

La biología molecular y su aplicación en el Banco de Sangre. Una herramienta a nuestro alcance

Julio César Martínez-Álvarez,* Araceli Arrazola-García, América Suárez-Cruz

Área de Histocompatibilidad y HLA del Laboratorio del Banco Central de Sangre,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D. F., México

RESUMEN

La prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) es una nueva técnica en el laboratorio, capaz de detectar virus infecciosos, a fin de evitar posibles contagios a través de la transfusión sanguínea, para garantizar la seguridad en la transfusión. El descubrimiento de las técnicas de amplificación del DNA, ha revolucionado la tipificación de antígenos leucocitarios de humanos (HLA), con la posibilidad de detectar el polimorfismo a nivel de alelo, constituyéndose en una de las principales herramientas para el trasplante de médula ósea, órganos sólidos y sangre de cordón umbilical. Se pueden determinar alelos de susceptibilidad de la región HLA (por ejemplo, HLA-B27 relacionado a espondilitis anquilosante). El uso de secuencias de nucleótidos repetidas a lo largo de todo el genoma (VNTR), en el seguimiento del injerto, es otra contribución importante de las técnicas moleculares que asegura el éxito del trasplante. El conocimiento de las técnicas moleculares, ha abierto la puerta para su aplicación en la geno-tipificación en diversas áreas de la medicina transfusional. En la actualidad, ya es posible resolver problemas clínicos relevantes que antes con las técnicas serológicas no era posible, como por ejemplo las discrepancias en la determinación de un grupo del sistema ABO y de otros sistemas de antígenos sanguíneos.

Palabras clave:

Complejo principal de histocompatibilidad, antígenos leucocitarios humanos, polimorfismo, reacción en cadena de la polimerasa, frecuencia, quimerismo

SUMMARY

The nucleic acid amplification test (NAT) is a new laboratory technology with the potential to detect viremia, better than current screening methods. It avoids inoculating infectious agents into transfusion recipients and improves the safety of the blood supply. The discovery of DNA amplification techniques has brought about a revolution in Human Leukocyte Antigens (HLA) typing by detecting polymorphisms at the allele level. NAT is an important tool for bone marrow, solid organ and umbilical cord blood transplantation. It can also detect susceptibility alleles associated with HLA (e.g. HLA-B27 related to ankylosing spondylitis). The use of Variable Number of Tandem Repeats (VNTR's) following a graft is another contribution of the molecular techniques that guarantees the success of the transplantation. Molecular knowledge has widened the possibilities to apply molecular genotyping in several areas of transfusion medicine. We are currently able to solve clinically relevant problems that were not feasible before the advent of this technology as were the discrepancies between ABO typing and other blood groups.

Key words:

Histocompatibility Complex, human leukocyte antigen, polymorphism, polymerase chain reaction, frequency, chimerism

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una herramienta indispensable en la biología molecular

Parece muy lejano, cuando en 1953 Watson y Crick publicaron en la revista Nature, el modelo tridimensional del ácido desoxirribonucleico (DNA), pero gracias a este descubrimiento y al desarrollo en 1985 por parte del Dr. Kary Mullis (Premio Nobel) de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR- del inglés *Polymerase Chain Reaction*), este método pronto se convirtió en "un procedimiento de rutina" en los

laboratorios de biología molecular. En un corto período esta tecnología ha modificado radicalmente el diagnóstico clínico. El desarrollo de la PCR ha revolucionado el campo de la biología molecular, pues hoy día se siguen incrementando sus aplicaciones. Muchas de éstas son presentadas aquí e involucran tanto procedimientos de novel (amplificación de algún gen a partir de nanogramos del DNA genómico) como modificaciones de métodos existentes (sitios específicos de mutaciones).

La PCR, es un proceso enzimático en el que una región específica del DNA se replica para producir muchas copias de

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Julio César Martínez-Álvarez, Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06720 México D. F., Tel.: 5727 6900 extensión. 21727. Correo electrónico: juliocesar_ma@yahoo.com.mx

Cuadro I. Periodos de ventana comparativos de las diferentes técnicas para el escrutinio de virus trasmisibles por transfusión sanguínea

Virus	Serología Convencional	NAT por PCR (Minipool)	NAT por PCR Individual
VIH (Incluye p24)	16 días	10 días	7 días
VHC	70 días	9 días	7 días
VHB	59 días	49 días	38 días

VIH = Virus de Inmunodeficiencia Humana, VHC = Virus de Hepatitis C, VHB = Virus de Hepatitis B, NAT = prueba de amplificación de ácidos nucleicos, PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

una secuencia particular. Utiliza ciclos repetidos, cada uno de los cuales consiste de tres pasos:

1. *Desnaturalización*: ruptura de puentes de hidrógeno.
2. *Hibridación o alineación*: unión de los iniciadores al DNA molde.
3. *Extensión*: síntesis de la nueva cadena de DNA.

Los ciclos son el número de veces que se repiten las etapas para obtener un determinado número de copias de la secuencia de DNA elegida.

