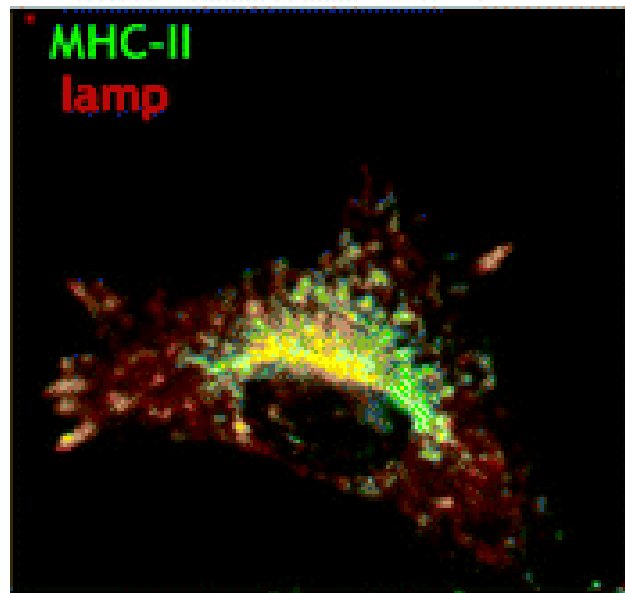
Inducido por IFN $\gamma$

- Aumenta su expresión por exposición a estímulos.  
EJ: IL-4 para LB ,  
IFN $\gamma$  para macrófagos.

La activación Celular afecta el nivel de expresión de la molécula CMH

- Células que no expresan CMH-II pueden expresar frente a un estímulo.  
Ej: fibroblastos, astrocitos, células endoteliales y células epiteliales frente a IFN $\gamma$ .(inflamación- infección- trauma) Problema ?
- Puede variar su expresión en los distintos estadios de diferenciación.  
Ej: pre-B -LB-CP  
CDi- CDm.
- CMH-II es regulado por CIITA (transactivador de clase II); y este por IFN $\gamma$ .
- El IFN $\gamma$  puede ser modulado por TGF $\beta$ , IFN $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-1, IL-10, drogas, patógenos.
- **Terapéutica:** statin: inhibe CIITA  
transfectar con vectores con CIITA

