

Revista Médica del IMSS

Volumen
Volume **43**

Suplemento
Supplemento

2005

Artículo:

Tipificación de los alelos HLA clases I y II

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Instituto Mexicano del Seguro Social

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

**María Araceli
Arrazola-García**

Química
farmacéutica biológica,
Unidad Médica
de Alta Especialidad,
Hospital
de Especialidades,
Centro Médico Nacional
Siglo XXI
Instituto Mexicano
del Seguro Social

Tipificación de los alelos HLA clases I y II

Se requiere tipificación HLA (*human leukocyte antigens*) exacta para realizar el trasplante de órgano sólido, medula ósea y sangre de cordón umbilical. El uso de los métodos moleculares para la tipificación de los alelos HLA clases I y II tienen un papel importante dentro de las técnicas utilizadas en un laboratorio de histocompatibilidad, por ofrecer algunas ventajas en comparación con los métodos serológicos tradicionales: flexibilidad en la resolución, reproducibilidad y mayor precisión. Las ventajas de los métodos de tipificación basados en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*) han permitido su amplia utilización, a tal grado que en algunos centros de trasplante han reemplazado en su totalidad a los métodos serológicos.¹ Por lo anterior, los métodos de tipificación los podemos dividir en:

- *Serológicos*: linfocitotoxicidad.
- *Moleculares*: hibridación, electroforesis, DNA conformacional

Método serológico

Representa el método más sencillo, económico y rápido para la tipificación HLA; se utilizan antisueros que contienen anticuerpos contra los antígenos leucocitarios humanos a estudiar. Los anticuerpos anti-HLA son altamente específicos para los determinantes estructurales que caracterizan a los diferentes antígenos del sistema HLA.

El principio de este método se basa en la lisis celular mediada por anticuerpos específicos en presencia de complemento. La muerte celular es un indicador de especificidad común del antígeno y anticuerpo, constituyendo una prueba positiva.²

Muestras

Se utiliza una suspensión de linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica con el método de gradiente de densidad, utilizando Fycoll-Hypaque (densidad 1.007 g/mL), ajustando su concentración a 2×10^6 células /mL. Los pasos a seguir para la determinación de HLA clase I son:

- Agregar 1 μ l de linfocitos a cada pozo de la placa, la cual contiene antisueros.
- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 5 μ l de complemento de conejo.
- Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 5 μ l de solución de eosina al 5% pH 7.2-7.4.
- Agregar 5 μ l de formol pH 7.2-7.4.
- Dejar reposar al menos 20 minutos.
- Colocar cubreobjetos en la placa y leer en microscopio invertido de contraste de fases.
- Informar los resultados de acuerdo a los estándares internacionales.

Comunicación con:
María Araceli Arrazola.
Tel.: 5627 6900,
extensión 21727.
Dirección electrónica:
arrazola_maria@terra.com.mx

Palabras clave

- ✓ antígenos leucocitarios humanos
- ✓ reacción en cadena de la polimerasa
- ✓ secuencia específica de primers
- ✓ secuencia específica de sondas de oligonucleótidos

Key words

- ✓ human leukocyte antigens
- ✓ polymerase chain reaction
- ✓ sequence-specific priming
- ✓ sequence-specific oligonucleotide probes

Informe de los resultados

Mortalidad

0 a 10 %	- [1] Negativo
11 a 20 %	± [2] Negativo dudoso
21 a 50 %	± [4] Positivo débil
51 a 80 %	++ [6] Positivo
81 a 100 %	+++ [8] Positivo intenso
	[0] No definible

Métodos moleculares

En la figura 1 se presenta una breve descripción de las técnicas moleculares empleadas en los laboratorios de histocompatibilidad.³

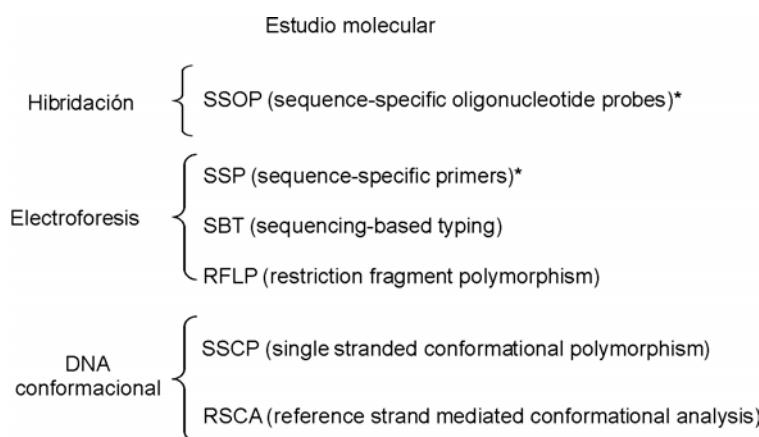


Figura 1. Técnicas moleculares de mayor uso en los laboratorios de histocompatibilidad. *Las de mayor empleo

PCR-SSOP

La PCR-SSOP (*polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe*) es la amplificación específica del locus HLA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la subsiguiente hibridación del producto amplificado por medio de sondas de oligonucleótidos de secuencia específica. La mayor parte del amplio polimorfismo del sistema HLA resulta de eventos en los cuales pequeñas secciones de nucleótidos de un alelo (usualmente no más de 100 bases) son transferidos a otro alelo. De esta manera, muchas de las secuencias tienden a compartir alelos y no son alelo-específicas,

surgiendo el uso de sondas de secuencia específica. Para estudiar los alelos se requiere un juego de sondas y el patrón de reactividad de estas sondas es lo que permite diferenciar los alelos HLA.

El sistema de detección utilizado consiste en marcar las sondas con digoxigenina y la detección de la hibridación de estas sondas. La secuencia complementaria presente en el producto amplificado del alelo HLA de un individuo se realizará adicionando un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, el cual utiliza CSPD como sustrato quimioluminiscente y la luz emitida es detectada por autorradiografía.

Muestra

Se utiliza DNA obtenido de sangre periférica recolectada en tubos con EDTA.

Esta prueba puede ser realizada en un periodo de 3 a 4 horas dependiendo del nivel de automatización utilizado. El número de sondas utilizadas es de 30 a 70 por locus. A esta técnica se le considera de mediana resolución dado que la tipificación inicial, a diferencia de las pruebas de SSP-PCR, es mayor que la tipificación a nivel antígeno y en ocasiones provee tipificación a nivel alélico. La técnica SSP puede ser utilizada para proveer resolución a nivel alélico.

Los pasos de esta técnica son:

- Obtención del DNA con una pureza mayor a 1.6 (relación entre la absorbancia del DNA y de las proteínas).
- Preparar mezclas de reacción.
- Amplificar las mezclas de reacción en un termociclador.
- Transferir el producto amplificado a los pozos o tiras de nitrocelulosa que contienen las sondas de oligonucleótidos inmovilizadas.
- Hibridar el DNA con las sondas de oligonucleótidos.
- Lavar los pozos o las membranas con buffer astringentes a fin de eliminar las sondas no hibridadas.
- Desarrollo de la reacción química de acuerdo con las sustancias químicas unidas a las cadenas del DNA. Los dos sistemas más comunes de detección son las enzimas que producen color y los compuestos quimioluminiscentes.

- Interpretación de los resultados. Debido al gran número de sondas utilizadas en la tipificación por SSO, la mayoría de los proveedores proporcionan el software para facilitar el análisis.⁴

PCR-SSP

La especificidad de los alelos HLA amplificados por PCR-SSP (*polymerase chain reaction-sequence specific priming*) se determina por los iniciadores (primers). Cada par de iniciadores utilizados amplifica uno o varios alelos. El número total de iniciadores utilizados deberá amplificar todos los alelos conocidos para el *locus* a determinar: Dependiendo de su selección, la PCR-SSP puede ser de baja, mediana o alta resolución.

Esta técnica requiere varios controles. Cada pozo contiene un par de iniciadores control que reacciona con una secuencia de DNA diferente a las regiones polimórficas HLA, y que sirve como control interno para todo el proceso de amplificación. Un segundo control, denominado "tubo abierto", contiene todos los reactivos, excepto el DNA. Éste se deja abierto durante el proceso de amplificación y si resulta positivo indica contaminación. A continuación se enumeran los pasos de esta técnica:

- Obtención del DNA con una pureza de 1.7-1.9 (relación entre la absorbancia del DNA y de las proteínas).
- Preparar las mezclas de reacción.
- Amplificación de las mezclas de reacción en el termociclador.
- Realizar electroforesis en un gel de agarosa.
- Analizar e interpretar los resultados

Una prueba exitosa muestra la banda control en cada reacción negativa y la banda de tamaño apropiado en los pozos positivos. Si una reacción de amplificación no muestra bandas después

de la electroforesis, el proceso de amplificación falló, lo que puede deberse al control inadecuado de la temperatura del bloque del termociclador, cantidad insuficiente de DNA o falla al adicionar la Taq polimerasa.⁵

Esta prueba se realiza en un tiempo de tres y media a cuatro horas, con un juego de iniciadores. Se presentan ambigüedades a nivel alélico en 5 a 10 % de las tipificaciones, dependiendo de la población en estudio. La principal desventaja de la técnica es la necesidad de utilizar gran número de par de iniciadores para realizar la tipificación de un solo paciente, el cual ocupa un termociclador (96 pozos), por lo que no es recomendable para grandes volúmenes de trabajo, siendo la limitante el número de termocicladores y las unidades de electroforésis. Para alto volumen de trabajo, la técnica PCR-SSO se considera más práctica.

SSP puede ser utilizado para complementar la técnica de SSO, dando resolución a nivel alélico cuando sea necesario.⁶

**María Araceli
Arrazola-García.
Tipificación HLA**

Referencias

1. United Network for Organ Sharing (UNOS). Disponible en: <http://www.unos.org/>
2. Hopkins, Catherine A. The basic lymphocyte microcytotoxicity tests. En: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, editor. Laboratory manual. Standard and AHG enhancement, volume I. Fourth edition. USA: ASHI; 2000. p. 1-7.
3. Gorodezky C. Manual de procedimientos serológicos y celulares de histocompatibilidad. México: INDRE; 2003 p. 78-80.
4. Rodey-Glenn E. HLA beyond tears. Second edition. Houston, USA: Durango, CO De Novo; 2000. p. 117-148.
5. Bunce M, Welsh K. PCR-SSP typing of HLA class I and class II alleles. En: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, editor. Laboratory manual. Standard and AHG enhancement. Volume II. Fourth edition. USA: ASHI; 2000. p. 1-10
6. HLA Informatics Group. Disponible en: <http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html> 