Las características principales, que hacen de esta técnica una herramienta útil y confiable, son:

- *Su especificidad*: el producto de amplificación corresponde sólo a la secuencia blanco.
- *Su fidelidad*: la secuencia de la nueva cadena corresponde a la de la cadena molde.
- *Su eficiencia*: mayor cantidad de producto con menor cantidad de ciclos.

La PCR se ha convertido, en combinación con otros métodos, en una herramienta versátil y en la base de una revolución tecnológica en la genética molecular. El método de PCR se ha utilizado para detectar la presencia de mutaciones, producir mutaciones *in vitro*, diagnosticar enfermedades genéticas, preparar DNA para su secuenciación, identificar virus y bacterias en enfermedades infecciosas, amplificar DNA de fósiles, analizar defectos genéticos en gametos y en células aisladas de embriones humanos, entre muchas otras aplicaciones.^{1,2}

En este artículo se describen las aplicaciones de amplificación de DNA que son útiles en medicina transfusional y algunas de las se han implementado en el Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

La biología molecular permitirá la detección de todos los virus que son trasmisibles

Uno de los factores clave para que una transfusión sanguínea sea segura, es llevar a cabo una buena selección de los donantes. En esta línea, las técnicas de biología molecular han supuesto una buena herramienta para reducir los periodos de ventana habituales en virus³ (cuadro I). De esta forma se podrán identificar, sin grandes complicaciones, los virus trasmisibles elevando con ello la seguridad transfusional. La

biología molecular ha permitido desarrollar técnicas diagnósticas para el escrutinio de virus conocidos y que son de especial relevancia en la transfusión sanguínea, de manera especial cuando las técnicas de detección de anticuerpos no son útiles. El desarrollo reciente de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT- del inglés *Nucleic Acid Amplification Test*) susceptibles de ser aplicadas de forma rutinaria posibilita la identificación de los virus en el plasma de donantes de sangre, que acaba con el riesgo de contaminación de agentes potencialmente infecciosos.⁴

El principal problema que se tiene en el escrutinio de los donadores, es que el tamizaje de agentes etiológicos se realiza mediante la detección de anticuerpos IgG, por medio de métodos enzimáticos, o por inmunoensayo quimioluminiscente, por lo que el periodo de ventana serológico es aproximadamente de 16 días después de la infección para el caso de VIH-1, de 70 días para VHC, y para VHB es de 59 días (Cuadro I).³

Las pruebas de ácidos nucleicos han sido las que han aumentado principalmente la seguridad de los productos sanguíneos. Los genomas virales (DNA/RNA) son actualmente demostrables, incluso antes de la detección de los antígenos virales o de los anticuerpos antivirales en la sangre de los donadores, de tal manera que el riesgo de transmisión de los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de la hepatitis B (VHB) y de la hepatitis C (VHC) ha disminuido considerablemente en los países industrializados y México (Cuadro II). La principal razón para implementar esta técnica en los bancos de sangre, es la disminución del periodo de ventana virémico con la consecuente reducción del riesgo residual (Cuadro II). Sin embargo, a pesar de lo anterior, existen riesgos restantes en la transfusión sanguínea. En términos generales, 2% de todos los donadores de sangre no refiere factores de riesgo de infecciones virales previas. Los donadores de sangre infectados que se presentan a donar en el periodo entre el inicio de la infección y la posible detección

Cuadro II. Riesgo residual en países industrializados y México

País	VIH	VHC	VHB
Francia	1:3,070,000	1:2,050,000	1:640,000
Alemania	1:5,540,000	1:4,400,000	1:620,000
Suiza	1:1,900,000	1:2,200,000	1:115,000
Reino Unido	1:7,142,000	1:1,250,000	1:602,000
México	1:19,939	1:9,915	1:8,170

Cuadro III. Procedimientos realizados de 2003 a junio de 2007

	2003	2004	Año 2005	2006	Hasta junio de 2007
Procedimientos por año	760	4090	9001	14470	7798
Total de procedimientos	36119				

del agente infeccioso en sangre (ventana diagnóstica), no pueden ser detectados.^{5,6}

La biología molecular y su aplicación en trasplantes

Dentro de los múltiples avances científicos en el campo de la medicina, registrados en el siglo XX, el trasplante de un órgano o tejido ha sido una meta afanosamente perseguida por diversos profesionales de las ciencias médicas, debido a que la sustitución de un órgano o tejido enfermo por uno sano, representa una acción curativa que otorga al paciente que cursa con una disfunción terminal, la oportunidad de recuperar un estado de calidad de vida saludable. Desde el inicio de la realización de trasplantes en el mundo, se ha registrado un incremento constante e importante de la necesidad de este tipo de procedimientos. Los padecimientos como la insuficiencia renal crónica (IRC) o los padecimientos hematológicos tales como las leucemias, han cambiado y generado un incremento de los grupos de mayor edad y grupos vulnerables como las edades preescolares y escolares, respectivamente, en los que, en la mayoría de los casos, el tratamiento ideal es el trasplante. Las infecciones virales y los rechazos son los dos grandes problemas de los trasplantes de médula ósea. Estas dos complicaciones dependen, en gran parte, de la compatibilidad entre receptor y donante, así como el grado de reconstitución inmune.⁷

La histocompatibilidad la determinan principalmente los genes del MHC (MHC -del inglés *Major Histocompatibility Complex*-Complejo Principal de Histocompatibilidad), conocido como sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*-Antígenos Leucocitarios Humanos) en el humano, y que se localizan en un segmento de 4 mega bases del brazo corto del cromosoma 6. La región HLA comprende 6 principales loci que codifican para proteínas estructuralmente homólogas que son clasificadas en Antígenos HLA clase I (HLA-A, -B y Cw) y clase II (HLA-DR, -DQ y -DP), de acuerdo a la función, distribución tisular y características en la presentación de péptidos a las células T.

Los antígenos HLA son glicoproteínas de la superficie celular que se caracterizan por un alto grado de polimorfismo alélico dentro de las poblaciones humanas; la función biológica de las moléculas HLA es presentar péptidos derivados de patógenos a los linfocitos T citotóxicos CD8+ y linfocitos T cooperadores CD4+, a este proceso se le conoce como presentación antigénica dependiente del MHC. Los complejos péptido-HLA son reconocidos por receptores de células T distribuidos en clonas. Los receptores de células T (TCR del inglés T-Cell Receptor) son capaces también de reconocer moléculas HLA

allogénicas, de tal forma que 1-10 % de los linfocitos de sangre periférica de un donador puede responder a un alo-antígeno.⁸

La respuesta inmune contra antígenos HLA compatibles representa la principal barrera al trasplante de órganos y de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Estas respuestas pueden ser extremas, como en el caso de la enfermedad injerto contra hospedero (EICH) mediada por linfocitos T-citotóxicos alorreactivos después de un trasplante allogénico de células progenitoras hematopoyéticas, o en el caso de un rechazo agudo mediado por anticuerpos específicos anti-HLA preformados después de un trasplante de órgano.

La correcta y exacta tipificación HLA y el criterio de compatibilidad son los principales factores para el éxito de un trasplante. La aplicación de la biología molecular es fundamental para este tipo de determinaciones, toda vez que es indispensable en el trasplante de órganos sólidos: riñón e hígado, o bien en el trasplante de CPH: provenientes de sangre periférica, de médula ósea o de sangre de cordón umbilical (SCU).

La metodología utilizada se basa en la PCR, donde son utilizados iniciadores de secuencia específica (SSP- del inglés *Sequence Specific Primers*) y sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP- del inglés *Sequence Specific Oligonucleotide Probes*). En el laboratorio de Histocompatibilidad y HLA del Banco Central de Sangre, del CMN SXXI del IMSS se realizan las tipificaciones HLA para trasplante, utilizando la técnica de PCR-SSP para la determinación HLA en el trasplante de CPH, y PCR-SSOP para trasplante de órganos sólidos. En el cuadro III se muestran los procedimientos realizados en el laboratorio de Histocompatibilidad y HLA, de octubre de 2003 a junio de 2007. Estos procedimientos incluyen desde la extracción del DNA, su cuantificación, hasta la etapa final de la tipificación HLA. Así mismo, en esta misma fecha, se ha tipificado por biología molecular para diferentes trasplantes, un total de 1766 muestras, entre donadores y receptores, que conforma una DNA-teca importante (Cuadro IV).⁹

La biología molecular aplicada a la determinación de la susceptibilidad a enfermedades

En 1997 se marcó el 30 aniversario del primer caso descrito de una enfermedad asociada al sistema HLA que fue la enfermedad de Hodgkin. Las enfermedades asociadas a los alelos HLA (alelos de susceptibilidad), pueden ser causadas por una interrelación de un gran número de diferentes genes y factores ambientales, donde los genes HLA confieren una fuerte predisposición genética a padecer la enfermedad.

Cuadro IV. Número de tipificaciones HLA por trasplante

	TMO	CCU	TR	Otros
Receptores	162		572	6
Donadores	411	180	429	6

TMO = Trasplante de médula ósea

CCU = Células de cordón umbilical, estudiados a mediana y alta resolución

TR = Trasplante renal y programa de donador cadáver

Otros = Trasplante hepático, de manos, intestino, renopancreático

Las enfermedades asociadas a HLA comparten ciertas características:

- Patogenia mayoritariamente desconocida.
- Asociadas con alteraciones inmunológicas.
- Son por lo general de naturaleza autoinmune.
- Frecuente incidencia familiar.
- Gen de susceptibilidad puede ser de alta o débil penetrancia.¹⁰

A la fecha se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar los mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad:

1. Mimetismo molecular entre antígenos HLA y antígenos de agentes infecciosos.
2. Modificación de la estructura de los antígenos HLA.
3. Antígenos HLA como receptores.
4. Deficiencias en la respuesta inmune.
5. Deficiencias de los antígenos HLA clase III.
6. Falla en la selección.

En el cuadro V se muestra algunas de las asociaciones HLA y enfermedad, donde la susceptibilidad a padecer este tipo de enfermedades se da a través del riesgo relativo; el riesgo relativo (RR) es la fuerza de asociación de una enfermedad con un determinado antígeno o alelo HLA, el RR superior a 1 indica asociación positiva, el RR inferior a 1 indica protección.¹¹

En el laboratorio de histocompatibilidad y HLA del Banco Central de Sangre del CMN SXXI, se han tipificado 67 pacientes por métodos moleculares con el HLA-B27 como alelo de susceptibilidad para espondilitis anquilosante y uveitis, en los servicios de reumatología y oftalmología, respectivamente, de la UMAE Hospital de Especialidades del CMN SXXI, han resultado positivos a este alelo 28% del total de pacientes estudiados.

En contraste, con mayor conocimiento que se tiene de la estructura del HLA-B27 y de los antígenos que presenta, las bases de su asociación con las espóndiloartropatías son todavía especulativas. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la participación del HLA-B27 en el desarrollo de estas enfermedades. Una de ellas postula que la enfermedad ocurre a través de una respuesta de tipo autoinmune, en donde la presentación de un péptido "artritogénico" restringido por B27 y reconocido específicamente por los linfocitos T de las articu-

Cuadro V. Algunas enfermedades asociadas con el sistema HLA

Enfermedad	Molécula HLA	Riesgo relativo (RR)
Enfermedad de Reiter	B27	40
Espondilitis Anquilosante	B27	106
Tiroiditis de Hashimoto	B47/DR5	15-3
Esclerosis múltiple	DR2	5
Artritis reumatoide	DR4	4
Diabetes juvenil	DR3/DR4	3-6
Enfermedad celiaca	DR3/DR5/DR7	30
Uveitis anterior aguda	B27	20
Tiroiditis subaguda	B35	14
Psoriasis vulgaris	Cw6	7
Narcolepsia	DQ6	38
Enfermedad de Grave	DR3	4
Miastenia gravis	DR3	2
Enfermedad de Addison	DR3	5
Artritis reumatoide juvenil	DR8	8
Enfermedad de Hodgkin	B5/B35/B18	2.8

laciones, mimetizaría a algún componente de la articulación, lo que conduciría a la pérdida de la tolerancia inmunológica y a una respuesta autoinmune crónica frente al tejido articular.^{12,13}

El papel de la biología molecular en el seguimiento del injerto (quimerismo)

El rechazo de los injertos depende del reconocimiento por el hospedero del tejido injertado como extraño, éste es un proceso complejo que incluye a la inmunidad celular y los anticuerpos circulantes, siendo los antígenos del sistema HLA responsables de esa respuesta.¹⁴

El propósito del seguimiento del injerto es identificar y cuantificar la población de células del donador presente en el receptor, después del trasplante de médula ósea (TMO) utilizando un marcador genético informativo. El marcador genético permite distinguir las células del donador de las del receptor y viceversa, es decir, el grado de quimerismo. El quimerismo es un estado inmunogenético caracterizado por la supervivencia y colaboración de poblaciones celulares originadas de dos individuos diferentes y puede ser espontáneo o secundario, sin embargo, hay que tomar en cuenta que existen diferentes factores que determinarán el grado de quimerismo en el trasplante como se muestra en el cuadro VI.¹⁵

Tipos de quimerismo

- *Quimera completa*: todas las células hematopoyéticas y linfoides son derivadas del donador después del TMO.
- *Quimera parcial, incompleta o mezclada*: las células hematopoyéticas y/o linfoides del receptor persisten junto con las del donador después del TMO (2.5 – 97.5% de las células del donador o del receptor).

Cuadro VI. Factores que determinan el desarrollo y características del Quimerismo

Condiciones hematopoyéticas e inmunológicas del huésped	Transfusiones previas
Radio y/o quimioterapia	Características mieloablativas y tóxicas
Dosis de irradiación total	Grado de destrucción tímica
Fuente de células germinales	Dosis, diferenciación, depleción total o parcial de linfocitos T
Historia clínica del donador	Enfermedades virales, vacunación, transfusiones
Curso post-trasplante	Terapia, complicaciones

- Microquimerismo < 2.5 % de las células son del donador o del receptor.

Para el estudio del quimerismo se utilizan diferentes técnicas, tales como la prueba de citogenética molecular (hibridación *in situ* marcada fluorescentemente o FISH), citogenética convencional, técnicas de Southern blotting, o bien, métodos automatizados que permiten observar diferencias no HLA entre el donador y el receptor.

El estudio debe realizarse con muestra del donador y el receptor, antes y después del trasplante, para determinar el grado de quimerismo. Es importante realizar un monitoreo a diferentes días pos-trasplante (38, 45 y 60 días postrasplante), esto con el fin de comprobar que existe realmente un rechazo, y poder documentar el injerto. Para la determinación del grado de quimerismo es necesario el estudio de los microsatélites, que son secuencias de nucleótidos que se encuentran repetidas a lo largo de todo el genoma.