## Immature DC



Peripheral and lymphoid tissues

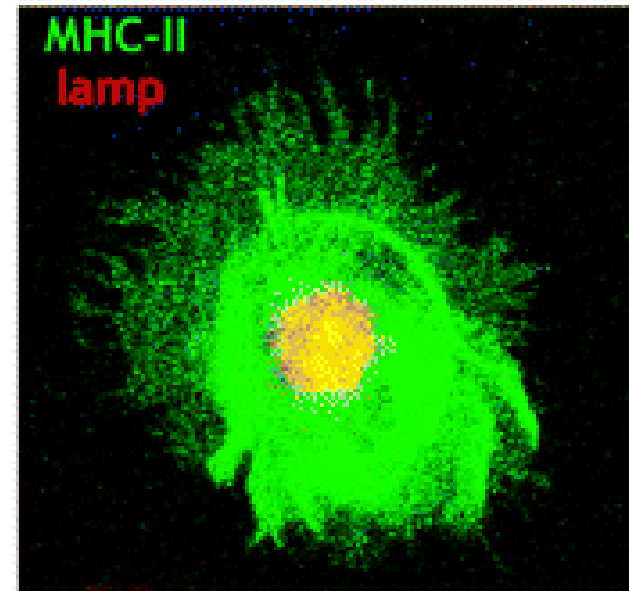
Highly endocytic

Low surface MHC-II and costimulators

Antigen accumulation



## Mature DC



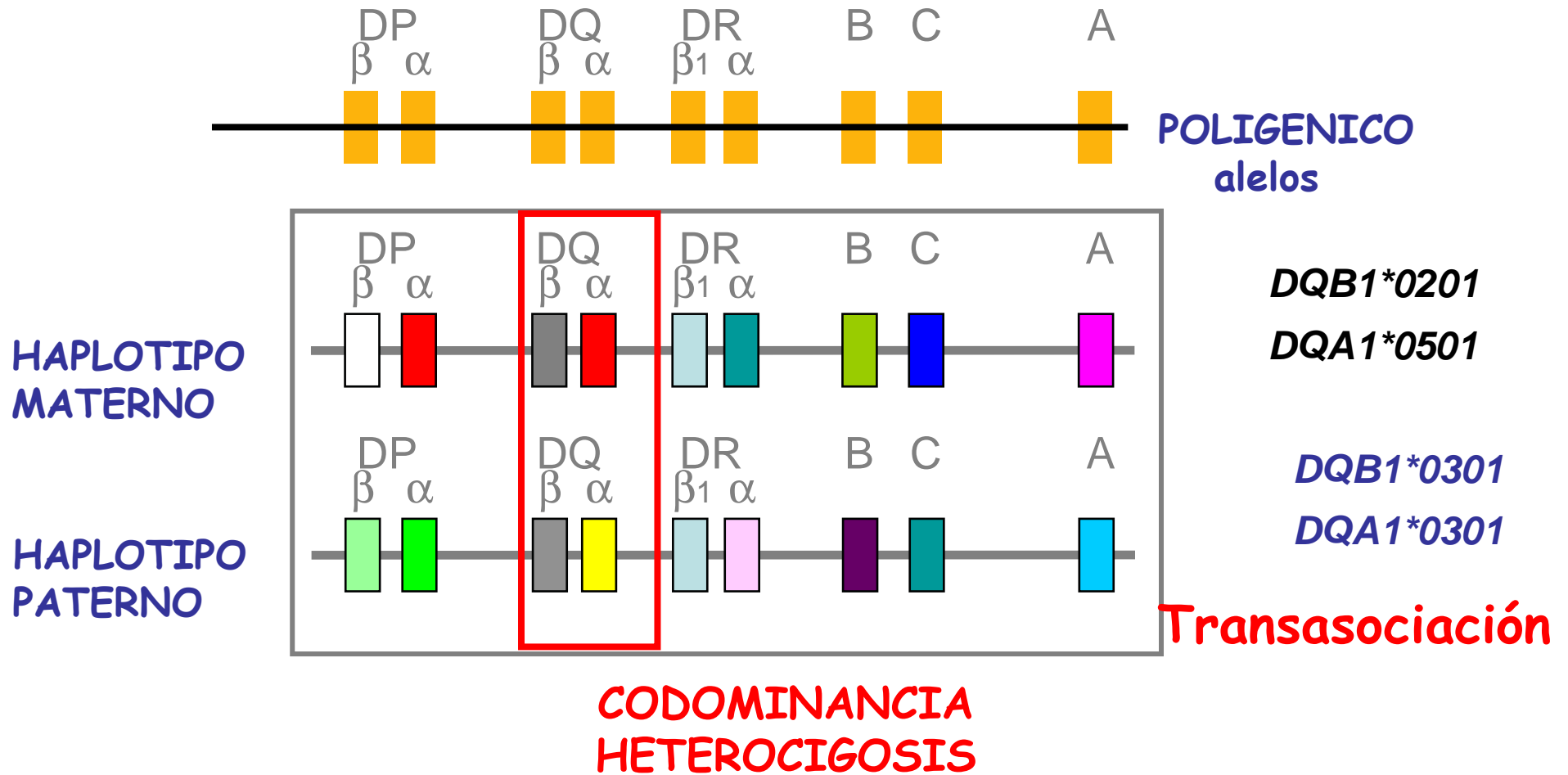
Lymphoid tissues

Endocytosis reduced

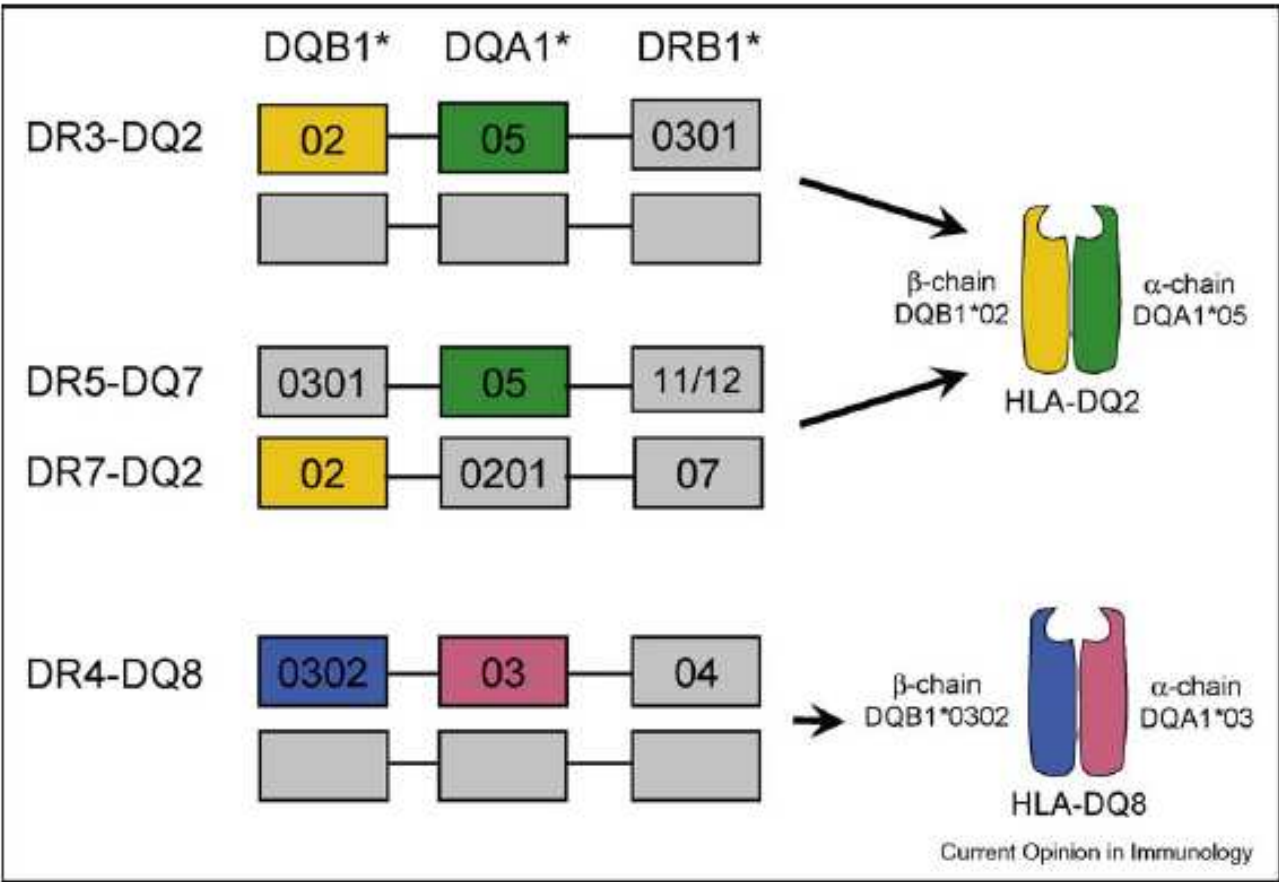
High surface MHC-II and costimulators

T cell stimulation

# Características



LOS GENES DEL CMH SE HEREDAN USUALMENTE EN GRUPO .  
**HAPLOTIPO CMH**  
**DESEQUILIBRIO DE LIGAMENTO**



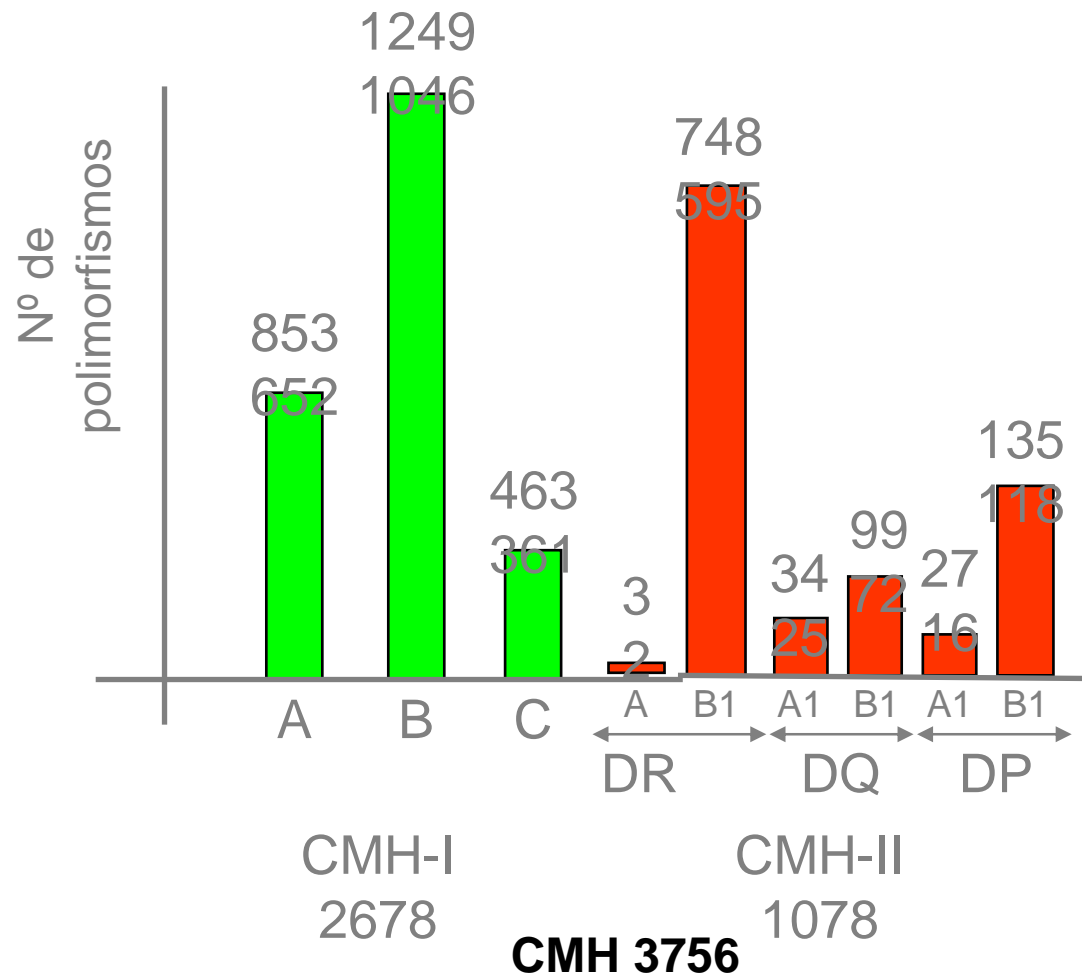


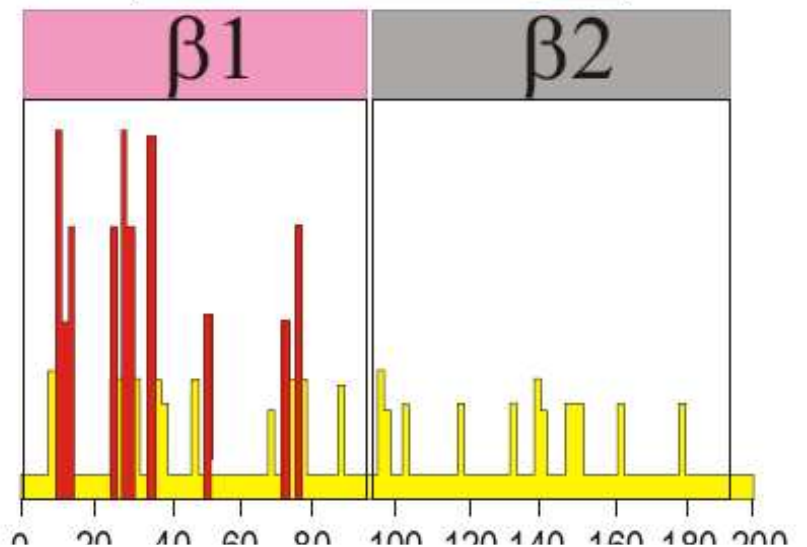
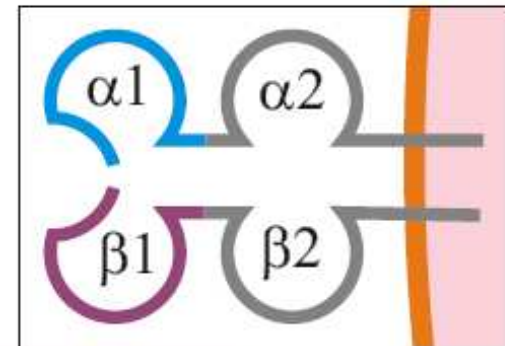
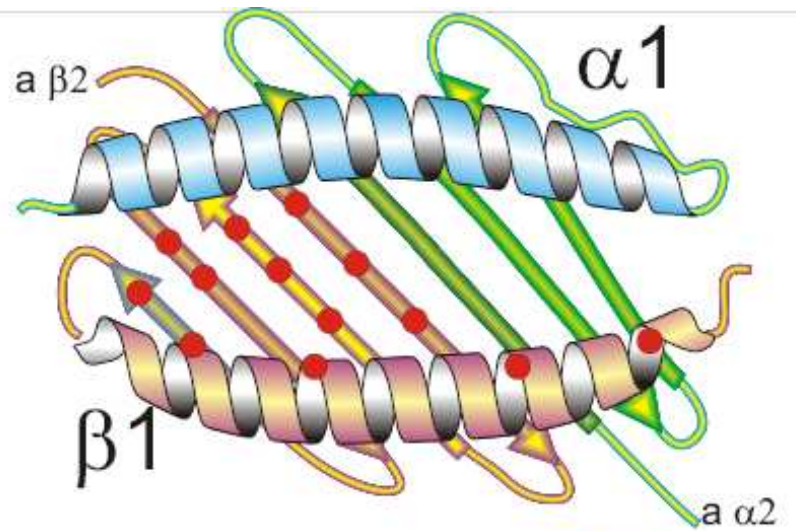
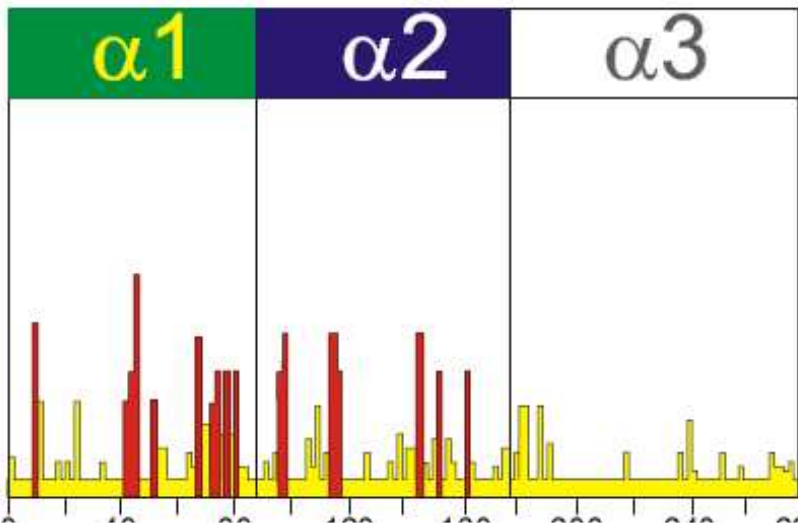
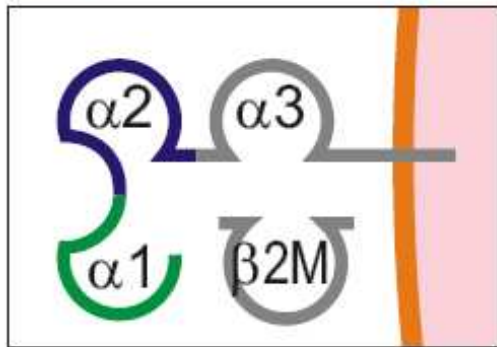
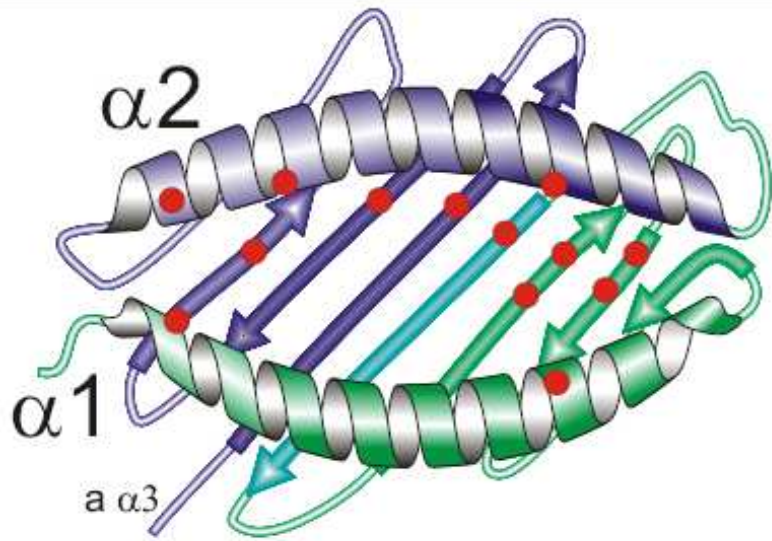
- ¿El MHC presenta la misma diversidad que los Anticuerpos y TCR?  
El número de tipos de moléculas CMH es limitado.
- ¿ Su generación es dinámica como BCR y TCR ?  
Tipo y variante de CMH es la misma durante toda la vida del individuo.

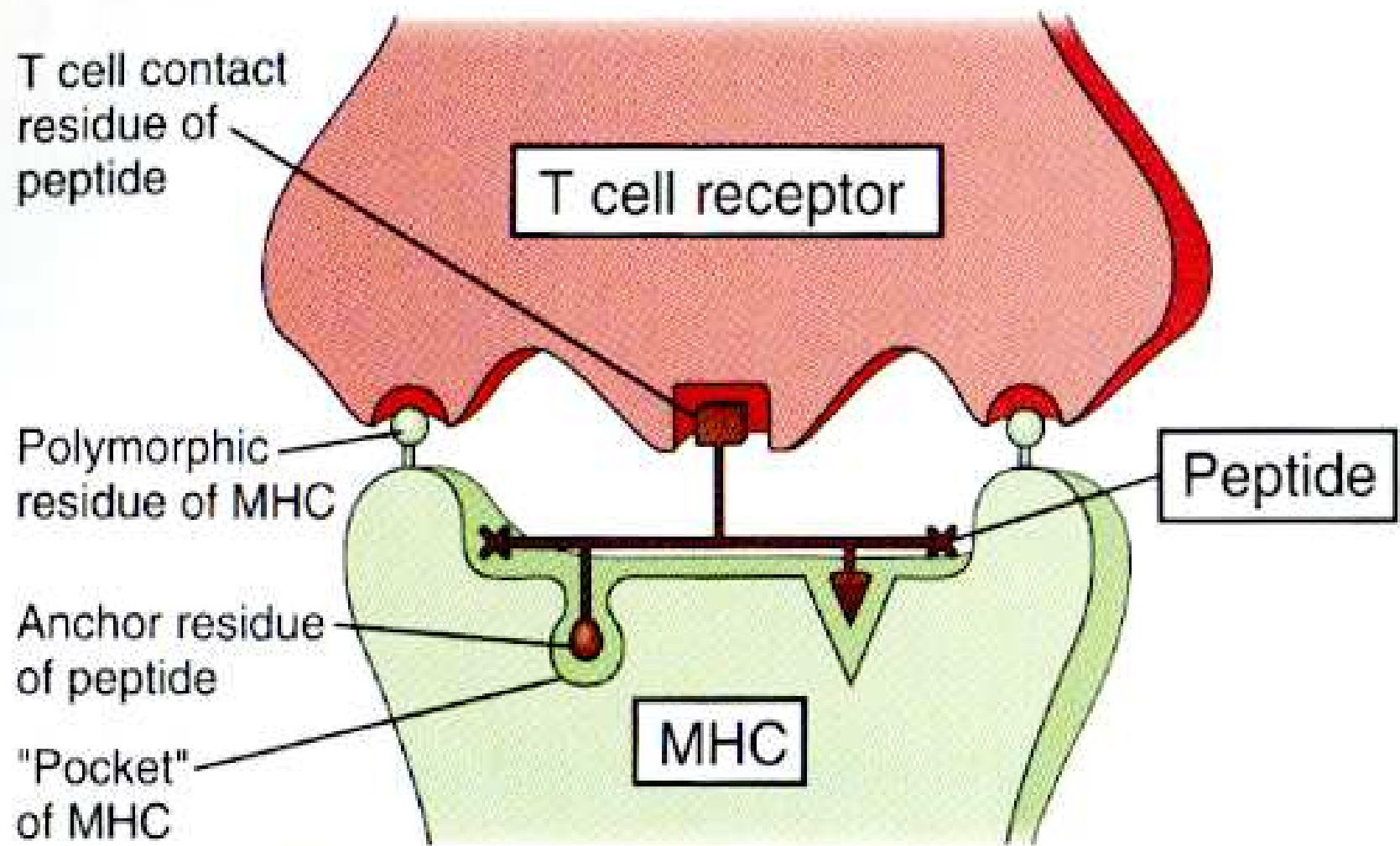
¿Como contrarestamos la flexibilidad del patogeno?

# Polimorfismo de genes CMH

Cada variante polimórfica es un alelo

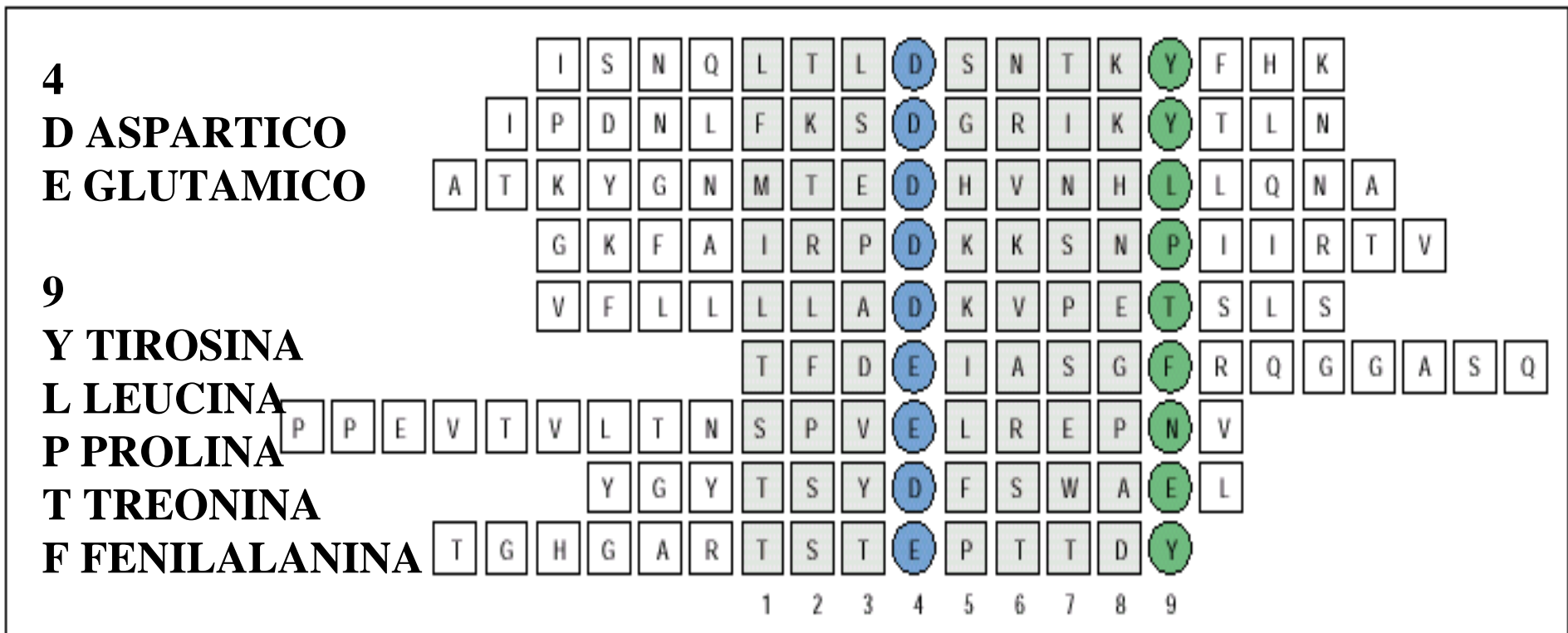
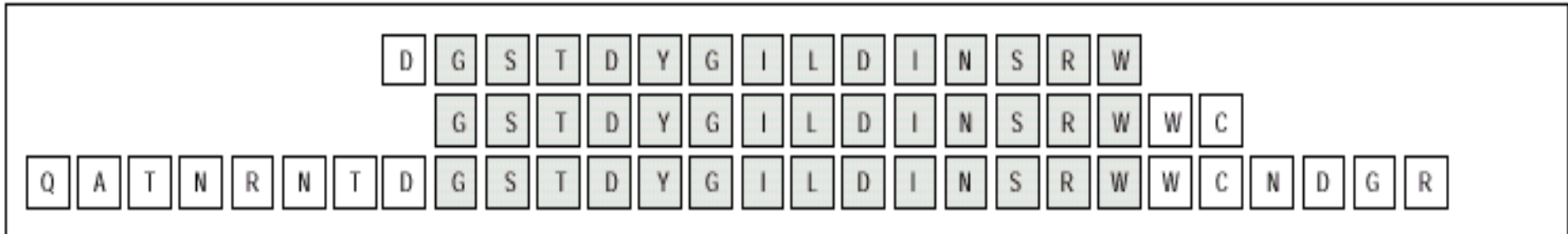




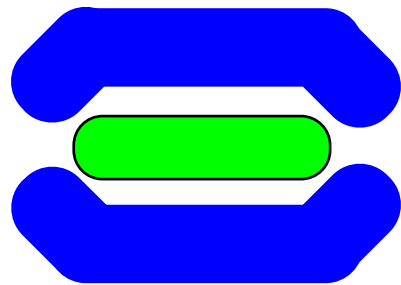
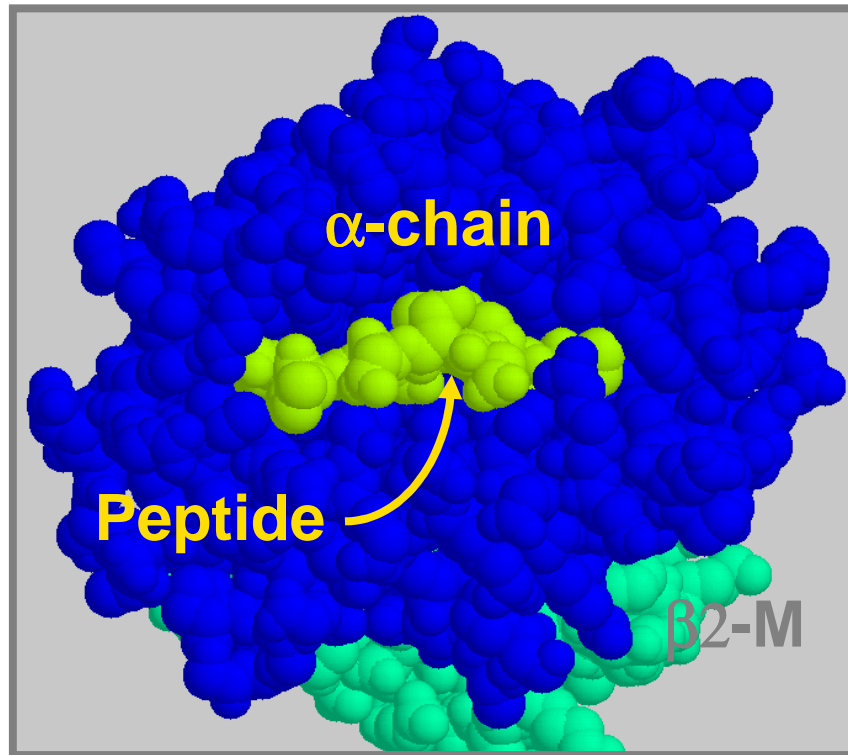


**Figure 4-1 T cell recognition of a peptide-MHC complex.**

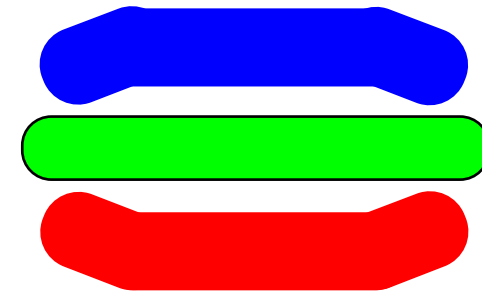
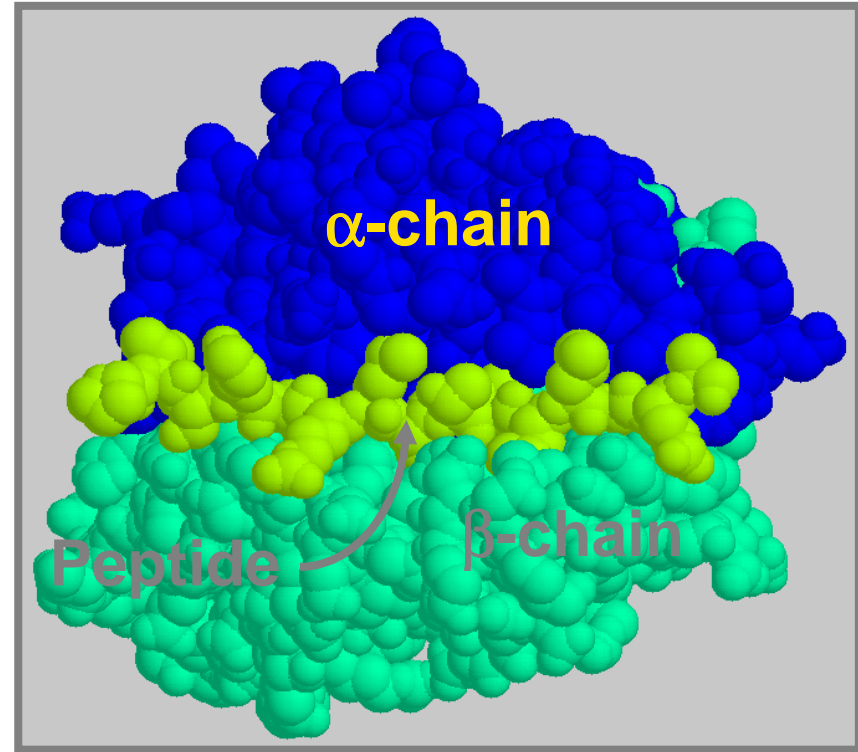
# Residuos de anclaje en péptido interactúan Con la molécula de histocompatibilidad (II)



¿cual es el tamaño del peptido que albergan?

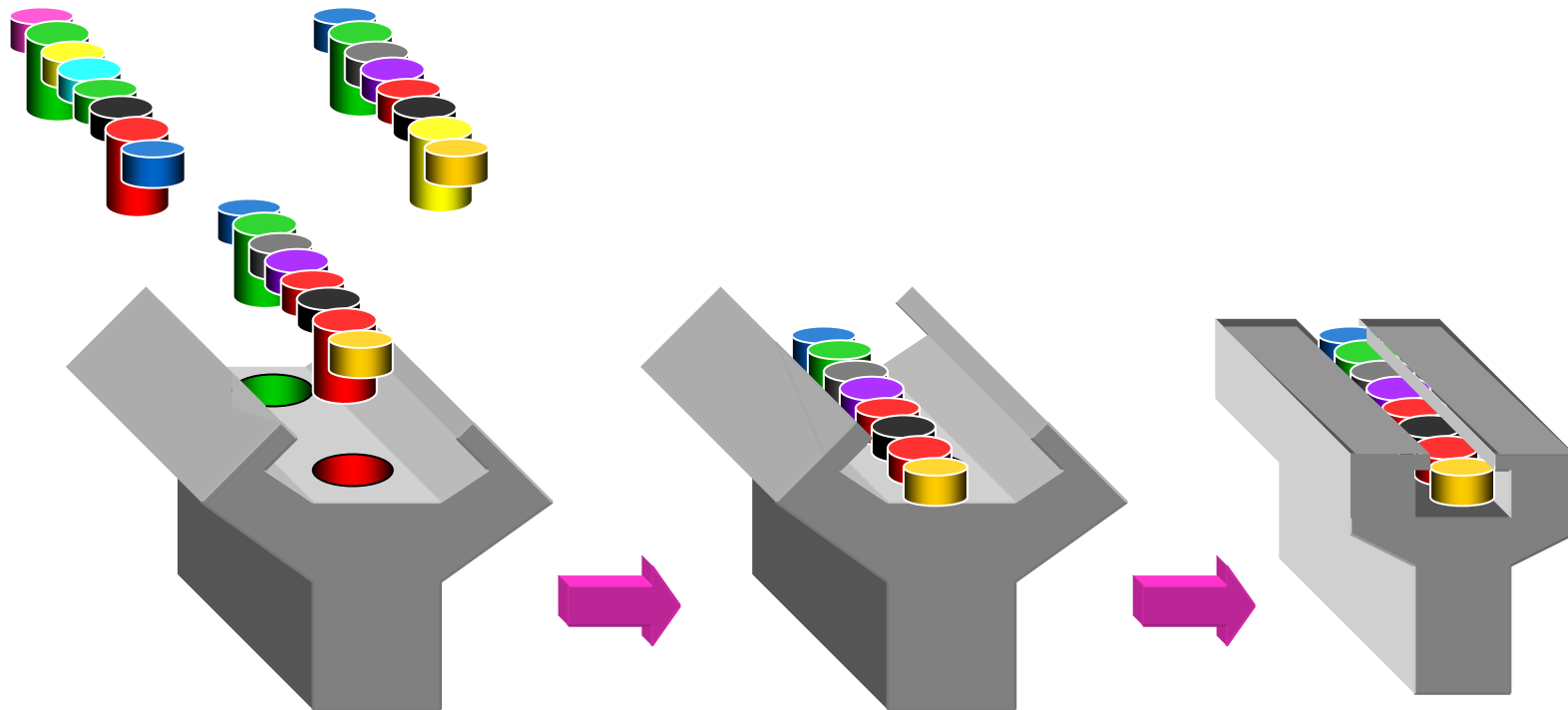


CMH-I acomoda  
peptidos de 8-10 amino acidos



CMH-II acomoda peptidos  
de >13 amino acidos

Cada molécula de CMH puede acomodar muchos péptidos distintos(pero solo 1 por vez) y cada peptido puede unirse a muchos CMH :  
**PROMISCUIDAD**



¿DE DONDE PROVIENEN LOS PEPTIDOS?

¿Siempre un peptido presentado por CMH genera respuesta?

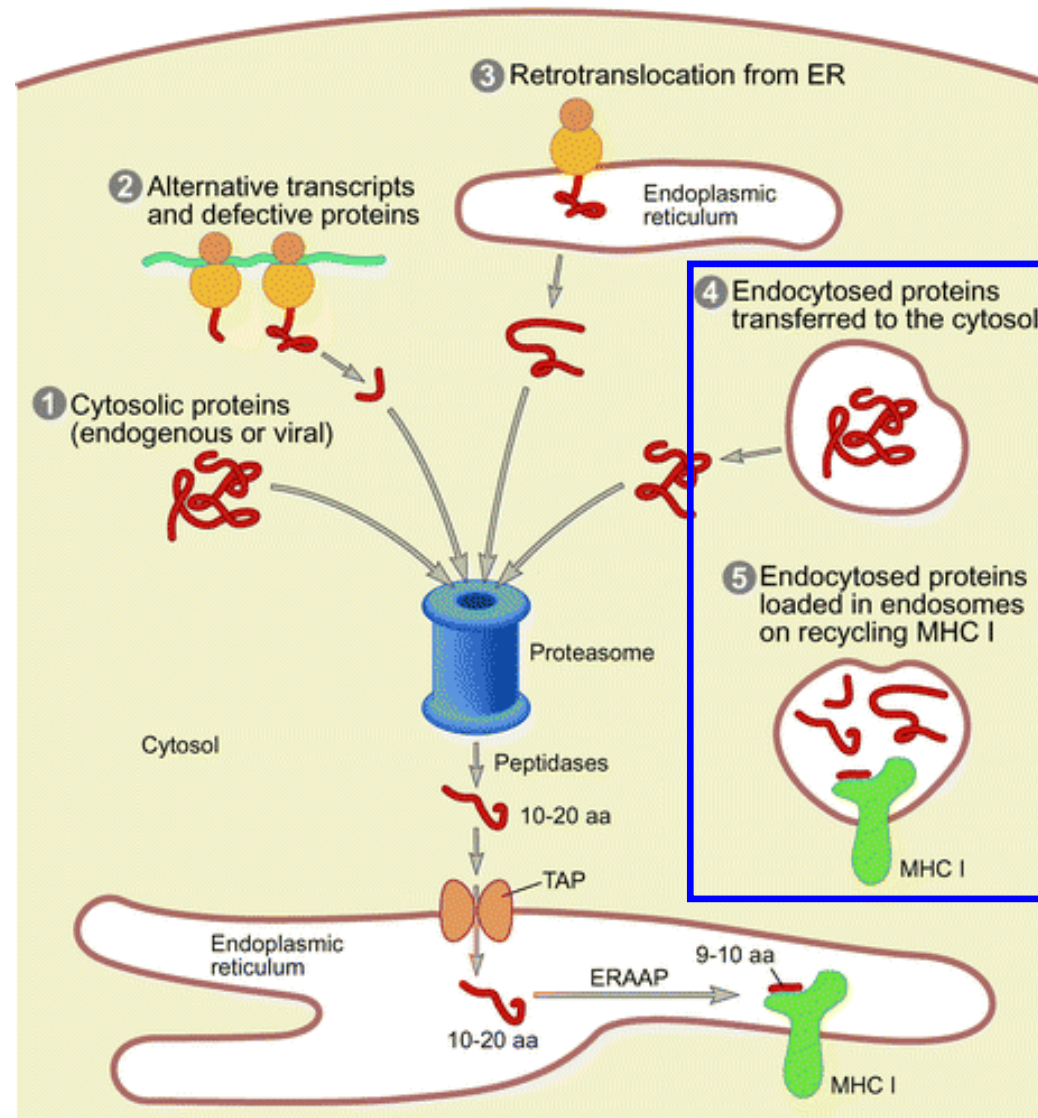
En una célula:

¿Puede expresarse el mismo peptido varias veces?

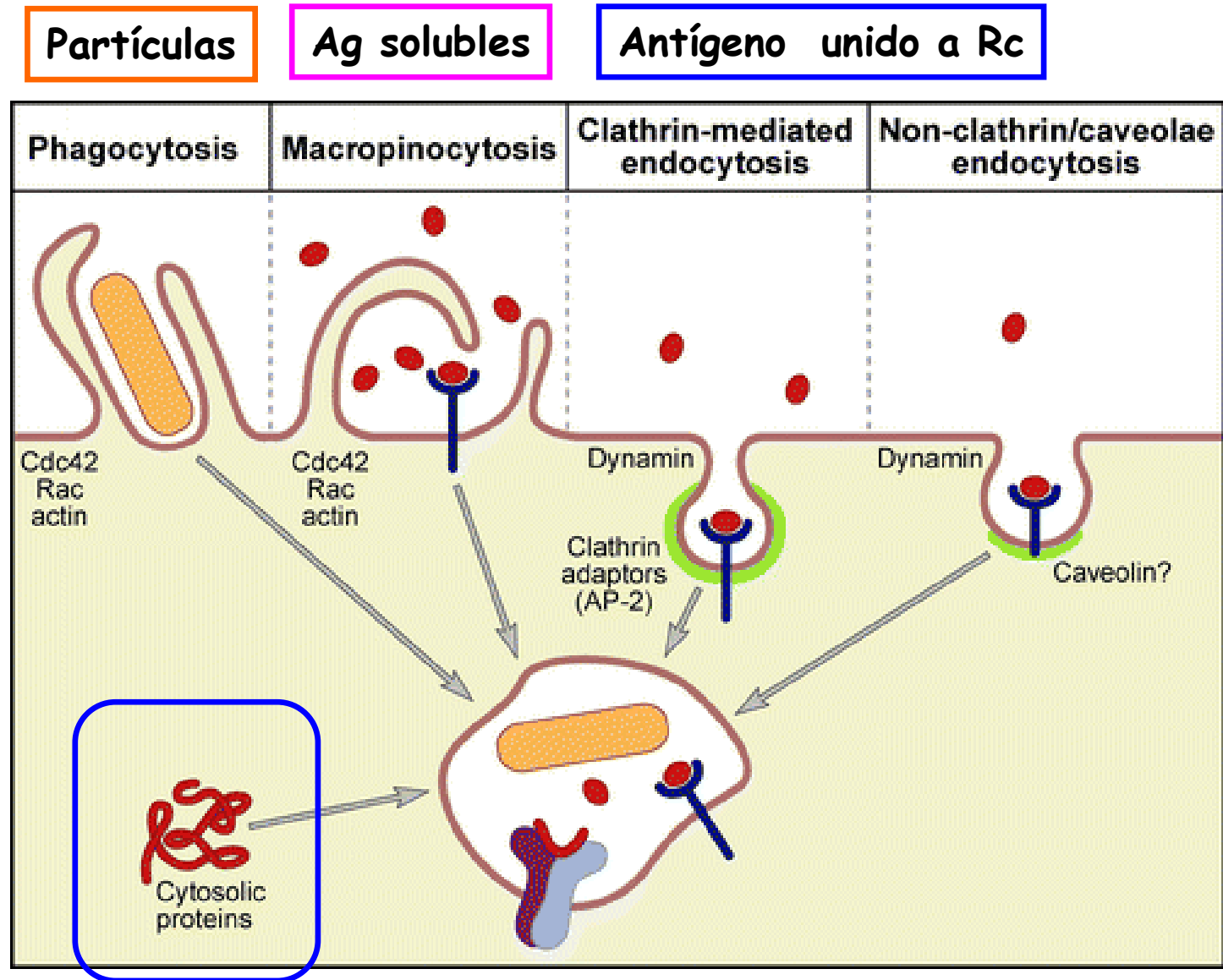
¿puede un mismo antígeno presentar diferentes péptidos en distintos individuos y generar respuesta diferente?



# Fuentes de antígeno para CMH-I

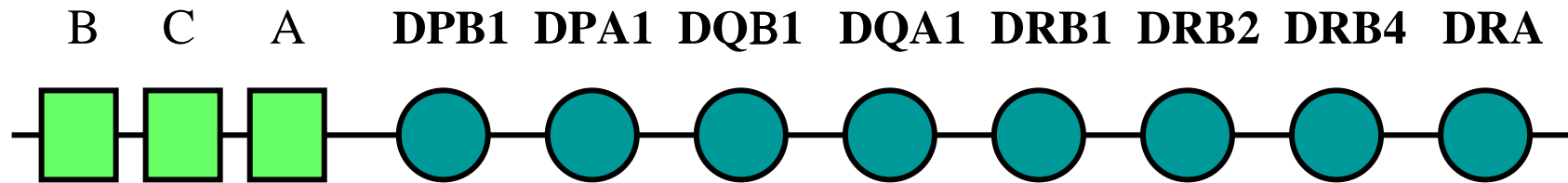


# Fuentes de Ag para presentación por CMH- II



**Autofagia**

# Nomenclatura del CMH



HLA-A\*0302 (Locus A; grupo 3; alelo 2)

HLA-CW\*0411 (Locus C; grupo 4; alelo 11)

HLA-DRB1\*0202

(Locus DRB1; grupo 2; alelo 2)

# POLIMORFISMO. Técnicas serológicas

A1  
A2  
A203  
A210  
A3  
A11  
A23 (9)  
A24 (9)  
A2403  
A25 (10)  
A26 (10)  
A29 (19)  
A30 (19)  
A31 (19)  
A32 (19)  
A33 (19)  
A34 (10)  
A36  
A43  
A66 (10)  
A68 (28)  
A69 (28)  
A74 (19)  
A80

**24**

B7  
B703  
B8  
B13  
B18  
B27  
B2708  
B35  
B37  
B38 (16)  
B39  
B3901  
B3902  
B41  
B42  
B44 (12)  
B45 (12)  
B46  
B47  
B48  
B49 (21)  
B50 (21)  
4005 (21)  
B51 (5)  
B5102  
B5103  
B52 (5)

B53  
B54 (22)  
B55 (22)  
B56 (22)  
B57 (17)  
B58 (17)  
B59  
B60 (40)  
B61 (40)  
B62 (15)  
B63 (15)  
B64 (14)  
B65 (14)  
B67  
B71 (70)  
B72 (70)  
B73  
B75 (15)  
B76 (15)  
B77 (15)  
B78  
B81

**49**

Bw4  
Bw6

Cw1  
Cw2  
Cw4  
Cw5  
Cw6  
Cw7  
Cw8  
Cw9 (3)  
Cw10(3)

**9**

DR1  
DR103  
DR4  
DR7  
DR8  
DR9  
DR10  
DR11 (5)  
DR12 (5)  
DR13 (6)  
DR14 (6)  
DR1403  
DR1404  
DR15 (2)  
DR16 (2)  
DR17 (3)  
DR18 (3)

**17**

DR51  
DR52  
DR53

DQ2  
DQ4  
DQ5 (1)  
DQ6 (1)  
DQ7 (3)  
DQ8 (3)  
DQ9 (3)

**7**

DPw1  
DPw2  
DPw3  
DPw4  
DPw5  
DPw6

**6**

# Los alelos se expresan con diferente frecuencia en las distintas poblaciones

<i>HLA-A type</i>	<i>Bone marrow donors n = 750</i>	<i>All cord units n = 1500</i>	<i>European Caucasoid CBU n = 935</i>	<i>Non-European Caucasoid CBU n = 367</i>	<i>African and Afro- Caribbean CBU n = 152</i>	<i>Oriental CBU n = 29</i>
A1	33.5	32.8	36.8	30.2	21.1	6.9
A2	48.4	41.7	46.7	29.1	37.5	58.6
A3	25.6	19.7	25.0	8.7	17.1	6.9
A23 (9)	2.6	4.8	3.7	2.2	18.4	0
A24 (9)	14.7	16.7	13.6	26.2	9.2	34.5
A25 (10)	4.1	2.1	3.1	0.3	0.7	0
<b>A26 (10)</b>	2.3	7.4 <sup>a</sup>	6.9 <sup>b</sup>	10.1	4.6	3.4
A34 (10)	0	0.5	0	0.3	3.9	3.4
A66 (10)	0	0.6	0.7	0	0.7	0
A11	12.8	16.1	13.8	24.8	5.9	34.5
A29 (19)	8.8	5.5	6.9	1.9	5.9	0
A30 (19)	3.0	5.6	3.8	4.4	19.1	6.9
A31 (19)	3.4	4.3	4.0	6.3	2.0	0
A32 (19)	7.1	7.1	6.8	8.7	5.3	6.9
<b>A33 (19)</b>	0.8	6.3 <sup>a</sup>	2.7	14.2	7.9	13.8
A74 (19)	0.1	0.7	0.1	0.5	5.3	0
A68 (28)	6.1	9.5	6.8	14.4	14.8	0
A69 (28)	0	0.1	0.1	0.3	0	0
A36	0	0.8	0.1	0	6.6	0
A43	0	0	0	0	0	0
A80	0	0.1	0	0	1.3	0

# ¿Para que tipificamos?

- Estudios de histocompatibilidad para trasplante de órganos vascularizados
- Estudios de histocompatibilidad para trasplante de médula ósea
- Estudios de paternidad
- Estudios antropológicos para establecer posibles relaciones entre distintas poblaciones o grupos étnicos.
- Estudios de asociación de alelos del HLA con enfermedades (susceptibilidad)

**TABLE 20-3 MOLECULAR MIMICRY BETWEEN PROTEINS OF INFECTIOUS ORGANISMS AND HUMAN HOST PROTEINS**

Protein*	Residue†	Sequence‡
Human cytomegalovirus IE2	79	P D P L G R P D E D
HLA-DR molecule	60	V T E L G R P D A E
Poliovirus VP2	70	S T T K E S R G T T
Acetylcholine receptor	176	T V I K E S R G T K
Papilloma virus E2	76	S L H L E S L K D S
Insulin receptor	66	V Y G L E S L K D L
Rabies virus glycoprotein	147	T K E S L V I I S
Insulin receptor	764	N K E S L V I S E
<i>Klebsiella pneumoniae</i> nitrogenase	186	S R Q T D R E D E
HLA-B27 molecule	70	K A Q T D R E D L
Adenovirus 12 E1B	384	L R R G M F R P S Q C N
α-Gliadin	206	L G Q G S F R P S Q Q N
Human immunodeficiency virus p24	160	G V E T T T P S
Human IgG constant region	466	G V E T T T P S
Measles virus P3	13	L E C I R A L K
Corticotropin	18	L E C I R A C K
Measles virus P3	31	E I S D N L G Q E
Myelin basic protein	61	E I S F K L G Q E

\*In each pair, the human protein is listed second. The proteins in each pair have been shown to exhibit immunologic cross-reactivity.

†Each number indicates the position in the intact protein of the amino-terminal amino acid in the listed sequence.

‡Amino acid residues are indicated by single-letter code. Identical residues are shown in blue.

SOURCE: Adapted from MBA Oldstone, 1987, *Cell* 50:819.

# Asociaciones HLA-Enfermedad

Enfermedad	Gen HLA	Riesgo relativo
• Síndrome de Reiter	B27	37
• Espondilitis anquilosante	B27	86
• Tiroiditis de Hashimoto	B47	15
• Esclerosis Múltiple	DR2	5
• Artritis Reumatoide	DR4	4
• Diabetes Juvenil	DR3/DR4	3 - 6
• Enfermedad Celíaca	DQ2 / DQ8	48



# MHC y enfermedad

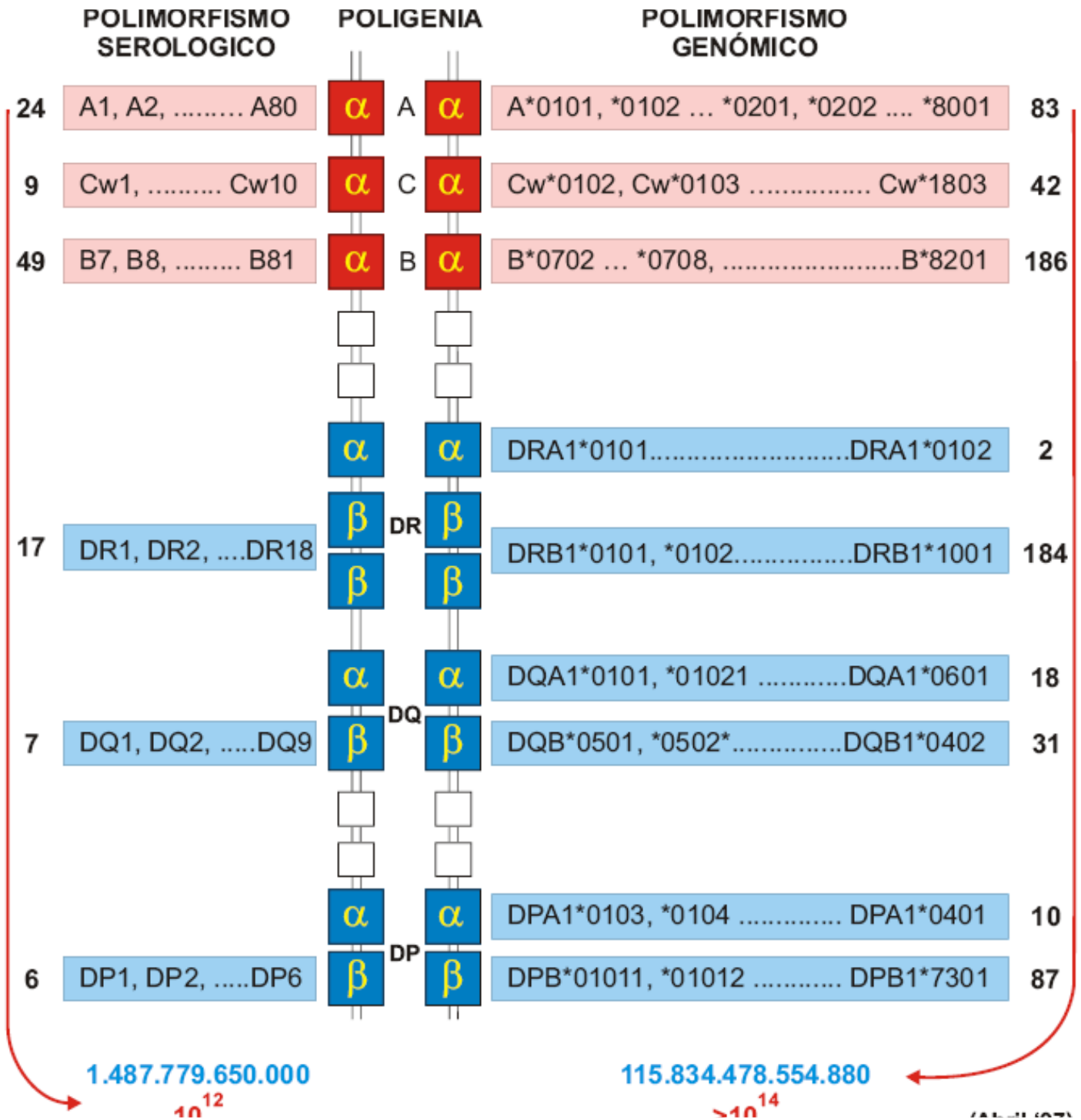
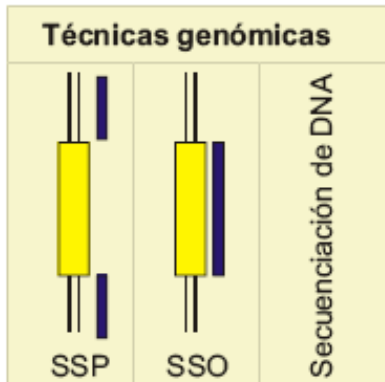
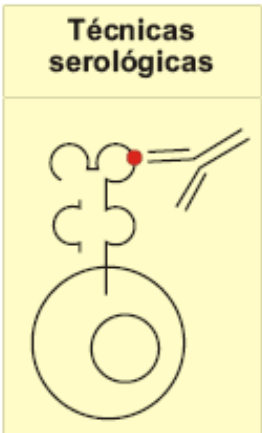
Espondilitis anquilosante y HLA-B27

