



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPORTANCIA DE UN LABORATORIO DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL PROGRAMA DE  
TRASPLANTE DE SANGRE PLACENTARIA Y SU  
IMPACTO EN LA POBLACIÓN MEXICANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ARMANDO CORTÉS MATIAS**



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA
Vocal	Prof. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS
Secretario	Prof. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
1er. Suplente	Prof. ROSALINDA VELÁZQUEZ SALGADO
2º. Suplente	Prof. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea

ASESOR DEL TEMA:

MASS. Eva Delia Calderón Garcidueñas

---

SUSTENTANTE

Armando Cortés Matias

---

## Agradecimientos

Llegado este momento, todo lo que deseo expresar se limita a una sola palabra, humilde y sencilla en su constitución pero sabia y valiosa en su significado: GRACIAS . . .

- A mis padres Gabriel y Teresa, por todo su apoyo y paciencia . . .
- A Lucio M. por haber sido el iniciador de este sueño y un ejemplo a seguir. Este triunfo también es tuyo, aunque ya no estés aquí para verlo. Dedico esta tesis a tu memoria.
- A Claudia Z. que me ha enseñado que la amistad sí existe.
- A mis amigos del grupo  $\alpha$ , que me han brindado su apoyo y afecto todo este tiempo.
- A mis amigos de otras generaciones, no menciono nombres pero todos han sido importantes en mi vida y he aprendido muchas cosas de cada uno de ustedes. CAS., PMP., LMG., NGP., NGJ., RM., . . .
- A la UNAM, que me ha dado tanto y a todos mis profesores de la gloriosa Facultad de Química.
- A Eva Delia Calderón, por darme su confianza, además de consejos y enseñanzas y haberme dado la oportunidad de estar en su equipo de trabajo.
- A la pequeña Miri, nunca cambies . . .
- Al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, particularmente a todos los integrantes del Departamento de Investigación, Desarrollo y Control de Calidad, Javier, Angie, el Inge, Pepe, Ara, Lalo, Rosi, Denhi, Marco, Bety . .

GRACIAS



---

## ÍNDICE

	Página
1.INTRODUCCIÓN.....	8
2.GENERALIDADES.....	9
2.1. MHC.....	9
2.2. HLA.....	12
2.2.1.HISTORIA.....	12
2.2.2.ORGANIZACIÓN GENÉTICA.....	15
2.2.2.1.La región de Clase I.....	16
2.2.2.2.La región de Clase II.....	16
2.2.3.POLIMORFISMO.....	17
2.2.4.EXPRESIÓN EN TEJIDOS.....	19
2.2.5.ESTRUCTURA.....	20
2.2.5.1.Moléculas de Clase I.....	20
2.2.5.2.Moléculas de Clase II.....	23
2.2.6.NOMENCLATURA.....	24
2.2.6.1.Para métodos serológicos.....	24
2.2.6.2.Para métodos moleculares.....	25
2.2.6.2.1.Ambigüedad.....	26
2.2.7.IMPORTANCIA DEL HLA EN TRASPLANTE.....	28
2.2.8.EL PAPEL DEL HLA EN EL BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.....	30
2.2.9.SELECCIÓN DE UNIDADES.....	32
2.2.10.METODOLOGÍAS UTILIZADAS.....	34
2.2.10.1.Métodos serológicos.....	35
2.2.10.1.1.Ensayo de Microlinfocitotoxicidad.....	36
2.2.10.1.2.Inmunoprecipitación e isoelectroenfoque.....	37
2.2.10.2.Métodos Moleculares.....	38



---

2.2.10.2.1.La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	38
2.2.10.2.1.1.Electroforesis.....	42
2.2.10.2.1.2.Nivel y ambigüedad.....	43
2.2.11.PREVALENCIA DE HLA.....	44
2.2.12.EL CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE HLA.....	46
3.OBJETIVOS.....	48
4.METODOLOGÍA.....	49
4.1.VALIDACIÓN.....	49
4.2.CONTROL DE CALIDAD INTERNO.....	49
4.3.CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.....	51
4.4.BÚSQUEDAS.....	51
5.RESULTADOS.....	53
5.1.CONTROL DE CALIDAD INTERNO.....	53
5.1.1.MUESTRAS DE LOTE.....	53
5.1.2.FRAGMENTOS.....	56
5.2.CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.....	73
5.3.BÚSQUEDAS.....	85
6.ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	87
7.CONCLUSIONES.....	91
8.REFERENCIAS.....	93
9.APÉNDICE.....	99
9.1.Material y reactivos.....	99
9.2.AISLAMIENTO Y EXTRACCIÓN DEL DNA.....	100
9.2.1.Técnica.....	100
9.2.2.Técnica para aislar el DNA a partir de un fragmento de unidad de SCU congelada ( <i>buffy coat</i> ) .....	101
9.3.AMPLIFICACIÓN DEL DNA (USAR GUANTES SIN POLVO).....	102



---

9.3.1. Dilución y calibración en espectrofotómetro.	
Cálculo de la concentración de DNA.....	102
9.3.2. Ajuste de la concentración de DNA.....	102
9.3.3. Operación del termociclador .....	104
9.4. ELECTROFORESIS Y ANALISIS DEL DNA AMPLIFICADO.....	104
9.4.1. Preparación del Buffer TBE X10 para el gel y la cámara de electroforesis.....	104
9.4.2. Preparación de la agarosa al 2 %.....	104
9.4.3. Preparación de la cámara de electroforesis.....	105
9.4.4. Visualización en el transiluminador UV.....	106
9.4.5. Obtención de fotografía del gel.....	106
9.4.6. Análisis en el programa Unimatch Plus.....	106



**IMPORTANCIA DE UN LABORATORIO DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL PROGRAMA DE TRASPLANTE DE  
SANGRE PLACENTARIA Y SU IMPACTO EN LA POBLACIÓN  
MEXICANA**





## 1. INTRODUCCIÓN

El trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) es un procedimiento que se realiza para tratar una variedad de enfermedades hematológicas y no hematológicas. La fuente de donde se obtienen las CPH ha ido ampliándose a través de los últimos años, obteniéndose principalmente de médula ósea y sangre periférica movilizada; sin embargo, las desventajas que presentan estas fuentes convencionales ha impulsado la búsqueda de otras opciones. A partir de la demostración de la presencia de CPH en Sangre de Cordón Umbilical (SCU) en los años setentas, se sugirió el uso de esta nueva opción como fuente de CPH, llevándose a cabo el primer trasplante exitoso en 1988. Desde entonces y debido a sus ventajas sobre otras fuentes, tales como facilidad de obtención, ausencia de riesgo para el donante y otras características biológicas, la SCU se ha convertido en los últimos años en un recurso muy importante no sólo para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas, sino también para otras aplicaciones que pudieran dársele en el futuro. Esto ha impulsado la creación de Bancos de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU) que se encargan de almacenar y conservar la SCU, teniéndolas disponibles para cuando se requiera. El éxito en los trasplantes de CPH reside principalmente en la compatibilidad en Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) entre donador y receptor, siendo de vital importancia que se realice la caracterización pre-trasplante. De las técnicas utilizadas para tales fines, las de tipo molecular son las de principal elección, siendo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la más utilizada. En este estudio se llevó a cabo el análisis del impacto que un laboratorio de este tipo tiene en la población mexicana, destacando a su vez la importancia que tiene en el programa de trasplante de sangre placentaria del BSCU del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS). Los resultados obtenidos permitieron concluir que la técnica propuesta es adecuada para la histotipificación de las unidades de SCU del BSCU y que un laboratorio de histocompatibilidad es de vital importancia para la optimización de los servicios que presta el BSCU a la población.



## 2. GENERALIDADES

### 2.1 MHC

Las principales funciones de los linfocitos T consisten en la defensa frente a microorganismos intracelulares y la activación de otras células, tales como macrófagos y linfocitos B. La tarea de presentar antígenos asociados a células para que sean reconocidos por los linfocitos T corre a cargo de proteínas especializadas que son codificadas por genes presentes en un locus denominado **complejo principal de histocompatibilidad (MHC**, por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*).

Durante casi dos décadas después de haberse descubierto el MHC, la única función documentada atribuida consistió en el rechazo a injertos en los procedimientos de trasplante, el cual evidentemente no es un fenómeno natural. Esto, desde luego, planteó un gran dilema a los investigadores, pues si su única función era controlar el rechazo de tejidos extraños, no existía una razón obvia para que estos genes se hubieran conservado a lo largo de la evolución. En los años sesenta y setenta se descubrió que los genes del MHC tenían una importancia fundamental en las respuestas inmunitarias a antígenos protéicos. A los genes para tales respuestas se les denominó **genes de respuesta inmunológica (Ir)**. Ahora se sabe que los genes Ir son, de hecho, genes del MHC que codifican moléculas del MHC.

Las moléculas del MHC de todos los mamíferos presentan esencialmente la misma estructura y función. Los genes identificados como fundamentales para el



rechazo de injertos en ratones (H-2K, H-2D y H-2L) son homólogos a los genes identificados por serología del MHC humano (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y se agrupan como genes de clase I del MHC. Los genes Ir del ratón (I-A e I-E) son homólogos a los genes humanos identificados por medio de reacción leucocítica mixta (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ) y se agrupan como genes de clase II del MHC<sup>1</sup>.

De las investigaciones realizadas se dedujeron características importantes de los genes y sus productos:

- a) Los dos tipos de genes del MHC (Clases I y II) codifican dos grupos de proteínas estructuralmente distintas, pero a la vez homólogas.
- b) Los genes del MHC son los más polimórficos del genoma.
- c) Los genes del MHC se expresan de forma codominante en cada individuo.  
Esto es, que cada individuo lleva un juego de genes MHC del padre y otro juego MHC de la madre.

Al conjunto de alelos del MHC presente en cada cromosoma se le denomina **haplotipo** del MHC<sup>1</sup> ; por lo tanto, cada haplotipo tiene 3 alelos que codifican para moléculas de clase I y 6 alelos para las moléculas de clase II.

En cuanto a la estructura de las moléculas del MHC, como es de esperarse, comparten características estructurales que son esenciales para llevar a cabo su función:

- a) Las moléculas del MHC forman un surco o hendidura de unión a péptidos.
- b) Constan de dominios similares a las inmunoglobulinas.
- c) Se encuentran ancladas por dominios transmembrana y citoplasmáticos.



- d) Los residuos de aminoácidos polimórficos se localizan en el interior y alrededor del surco.

Entre mas han evolucionado los organismos, más complejo se ha tornado su sistema inmune, de tal forma que los vertebrados poseen el sistema más complejo en la naturaleza; sin embargo, entre las diferentes especies de vertebrados se han llevado a cabo modificaciones y cambios en el sistema inmune, por lo que en el caso del MHC, algunas especies han modificado regiones de su MHC pero en cambio han conservado o incluso expandido otras. Un ejemplo de ello se da en los felinos, en el que el gato carece de la región entera MHC-DQ, conserva restos de pseudogenes homólogos a MHC-DP, pero en cambio tiene reorganizado y expandido regiones de MHC-DR<sup>2</sup>. Todo esto nos lleva a que si bien es cierto que el MHC de las diferentes especies comparten características similares, las diferencias existentes ofrecen una oportunidad comparativa que puede ser de gran utilidad en la elucidación del papel que desempeñan estas moléculas en el funcionamiento del sistema inmune de una especie en particular.



## 2.2 HLA

### 2.2.1 HISTORIA

El descubrimiento de Karl Landsteiner en 1901 de que el suero de algunos individuos aglutinaban células rojas (los glóbulos rojos o eritrocitos) mientras que el de otros no, marcó el inicio del estudio del polimorfismo entre individuos. A principios de los años 50's ya se conocían diez sistemas de grupos sanguíneos, y fue por estos años también, cuando la historia del HLA (la versión en el humano del MHC, por sus siglas en inglés *Human Leucocyte Antigen*) realmente empezó, pues el trabajo realizado en las células rojas fue extrapolado a los leucocitos. Se describieron anticuerpos que podían aglutinar leucocitos en pacientes con leucemia, neutropenia del recién nacido, neutropenia inducida por pirimidona, agranulocitosis debida a la ocurrencia de leuco aglutininas, y anemia hemolítica. El origen de tales anticuerpos era incierto y, por lo tanto, se desconocía su importancia clínica. En 1954, Miescher y Fauconnet describieron la presencia de anticuerpos antileucocitarios que aglutinaban únicamente a algunos donadores de un panel; utilizaron por vez primera el término "grupos de leucocitos". Ese mismo año, Dausset demostró que las transfusiones sanguíneas inducían leuco aglutininas que, no obstante, no aglutinaban los leucocitos del propio paciente; en otras palabras, que tales leuco aglutininas eran anticuerpos aloinmunes. En 1956 Van Loghem demostró que los anticuerpos contra leucocitos inducidos por transfusión sanguínea, eran capaces de producir reacciones de transfusión no hemolíticas, y además que tales reacciones podían prevenirse removiendo los



leucocitos de la sangre a transfundir. En 1958, Van Rood y colaboradores, observaron que durante el embarazo también podían formarse leuco aglutininas, contrario al dogma prevaleciente en esos días, que solo después de una transfusión podían formarse esos anticuerpos. Casi al mismo tiempo Rose Payne llegó a una conclusión similar en un estudio independiente. En ese mismo año, Dausset transfundió pacientes anémicos repetidamente con sangre de un solo donador. Estos pacientes formaron anticuerpos que reaccionaron con una proporción de muestras de leucocitos tomados de un panel de individuos seleccionados al azar. Estos anticuerpos no reaccionaron con los leucocitos de los individuos que las habían formado. Al antígeno del leucocito así identificado fue llamado MAC (en honor a los tres voluntarios que participaron en el experimento, cuyos nombres empezaban con M, A y C respectivamente). MAC resultó ser similar a los antígenos hoy conocidos como HLA-A2 y -A28. En 1961, Van Rood basándose en reacciones de aglutinación y en análisis estadístico computarizado de sus resultados definió un sistema de dos alelos, la de los antígenos 4A y 4B, actualmente conocidos como HLA-BW4 y -BW6. En 1964, Rose Payne y Walter Bodmer identificaron los antígenos LA, que hoy se conocen como antígenos del locus HLA-A. Durante este mismo período, el ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento, desarrollado por Batchelor, Walford y otros, y la prueba de microcitotoxicidad, desarrollada por Terasaki y McClelland (1964) constituyeron verdaderas técnicas perfeccionadas que revolucionaron la investigación y le dieron un impulso enorme a la investigación del HLA. Este mismo año también, Van Rood y Van Leeuwen describieron antígenos que actualmente se conocen como HLA-B7. A iniciativa de Bernard Amos, es organizado el primer taller internacional



sobre HLA; éste, fue el primero de una serie de talleres internacionales que han estimulado el desarrollo del sistema HLA. El Taller Internacional de Histocompatibilidad (en inglés *Internacional Histocompatibility Workshop*) tiene bajo su responsabilidad, la coordinación y estandarización de técnicas, comparación de resultados y la definición unificada de los antígenos. En el Taller de 1965 se realizó la demostración memorable de que los antígenos HLA eran los antígenos de trasplante. Peter Medawar, había demostrado en su experimento clásico que si transplantaba un trozo de piel entre dos conejos, el injerto era rechazado después de 10 días, pero cuando un segundo trozo de piel del mismo donador era transplantado al mismo receptor, el injerto era rechazado en 5 días. Medawar concluyó que el primer injerto había inmunizado al receptor y que se había inducido sensibilidad en éste (Medawar 1946). En el protocolo presentado en el Taller, Medawar no transplantó piel, sino que inyectó intradérmicamente el *buffy coat* de una muestra de sangre de un donador en un receptor, y posteriormente transplantó un trozo de piel del mismo donador. El resultado fue que el primer trasplante no era rechazado en 10 días, sino en 5; en otras palabras, que una inyección intradérmica de leucocitos había inducido la misma sensibilidad al injerto que un trasplante de piel. Podría decirse que con esto, inició la inmunología de trasplantes.

En los Talleres de 1965 y 1967, el concepto básico de la genética del HLA giraba en torno a que se trataba de un sistema de componentes, parecido al del sistema de grupo sanguíneo Rhesus. El descubrimiento del HLA-C como un locus separado, se le acredita al grupo de Aarhus, junto con Lena Sandberg (Sandberg et al., 1970). La utilización de anticuerpos para estudiar diferencias aloantigénicas



entre donantes y receptores se complementó con el cultivo mixto de linfocitos (CML), una prueba que se utiliza para valorar el reconocimiento de células alogenas por los linfocitos T. El primer gen que se identificó a partir de estos estudios de respuestas celulares fue el de HLA-D. Edmond Yunis y Bernard Amos (1971) describieron primero el HLA-D como un locus separado; éste se ubicó en una región adyacente al locus HLA definido serológicamente y en consecuencia, recibió el nombre de HLA-D. La proteína codificada por el locus HLA-D se detectó posteriormente y se denominó “molécula relacionada a HLA-D” o HLA-DR. Posteriormente se descubrieron proteínas similares estructuralmente a la HLA-DR, y que además eran codificados por dos genes adyacentes a HLA-DR; estos genes se designaron como HLA-DQ y HLA-DP (la P y la Q se asignaron por su proximidad alfabética a la R)<sup>3,4</sup>.

### 2.2.2 ORGANIZACIÓN GENÉTICA

El complejo principal de histocompatibilidad humano se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la porción distal de la banda 6p21.3<sup>5</sup>; está constituido por 224 genes<sup>6</sup> aproximadamente y pseudogenes, representando casi 2.5% de la longitud total del cromosoma 6, donde abarca alrededor de 4 Mbp. Los genes HLA se encuentran distribuidos en tres regiones, genes de clase II (la región más centromérica) genes de clase III y genes de clase I (la más telomérica)<sup>6,7,8</sup>, así como regiones extendidas de clase I y clase II, conocidas





como xMHC, de 7.6 Mbp [tRNA (157 genes)<sup>6</sup>, histonas (66 genes)], así como receptores olfatorios (OLFRs, 33 genes)<sup>6,7</sup>.

#### 2.2.2.1 La región de Clase I

La región de clase I comprende 2 Mbp de DNA y consta de 26 genes<sup>6</sup>. Ésta es la parte mejor caracterizada del MHC humano. Contiene tres principales loci funcionales (conocidos también como de clase Ia o clásicos): HLA-A, HLA-B, HLA-C. Los loci de clase Ib o no clásicos (también conocidos como de Clase I-like) incluyen: HLA-E, HLA-F y HLA-G.

Adicionalmente a los loci anteriormente mencionados, la región de clase I contiene al menos 8 pseudogenes.

Otro gen relacionado a clase I, se encuentra a una considerable distancia telomérica del MHC y se denomina locus HFE; una mutación en éste gen se encuentra implicado en el desarrollo de la hemocromatosis hereditaria.

#### 2.2.2.2 La región de Clase II

La región de clase II abarca cerca de 1000 kbp de DNA y consta de 24 genes, conteniendo un gen cada 40 kbp en promedio; se compone principalmente por tres subregiones también conocidas como de clase II clásicas: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, cada una conteniendo al menos un par de alelos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) por subregión.



Los loci de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están arreglados en pares correspondientes (por ejemplo, DRA y DRB, DQA y DQB, DPA y DPB). En esta región también se encuentran otros dos pares de genes del tipo clase II no clásicas (o Clase II-like), HLA-DO y HLA-DM. La HLA-DO es una proteína heterodimérica, producto de HLA-DOA y HLA-DOB, quienes no se encuentran adyacentes en el cromosoma y su función fisiológica no es aún muy clara<sup>3</sup>. La proteína heterodimérica HLA-DM es codificada por los genes HLA-DMA y HLA-DMB, e interviene en la unión del péptido a las moléculas de clase II<sup>1,8</sup>.

Dentro de esta región, también se codifican algunas proteínas implicadas en el procesamiento de antígenos para ser presentados por moléculas de clase I; tal es el caso de los genes TAP y LMP. Los productos de los dos genes TAP, TAP1 y TAP2, son miembros de la superfamilia de transportadores ABC ( del inglés *ATP-binding cassette* ). Miembros de esta familia de moléculas transmembrana están involucradas en el transporte de una amplia selección de diferentes sustancias a través de las membranas, que incluyen oligopéptidos, proteínas e iones. Los genes LMP2 y LMP7 están localizados muy cerca de los genes TAP y codifican componentes del complejo del proteasoma.

### 2.2.3.POLIMORFISMO

Como ya mencionamos antes, una de las principales características de los genes MHC es su gran polimorfismo<sup>3,5,6</sup>. Las moléculas HLA- no clásicas muestran pequeñas variaciones polimórficas, en contraste al alto polimorfismo de las HLA-clásicas; de éstas últimas, el gen que codifica HLA-B es el gen más polimórfico



identificado en el genoma humano hasta el momento. En un principio, el polimorfismo fue analizado por métodos serológicos convencionales y posteriormente con métodos moleculares<sup>6</sup>. Hasta mediados de 2005, se habían descrito un total de 1180 alelos de Clase I y 732 alelos de Clase II<sup>9</sup>. No obstante, aunque hay muchos posibles alelos codificando diferentes antígenos, cada individuo lleva solo uno de los posibles alelos de cada locus HLA en cada cromosoma.

El caso de DR $\alpha$  es muy particular, pues aunque sabemos que todos los productos del MHC son polimórficos en un mayor o menor nivel, DR $\alpha$  no varía en su secuencia entre diferentes individuos y se dice entonces que es monomórfico.

Para los genes MHC clase II, el número de diferentes productos se incrementa, debido a la combinación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  codificados por diferentes cromosomas; puede llevarse a cabo un apareamiento entre una cadena  $\alpha$  de un isotipo y una cadena  $\beta$  de otra, sin embargo hasta el momento no se ha observado que tales combinaciones jueguen un papel significativo *in vivo*<sup>3</sup>.

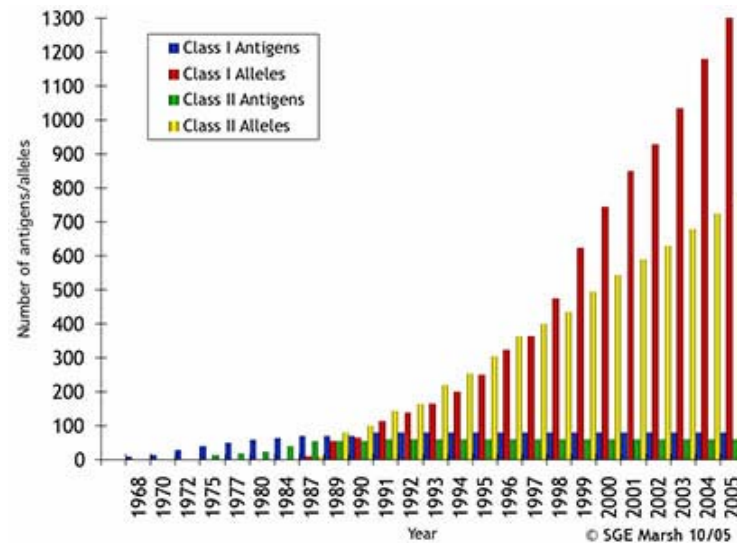


Fig. 1 Número de antígenos y alelos nombrados por el Comité de Nomenclatura de HLA de 1968 a 2005 (tomado de Anthony Nolan Research Institute)

#### 2.2.4. EXPRESIÓN EN TEJIDOS

La expresión de los antígenos del HLA es especialmente alta en los leucocitos, razón por lo que estas células son utilizadas para identificar los tipos de HLA. Las moléculas de clase I se expresan en la mayor parte de las células somáticas, aunque hay algunas excepciones, como las neuronas, células del páncreas exocrino, células del miocardio, ciertas células de la placenta, espermatozoides en algunas etapas de desarrollo, huevos no fertilizados y en células de embriones recién formados. El nivel de expresión varía dependiendo del tejido y puede aumentar o disminuir por el estímulo de factores como las infecciones virales y citocinas. Entre todas las células somáticas adultas, los linfocitos T y B expresan



niveles altos de moléculas clase I. Aunque las plaquetas expresan antígenos de esta clase, frecuentemente no expresan algunos antígenos HLA-B y la mayoría de los antígenos HLA-C. En contraste, los antígenos de clase II están más restringidos en su distribución, pues su expresión se limita a las células inmunocompetentes, principalmente en linfocitos B, y en menor grado en linfocitos T activados, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y epitelio tímico. Otras células no expresan moléculas de clase II, pero puede inducirse su expresión (o incrementar la expresión en el caso de las células que sí lo hacen normalmente) por tratamiento con citocinas<sup>3,5, 8,10</sup>.

## 2.2.5. ESTRUCTURA

### 2.2.5.1. Moléculas de Clase I

Todas las moléculas de Clase I presentes en la superficie de las células, constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente, una cadena pesada polimórfica (o cadena  $\alpha$ ) con un peso molecular de 43 a 47 kD y una cadena ligera no polimórfica de 11 a 12 kD denominada  $\beta_2$ -microglobulina (debido a su movilidad electroforética  $\beta_2$ , a su tamaño –micro, y a su solubilidad –globulina); este polipéptido invariante no glicosilado está codificado por un gen localizado en el cromosoma 15. La cadena pesada, se compone de 283 aminoácidos<sup>5</sup> y tiene cinco dominios: tres dominios extracelulares, designados como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$



( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  dominios de unión a péptido;  $\alpha 3$  dominio de inmunoglobulina) , una región transmembrana, y una región carboxílica terminal variable (*cola citoplasmática*), ubicada en el citoplasma. En los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , se encuentran dos bucles (en inglés *loops*) formados por enlace disulfuro, uno en cada uno<sup>5</sup>.

El surco de unión a péptido de una molécula HLA se compone de dos partes, una plataforma y dos paredes (fig.1). Los segmentos amino terminal  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (cada una de longitud aproximada de 90 residuos), interactúan para formar una plataforma de ocho hebras antiparalelas en hoja plegada  $\beta$  que soportan dos hebras paralelas de hélice  $\alpha$ , formando así el surco o hendidura de unión a péptido. El tamaño de dicho surco (aproximadamente 25Å de largo y 10Å de ancho)<sup>5</sup> es suficientemente grande para que péptidos de 7 a 15 residuos<sup>11</sup> se fijen a él con una conformación extendida y flexible. Los extremos de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  convergen, cerrando así la hendidura, de forma que los péptidos grandes no pueden unirse. La parte polimórfica de la cadena  $\alpha$ , está limitada a los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , contribuyendo así a la producción de variaciones entre los diferentes alelos pertenecientes a las moléculas de clase I. El dominio  $\alpha 3$  es la parte de la cadena  $\alpha$  que se encuentra unido no covalentemente a la  $\beta_2$ -microglobulina, quien a su vez, también interactúa con la parte baja de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . La región formada por los dominios  $\alpha 3$  y  $\beta_2$ -microglobulina tiene una conformación estructural semejante a la región constante de las moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, por lo que se le conoce como *dominios de inmunoglobulina*.

Antes de que el dominio  $\alpha 3$  se ancle a la membrana celular, existe un péptido conector de alrededor de una docena de aminoácidos hidrofílicos. La región



transmembranal, tiene una longitud aproximada de 19 a 26 residuos de aminoácidos hidrofóbicos; inmediatamente después, se ubica la *cola citoplasmática* y consta de alrededor de 30 residuos de aminoácidos localizados en el citoplasma y por lo general contiene la secuencia Ser-Asp/Glu-X-Ser-Leu (donde X es cualquier aminoácido). Esta secuencia es un sitio potencial de reconocimiento de la proteincinasa (PKC)<sup>10</sup>.

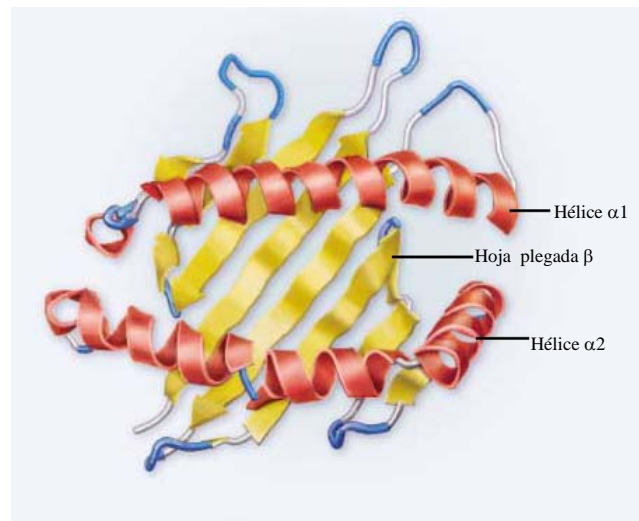


Fig. 2. Modelo de la estructura terciaria de un módulo de unión a péptido de Clase I. Las cadenas  $\alpha$  componen las hojas plegadas  $\beta$ . New England Journal of Medicine 343 (10): 707



### 2.2.5.2 Moléculas de Clase II

La estructura tridimensional de las moléculas de Clase II muestra gran similitud con las moléculas de Clase I, como es de esperarse de moléculas que realizan funciones similares.

Las moléculas de la región HLA-D son expresadas como glicoproteínas heterodiméricas, que consisten de dos cadenas unidas a la superficie celular por enlaces no covalentes, con ambas cadenas penetrando la membrana celular. La cadena  $\alpha$  de 32 a 34 kD y una longitud que varía de 219 a 233 aminoácidos, y la cadena  $\beta$  de 29 a 32 kD conteniendo cerca de 225 a 244 aminoácidos se encuentran unidas entre sí por enlaces no covalentes. Cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  tiene cuatro dominios: el dominio de unión a péptido ( $\alpha 1$  o  $\beta 1$ ), el *dominio de inmunoglobulina* ( $\alpha 2$  o  $\beta 2$ ), la región transmembrana y la *cola citoplasmática*.

A diferencia de las moléculas de Clase I, ambas cadenas se codifican por genes ubicados en el cromosoma 6. El surco o hendidura de unión a péptidos es estructuralmente similar a la de las moléculas de clase I. En este caso, son los segmentos amino terminales  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, las que interactúan para formar el surco. El dominio  $\alpha 1$  forma cuatro hebras de la plataforma de la hendidura y una de las hélices de la pared, mientras que las otras cuatro hebras de la plataforma y la segunda hélice de la pared están formadas por  $\beta 1$ . En las moléculas de Clase II, los residuos polimórficos están localizados en  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ . En HLA Clase II, la mayor parte de los polimorfismos se encuentran en la cadena  $\beta$ . A diferencia de las moléculas de Clase I, en las de Clase II el surco de





unión a péptido tiene extremos abiertos, de manera que pueden acomodarse péptidos más largos (de 30 residuos o más). Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  (como en  $\alpha 3$  y  $\beta 2$ -microglobulina de las moléculas de clase I) conforman los *dominios de inmunoglobulina* y no son polimórficos entre varios alelos. Los extremos carboxílicos terminales de  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  continúan con péptidos conectores, seguidos de regiones de aminoácidos transmembranales, los que a su vez terminan en las *colas citoplasmáticas*, todo esto con características similares a las moléculas de Clase I.

## 2.2.6. NOMENCLATURA

### 2.2.6.1. Para métodos serológicos

La nomenclatura oficial utilizada para los antígenos definidos por serología es la establecida por el Comité de Nomenclatura de HLA de la Organización Mundial de la Salud.

La letra (A, B, . . .) refiere el *locus* genético, mientras que el número indica el antígeno particular codificado por ese *locus*. Los números entre paréntesis denotan a los “supertipos” del que se han subdividido los “subtipos”<sup>12</sup>.

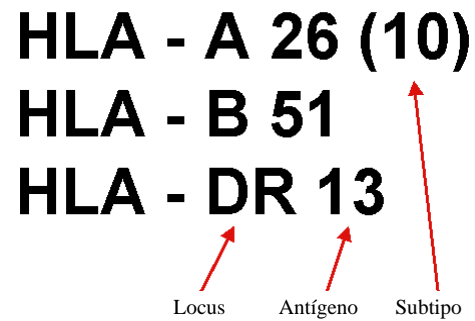


Fig. 3. Nomenclatura para métodos serológicos <sup>12</sup>

#### 2.2.6.2. Para métodos moleculares

La asignación del alelo para cada *locus* del HLA se realiza utilizando la nomenclatura siguiente. Usualmente se utilizan cuatro dígitos para identificar el alelo (ver fig.1):

El locus HLA (A, B, C, DR, DQ, y DP) es separado por el símbolo \* (asterisco) de dos dígitos numéricos que asignan el equivalente serológico del antígeno; para fines prácticos, el asterisco es un indicativo de que la nomenclatura es para método molecular. Éste, es seguido por otros dos dígitos numéricos que asignan el alelo específico. Ocasionalmente, se agrega un quinto dígito, para identificar un subtipo diferente producido por la sustitución de un nucleótido que no altera la secuencia de aminoácidos y por lo tanto, la expresión antigénica. Por ejemplo, HLA-A\*68011 y HLA-A\*68012 indican dos formas del alelo HLA-A\*6801 que difieren por un nucleótido sencillo que no altera la proteína codificada<sup>5</sup>. También, frecuentemente se emplean los símbolos X e ?, para designar tipificación de alta



resolución no realizada y tipificación de alta resolución realizada pero no discriminante, respectivamente<sup>12</sup>.

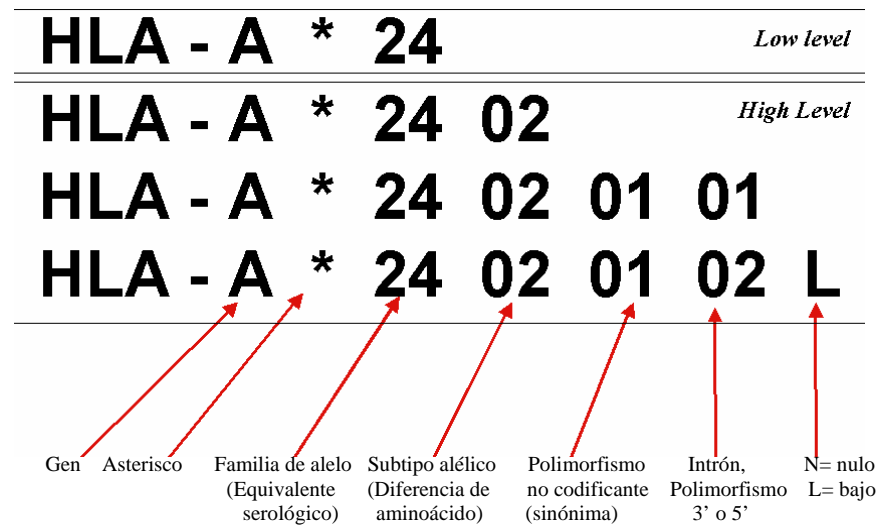


Fig. 4. Nomenclatura para métodos moleculares<sup>12</sup>

Nulo y bajo indican el nivel de expresión del alelo y no es utilizado muy frecuentemente.

#### 2.2.6.2.1. Ambigüedad

La ambigüedad es producida por una posible reacción cruzada de las sondas utilizadas para la tipificación, y se indica con dos símbolos: - (guión) y / (slash). De tal forma que:



- - (guión). Significa que el posible alelo se encuentra entre la primera y la última posibilidad mencionada.
- / (slash). Significa que es únicamente una de las posibilidades mencionadas.

Ejemplo:

	Indica la presencia de :
DRB1*0401-04	DRB1*0401 ó 0402 ó 0403 ó 0404
DRB1*0401/04	DRB1*0401 ó DRB1*0404

Tabla 1. Nomenclatura para designar ambigüedades<sup>12</sup>.

En resultados como éste: HLA-B\*1501/1502/1505/1515/1521/1545/1556/1570.

La sonda puede detectar la presencia de los alelos 01, 02, 05, 15, 21, 45, 56 y 70, pero no puede detectar la presencia de los alelos 03, 04, 06 etc, por lo tanto, para el paciente sabemos que no tiene ningún alelo 03, 04 etc., sin embargo no sabemos si el alelo específico es 01 ó 02 ó 05 ó 15 etc.

Cuando indicamos resultados tan ambiguos como el anterior, es muy importante no truncar la cadena, pues puede perderse información importante que nos conduzca a un resultado erróneo<sup>12</sup>.

Por convención, las especificidades de HLA-A y HLA-B son numeradas exclusivamente, es decir, que puede haber un HLA-A2, pero no un HLA-B2, y viceversa, puede haber HLA-B5 pero no HLA-A5<sup>3</sup>.



### 2.2.7. IMPORTANCIA DEL HLA EN TRASPLANTE

La diversidad o polimorfismo de las moléculas de HLA determina que el sistema inmunitario del receptor de un órgano o tejido identifique como extrañas las células del donante, aún cuando las moléculas del HLA difieran en un solo aminoácido. Este reconocimiento alogénico constituye el primer paso de la respuesta de rechazo. Esta rápida y muy potente respuesta inmune celular, resulta de la presencia de un gran número de células T en cualquier individuo que son reactivas a moléculas alogénicas del HLA. Las células T alorreactivas responden mediante la unión directa del TCR propio a distintas presentaciones de la molécula HLA no propia. El TCR se une a moléculas HLA no propias generando una fuerte señal, debido a la alta concentración de moléculas HLA no propias sobre la superficie de la célula presentadora. Ambos mecanismos contribuyen a la alta frecuencia de las células T que responden a moléculas HLA no propias sobre el tejido trasplantado, lo cual refleja claramente la función del linfocito T en el reconocimiento de las moléculas MHC en general<sup>7</sup>.

De lo anterior, se deduce que el grado de compatibilidad de HLA es crítico en la determinación de la probabilidad de la Enfermedad Injerto Contra Huésped ( sus siglas en inglés GVHD: *Graft-versus-Host disease* ) que es la principal forma de rechazo en trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Para minimizar estas alorespuestas, la compatibilidad de HLA clases I y II del donador y receptor deben ser tan cercanas como sea posible. No obstante, debido al ya conocido extenso polimorfismo, es muy raro que un donador tenga HLA idéntico al del paciente. La mayoría de los receptores de trasplante, por lo tanto, son



sometidos a regímenes de acondicionamiento con fármacos inmunosupresores para prevenir o disminuir la respuesta aloinmune; sin embargo, este método también compromete al paciente, dejándolo expuesto a las infecciones<sup>12</sup>.

En los trasplantes de donador no relacionado, el resultado está influenciado por el grado de compatibilidad de HLA del donador y por la toxicidad asociada con el régimen de acondicionamiento pre-trasplante y el régimen inmunosupresivo post-trasplante. Por estas razones, los pacientes obtienen mayores beneficios en trasplantes de este tipo, cuando tienen donadores compatibles y cuando pueden tolerar el procedimiento del trasplante. La eficacia del trasplante no emparentado de HSC en el tratamiento de enfermedades hematológicas se incrementa cuando la enfermedad está bien controlada. El efecto de la incompatibilidad del donador sobre la mortalidad después de este tipo de trasplante es un producto complejo de factores genéticos y no genéticos<sup>13</sup>.

En los trasplantes de médula ósea no emparentados, la compatibilidad de HLA entre donante-receptor es un factor crítico que determina el rechazo del injerto y GVHD, por lo que la compatibilidad debe ser muy estricta. En contraste, en el trasplante de HSC de SCU las posibilidades de éxito son mayores y se han realizado trasplantes de SCU con uno a tres antígenos HLA dispares, y aún así se ha observado una muy baja incidencia y severidad de GVHD; además, tampoco se ha observado que GVHD muestre una correlación directa con el número de incompatibilidades de HLA<sup>14</sup>.



## 2.2.8. EL PAPEL DEL HLA EN EL BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Como ya se mencionó, para que un trasplante de CPH procedentes de médula ósea tenga posibilidades de éxito la compatibilidad donante-receptor debe ser prácticamente total, lo que reduce dramáticamente la posibilidad de encontrar un donador no emparentado para algún paciente; es por esto que en la actualidad la SCU es una fuente de CPH alternativa a la tradicional de médula ósea.

La presencia de células progenitoras hematopoyéticas en SCU se observó desde los años setentas. Sin embargo, no fue hasta el año de 1988 cuando se realizó el primer trasplante de SCU entre hermanos HLA idénticos, por la Dra. Eliane Gluckman en París, en un niño de seis años que padecía anemia de Fanconi. A partir de entonces, empezaron a crearse Bancos de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU) con la finalidad de poder contar con un inventario de unidades siempre disponibles para el trasplante, incrementándose de esta forma el *pool* de donadores.

Netcord es una red internacional de búsqueda para trasplantes no emparentados, formada por BSCU alrededor del mundo, que otorga la facilidad de buscar unidades de sangre de cordón umbilical según el antígeno HLA. De esta forma, es posible buscar unidades compatibles con el paciente que la requiere no solo dentro del país de origen, sino en el inventario de unidades de los BSCU que conforman la red. La posibilidad de localizar una unidad de SCU, HLA compatible para un paciente y que además tenga suficiente número de CPH, depende del número, así como de la calidad de las unidades almacenadas en banco. Es por



esto que Netcord ha desarrollado además, estándares internacionales para los BSCU que la conforman.

De acuerdo a los estándares FACT/ Netcord, los BSCU pertenecientes a la red proveen unidades con las siguientes características: fecha de recolección, volumen, número de células en la unidad, grupo ABO, sexo, marcadores de enfermedades infecciosas y tipificación de HLA. Adicionalmente, se guarda una muestra de células madre para tipificación confirmatoria; las células de SCU y DNA son almacenadas para la completa tipificación pretrasplante.

En la actualidad, la mayoría de centros de trasplante/ BSCU, seleccionan unidades para un respectivo paciente basados en la tipificación de baja resolución de HLA-A y HLA-B y de alta resolución para HLA-DRB1, en contraste al trasplante de médula ósea, para el que se ha implementado la tipificación de alta resolución para HLA clases I (A,B,C) y II (DRB1 y DQB1), con el fin de minimizar el riesgo de GVHD y rechazo del injerto<sup>14</sup>. En el BSCU del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS) dicha tipificación HLA se realiza mediante el método molecular de reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de resolución media, tanto para los antígenos de clase I (-A, -B), como para la clase II ( -DR, -DQ).





## 2.2.9. SELECCIÓN DE UNIDADES

Se estima, que la probabilidad de encontrar un donador de médula totalmente compatible en el registro de los EUA es de 1 en 400, y en un hermano de 1 en 4. Estos números contrastan mucho cuando se trata de SCU. Se ha estimado que para que un banco pueda darle a un niño un 80% de probabilidad de encontrar un cordón que sea compatible, debe tener al menos 1000 cordones. Sin embargo, este no es el caso de la población mexicana, según se ha observado. Un ejemplo claro de esto es la experiencia de BSCU del CNTS, cuyo primer trasplante en el año 2004 se realizó con una unidad de SCU seleccionada de tres que se encontraron compatibles, de un inventario total (en ese entonces) de 50 cordones; esto pudiera indicarnos que los mexicanos no somos muy distintos genéticamente. En el caso del BSCU del CNTS, antes de descongelar alguna unidad de SCU para trasplante, es necesario contar con una solicitud que el médico responsable que atenderá el trasplante dará al responsable del BSCU siendo en este caso al Subdirector de Investigación. En dicha solicitud, se describe de manera general el diagnóstico del paciente y además incluye la histocompatibilidad del mismo. Cuando la solicitud está en propiedad del Subdirector de Investigación del BSCU, se informará al Director Técnico y de Investigación del CNTS, así como al Director General del CNTS, para dar aprobación del procedimiento. Para seleccionar la unidad, se coteja la histocompatibilidad del paciente con las unidades que se encuentran en el inventario del banco, utilizando para ello, el programa TESI Hemodata que es un programa que registra todo lo relacionado con el procesamiento de las unidades de SCU. El criterio principal para la selección de



las unidades es la compatibilidad en HLA de un mínimo de 4 de 6 antígenos (clase I: HLA-A, -B, clase II: HLA-DR y a veces HLA-DQ). La unidad de SCU se transporta en un Crioshiper (contenedor especialmente diseñado para transportar materiales a temperaturas criogénicas a  $-196^{\circ}$  C de tipo Dewar) hasta el centro de trasplante, donde se realiza el acondicionamiento final para que pueda ser transplantado.

Al momento se llevan realizados 27 trasplantes, los cuales han injertado en promedio al día +17 después de haberse realizado la infusión, tiempo después del cual se considera como de mayor probabilidad para que el injerto no sea rechazado.

El BSCU del CNTS con respecto a sus homólogos que conforman la red Netcord, se ubica en el quinto lugar a nivel mundial en trasplantes, lo que nos da una idea de la importancia que ha adquirido esta opción de fuente de células madre en nuestro país.



No.	Indicación del Trasplante	Edad Paciente	Injerto P. quimerismo
1	Leucemia linfoblástica células T	10 años	+ 17
2	Leucemia linfoblástica en recaída.	2 años	† +5
3	Histiocitosis de células de Langerhans	4 años	+20
4	Leucemia Mieloblástica aguda	34 años	+ 17
5	S. de Wiskott-Aldrich	1 año	+ 30
6	S. Mielodisplásico	70 años	† + 3
7	Leucemia granulocítica	35 años	+ 18
8	S. Mielodisplásico	16 años	† + 2
9	S. Mielodisplásico	3 años	+ 15
10	S. Omenn	40 días	+ 10
11	Leucemia Linfoblástica	17 años	+ 9
12	Leucemia Mieloide aguda	72 años	+ 15
13	M7		
14	Anemia Aplásica Severa	9 años	+32
15	Leucemia Linfoblástica	15 años	+14
16			
17	Leucemia Linfoblástica	3 años	+22
18	Leucemia Linfoblástica	7 años	+18
19	Leucemia Linfoblástica	12 años	†+ 8
20	Leucemia Granulocítica Crónica	10 años	+21
21	Leucemia Granulocítica Crónica	7 años	+35
22	Leucemia Mieloide Aguda	17 años	No reportado
23	Leucemia Mieloblástica Aguda	22 años	+13
24	Blackfan-Diamond	4 años	No reportado
25	Leucemia Mieloide Aguda	8 años	En curso
26	Anemia de Fanconi	13a	En curso
27	Anemia Aplásica severa	4a	En curso

Tabla 2. Trasplantes realizados con USCU del CNTS-SSA

## 2.2.10. METODOLOGÍAS UTILIZADAS

Antes de 1991, se utilizaban los ensayos celulares y de microcitotoxicidad para la tipificación de HLA. En 1991 y 1992, se introdujeron métodos moleculares para las tipificaciones de HLA-DRB1 y HLA-DQB1 respectivamente. La tipificación serológica de los antígenos de HLA-C se introdujo en 1996, mientras que la



tipificación molecular de sus alelos se implantó hasta el año 2000<sup>13</sup>. La tipificación basada en métodos de DNA es la más utilizada actualmente.

#### 2.2.10.1. Métodos serológicos

La tipificación de HLA basada en serología utiliza sueros específicos de antígeno. Los sueros son preparaciones derivadas de compuestos humanos que reaccionan a antígenos de HLA específicos expresados sobre leucocitos; una prueba de este tipo determina el tipo de tejido de una persona, observando cuáles sueros reaccionan con los leucocitos de la persona y cuáles no reaccionan. Después de un paso de incubación que proporciona tiempo para que el anticuerpo se una a cualquiera de los antígenos correspondientes en las células, se agrega un complemento para facilitar la lisis celular. Las reacciones son entonces vistas bajo microscopio y clasificadas de acuerdo a la cantidad de lisis celular que ha ocurrido. El tipo es asignado después de revisar los patrones de reacción para los varios sueros.

Aunque la serología de histocompatibilidad ha sido utilizada como sinónimo del microensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (también conocido como ensayo de microlinfocitotoxicidad o linfocitotoxicidad), podría ser igualmente aplicada a técnicas donde el enlace de los anticuerpos, después de la incubación con el aloantisuero, es detectado no por la activación del sistema del complemento, sino por el uso de fluorocromos y citometría de flujo. La tipificación serológica es una prueba menos específica que aquella basada en métodos moleculares. Aunque las técnicas basadas en DNA remplazaron a la serología



para la definición de especificidades de HLA-A, -B, -C, así como para -DR y -DQ, aún juega un papel en la tipificación de -A, -B, -C, particularmente utilizando anticuerpos monoclonales. A largo plazo, la serología seguirá siendo importante para la investigación de la expresión en la superficie celular de alelos de HLA y variantes definidas a nivel de DNA. El uso de la serología puede ayudar a elucidar la expresión de un antígeno de HLA., así como la presencia de un alelo asociado con una enfermedad en particular<sup>3, 17</sup>.

#### 2.2.10.1.1 Ensayo de microlinfocitotoxicidad

El ensayo de linfocitotoxicidad es una reacción en el que se incuban anticuerpos citotóxicos (antisuero específico de HLA que puede ser aloantisuero o anticuerpo monoclonal) con linfocitos viables que poseen el antígeno correspondiente en presencia de complemento ( la fuente habitual es suero de conejo); el anticuerpo se fija al antígeno ( si se encuentra presente) sobre la superficie del linfocito, lo que activa al complemento, produciéndose citotoxicidad que se manifiesta como lisis de la membrana celular, entonces el porcentaje de células viables es determinado usualmente por tinción y posterior evaluación microscópica. Aunque es universalmente utilizada para la tipificación de HLA-DR y HLA-DQ, no es tan robusta para estas dos, como para HLA-A, HLA-B y HLA-C<sup>3,17</sup>.



### 2.2.10.1.2 Inmunoprecipitación e isoelectroenfoque

La inmunoprecipitación es principalmente útil para moléculas de HLA-A, HLA-B y HLA-C cuando los anticuerpos monoclonales específicos de locus están disponibles. Las bases principales de la técnica son:

- Marcado radiactivo de células *target* con metionina [ $S^{35}$ ].
- Lisis de las células marcadas con detergente.
- Precipitación de los antígenos de HLA marcados con [ $S^{35}$ ] con anticuerpos monoclonales.
- Separación de los antígenos precipitados de acuerdo a sus puntos isoeléctricos en gel con gradiente de pH.
- Arreglo y tinción del gel para revelar los patrones de bandeo.
- Interpretación del fenotipo de HLA utilizando banda de  $\beta_2$  –microglobulina común como referencia.

La principal desventaja es el tiempo necesario para obtener un resultado. De cualquier modo, es posible identificar algunos alelos de HLA-A, HLA-B y HLA-C, así como muchas especificidades utilizando esta técnica.

Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, la inmunoprecipitación y el isoelectroenfoque de una dimensión han dejado de ser utilizados, pero podría tener ventajas para estudios de expresión de antígeno de HLA<sup>3</sup>.



## 2.2.10.2. Métodos Moleculares

### 2.2.10.2.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los métodos moleculares de tipificación utilizan sondas y *primers* sintéticos para determinar el tipo de HLA de una persona; estas sondas y *primers* no reaccionan a los antígenos expresados en las células blancas, sino al DNA que especifica qué antígenos están presentes.

De las técnicas moleculares disponibles, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha facilitado grandemente el estudio de la diversidad de las secuencias alélicas, así como el desarrollo de métodos de tipificación basados en DNA simples y rápidos, convirtiéndose así en la más utilizada.

La reacción en cadena de la polimerasa es el nombre con que se le conoce a la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos por medio de ciclos repetidos de síntesis dirigidos por un *primer* (cebador). El mecanismo es básicamente el que la célula utiliza durante la replicación de su DNA: la desnaturalización de la doble hélice de DNA le permite a una enzima polimerasa generar una copia complementaria de la secuencia de interés a partir de la cadena de DNA sencilla en presencia de deoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs).

La idea de la amplificación repetida de DNA se publicó en 1971, pero no fue sino hasta los años ochentas que se le explotó comercialmente después de los trabajos publicados por Kary B. Mullis<sup>15</sup>.

Cada uno de los ciclos del PCR, consta de tres etapas:



- 1) Desnaturalización. En esta fase, se separan las dos hebras de DNA por calentamiento, a una temperatura entre 68 y 97°C y durante 30 a 120 s.
- 2) Hibridación o templado. Durante esta etapa, se produce un enfriamiento (37 a 65°C) durante un determinado tiempo (10 a 120 s) que permite la hibridación de las hebras sencillas de DNA con el *primer*.
- 3) Replicación o extensión. Esta es la fase en que se lleva a cabo la amplificación de las hebras originales, mediante la acción de la DNA polimerasa utilizando como sustrato los cuatro dNTPs. Las condiciones en que suele llevarse a cabo esta fase son 72 a 75°C durante 1- 3 minutos.

Es de hacer notar que en los primeros ciclos se generarán copias de mayor tamaño que la región diana, y solo hasta después del tercer ciclo aparecen copias exactas<sup>18</sup>. Este método tiene una alta capacidad de detección, de tal forma que es posible amplificar una única molécula de DNA presente en cualquier tipo de muestra clínica, forense o arqueológica. En cuanto a la fidelidad (la capacidad de copiar secuencias sin introducir mutaciones), éste depende principalmente de que la enzima polimerasa empleada tenga o no actividad 3'-exonucleasa (que sirve como correctora de pruebas). La enzima más utilizada comercialmente es la *taq* polimerasa y carece de la actividad antes mencionada, pero en cambio es muy termoestable y su frecuencia de error es bastante aceptable; de cualquier forma, la elección de la enzima dependerá del objetivo del PCR.

En el presente estudio, se realiza la amplificación mediante la técnica PCR-SSP, utilizando el kit comercial ABDRDQ SSP UniTray<sup>®</sup> PEL-FREEZ<sup>®</sup>. