

La biología molecular en el estudio de la inmunopatología

Molecular Biology in the study of Immunopathology

Dra. Yamila Adams Villalón, DrC. Antonio Bencomo Hernández, Dr. Rodisnel Rodríguez Leyva, Lic. Suharmi Aquino Rojas, Lic. Ihosvani González Díaz.

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Las técnicas de biología molecular han tenido un profundo impacto en el campo de la inmunología. Han permitido dilucidar varias interrogantes sobre el funcionamiento del sistema inmune y han aumentado nuestra habilidad para entender, diagnosticar y tratar una gran variedad de enfermedades inmunológicas. Se realizó una revisión de la literatura sobre aspectos generales de la importancia de las técnicas de biología molecular en el estudio de la respuesta inmune, que incluye conceptos generales y clasificación de las metodologías más empleadas, así como la referencia de algunas aplicaciones en el estudio de la inmunología y la inmunopatología. Se muestra información actualizada con enfoque analítico que permite ilustrar las características de los principales métodos empleados en biología molecular y su aplicación en el estudio de la respuesta inmune. La utilidad de las técnicas de biología molecular en el estudio de la respuesta inmune, ha constituido un poderoso instrumento para sus aplicaciones en el desarrollo de mejores alternativas diagnósticas y terapéuticas.

Palabras clave: biología molecular, inmunopatología, inmunología.

ABSTRACT

Molecular biology technical methods have caused a high impact in the field of immunology. They have made it possible to know the answer to many questions regarding the immune system function and have increased our ability to understand,

diagnose and treat a great deal of immunological diseases. A review of the literature about the importance of molecular biology in the study of immune response was made, including general concepts, classification of the most used technologies, as well as some applications in the study of immunology and immunopathology. Update information with analytic view about the main methods used in molecular biology and its application in the evaluation of immune response is shown. Usefulness of molecular biology techniques are a powerfull instrument to develop new and better alternatives for diagnoses and treatment.

Keywords: molecular biology, immunopathology, immunology.

INTRODUCCIÓN

La genética y la inmunología como ciencias han evolucionado vertiginosamente en los últimos 50 años. Un sinnúmero de investigaciones básicas y aplicadas utilizan sus principios y aportan un nuevo caudal de conocimientos en diferentes áreas de la ciencia.

En particular, la biología molecular ha desarrollado una armazón tecnológica que permite su aplicación en diferentes disciplinas médicas; en especial, para la inmunología ha constituido un poderoso instrumento.

El profundo impacto que han tenido las técnicas de genética y biología molecular en el campo de la inmunología ha permitido dilucidar varias interrogantes sobre el funcionamiento del sistema inmune y, además, ha aumentado enormemente nuestra habilidad para entender, diagnosticar y tratar una gran variedad de enfermedades inmunológicas.¹

Se denominan técnicas de biología molecular a todos los procederes de laboratorio que se usan para aislar ácidos nucleicos o extraerlos con alta pureza, visualizarlos, cortarlos, pegarlos, amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas, cortar una determinada región con enzimas de restricción para ver si por una mutación se gana o se pierde un sitio de restricción, entre otras múltiples variantes. Poseen diversas aplicaciones, generalmente en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, búsqueda de alelos o marcadores moleculares asociados a características de interés, diagnóstico microbiológico.²

La identificación, clonaje y secuenciación de un gran número de genes relacionados con las enfermedades inmunológicas se ha constituido en una herramienta extraordinaria para precisar los eventos genéticos y moleculares subyacentes a estas enfermedades. Inicialmente, la aplicación de estas técnicas en el ámbito de la inmunología básica permitió caracterizar, estructural y funcionalmente, una serie de complejos moleculares como las inmunoglobulinas (Ig), el receptor del linfocito T (RCT), las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las citocinas,

los co-receptores celulares y las proteínas del complemento. Esta información posibilita, a la vez, un conocimiento mucho más profundo y completo de una serie de procesos inmunológicos fundamentales tales como tolerancia, autoinmunidad, selección tímica, muerte celular y mecanismos efectores de la respuesta inmune. Este conocimiento más preciso y acabado del sistema inmune y sus trastornos, en conjunto con el desarrollo de modernas técnicas diagnósticas, permite la apertura de un nuevo panorama diagnóstico y terapéutico prometedor.¹

Estas razones hacen imprescindible ampliar el acervo de conocimiento y la actualización sobre estas temáticas, de los profesionales vinculados de una forma u otra al apasionante mundo del estudio de la respuesta inmune.

DESARROLLO

El área de trabajo de la biología molecular es amplia, pero puede agruparse en varias metodologías, entre las que se incluyen los métodos de hibridación, clonaje y secuenciación. Haremos un bosquejo general de cada grupo con énfasis en el clonaje acelular (la reacción en cadena de la polimerasa, *PCR*) y comentaremos algunas de las aplicaciones más importantes para la inmunología.

HIBRIDACIÓN MOLECULAR

La hibridación molecular es uno de los pilares de la mayor parte de las metodologías que se utilizan en el laboratorio de biología molecular. Un grupo de estas técnicas se ha diseñado para identificar determinadas secuencias en los ácidos nucleicos.²

Los métodos de hibridación se basan en el proceso de renaturalización de dos cadenas sencillas de ácido nucleico, muestra o diana, con una sonda marcada de secuencia conocida, que bajo condiciones experimentales permiten el apareamiento entre bases complementarias. El método de detección de los híbridos formados depende del marcaje empleado en la sonda.

El apareamiento por puentes de hidrógeno entre bases complementarias da lugar a estructuras de doble hebra de gran estabilidad. Estas pueden ser híbridos de ácidos desoxirribonucleicos (ADN), de ácidos ribonucleicos (RNA) (ambos considerados homodúplex) o híbrido ADN-ARN (heterodúplex). Las hebras apareadas tienen distinto origen (distinta especie, en general distinto ácido nucleico).³ El hecho de que cadenas diferentes de ácidos nucleico hibriden entre sí, indica que los organismos de donde proceden comparten un cierto grado de herencia evolutiva común y que sus ARN y proteínas tienen estructuras y funciones similares. A mayor grado de hibridación, mayor grado de conexión evolutiva entre especies.

Los ensayos de hibridación pueden clasificarse en hibridación en fase líquida, soporte sólido o *in situ*.³ La hibridación en soporte sólido incluye diferentes procedimientos, en los que la variación está dada por el tipo de ácido nucleico utilizado, el soporte en que se lleva a cabo la hibridación y la forma de colocar los ácidos en la membrana o soporte. Dentro de estos ensayos se encuentran estudios como *Southern blot*, *Northern blot*, *Dot blot*, *Slot blot* y la hibridación *in situ*.² A continuación se detallan diferentes procedimientos y su aplicación:

CLONAJE MOLECULAR

El proceso de clonación consiste en la obtención de un clon, entendido como un conjunto de elementos genéticamente idénticos entre sí, y a su precursor. Su interés radica en su carácter biotecnológico como proceso de multiplicación de moléculas de ADN, ARN, células, tejidos u organismos complejos, mediante mecanismos de manipulación genética.³

En particular la clonación de moléculas, sean éstas genes o fragmentos de ADN o ARN, puede dividirse según el proceso experimental en celular y acelular.³

Clonación Celular

El método clásico de clonación de ácidos nucleicos es el que aprovecha la capacidad de las células para replicar el ADN, relativo a la tecnología del ADN recombinante. Para ello, el fragmento de ADN o ADNc a clonar (inserto) se une a otro ADN (vector de clonación) y la molécula de ADN recombinante formada se incorpora a la célula anfitriona en cultivo donde tiene lugar la amplificación por replicación. Este proceso se conoce como transfección de genes y sus objetivos centrales son la amplificación y la expresión de los productos génicos.

La amplificación permite el estudio de la secuencia y la estructura de ácidos nucleicos, así como la detección de mutaciones asociadas a enfermedad. Por su parte, la expresión de los productos génicos permite el estudio de los procesos de transcripción, traducción y regulación. La producción de proteínas o ARN para su estudio y aplicación en el diagnóstico, la terapéutica, así como la ingeniería de proteínas con manipulación de sus propiedades para uso en la industria, son utilidades prácticas de la evaluación de los productos de expresión génica.³

Los genes tienden a estar desmetilados en los tejidos donde se expresan y metilados donde no se expresan, especialmente en regiones de ADN llamadas "islotes Cpg". Multiples factores ambientales pueden modificar este proceso y constituyen elementos reguladores de la expresión genética (Regulación Epigenética).

Para su evaluación en los productos génicos, encontramos técnicas avanzadas para la detección de metilaciones en los genes, como el MALDITOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), la HPLC (*High-performance liquid chromatography*) y la MSP-R CP (*Methylation-Specific PCR*). Esta última metodología precisa de un tratamiento especial de la muestra con bisulfito sódico para diferenciar las bases metiladas de las no metiladas. La *Nested-MSP* (*MN-MSP*) aparece como método alternativo a la *MSP* en aquellos casos en que se analicen muestras con baja cantidad o calidad de ADN inicial, como puede ocurrir con las conservadas en parafina.⁴

Clonación Acelular

Cuando la clonación no requiere la intervención de célula alguna e implica la clonación *in vitro* de moléculas de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, estamos refiriéndonos a la clonación acelular.^{5, 6}

La PCR es el ejemplo clásico de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, considerada hoy como una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética.

Esta técnica está basada en el uso de cebadores y una enzima, ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), que permite amplificar el segmento señalado por los cebadores (oligonucleótidos). Es un proceso cíclico de aproximadamente unas 40 repeticiones de tres pasos que suceden a diferentes temperaturas: desnaturación, alineamiento o fijación de los cebadores y extensión. Esta progresión es controlada en el tiempo y por los cambios de temperatura.^{5, 6}

Se han desarrollado variantes de la PCR que amplían su versatilidad dentro de las que se encuentran: PCR múltiple, RT-PCR, PCR anidada, PCR de extensión solapada (mutagénesis), PCR *in situ*, PCR *hot start*, amplificación mediante activación progresiva de la polimerasa, amplificación con rampa decreciente de temperaturas, amplificación asimétrica, amplificación cuantitativa (PCR en tiempo real), amplificación en chips.

La Taq polimerasa usa ADN como molde; cuando se parte del aislamiento de ARN se requiere de un paso previo denominado reverso transcripción (RT) conducido por enzimas. Hoy existen sistemas capaces de realizar ambas funciones, tanto la RT como la polimerización del ADN, y entonces el proceso se denomina RT-PCR. Despues de la amplificación el producto de la PCR puede ser detectado por medios, como la electroforesis en gel de agarosa o la electroforesis capilar.

Entre las ventajas actuales de la PCR se encuentran un menor tiempo de obtención de resultados y una mayor sensibilidad. Entre las desventajas resalta que es un proceder costoso, laborioso y requiere personal altamente entrenado para su ejecución.^{5, 6}

Esta técnica se ha utilizado en la evaluación cualitativa de mediadores de la respuesta inmune en sistemas de detección/no detección. Este método es eficiente evaluando el polimorfismo genético de mediadores solubles y receptores involucrados en la respuesta inmunitaria. Su uso se amplía al rastreo de mutaciones, tipado de ADN para trasplante, detección de microorganismos infecciosos, detección de enfermedades inmunológicas de origen genético, entre otras aplicaciones.³

El principio de la PCR a punto final se ha utilizado en sistemas de semicuantificación de mediadores del sistema inmune, como las citocinas, en las que el producto amplificado en diferentes diluciones se comprueba hasta su no detección, y se multiplica por el coeficiente de dilución.⁵

Otro de los métodos empleados en la evaluación de mediadores inmunitarios utilizando PCR a punto final, es la cuantificación de la densidad de banda resultado de electroforesis según los niveles de fluorescencia emitida durante la fase de meseta del proceso de amplificación, con la limitante de estar evaluando el producto de una relación que no es lineal con la concentración inicial. En todos los casos se establecen genes que sirven de control interno en la eficiencia de la reacción.⁷

RT-PCR en tiempo real

La RT-PCR ha demostrado ser un método eficiente para la cuantificación de la expresión de genes. La tecnología de la RT-PCR en tiempo real ha sido adaptada para realizar cuantificaciones. Existen dos métodos fundamentales para analizar los datos

de la PCR en tiempo real: la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. La cuantificación absoluta determina el aporte del número de copias del transcripto de interés, usualmente relacionando la señal de la PCR con una curva estándar. La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión del gen diana en comparación con algún grupo de referencia, tal como un control sin tratar o una muestras en el tiempo 0 durante el período de estudio.⁸