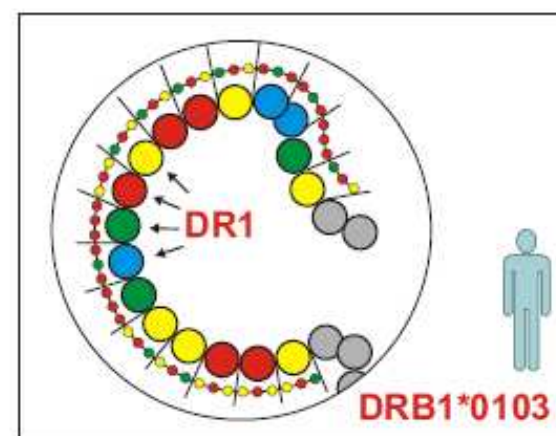
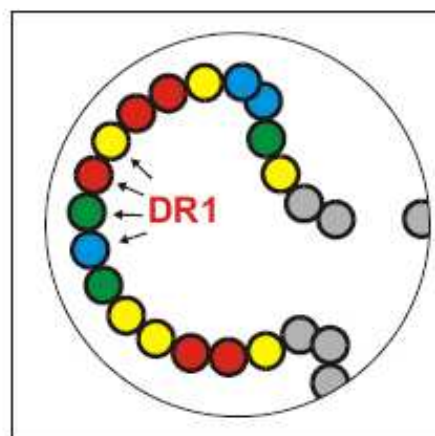
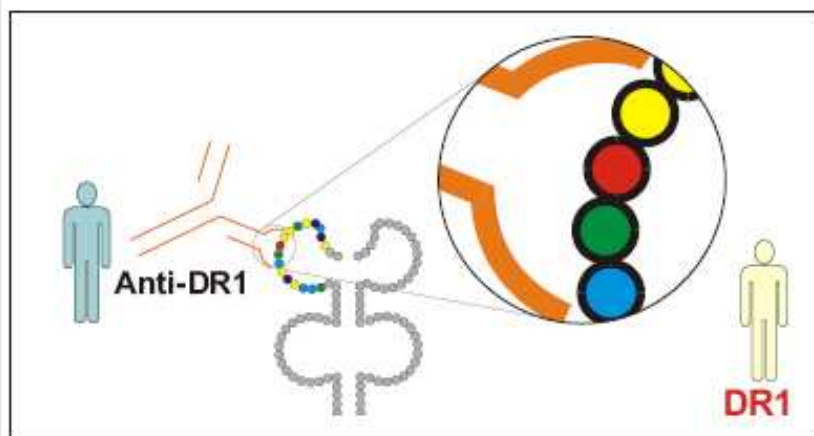
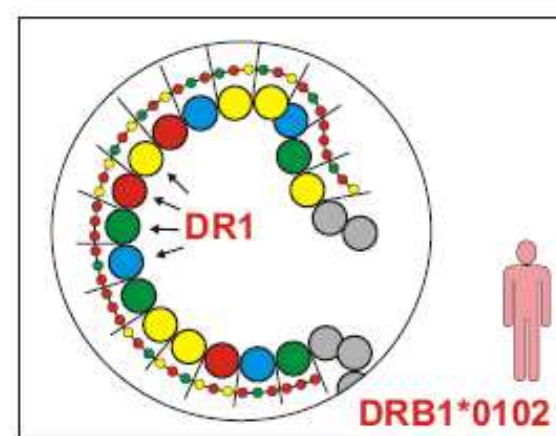
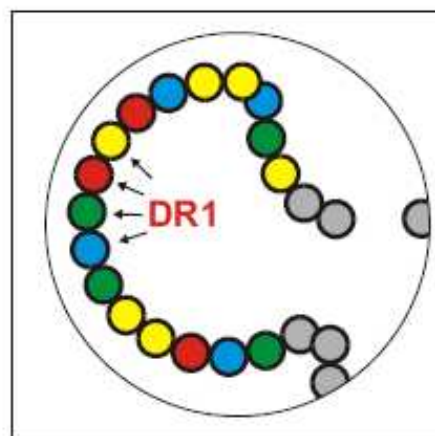
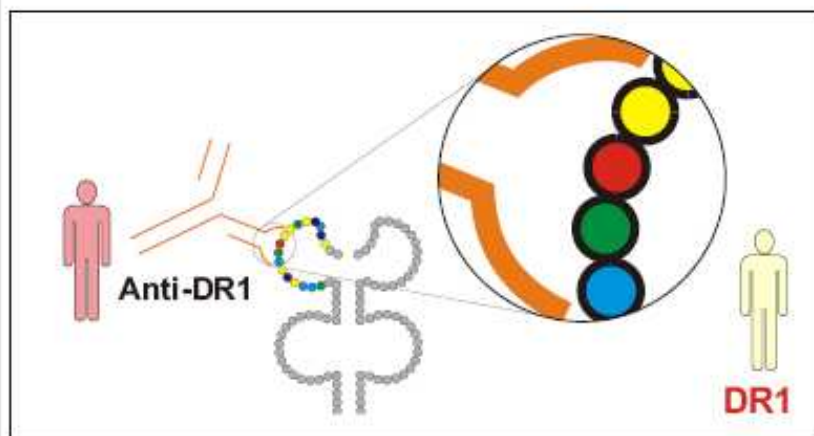
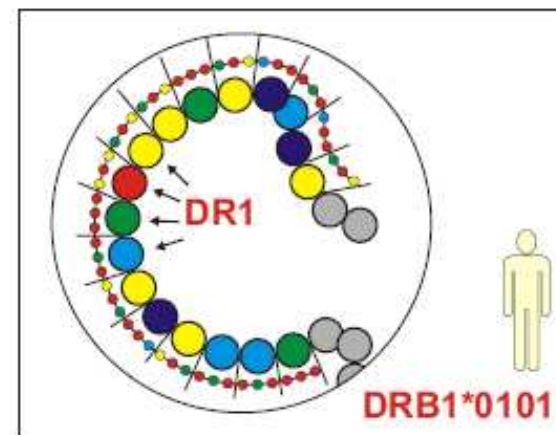
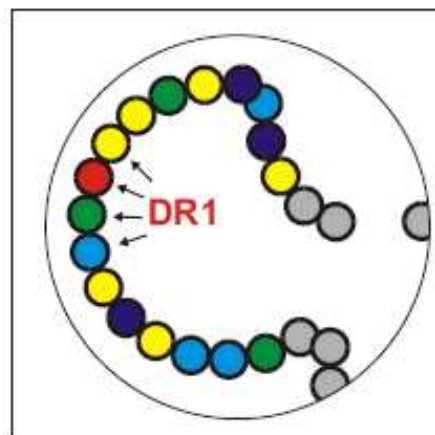
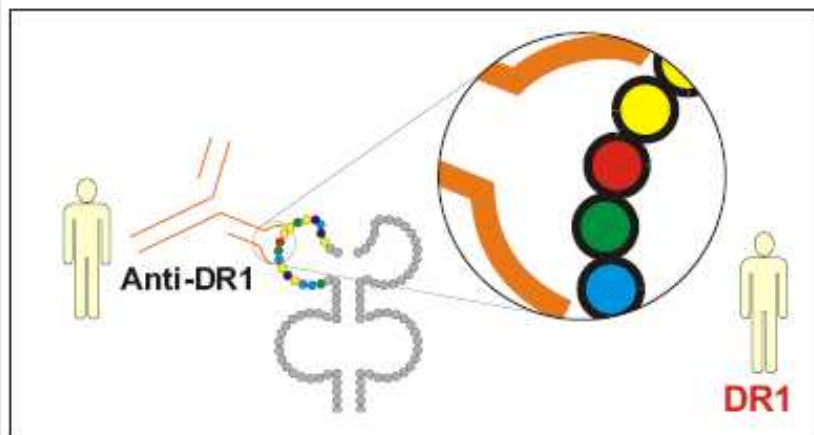
Riesgo Relativo:  $\frac{\text{Ag}^+ / \text{Ag}^- \text{ enfermos}}{\text{Ag}^+ / \text{Ag}^- \text{ sanos}}$

**¿Cómo estudiamos en el laboratorio CMH?**

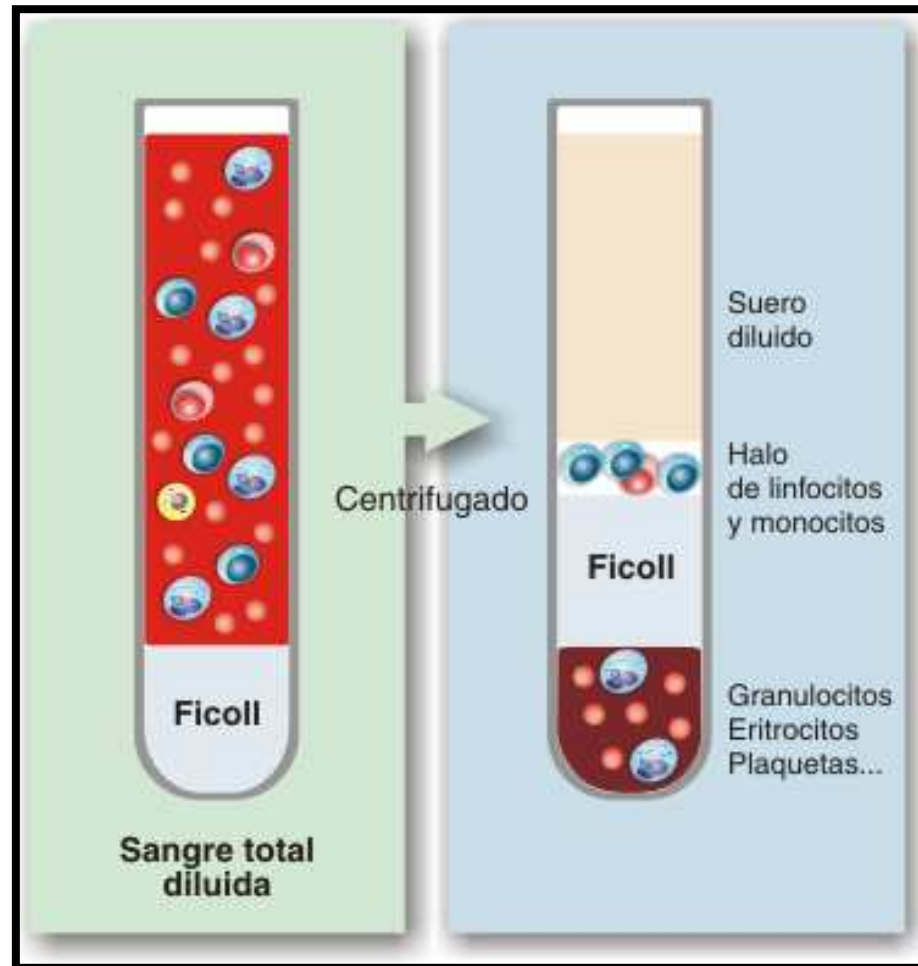
# ¿Cómo tipificamos?

- Técnicas serológicas: microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki
- Técnicas moleculares
  - PCR con cebadores específicos de secuencia (SSP)
  - PCR con cebadores específicos de locus e hibridización con sondas marcadas, específicas de alelos (SSOP)
  - Secuenciación directa (SBT)
  - Hibridación reversa
  - Luminex

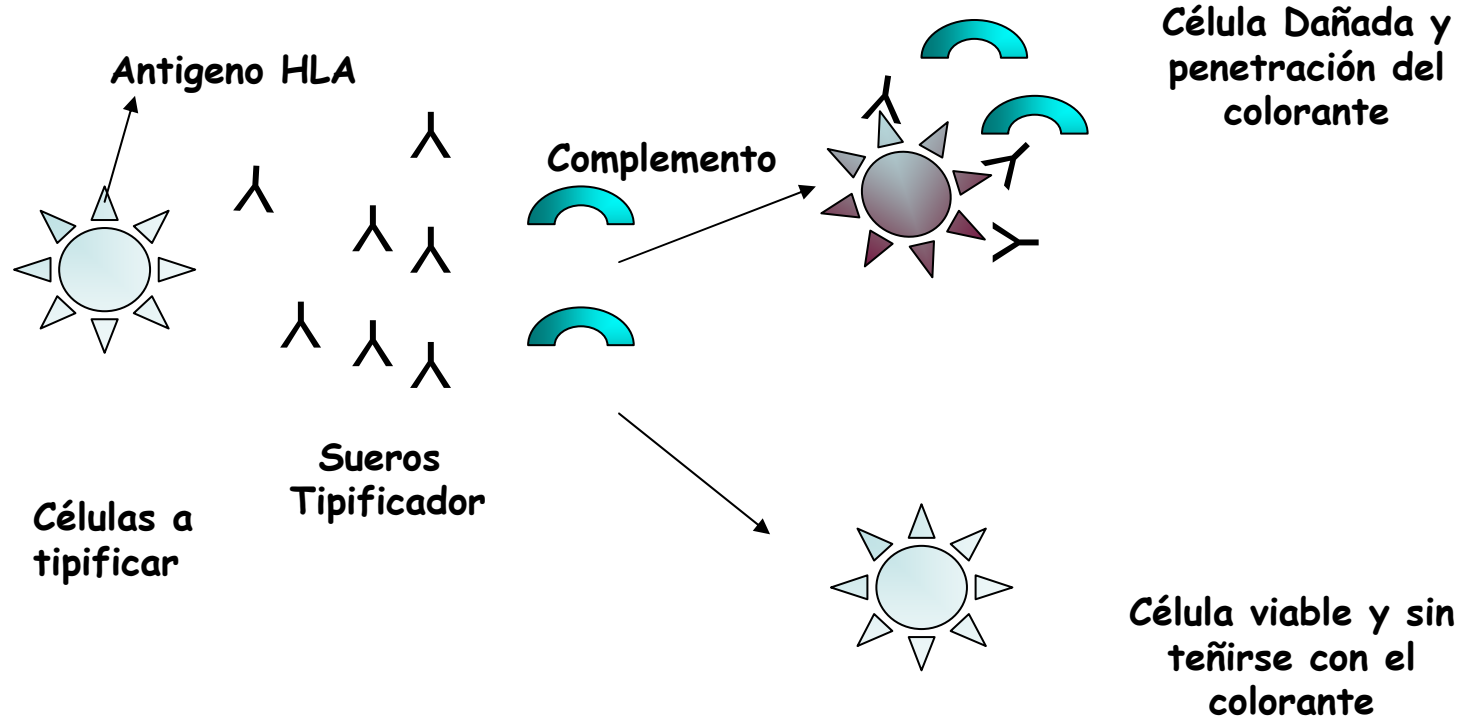




# Separación de células mononucleares



# Tipificación serológica



## Inconvenientes:

- Células vivas
- Sueros tipificadores

# Técnica Serológica

## Origen de los sueros:

- mujeres multíparas (4 o más hijos del mismo padre), pacientes que hayan rechazado un transplante previo, pacientes politransfundidos.

.

## Inconvenientes:

- La técnica debe realizarse sin interrupción.
- Baja resolución.
- No existen sueros contra alelos poco frecuentes.
- La mayoría de los sueros no son monoespecíficos y presentan reactividad cruzada con otros alelos ("grupos de reactividad cruzada" o "CREGs"): interpretación difícil.
- No adecuado para tipificación de donantes cadavéricos .
- No se detecta homocigosis (en general se informa 1 alelo y el otro se informa como "blanco").
- Ambigüedades (no se pueden definir determinadas combinaciones de alelos)

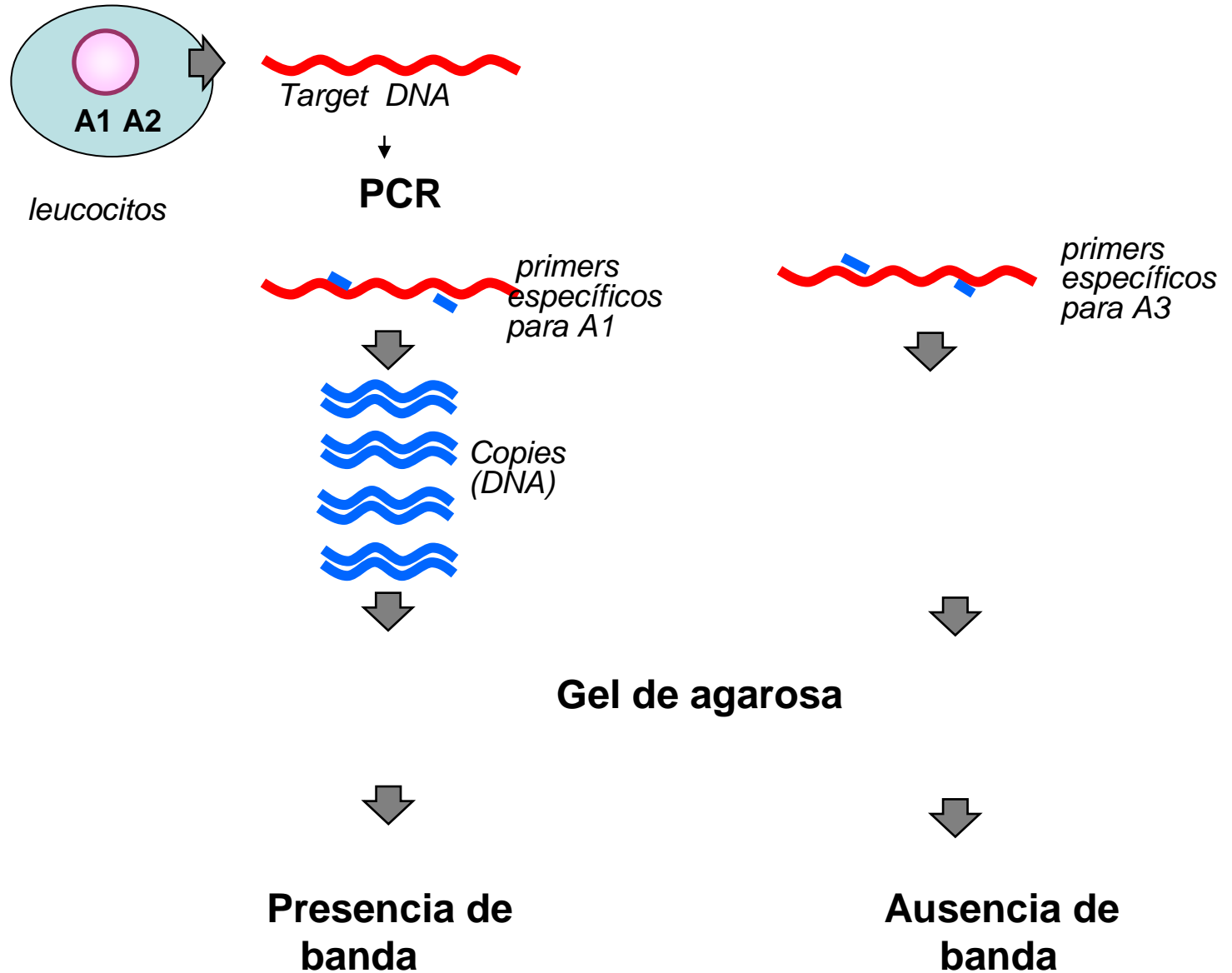


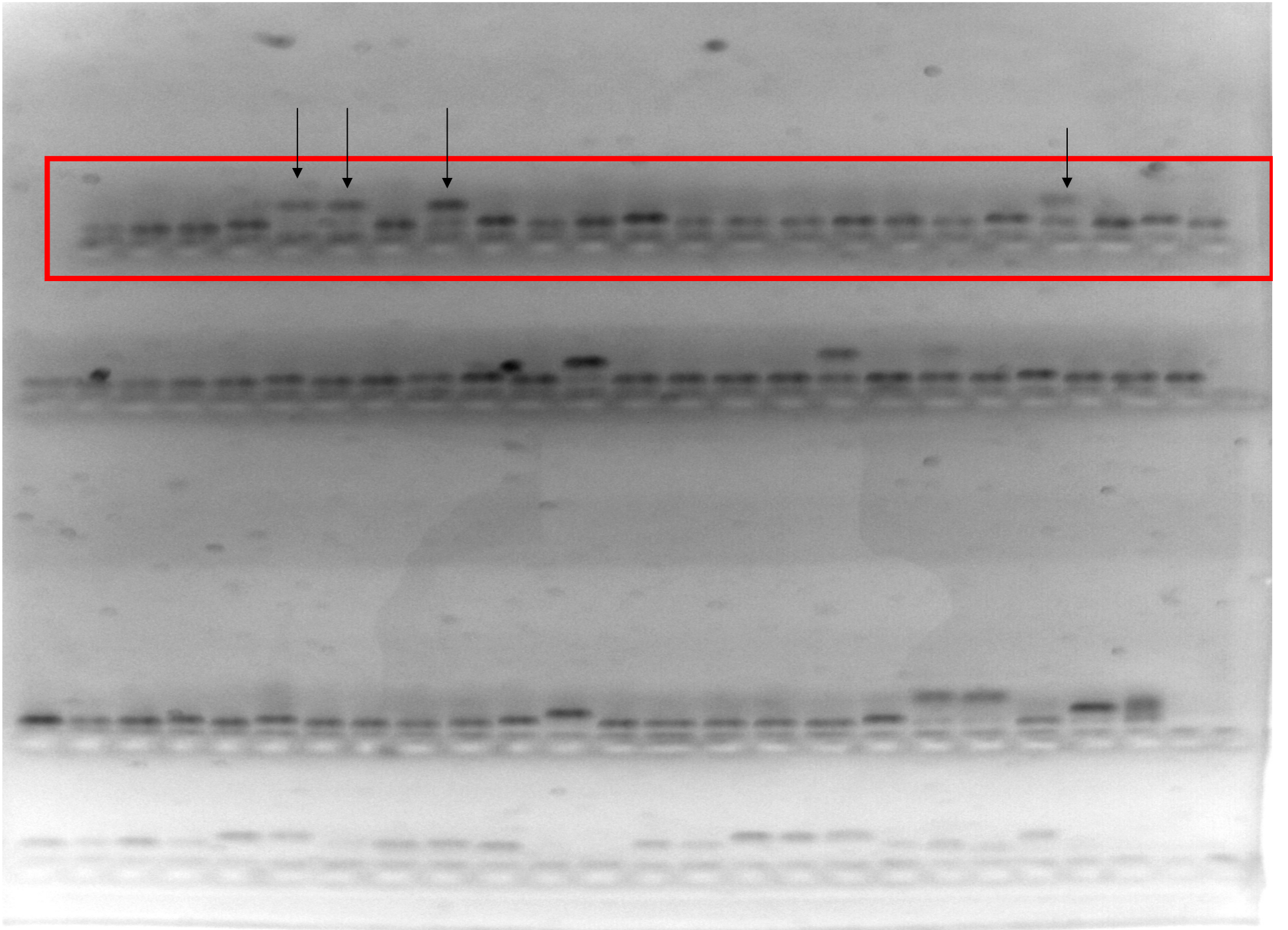
# Técnicas de BM ¿Cómo se estudia?

## A partir de sangre periférica

- Extracción DNA
  - Amplificación (Técnica de PCR)
    - con primer específico: SSP-PCR
    - con primer genérico: SSOP-PCR
- Hibridación Reversa

# Primer alelo específico (SSP)





# PCR con cebadores específicos de secuencia (SSP)

## Ventajas:

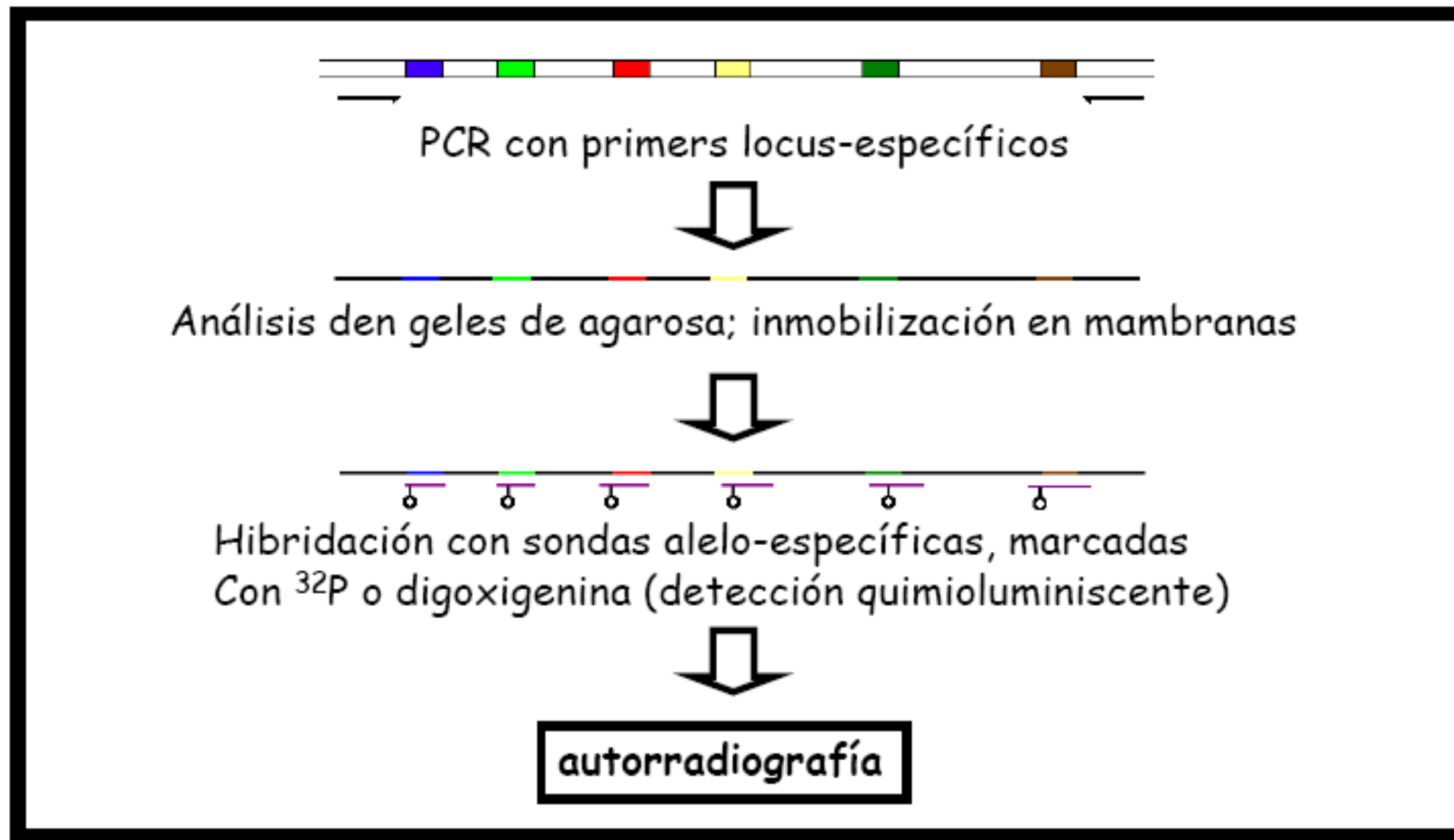
- Técnica sencilla
- poco equipamiento sofisticado (máquina para PCR).
- No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera).
- Resolución mayor que las técnicas serológicas ("Resolución intermedia").
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos.
- Permite la detección de alelos "nulos".
- Es adecuado para tipificación de donantes cadavéricos

## Desventajas:

- No es adecuado para tipificación de donantes de médula ósea no relacionados.
- Presenta ambigüedades.
- Cada par de "primers" amplifica unos pocos alelos del HLA, por lo que será necesario el empleo de un gran número de pares de "primers"
- No resulta práctico para análisis simultáneo de un gran número de muestras .
- No se detecta homocigosis.

## Técnicas moleculares:

PCR con primers específicos de locus e hibridación con sondas marcadas, específicas de alelos (SSO)



# PCR con cebadores específicos de locus e hibridación con sondas marcadas, específicas de alelos (SSOP)

## **Ventajas:**

No requiere el aislamiento de células (sangre entera).

Alta resolución.

Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos.

Es posible detectar homocigosis y alelos "nulos".

Adecuado para tipificación de donantes cadavéricos.

Permite el análisis simultáneo de un número grande de muestras.

## **Desventajas:**

Interpretación compleja (reactividad cruzada entre sondas, detección de determinadas combinaciones de alelos producen patrones similares).

Las condiciones de lavado de las diferentes sondas pueden ser diferentes, lo que complica en procesamiento simultáneo de muchas muestras.

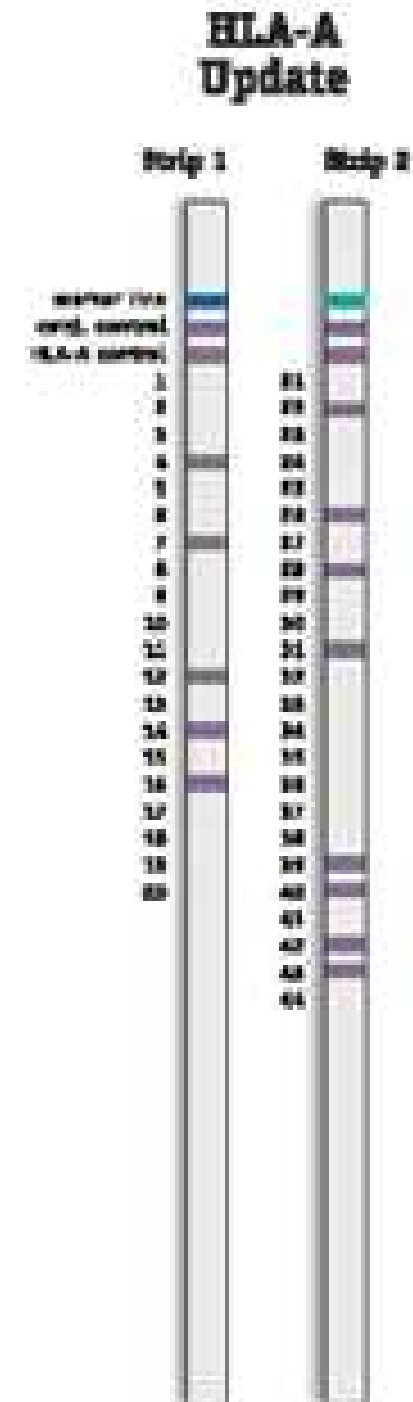
A pesar de su elevada resolución, siguen existiendo ambigüedades.

Técnica compleja y costosa que requiere equipamiento algo más sofisticado (máquina para PCR, horno para hibridaciones, infraestructura para manipulación de radioisótopos).

Generación de desechos radiactivos.

# Hibridación Reversa

Sondas específicas pegadas a una membrana de nitrocelulosa  
Primer biotinilado  
avidina- peroxidasa  
Revelado por color.



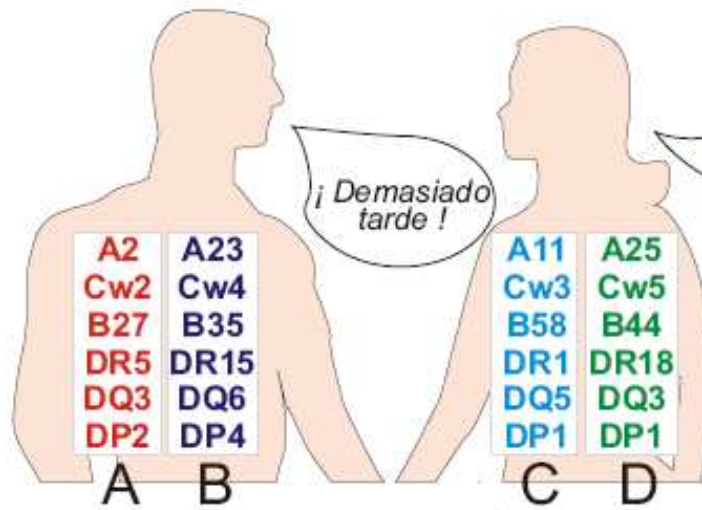
Ejemplo:

Niño de 6 años con Aplasia Medular solicita estudio de histocompatibilidad para posible trasplante de médula ósea.

**¿Posibles donantes?**



**A veces es muy fácil encontrar ese HLA idéntico ...**



¡ Demasiado tarde !

De verdad, cariño ¿No te importa que sea homocigótica DP1?



A2	A11
Cw2	Cw3
B27	B58
DR5	DR1
DQ3	DQ5
DP2	DP1

A C



A2	A25
Cw2	Cw5
B27	B44
DR5	DR18
DQ3	DQ3
DP2	DP1

A D



A23	A11
Cw4	Cw3
B35	B58
DR15	DR1
DQ6	DQ5
DP4	DP1

B C



A23	A25
Cw4	Cw5
B35	B44
DR15	DR18
DQ6	DQ3
DP4	DP1

B D

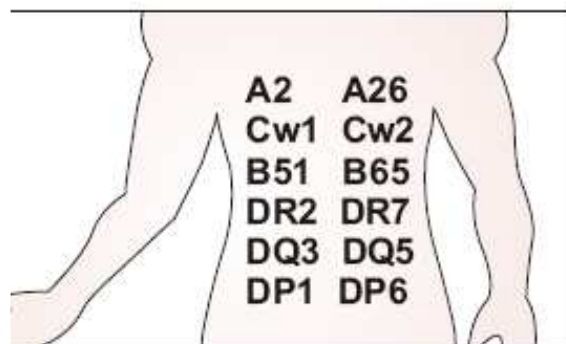
Con esta combinación...  
¡ no hay quinto malo !

A2	A25
Cw2	Cw5
B27	B44
DR5	DR18
DQ3	DQ3
DP2	DP1

A D

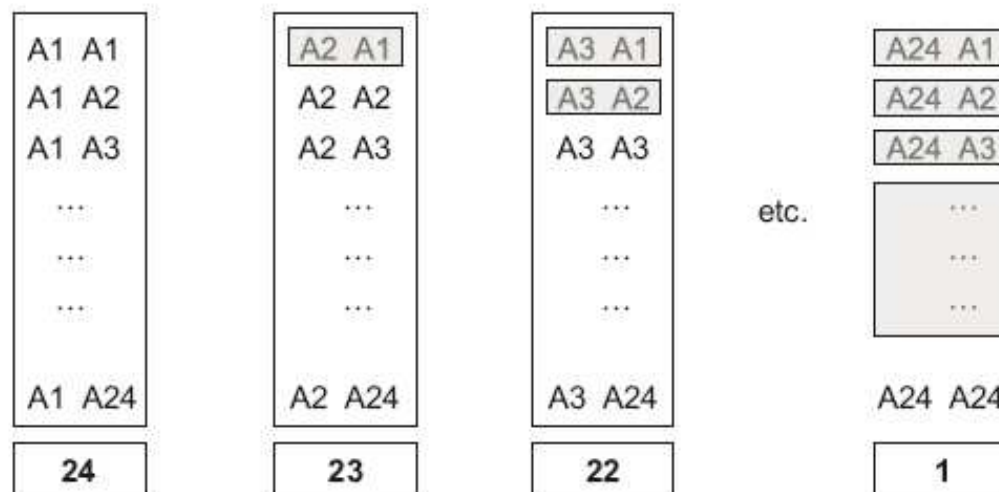


**¿Que probabilidad  
existe de encontrar  
dos individuos  
HLA idénticos?**



Con el polimorfismo que detecta la serología...

**Locus A (24 alelos)**



$24 + 23 + 22 + 21 + \dots + 1 = 300$

**Locus C (9 alelos)**  $9 + 8 + 7 + 6 + 5 + 4 + 3 + 2 + 1 = \longrightarrow 45$

**Locus B (49 alelos)**  $49 + 48 + 47 + 46 + 45 + 44 + 43 + 42 + \dots + 1 = \longrightarrow 1.225$

**Locus DR (17 alelos)**  $17 + 16 + 15 + 14 + 13 + 12 + 11 + \dots + 1 = \longrightarrow 153$

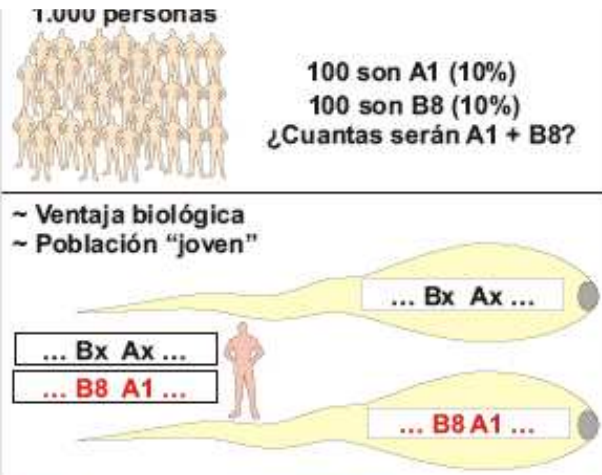
**Locus DQ (7 alelos)**  $7 + 6 + 5 + 4 + 3 + 2 + 1 = \longrightarrow 28$

**Locus DP (6 alelos)**  $6 + 5 + 4 + 3 + 2 + 1 = \longrightarrow 21$

**TOTAL:  $300 \times 45 \times 1225 \times 153 \times 28 \times 21 = 1.487.779.650.000$**

**( Un billón y medio)**

## Desequilibrio de ligamiento



## Distribución racial



## Distribución celular



## Concentración celular



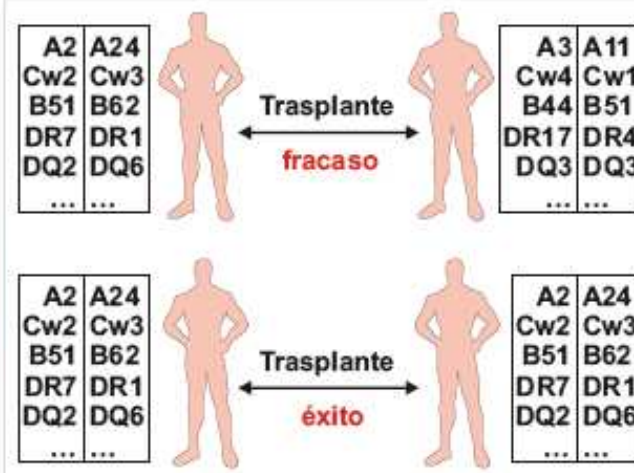
Población sana  
HLA-B27: 7%



Pacientes con Espondilitis anquilosante  
HLA-B27: 90%



## Asociaciones HLA-enfermedad



## Trasplantes

El tremendo esfuerzo biológico realizado a lo largo de millones de años para generar este polimorfismo debe tener alguna compensación ...

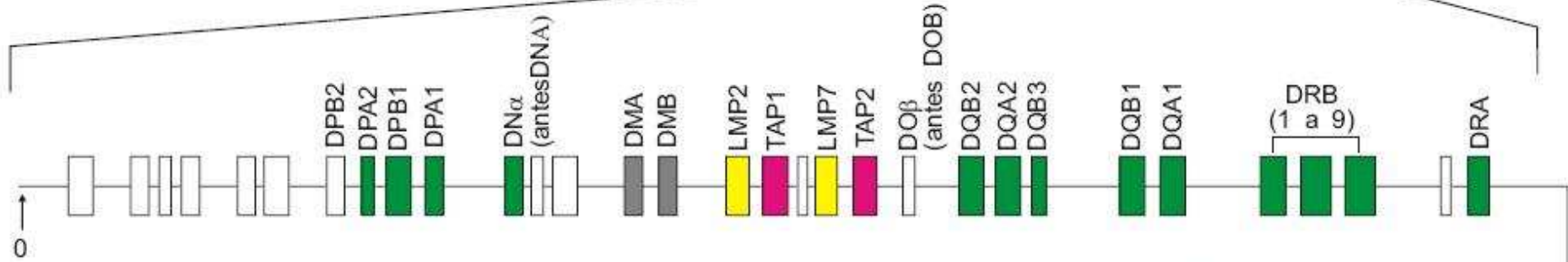
¿Cual es la función de estas moléculas?

¿Entorpecer los trasplantes?

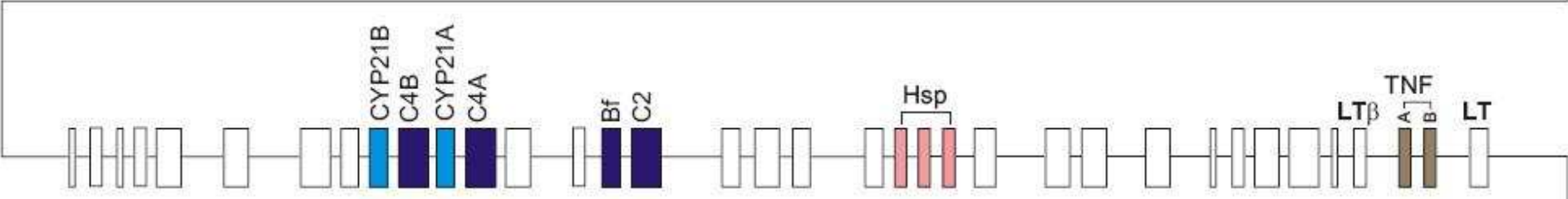
¿Aumentar la susceptibilidad a enfermedades?

**MHC no clásicas**

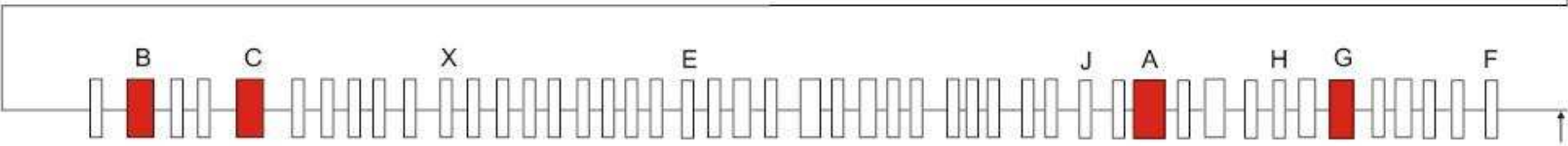
# Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano (MHC)



■ Genes HLA de clase II    
 ■ Genes de catalizadores de la unión HLA-péptido    
 ■ Genes de componentes del proteosoma    
 ■ Genes de transportadores de péptidos



■ Genes de la 21-OH    
 ■ Genes del C' (clase III)    
 ■ Genes de la proteína del golpe de calor (Hsp)    
 ■ Genes de TNF (Tumour Necrosis Factor)



■ Genes HLA de clase I

4.000.000

# Genes CMH-I no clásicos

Codifican proteínas CMH-I like.

Se asocian con B-2 microglobulina (no todas)

Patrón de distribución restringida.

Niveles bajos de expresión

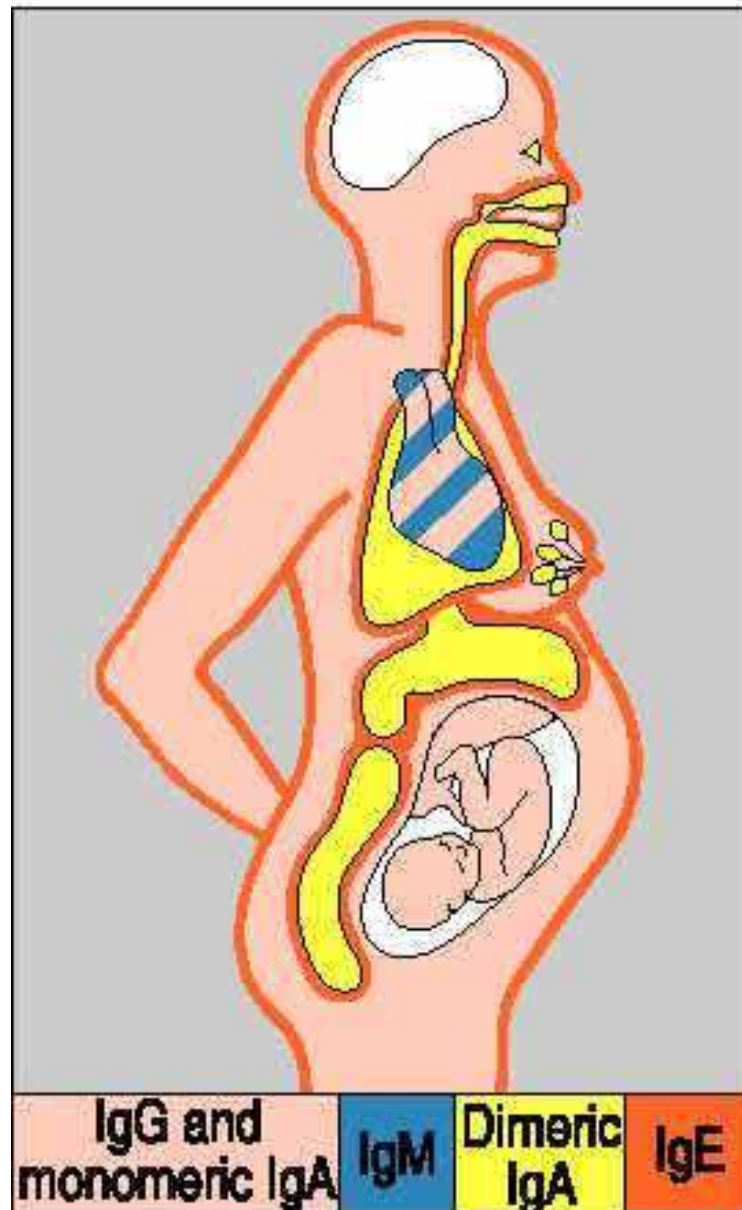
Cumplen funciones muy heterogéneas (no siempre presentan peptidos)

Son poco polimorficos ( salvo MIC )

Pueden o no estar localizados en el loci CMH.

Ej: HLA-E, HLA-F, HLA-G, MIC, HLA-FE, FcRN, CD1.

Figure 7.17



## HLA-G

En células trofoblásticas,  
TEC, macrófagos activados,  
microglia

Inhibe NK

(ILT2/ILT4/KIR2DL4)

7 miembros (3 solubles)

Poco polimorfica

Es una molecula  
presentadora  
de antígenos

¿Si el feto presenta todos los genes CMH paternos porque no hay rechazo?

**Sitios antómicos de contacto madre- feto:**

- Sangre materna en contacto con sincitiotrofoblasto: carece de CMH-I y CMH-II
- Decidua materna en contacto con trofoblasto extravelloso: expresa HL-G, HLA-E y HLA-C

**¿Importancia en la implantación?**



**Table 1: Immunoregulatory effects of HLA-G.**

---

<b>Cellular Target of HLA-G</b>	<b>Functional Effect</b>
Natural killer cell	Prevents cytolytic killing Inhibits migration Induces apoptosis
Blood mononuclear cells	Induces proliferation, IFN $\gamma$ production Regulates cytokine production
Cytotoxic T cell	Suppresses cytolytic killing Regulates cytokine production Induces apoptosis
Helper T cell	Decreases expression of CD8 Decreases proliferation Induces suppressive phenotype
Monocyte/macrophage	Induces TGF- $\beta$ 1 production
Dendritic cell	Reduces stimulatory capacity Alters maturation

---

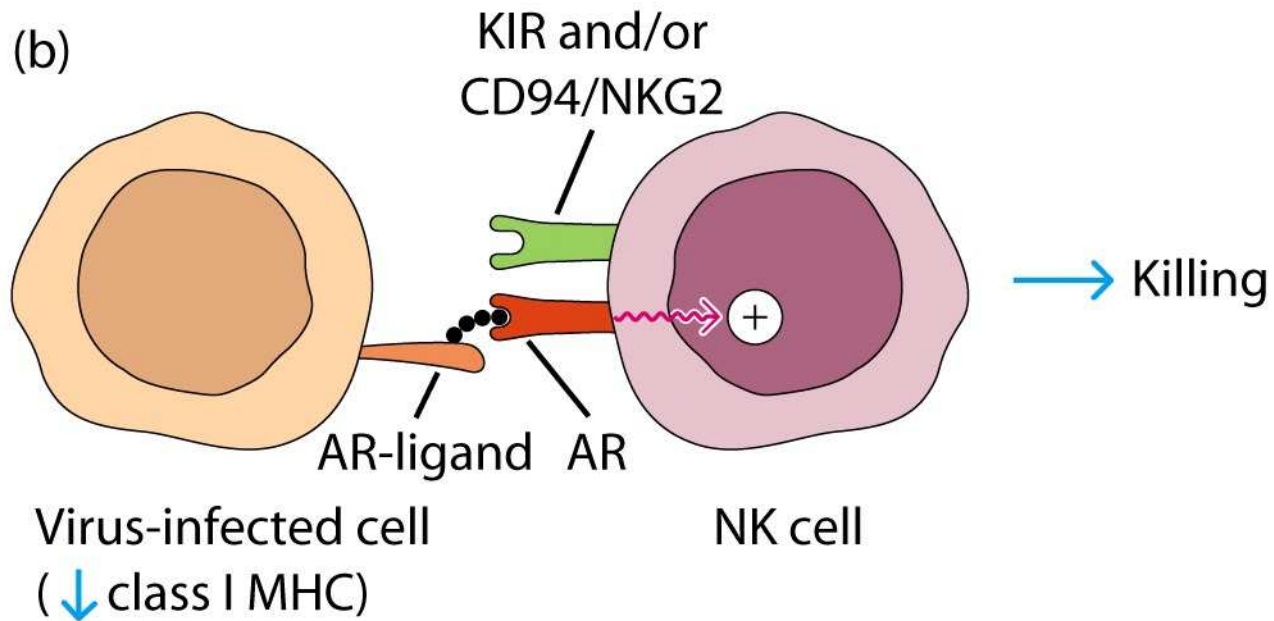
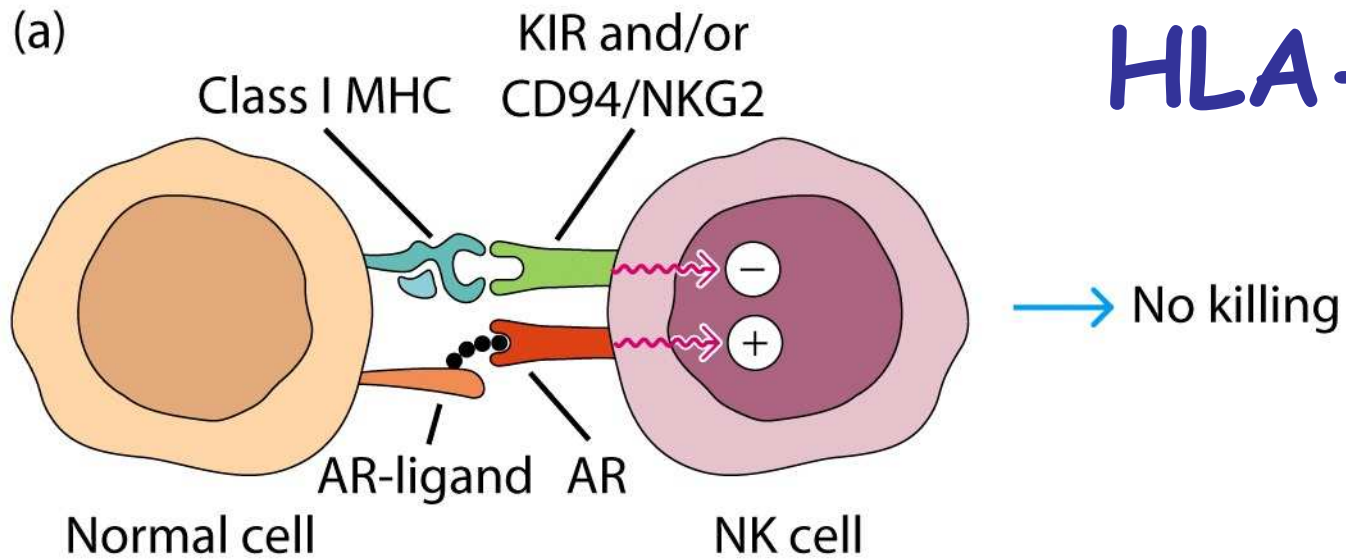
## HLA-E

- Poco polimorfo
- Inhibe a NK (CD94/NKG2A) o lo estimula (CD94/NKG2C)
- Ampliamente distribuidas: células trofoblasticas, células tumorales

## HLA-F

- Intracitoplasmático
- Inhibiría NK y LTc (ILT2/ILT4)
- Amígdalas, bazo, timo

# HLA-E



¿Mecanismo de evasión de virus y células tumorales?

# FcRn

Heterodimero

NO PRESENTA PEPTIDOS

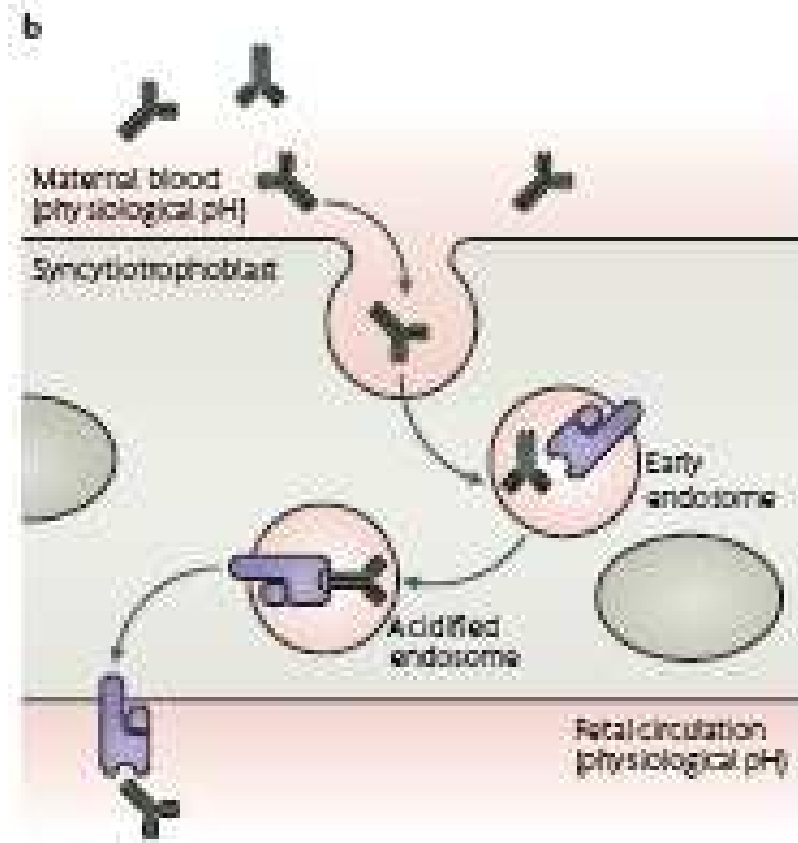
Une Fc de IgG

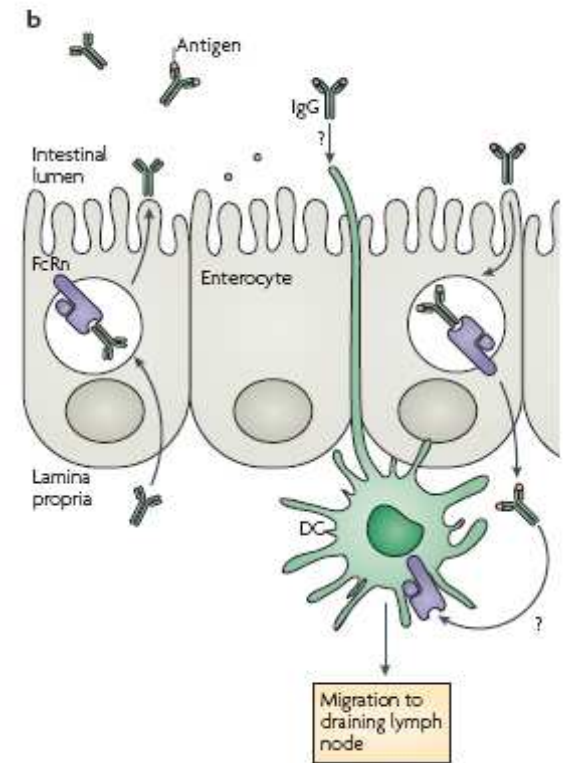
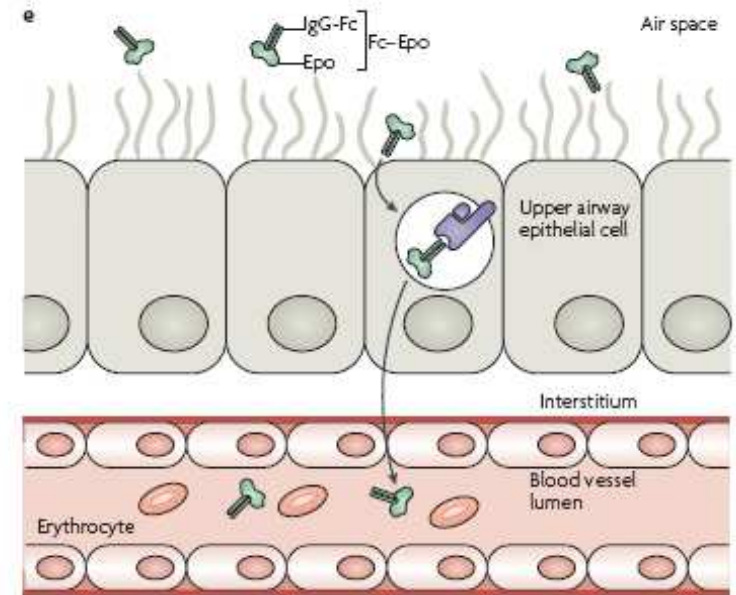
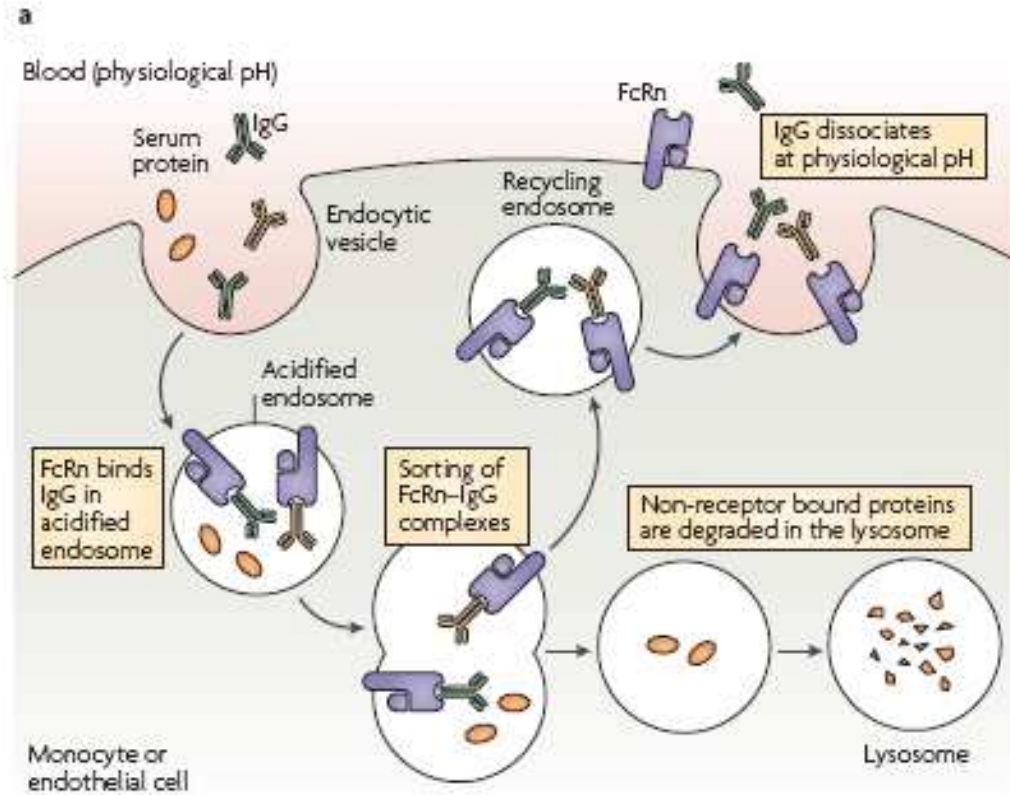
En placenta y células  
endoteliales fetales,  
endotelio vascular,  
sinusoides hepáticos, células  
del tubo renal.

Transporta IgG de sangre  
materna al feto.

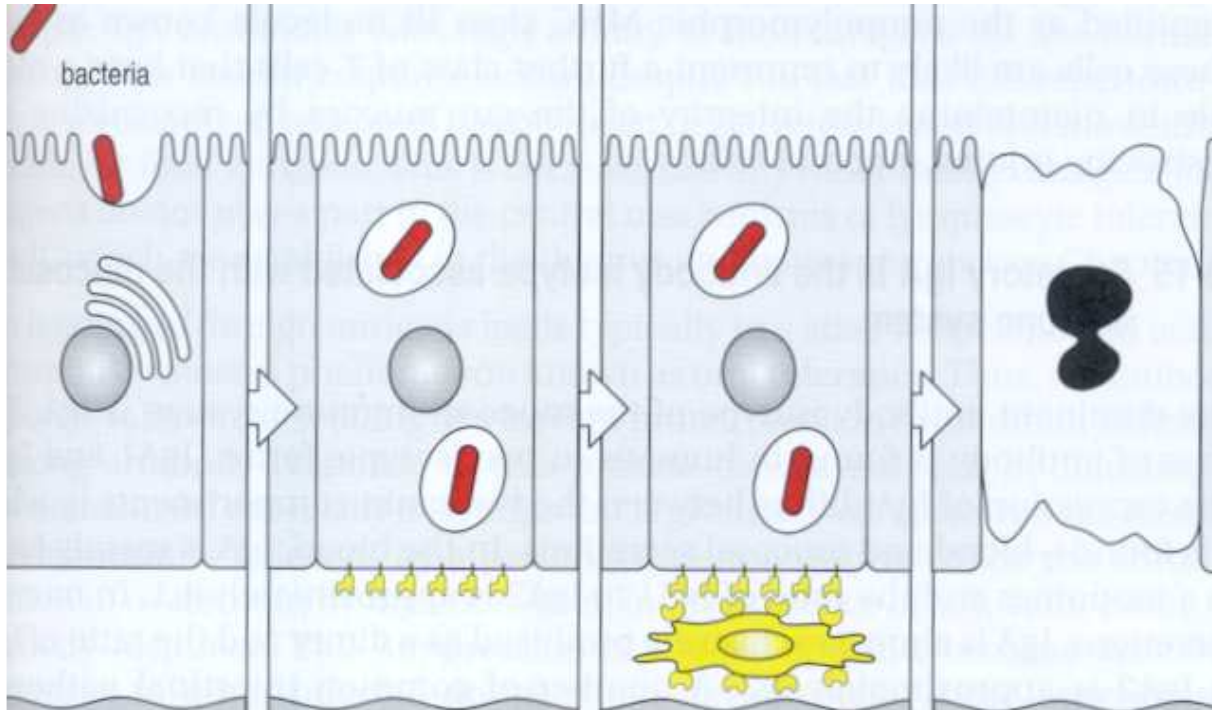
Protege la degradación  
catabólica de IgG.

Cromosoma 19





# MIC-A / MIC-B



Son polimorficos,  
Sin B2 microglob.  
no presentan pep.  
Activan NK, LT,  
algunos LTc.  
(NKG2D)

MIC-A, MIC-B

Patrón de expresión restringido: **células epiteliales**  
(fibroblastos, endotelio, enterocitos, etc.)

Se induce o aumenta su expresión tras estímulo de stress,  
infección con agentes patógenos intracelulares o  
neotransformación (no responde a IFN $\gamma$ )

# CD1

Glicoproteína sobre la superficie celular (apical y lateral de células epiteliales del intestino)

- No polimorfica, localizado en cromosoma 1
- Expresada junto a beta-2 microglobulina (estructura similar a MHC-I)
- Une antígenos lipídicos (lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, etc. exponiendo la región polar para su unión con TCR)
- Función: presenta antígenos a **LT gamma delta, LTc Alfa beta, NKT**
- 5 tipos : CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e
- Se expresa en **timocitos corticales y en CPA** (macrófagos, LB, células dendríticas mieloides)

# CD1