Esta determinación se realiza por métodos moleculares con la utilización de los VNTR's (VNTR – del inglés Variable Number Tandem Repeat). Existen microsatélites en la región HLA (Cuadro VII), que se puede usar en el estudio de quimerismo, siempre y cuando existan diferencias HLA entre el donador y el receptor. Dependiendo del tamaño de repeticiones se clasifican en:

- Microsatélites: 2 a 7 nucleótidos
- Minisatélites: 8 a 70 nucleótidos.^{16,17}

La biología molecular en transfusiones (grupos sanguíneos)

Aplicando la técnica de PCR-SSP, es posible determinar diferentes grupos sanguíneos en el banco de sangre, con el fin de obtener una tipificación exacta del grupo en donadores o receptores, cuyas pruebas a nivel serológico no podrían llegar a ese grado de determinación. Un ejemplo de las aplicaciones moleculares en este rubro es la determinación de antígenos de los siguientes sistemas de grupos san-guineos.¹⁷⁻¹⁹

- Sistema Rh-Hr
- Variantes del Rh (D)
- Sistema ABO
- CDE
- Sistema MNS
- Anticuerpos antiplaquetarios HLA
- Sistema Diego

En el caso del sistema Diego los anticuerpos anti-Dia y anti-Dib son generalmente IgG que causan hemólisis post transfusional y enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), que puede ser desde leves hasta muy graves. El anti-Diego-b es un anticuerpo pocas veces encontrado y reportado; no mas de 15 casos en la literatura internacional. En el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS se han detectado 4 casos en los últimos 10 años. Existe el riesgo de confundir como auto anti sistema Rh/Hr los

Cuadro VII. Algunos microsatélites en la región HLA

Microsatélite	Localización	Rango del tamaño (pb), Nucleótido repetido y número de alelo
D6S299	6p22.3-6p21.3	206-226
AFM 217xg7	41.3 cM	223
z16986	Tel. (5 cM)/HLA-A	8
D6S461	6p	246-268
AFM 316zg5	41.3 cM	CA (Alelo 245: CA11)
D6S1554	6p	152-170
D6S105	6p22.1-p21.33	116-138
MOGb	6p21.3-p22	160-190

pb = pares de bases

Cuadro VIII. Frecuencias alélicas HLA Clase I y II del programa donador cadáver para trasplante renal

HLA Clase I			HLA Clase II								
Locus A			Locus B			Locus DRB1			Locus DQB1		
Alelo	E.S*	F(%)**	Alelo	E.S*	F(%)**	Alelo	E.S*	F(%)**	Alelo	E.S*	F(%)**
A*010101-04/	A1	3.7	B*070201-06/	B7	3.7	DRB1*010101-	DR1	14.8	DQB1*0201-	DQ2	9.2
A*02010101-02/	A2	31.5	B*0811/21	B8	9.2	DRB1*030101/	DR3	5.5	DQB1*030101/	DQ3	46.3
A*0309	A3	5.5	B*1401	B14	5.5	DRB1*040101-11/	DR4	22.2	DQB1*0401/	DQ4	16.6
A*1106	A11	3.7	B*1508	B15	7.4	DRB1*070101/	DR7	3.7	DQB1*050101	DQ5	24.1
A*24020101-06/	A24	20.3	B*2703/0502-	B27	3.7	DRB1*080101-	DR8	16.6	DQB1*060101-	DQ6	3.7
A*2601/02/	A26	3.7	B*350101-04/06-	B35	22.2	DRB1*1105/	DR11	7.4			
A*310102/02/	A31	3.7	B*390601/0602	B39	14.8	DRB1*130101-	DR13	5.5			
A*3201-03/06/07	A32	3.7	B*4002-04/	B40	5.5	DRB1*1402/	DR14	16.6			
A*3301/0301-07	A33	5.5	B*440301/0302/	B44	1.8	DRB1*150101-	DR15	3.7			
A*3401/02/04/05	A34	1.8	B*4801/03/04/	B48	3.7	DRB1*160101-	DR16	3.7			
A*680101-04/06-	A68	16.6	B*4901	B49	1.8						
A*7401-05/07-	A74	1.8	B*5001/02/04	B50	3.7						
			B*510101-03/06/	B51	7.4						
			B*520102/0104-	B52	1.8						
			B*5501-03/05/	B55	1.8						
			B*570101-04/	B57	3.7						
			B*5801/02/	B58	1.8						

*Equivalencia Serológica;

**Frecuencia en %

Cuadro IX. Frecuencias HLA en 188 unidades de sangre de cordón umbilical

HLA* Locus A	% F**	HLA* Locus B	% F**	HLA* Locus DRB1	% F**	HLA* Locus DQB1	% F**
A1	6.25	B7	2.25	DR1	3.76	DQ2	6.45
A2	32.95	B8	3.39	DR3	2.69	DQ3	58.60
A3	6.25	B13	0.56	DR4	27.42	DQ4	18.28
A11	2.84	B14	2.81	DR7	4.84	DQ5	6.99
A23	2.27	B15	10.11	DR8	19.35	DQ6	9.68
A24	18.18	B18	2.25	DR9	1.08		
A25	0.57	B27	1.69	DR10	1.08		
A26	1.14	B35	15.17	DR11	4.84		
A29	2.27	B37	1.12	DR13	6.99		
A30	0.57	B38	0.56	DR14	17.74		
A31	9.09	B39	16.29	DR15	5.91		
A32	0.57	B40	11.24	DR16	4.30		
A33	1.14	B42	0.56				
A36	1.14	B44	1.69				
A66	0.57	B45	0.56				
A68	14.20	B48	11.24				
		B49	2.25				
		B50	1.12				
		B51	4.49				
		B52	2.81				
		B53	2.25				
		B55	1.69				
		B56	0.56				
		B78	2.25				
		B83	0.56				

* Equivalente serológico

** % F= Frecuencia reportada en por ciento

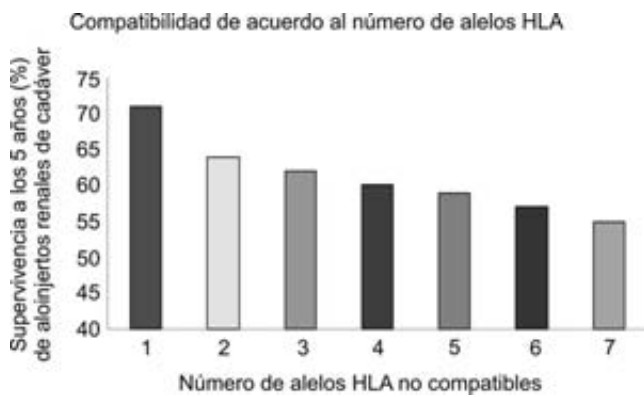


Figura 1. Sobrevida versus disparidad HLA en injertos de donador cadáver

aloanticuerpos en pacientes recientemente transfundidos que tengan este anticuerpo. La solución que se presenta con las nuevas tecnologías, es estudiar a la población por medio de la biología molecular, y es de esta manera como en el Banco Central de Sangre del CMN SXXI se han diseñado sondas de oligonucleótidos correspondientes a los polimorfismos de Di1 y Di2 de acuerdo a la secuencia publicada para el cromosoma humano 17 y al reporte hecho por el grupo del Instituto de Medicina Transfusional Ni.Gang Xi Road de China. Este tipo de estudios abre una gama de posibilidades de trabajar por métodos moleculares, otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con prueba de Coombs directo positivo, a los que no es posible realizar los fenotipos eritrocitarios por la mezcla de células transfundidas y anticuerpos pegados a los eritrocitos; en estos pacientes es muy difícil dilucidar si la hemólisis es causada por autoanticuerpos, o por

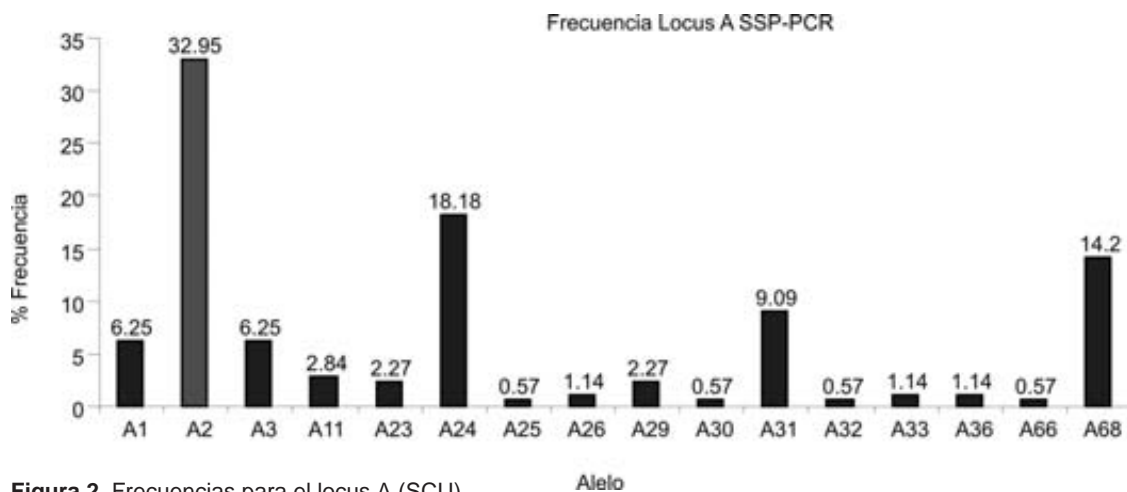


Figura 2. Frecuencias para el locus A (SCU)