La cuantificación absoluta debe ser realizada en situaciones donde es necesaria la determinación absoluta del número de copias del transcripto. En algunas situaciones, es innecesaria, siendo suficiente el reporte del cambio relativo en la expresión de un gen. Por ejemplo, determinar que un tratamiento incrementó la expresión de un gen X en 2.5 órdenes puede ser más relevante que determinar que el tratamiento incrementó la expresión del gen X de 1 000 copias a 2 500 copias por célula.⁹

La cuantificación de los cambios relativos en la expresión génica utilizando RT-PCR en tiempo real requiere de ciertas ecuaciones, asunciones y su prueba para analizar los datos adecuadamente. El método de Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es el más utilizado para calcular los cambios en la expresión génica en este tipo de experimentos.⁹

Para aplicar este método es necesaria la selección de un control interno y un calibrador. El propósito de un gen como control interno es normalizar las PCRs para la cantidad de ARN adicionado a las reacciones de reverso transcripción. Se ha visto que los genes "*housekeeping*" (del inglés) estándares son usualmente suficientes como genes de control interno. Entre los controles internos apropiados para la PCR cuantitativa en tiempo real se encuentran el GADPH, la β -actina, la β 2-microglobulina y el ARN ribosomal (ARNr). Estos genes se expresan en los tejidos con diferente intensidad y esta información debe ser aprovechada para escoger el control interno más apropiado según el tejido en estudio.⁹

Los instrumentos utilizados para la PCR en tiempo real tienen un sistema de ciclos térmicos y de detección de fluorescencia controlados por un programa informático, y pueden monitorear la acumulación de productos en tiempo real midiendo el incremento en la fluorescencia durante cada ciclo de la reacción para generar resultados cuantitativos. En la actualidad existen varios tipos de reactivos para detectar los productos amplificados con sensibilidad similar. Se clasifican de forma general en dos grupos: las sondas fluorogénicas y las moléculas fluorescentes, que se unen al ADN.⁸

Son posibles los análisis de elevados rendimientos de expresión de genes mediante la utilización de tecnologías de microarreglos de ADN complementarios. En este caso, la expresión de un gran número de genes puede ser monitoreada de forma simultánea, comparando sus perfiles en diferentes muestras, combinando técnicas de hibridación. Entre las aplicaciones recientes de esta técnica en el campo de la inmunología encontramos el monitoreo de cambios en la expresión causada, por ejemplo, en las citocinas por la inflamación aguda o crónica de diferente origen, o la comparación entre las poblaciones celulares.¹⁰⁻¹³ Sin embargo, las bajas señales de hibridación son difíciles de interpretar; además, el costo elevado de los arreglos limita su uso en los estudios de rutina.

Secuenciación nucleotídica del ADN

La consecuencia inmediata de clonar un fragmento de ADN es la posibilidad de secuenciarlo. Conocer la estructura primaria de sus nucleótidos permite una caracterización estructural y funcional de la molécula secuenciada. Básicamente existen dos métodos para la secuenciación del ADN, uno químico y otro enzimático, desarrollados desde la década de los 70 del pasado siglo.

En el método químico de Maxam y Gilbert, el segmento de cadena simple (presente en múltiples copias) se marca radiactivamente en el extremo 5'. La solución que contiene al ADN marcado se divide en cuatro porciones, cada una de las cuales se somete a un tratamiento químico diferente para romper las moléculas en una sola de las cuatro bases nitrogenadas.

En la secuenciación por el método enzimático, el oligonucleótido iniciador marcado radiactivamente se aparea con el ADN de simple cadena a secuenciar y se inicia la síntesis de la cadena complementaria por parte de la ADN polimerasa. La mezcla en la que se producirá la reacción de síntesis se separa en 4 tubos, cada uno de los cuales contiene, además, uno de los nucleótidos terminadores (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP).

Combinando la información obtenida con cada una de las cuatro reacciones se puede inferir la secuencia del segmento completo.

El conocimiento de genes responsables de enfermedades hereditarias hace posible, mediante secuenciación, identificar a individuos portadores asintomáticos o en fase preclínica. La secuenciación del genoma de determinados agentes biológicos patógenos permite, además de comprender los mecanismos de producción de la enfermedad, desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos.²

La denominada "*next generation of sequency*" o secuenciación profunda, ha devenido en tecnología de avanzada que permitirá el genotipaje de alta resolución de genes con elevado grado de polimorfismo.^{14,15}

Después de finalizado el Proyecto de Genoma Humano, la alta demanda de secuenciadores de bajo costo ha elevado el número de tecnologías de secuenciación de nueva generación con elevado nivel de procesamiento, disponibles en el mercado. Esta nueva plataforma de secuenciación tiene un amplio rango de aplicaciones como: secuenciación de genoma completo *de novo* o por resecuenciación, dianas de resecuenciación para detección de mutaciones puntuales, perfil de transcriptoma, investigaciones en microbioma o estudio de regulación de genes.

El equipamiento puede estar diseñado para aplicaciones orientadas a la clínica con una capacidad de procesamiento de 10 Mb a 7.5 Gb por corrida hasta 600 Gb por corrida en los secuenciadores de elevado procesamiento, plataforma útil en el estudio de secuencias repetidas e incluso de genomas completos

ALGUNAS APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

Trasplantología

Se ha utilizado en trasplantología para optimizar el estudio de la histocompatibilidad de la pareja donante receptor a través del tipaje HLA por técnicas de oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO), donde la hibridación con oligosondas marcadas, combinado con la utilización de anticuerpos contra ese marcaje, permite la identificación de las variantes alélicas presentes.¹⁶

La técnica de *primer* específico de alelos PCR- SSP introducida por Ollerup emplea iniciadores conocidos como específicos de alelos o grupo de ellos y la asignación de especificidad está dada por la presencia o ausencia del producto amplificado. Es una técnica simple, reproducible y de gran poder de resolución y rapidez, especialmente útil en los aseguramientos del trasplante renal y de medula ósea.¹⁶

Estas técnicas permiten además detectar alelos que no se tipifican por métodos serológicos como los correspondientes al DQa, y brinda un panorama más real del verdadero polimorfismo del sistema. Como resultado de la aplicación de estas técnicas se dan respuestas a algunas interrogantes que existían relacionadas con las asociaciones HLA, enfermedad y al trasplante.^{16, 17} La secuenciación profunda por ejemplo ha devenido en tecnología de avanzada que permitirá el genotipaje de alta resolución de genes HLA clase I y II, en los que las ambigüedades alélicas son el mayor problema en la tipificación debido a una cobertura genómica incompleta entre otros factores.^{14, 15}

HLA y enfermedad

El genotipo HLA puede asociarse a predisposición o protección de padecer ciertas enfermedades, frecuentemente de origen autoinmune, cuyo debut y severidad pueden estar relacionados con mecanismos que vinculan la expresión de determinados genes que codifican antígenos leucocitarios humanos.

Los primeros estudios sobre HLA y enfermedad se realizaron en relación con la propensión a padecer enfermedades infecciosas. Teniendo en cuenta la función de estas moléculas en la presentación antigenica es claro su mecanismo. Otro grupo de enfermedades se fueron asociando crecientemente, agrupadas fundamentalmente en: alteraciones inmunológicas (inmunodeficiencias, autoinmunidad, alérgicas); enfermedades metabólicas, tumores malignos sólidos o hematológicos, enfermedades infecciosas y parasitarias.

Las enfermedades autoinmunes son las más representadas y muestran una gran diversidad de asociaciones. Es clásica la asociación HLA B27 con la espondilitis anquilosante. El 60 % de la base genética para la diabetes mellitus está asociada a HLA DR3, DR4 y dependiendo de las poblaciones estudiadas DRB1*0401, DRB1*0301 y DQB1*0602. Otras asociaciones bien establecidas incluyen: enfermedad celíaca (DQ2, DQ4); narcolepsia (DR2, DRB1*1601, DRB1*1502); enfermedad de Behçet (HLA-B51/B5), entre otras.^{17, 18}

La asociación con enfermedad no solo se ha establecido para los genes HLA sino también con otros genes involucrados en la respuesta inmune. En la propia enfermedad de Behçet (EB), se vincula con el gen ICAM-1 (del inglés, *intracelular adhesión molécula*), gen óxido nítrico sintetasa endotelial, gen de TNF (del inglés, *tumor necrosis factor*), entre otros genes relacionados con el grupo de síndromes autoinflamatorios, como la fiebre mediterránea familiar. La reacción en

cadena de la polimerasa y los estudios a partir de microarreglos han sido de gran utilidad en el desarrollo de esta área.¹⁹

Tolerancia inmune

Un ejemplo elocuente de la integración de varias técnicas de biología molecular en la investigación en trasplante y tolerancia inmune, son las realizadas por instituciones especializadas de Londres y Estados Unidos. Desarrollaron una plataforma cruzada de biomarcadores para distinguir pacientes receptores tolerantes de trasplante, de pacientes con función renal estable y pacientes receptores con diferentes grados de inmunosupresión. Los primeros mostraron un perfil de expresión de genes distintivo.²⁰

Se utilizó un microarreglo diseñado para la investigación en trasplante, que permitió el análisis de la expresión diferencial de 4 607 genes en muestras de sangre periférica. Los resultados de estos ensayos fueron confirmados por el análisis de RT-PCR cuantitativa de varios genes altamente asociados, incluida la combinación de genes que tenía disminuida o aumentada su expresión normal.²⁰

Para mayor precisión se seleccionaron los genes más distintivos en su capacidad diagnóstica y se conformó una firma de expresión génica que identifica específicamente a los receptores de trasplante renal tolerantes sin uso de inmunosupresores por al menos 1 año, con un patrón común de 8 genes modificados, relacionados con las células B (*FCRLA, IGHM, IGKV3, EBI2, CD40, BLNK, CD79A, CD79B*). Paralelamente a través de RT-PCR cuantitativa se estudió la expresión del gen Fox P3, que resultó mayor en los receptores tolerantes al trasplante, lo que refuerza la idea de una actividad reguladora activa en estos casos.²⁰

Inmunohematología

Los genes que codifican a la mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos han sido clonados. Todos los sistemas de antígenos plaquetarios humanos conocidos se han caracterizado y difundido en diversas bases de datos, como por ejemplo:<http://www.iccbba.com/page27.htm>, <http://www.bioc.aecom.yu.edu/bqmut/index.htm>, <http://www.uni-ulm.de/fleigel/rh/>, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>.²¹

La mayoría de los grupos sanguíneos descritos derivan de mutaciones puntuales. La evaluación de la detección del polimorfismo simple de nucleótido es el método molecular empleado. No obstante, la aparición de estos sistemas de grupos sanguíneos también puede ser explicada por fenómenos de conversión génica, eventos de delección, duplicación o entrecruzamiento (*unequalcrossover*).²¹

Algunas de las áreas en las que el diagnóstico molecular es determinante en inmunohematología se relacionan con:

- pruebas prenatales para el genotipaje fetal en madres con anticuerpos inmunes;
- evaluación de la cigocidad en padres antígeno D positivos;²²
- tipaje de pacientes recién transfundidos, con anticuerpos antieritrocitarios que interfieran con la accesibilidad al antígeno, o con manifiestos problemas para la detección serológica por discrepancias en los grupos.²¹

Contar con donantes y receptores de transfusión sanguínea completamente genotipados permite, al realizar la predicción serológica, menores posibilidades de aloinmunizaciones y en consecuencia, de reacciones postransfusionales. Esta ventaja cobra mayor valor al lograr la detección de donantes raros, que facilitan la transfusión profiláctica en los casos más difíciles.^{21, 22}

Se ha desarrollado la plataforma tecnológica que permite alcanzar estos objetivos a través del desarrollo de BioChips que utilizan ADN genómico extraído a partir de sangre humana para la tipificación de variantes alélicas de genes que codifican para los principales grupos sanguíneos y antígenos plaquetarios.^{22, 23}

Inmunología plaquetaria

Los estudios iniciales usando ARNm derivado de plaquetas en la década del 80 del siglo pasado, involucraron la construcción de librerías de ADNc que identificaban muchos transcriptos presentes en las plaquetas. El análisis serial de la expresión de genes (*SAGE* del inglés, *serial analysis of gene expression*) y la tecnología de microarreglos, han sido utilizados para la caracterización, cada vez más completa, de los transcriptos plaquetarios, lo que sugiere que entre el 15 y el 32 % de los genes estudiados están presentes en plaquetas, incluidos genes involucrados en la respuesta inmune, consistente con la función de las plaquetas en la inmunidad e inflamación.²⁴

La preparación de un panel de plaquetas para determinar la especificidad realizando exclusión por reactividad, es complejo, pues algunos de estos antígenos tienen una frecuencia baja de expresión en la población. El desarrollo de una línea celular capaz de expresar antígenos plaquetarios humanos específicos ha constituido una metodología útil que ha mejorado las condiciones de sensibilidad y especificidad de los ensayos. Esto se ha logrado a través tecnología recombinante con la transfección de los genes de interés.²⁵

Inmunodeficiencias primarias

Sin duda, en el área de las inmunodeficiencias primarias las técnicas de genética y biología molecular han tenido gran aplicación ya que han permitido descifrar las bases estructurales de más de 160 enfermedades primarias del sistema inmune. Así, se han logrado caracterizar alteraciones moleculares que afectan importantes componentes del sistema inmune, como por ejemplo: los linfocitos, los fagocitos y el complemento. En los linfocitos se han encontrado alteraciones a nivel del receptor del linfocito T (TCR), de las moléculas de clase I y II del MHC, de los co-receptores celulares, de las enzimas citoplasmáticas y de los receptores de citocinas. En el sistema fagocítico se han encontrado defectos generalmente a nivel enzimático, mientras que en el sistema del complemento se han logrado detectar deficiencias de casi todos sus componentes.¹

La secuenciación profunda o "*next generation of sequencing*" constituye una herramienta útil en la evaluación de la variabilidad de anticuerpos que permitiría predecir la combinación de reordenamientos más probables en el repertorio desarrollado por un individuo, frente a determinado reto antigenico. Esta información es útil para evaluar deficiencias de anticuerpo antigeno específico, en vacunología e ingeniería genética, entre otras múltiples áreas.^{14, 15}

LAS BASES DE DATOS

Un resultado de la secuenciación, estudio de la estructura y funcionamiento de los elementos del sistema inmune es ponerlo a disposición de la comunidad científica. A estos efectos se han creado múltiples bases de datos que resumen la información recopilada, tanto en humanos como para especies de animales, plantas y organismos inferiores; que permite su estudio, comparación y manipulación de forma óptima.

La base de datos de inmunopolimorfismo (*IPD* del inglés, *Immuno Polymorphism Database*: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/>) es un espacio de bases de datos especializadas relacionado con el estudio de polimorfismo de genes en el sistema inmune. Creado hace 10 años, está integrado por cuatro bases de datos: *IPD-KIR*, contiene las secuencias alélicas de los receptores tipo inmunoglobulinas, de la células asesinas naturales; *IPD-MHC*, una base de datos del complejo mayor de histocompatibilidad de diferentes especies; *IPD-HPA*, aloantígenos expresados solo en plaquetas; e *IPD-ESTAB*, que provee un acceso a la base de datos europea de líneas celulares de tumor; un banco de líneas celulares de melanomas caracterizados inmunológicamente.

La base de datos está incluida en *SRS*, *BLAST* y *FASTA*, motores de búsqueda del instituto europeo de bioinformática. Estas y otras bases de datos interconectadas son herramientas indispensables, que a través de la bioinformática proveen la mejor y más optimizada información relacionada con el polimorfismo de secuencia del sistema inmune a los diversos grupos de investigación.

Sería interminable el abordaje en sus diferentes perfiles, de la utilidad de las técnicas de biología molecular en el estudio de la respuesta inmune y sus aplicaciones en el desarrollo de mejores alternativas diagnósticas y terapéuticas, como la fármacogenómica y la terapia génica, entre otros, para la creciente lista de entidades que incluyen en su etiopatogenia un mecanismo inmune. Sirva esta revisión para la introducción a este apasionante tema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carrión F, Figueroa FE, Rodríguez C. La inmunología clínica actual: una perspectiva genética y molecular. Rev méd Chile. 2000 Jun; 128(6): 650-8.
2. Ruiz Álvarez V, Menéndez Lorenzo R. Métodos y aplicaciones de la Biología Molecular en Biomedicina. (Internet). 2006. (citado enero15, 2014). Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>
3. Luque J, Herráez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. conceptos, Técnicas y Aplicaciones en ciencias de la salud. La Habana: Ciencias Medicas. 2001.
4. López-Durán M, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Diez-Pérez R, Bascones-Martínez A. Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología oral. Av. Odontoestomatol 2010; 26 (4): 189-96.

5. Ito Y, Ichiyama T, Kimura H, Shibata M, Ishiwada N, Kuroki H, et al. Detection of influenza virus RNA by reverse transcription-RCP and proinflammatory cytokines in influenza-virus-associated encephalopathy. *J Med Virol*, 1999; 58(4): 420-5.
6. Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, Appleyard GD, Chui L, Pang XL, et al. Design and Validation of Real-Time RT-RCP assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3454-60. doi: 10.1128/JCM.01103-09.
7. Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Yamakawa T. Semi-quantitative RT-RCP-based assay, improved by Southern hybridization technique, for polarity-specific influenza virus RNAs in cultured cells. *J Virol Methods*. 2002; 106(1):125-34.
8. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct;25(2):169-93
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative RCP and the 2- $\Delta\Delta Ct$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
10. Keynan Y, Juno J, Meyers A, Ball TB, Kumar A, Rubinstein E, et al. Chemokine Receptor 5 $\Delta 32$ Allele in Patients with Severe Pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis*. 2010 Oct;16(10):1621-2. doi: 10.3201/eid1610.100108.
11. Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The Chemokine Receptor CCR5 Plays a Key Role in the Early Memory CD8+ T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):101-13. doi: 10.1016/j.jimmuni.2008.05.011.
12. Salentin R, Gemsa D, Sprenger H, Kaufmann A. Chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness of human monocytes after influenza A virus infection. *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):252-9.
13. Wareing MD, Lyon A, Inglis C, Giannoni F, Charo I, Sarawar SR. Chemokine regulation of the inflammatory response to a low-dose influenza infection in CCR2-/- mice. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):793-801.
14. Trachtenberg EA, Holcomb CL. Next-Generation HLA Sequencing Using the 454 GS FLX System, in Transplantation Immunology. *Methods Mol Biol*. 2013;1034:197-219. doi: 10.1007/978-1-62703-493-7_10.
15. Mathonet P, Ullman CG. The application of next generation sequencing to the understanding of antibody repertoires. *Front Immunol*. 2013 Sep 11;4:265. eCollection 2013.
16. Ramos Alvarez F. Tecnicas de Histocompatibilidad para el trasplante de organos y tejidos. Laboratorio Clínico. La Habana: Ciencias Médicas. 2004.
17. Kalble T, Alcaraz A, Budde K, Humke U, Karam G, Luc M. Guía clínica sobre el trasplante renal. European Association of Urology. 2010.
18. Bai JC, Bottero AJ, González AF, Litwin N, Martín GT, Martínez SM, et al. Guía de práctica clínica sobre diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celíaca en el primer

nivel de atención. Buenos Aires: Ministerio de Salud Presidencia de la Nación.: Buenos Aires. 2012.

19. García-Palenzuela R, Graña Gil J, Varela Arias M, Tovar BoboM. Actualización de la enfermedad de Behcet. A propósito de 2 casos en atención primaria. Semergen. 2012 Jan-Feb; 38(1):33-9.
20. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010 Jun;120(6):1848-61. doi: 10.1172/JCI39922.
21. van der Schoot CE. Molecular diagnostics in immunohaematology. *Vox Sanguinis*, 2004. 87(Suppl. 2): 189-92.
22. Castilho L. Applying molecular immunohematology discoveries to daily transfusion practice. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012; 34(3):175-87.
23. Avent ND, Martinez A, Flegel WA, Olsson ML, Scott ML, Nogués N, et al. The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2009; 36(3): 162–167. doi:10.1159/000218192
24. Macaulay IA, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D, Watkins NA. Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest.* Dec 1, 2005; 115(12): 3370-3377. doi: 10.1172/JCI26885
25. Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, Furuta RA, Hori Y, et al. Establishment of a cell line panel as an alternative source of platelet antigens for a screening assay of anti-human platelet antibodies. *Transfus Med.* 2011 Jun; 21(3):199-204. doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01064.x.

Recibido: Abril 07, 2014

Aceptado: Mayo 31, 2014

Dra. Yamila Adams Villalón. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268 Fax (537) 644 2334 Email: rchematologia@infomed.sld.cu