

Artículo de revisión

Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la determinación del antígeno Diego^{-b} utilizando iniciadores de secuencia específica (SSP)

Martínez-Álvarez JC,* Alcaraz-López JL,* Arrazola-García A,* Suárez-Cruz A,* Pérez-Rodríguez M,** Rivera-López R,* Ambriz-Fernández R*

Resumen

Los anticuerpos anti-Di^a y anti-Di^b son generalmente IgG que causan hemólisis postransfusional y enfermedad hemolítica del recién nacido que pueden ir desde leves hasta muy severas. El anti Diego-b es un anticuerpo pocas veces encontrado, reportado no más de 15 veces 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. La solución que se presenta ahora con las nuevas tecnologías es estudiar a la población por biología molecular, para lo cual contamos con dos donadores clasificados Diego-b negativos, que servirán de controles, y con 154 donadores fenotipados como Diego-a positivos, de los que desconocemos su antígeno Diego-b y que serán el objeto de estudio de este trabajo. Las sondas de

Abstract

The anti-Di^a and anti-Di^b antibodies are generally anti-IgG type. They cause hemolysis post-transfusion and hemolytic disease of the newborn from mild to severe. The anti-Diego^{-b} is an antibody rarely found and reported no more than 15 in world literature and the Blood Bank of National Medical Center Century XXI, IMSS, have been detected 4 in the last 10 years. The solution is now presented with new technologies to study the population by molecular biology, for which we have two donors classified Diego^{-b} negative controls, and we serve with 154 donors phenotyped Diego^a positive for these we don't know his Diego^{-b} antigen. Oligonucleotide probes for the polymorphisms of Di1 and Di2 were designed according to the published sequence for human chromosome 17 and the report made by the group of

Abreviaturas:

Di: Sistema Diego

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SSP: Iniciadores de secuencia específica

* Laboratorio de Histocompatibilidad y HLA, Banco Central de Sangre, IMSS, México, D.F.

** Unidad de Investigación en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, IMSS, México, D.F.

oligonucleótidos correspondientes a los polimorfismos de Di1 y Di2 fueron diseñadas de acuerdo a la secuencia publicada para el cromosoma humano 17 y el reporte hecho por el grupo del Instituto de Medicina Transfusional Ni Gang Xi Road de China.

Palabras clave: Ácido desoxirribonucleico, reacción en cadena de la polimerasa, iniciadores de secuencia específica.

the Institute of Transfusion Medicine Ni Gang Xi Road of China.

Key words: Desoxirribonucleic acid, polymerase chain reaction, sequence specific primers.

Introducción

El primer anticuerpo anti Diego-b fue reportado por Thompson y cols. en 1967 en un paciente latinoamericano politransfundido. Según estudio realizado por Grumbaum y cols.,³ en la población mestiza de la ciudad de México la frecuencia del antígeno Di^a positivo es de 4.8 y 99.7% del Di^b; en la población caucásica el antígeno Diego^b es de alta incidencia y para fines prácticos se considera como 100%.

Forma parte de la banda 3 de la membrana del eritrocito. Este sistema mantiene la integridad celular por unión con la espectrina y es mediador de intercambio de los aniones C. Algunas de las anomalías en la estructura de los eritrocitos se asocian con mutaciones en el gen de la banda 3: ovalocitosis del sudeste asiático⁵ y la resistencia de ellos a la malaria,⁶ esferocitosis autosómica dominante⁷ y acidosis renal de túbulos distales.⁸

Hasta ahora se conocen 17 antígenos de este sistema (Cuadro I)⁹ y dos más que no han sido clasificados. Los anticuerpos anti-Di^a y anti-Di^b son generalmente IgG que causan hemólisis postransfusional y enfermedad hemolítica del recién nacido, y que pueden ir desde un grado leve hasta uno muy severo. El anti Diego^{-b} es un anticuerpo pocas veces encontrado y reportado, no más de 15 veces en la literatura internacional. En el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS se han detectado 4 en los últimos 10 años.

Los dos primeros casos fueron pacientes politransfundidos y con anticuerpos que estuvieron activos más de 13 y 17 años respectivamente. Se corre el riesgo de confundir como auto anti Sistema Rh/Hr los aloanticuerpos en pacientes recientemente transfundidos que tengan este anticuerpo.

Hasta ahora no se han encontrado anti-Kell 2 en nuestra población, por lo que se debe pensar primero en un anti-Diego^{-b} y no en el

Cuadro I: Antígenos del sistema Diego.

Número ISBT*	Grupo sanguíneo	Amino-ácido	Mutación	Epítopo banda 3
010001	Di ^a	854	Pro Leu	7
010002	Di ^b	854	Pro	7
010003	Wr ^a	658	Glu Lis	4
010004	Wr ^b	658	Glu	4
010005	Wd ^a	557	Val Met	3
010006	Rb ^a	548	Pro Leu	3
010007	WARR	552	Tr Ile	3
010008	ELO	432	Arg Trp	1
010009	Wu	565	Gly Ala	3
010010	Bp ^a	569	Asn Lys	3
010011	Mo ^a	656	Arg Hys	4
010012	Hg ^a	656	Arg Cys	4
010013	Vg ^a	555	Tyr Hys	3
010014	Sw ^a	646	Arg Gln	4
010015	BOW	561	Pro Ser	3
010016	NFLD	429	Glu Asp	3
010017	Jn ^a	566	Pro Ser	3
010018	KREP	566	Pro Ala	
010019	Tra	551	Lys Asn	

*Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea.

«anti-cellano», como se catalogaron inicialmente estos 4 anticuerpos.

Es recomendable tener una base de datos con la información de donadores de fenotipos raros para resolver estos casos que pueden ser más comunes de lo que pensamos, pero que no los detectamos por faltar esta información.

El problema al que nos enfrentamos es que no hay antisuero comercial anti-Di^b en ninguna parte del mundo y por lo tanto no es posible fenotipar a los donadores y pacientes para este antígeno.

La solución que se presenta ahora con las nuevas tecnologías es estudiar a la población por biología molecular,¹⁰ para lo cual se contó con dos donadores clasificados Diego^b negativos que sirvieron de controles.

Este primer estudio abre la puerta a las posibilidades de trabajar por métodos moleculares otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con 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 aloanticuerpos y al transfundir sangre potencialmente compatible *in vitro* puede poner 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 al 100% a nuestros pacientes politransfundidos, como también 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.

Material y métodos

El grupo sanguíneo Di (Diego) se determinó utilizando suero comercial políclonal anti-Di^a (Gamma-Biologicals, Houston, Tx.) para los controles Di^a.

Determinación del genotipo utilizando PCR-SSP (Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específica): Antes de 1995, se asignaron 2 pares de antígenos an-titéticos para el sistema Di, el Dia (DI1) y Dib (DI2) (Figura 1).

Las sondas de oligonucleótidos fueron diseñadas de acuerdo a la secuencia publicada para el cromosoma 17 (GeneBank) (Cuadro II). La PCR inicial se realizó con 1 μ L de DNA muestra, 1 μ L de la enzima Taq DNA polimerasa y 8 μ L de mezcla o master mix para tipificar Di (Tris-HCl, MgCl₂, dNTP's y cada uno de los iniciadores forward y reversa). Se sometieron al estudio dos pacientes para los controles positivos, los cuales son Di^b y controles negativos de donadores Di^a. Las muestras se llevaron a 30 ciclos de PCR en un termociclador. Seguidos de una extensión final, los productos de PCR fueron analizados por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidium,

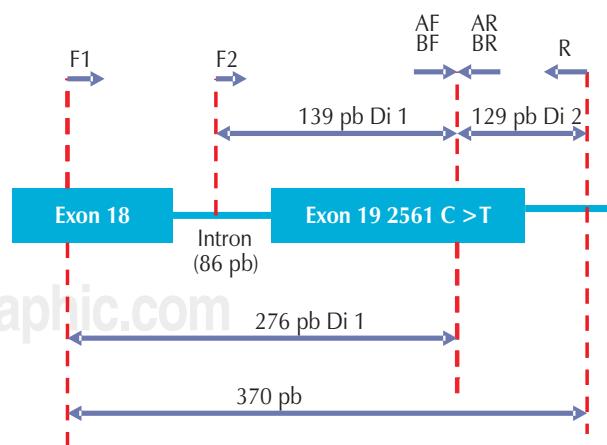


Figura 1. Diseño de los iniciadores.

Cuadro II. Iniciadores utilizados para genotipificación de Di.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Posición del nucleótido*	Mezcla de iniciadores	Alelo detectado	Tamaño del producto pb
F1	GGTCACGTGCTCAGCGG	137075-137092	F1/AR	Di 1	276
F2	GTGCTGGGGTGTGATAGGC	137212-137230	F2/AR	Di1	139
AR	CAGGGCCAGGGAGGCCA	137350-137334			
BF	GGTGGTGAAGTCCACGCC	137317-137334	BF/R	Di 2	129
R	CCAGGCAGCCACTCACAC	137444-137427			
HGHF	GCCTTCCCAACCATTCCCTT	893-912	HGHF/HGHR	HGH	427
HGHR	TCACGGATTCTGTGTTTC	1319-1298			

*Datos del Gene Bank

para finalmente ser observados con luz ultravioleta.

Resultados

Las amplificaciones fueron de acuerdo a los iniciadores utilizados y las bandas de dichos productos se pudieron determinar visiblemente en los corrimientos electroforéticos (*Figura 2*); las bandas se compararon con los marcadores de peso molecular; el tamaño de los productos pudo ser establecido de acuerdo al marcador de peso molecular, siendo estos productos de 139 para DI1 y 129 para DI2 en pares de bases; la especificidad y sensibilidad del método molecular basado en la secuencia específica de iniciadores por PCR fue la esperada de acuerdo a lo observado y a lo publicado por otros grupos de trabajo. La determinación de la PCR-SSP duró 4 horas a partir de la obtención del DNA.

Discusión

El problema al que nos enfrentamos es que no hay antisero comercial anti-Dib en ninguna parte del mundo y por lo tanto no es posible fenotipar a los donadores y pacientes para este antígeno.

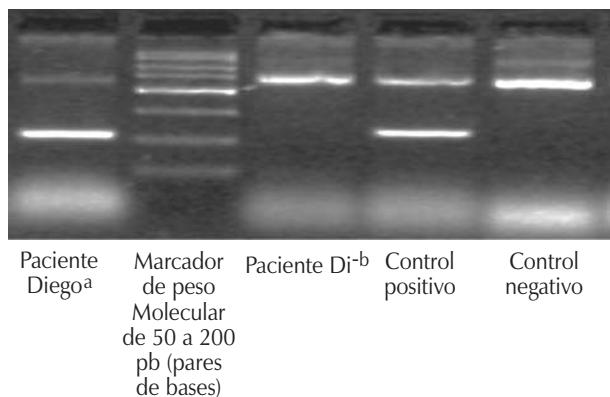


Figura 2. Gel de agarosa al 2%. Corrimiento electroforético.

Este estudio abre la puerta a las posibilidades de trabajar por métodos moleculares otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con 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 aloanticuerpos y al transfundir sangre potencialmente compatible *in vitro* puede poner 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 por consecuencia al 100% a nuestros pacientes politransfundidos, así 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 barato y rápido y puede realizarse a gran escala.

Conclusión

La realización de métodos moleculares aplicados a la inmunohematología abre la posibilidad de resolver problemas transfusionales en pacientes a los cuales no se les puede clasificar aloanticuerpos por métodos convencionales.

La realización de metodologías basadas en la biología molecular resulta barata y rápida, tomando en cuenta su alto grado de sensibilidad y especificidad.

Este primer estudio abre la puerta a las posibilidades de trabajar por métodos moleculares otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con Coombs directo positivo. Se podrán realizar los fenotipos por métodos moleculares de los sistemas Rh/Hr, Duffy y Kidd, que son los más peligrosos en los servicios de transfusión, y el contar con los iniciadores diseñados baja el costo de este tipo de pruebas, además de poder realizar este estudio a gran escala, optimizando reactivos y

tiempo con la certeza de tener un resultado rápido y preciso.

Referencias

1. Larysse N, Arends T, Domínguez SR. Nuevos grupos sanguíneos encontrados en descendientes de Indios. *Acta Med Venez* 1955; 3: 132-132.
2. Thompson PR, Childers DM, Hatcher DE. Anti-Dib. First and second examples. *Vox Sang* 1967; 13: 314.
3. Gorodezky C, Loon J, Moliterno R. HLA in some Latin American populations. 11º International Histocompatibility Workshop in Yokohama, Japan. 1991.
4. Grunbaum, B.W., Selvin, S., Mhyre B.A., and Pace N. Distribution of gene frequencies and discrimination probabilities for 22 human blood genetic systems in four racial groups. *Journal of Forensic Sciences*. 25: 428-444.
5. Booth PB, Serjeantson S, Woodfield DG, Amato D. Selective depression of blood group antigens associated with hereditary ovalocytosis among Melanesians. *Vox Sanguinis* 1977; 32: 99-110.
6. Hadley TA, Saul G, Lamont DE, Hudson LH. Resistance of Melanesian elliptocytes (ovalocytes) to invasion by *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium falciparum* malaria parasites *in vitro*. *J Clin Invest* 1983; 71: 780-782.
7. Jarolim PHL, Rubin SC, Liu MR, Cho V, Brabec LH, Derick SJ, Yi STO, Saad S, Alper C, Brugnara DE, Golan, Palek J. Duplication of 10 nucleotides in the erythroid band 3 (AE1) gene in a kindred with hereditary spherocytosis and band 3 protein deficiency (band 3 prague). *J Clin Invest* 1994; 93: 121-130.
8. Bruce LJ, Cope DL, Jones GK, Schofield AE, Burley MS, Povery RJ, Unwin O, Wrong, Tanner MJA. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (band 3, AE1) gene. *J Clin Invest* 1997; 100: 1693-1707.
9. Jarolim P, Rubin HJ, Zakova D, Reid ME. Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. *Blood* 1998. (In Press).
10. Guo-Guang Wu, Yu-Qing Su, Qiong Yu et al. Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Transfusion* 2002; 42: 1553-1556.

Correspondencia:

Martínez-Álvarez JC

Banco Central de Sangre.

Av. Cuauhtémoc Núm. 330

Col. Doctores, México, D.F.

Delegación Cuauhtémoc. 06720.

Teléfono: 5 6 27 69 00 Ext. 21727.

Fax: 54 40 05 04.

Correo electrónico: juliocesar_ma@yahoo.com.mx