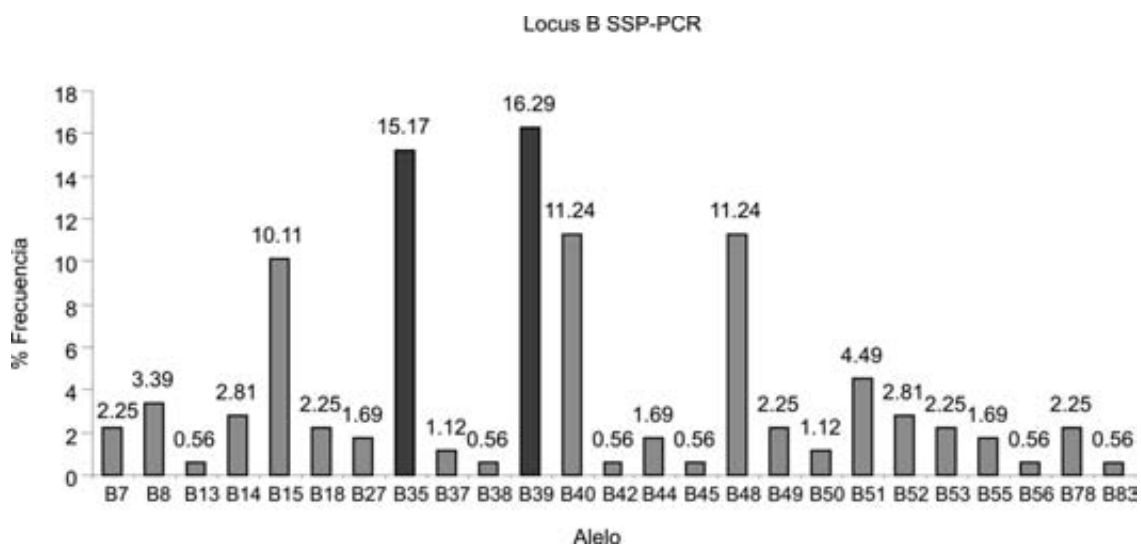


Figura 3. Frecuencias para el locus B (SCU)

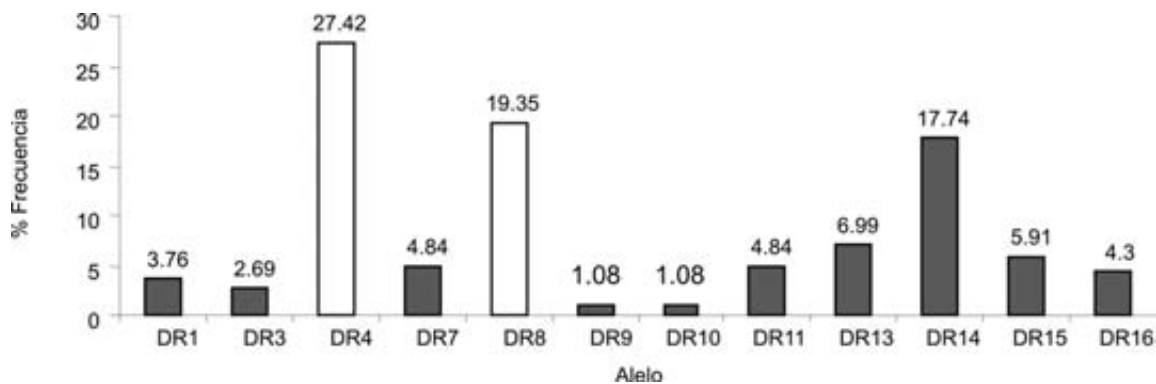


Figura 4. Frecuencias para el locus DRB1 (SCU)

aloanticuerpos y al transfundir sangre potencialmente compatible *in vitro* puede ponerse en peligro la integridad del paciente por aloanticuerpos no clasificados. Para resolver estos problemas que muchas veces son muy complicados, se podrán realizar los fenotipos por métodos moleculares de los sistemas Rh/Hr, Duffy y Kidd, que son los más peligrosos, cuidando así por completo a nuestros pacientes politransfundidos, como a los de trasplante de médula ósea con terapia transfusional previa y a los que es necesario realizar sus fenotipos para llevar a cabo trasplante alogénico. Este método resulta ser económico y rápido.^{20,21}

Impacto de la biología molecular en el Programa de trasplante renal de donador de cadáver y trasplante de CPH de sangre de cordón umbilical. Frecuencias obtenidas

Trasplante renal. Programa donador cadáver

El trasplante realizado de donador cadáver con una mejor paridad implica ventajas tanto en la sobrevida del injerto (Figura 1) como económicas, para los centros de trasplante. Los loci HLA-A, -B y -DR son generalmente tipificados para el trasplante a partir de un donador cadáver. La importancia de contar con una base de datos que contenga información suficiente sobre la frecuencia de los alelos y haplotipos, provee una herramienta útil para mantener actualizada la lista de receptores dentro del programa de donador cadáver, para poder comparar las paridades tanto del donador cadáver y del receptor en lista de espera, y con ello evitar rechazo por anticuerpos preformados a través de los resultados del panel reactivo de anticuerpos (PRA) de los receptores de acuerdo a la frecuencia alélica; sobre todo en aquellos receptores que son sometidos a un segundo trasplante, que se encuentren dentro del programa de hemodiálisis (politransfundidos), y mujeres con embarazos previos.

Las frecuencias que se tiene en 150 receptores del programa donador cadáver, son similares a las reportadas en nuestro país por otros grupos de trabajo (Cuadro VIII) en nuestra población; existe un alto porcentaje para el locus HLA-A2 siendo de 31.5%, para el locus HLA-B35 de 22.2%, para el

locus HLA-DR4 22.2% y para HLA-DQ3 de 46.3%. La frecuencia de los haplotipos más comunes fueron A2 B35 DR4 y A68 B39 DR4, esto permite encontrar con mayor poder de predicción un donador compatible con el receptor en HLA-DR, favoreciendo el tiempo de sobrevida del injerto al no encontrar diferencias en HLA-DR en comparación a los loci HLA-A y HLA-B, dado que juntos presentan mayor polimorfismo.

Trasplante de CPH. Sangre de cordón umbilical

El primer trasplante de sangre de cordón umbilical se llevo a cabo en 1988, en un paciente afectado por anemia de Fanconi. El uso de sangre de cordón umbilical (SCU) como fuente de precursores hematopoyéticos para el rescate de terapias intensivas se ha ido imponiendo en los últimos años, sobre todo en pacientes pediátricos. De hecho, ya al principio, tanto la incidencia como la gravedad de la enfermedad del injerto en contra del hospedero aguda se evidenció menos que la producida cuando se utilizaba médula ósea como fuente de precursores hematopoyéticos. De esta forma, se pasó de utilizar SCU de donantes no emparentados HLA idénticos a la situación actual, en la que se aceptan de uno a tres disparidades HLA.

En el Banco Central de Sangre de CMN Siglo XXI se ha determinado la frecuencia de 180 unidades de SCU (Cuadro IX), por medio de PCR-SSP, demostrando con ello que estas frecuencias son similares a las encontradas en las del programa de donador cadáver, encontrándose en nuestra población un alto porcentaje para el locus HLA-A2 siendo de 32.95% (Figura 2), para el locus HLA-B39 del 16.29% (Figura 3) y para el locus HLA-DR4 27.42% (Figura 4).^{22,23} La tipificación de esta sangre criopreservada permite una rápida respuesta para aquellos pacientes que no cuentan con otro tipo de donador.

Referencias

1. **Charlieu JP.** PCR as a technique used daily in molecular biology. En: PCR Technology. Current Innovations. Griffin HG, Griffin AM, (Eds.), CRC Press., Florida, EUA, 1994, pp 1-4.
2. **Rodey GE.** HLA beyond tears. Introduction to human histocompatibility. De Novo Inc Durango Co., Texas, EUA, 2000.

3. **Marshall D, Kleinman SH, Wong, JB, AuBuchon JP, Grima DT, Kulín NA**, et al. Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sanguinis* 2004;86:28-40.
4. **Del Rey GP**. Aplicación de nuevas técnicas de biología molecular a la virología. Detección de tamizaje en bancos de sangre. *Gac Méd Méx* 2004;140(Supl 3):73-75.
5. **Offergeld R, Faensen D, Ritter S, Hamouda O**. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill* 2005;10:8-11.
6. **Vázquez JA, Valiente L, Marín RA, Sánchez SA**. La seguridad de las reservas sanguíneas en la República Mexicana durante los años 1999 a 2003. *Rev Invest Clin* 2006;58:101-108.
7. Dirección de Prestaciones Médicas Coordinación Nacional de Trasplantes. Evolución y perspectivas de los trasplantes de órganos y tejidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. México D.F., México, 2003.
8. **Martínez JC, Arrazola A**. Importancia de la tipificación HLA en alta resolución para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. *Rev Med IMSS* 2006;44(Supl 2):11-14.
9. **Martínez JC**. El papel del complejo principal de histocompatibilidad en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. *Rev Med IMSS* 2005;43(Supl 1):S87-S89.
10. **Shiina T, Inoko H, Kulski JK**. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64:631-649.
11. **De Vries RR**. HLA and disease: past, present and future. *Neth J Med* 1994;45(6):302-308.
12. **Pérez M**. HLA y enfermedad. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (Supl 1):91-93.
13. **Thorsby E**. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997;53:1-11.
14. **Smith W, Williams S, Van-Epps DE**. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clinical Immunopathology* 1994;70:10-18.
15. **Smith AG, Martin PJ**. Analysis of amplified variable number tandem repeat loci for evaluation of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. *Rev immunogenetics* 1991;1:255-264.
16. **Lawler M, Cayuela JM**. Minimal Residual Disease Detection. En: *The EBMT Handbook Blood and Marrow Transplantation*. Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A (Eds.) European School of Haematology. 2a ed. París, Francia, 2000, pp. 216-229.
17. **Martínez JC**. Importancia del CMH en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical y seguimiento del injerto. *Gac Méd Méx* 2004;140(Supl 3):64-67.
18. **Avent ND**. The Rhesus blood group system: insights from recent advances in molecular biology. *Transfus Med Rev* 1999;13:245-246.
19. **Garraty G**. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion* 2004;44:5-9.
20. **Siberstein LE, Jefferies LC, Goldman J, Friedman D, Moore JS, Nowell PC, et al**. Variable region gene analysis of pathologic human autoantibodies to the related i and I red blood cell antigens. *Blood* 1991;78:2372-2386.
21. **Guo GW, Yu QS, QiongY, Shi ZJ, Tong MZ**. Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Transfusion* 2002;42:1553-1556.
22. **Beck S**. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 1999;401:921-925.
23. **Gorodesky C, Alaez C**. The genetic structure of Mexican mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Human Immunology* 2001;62:979-991.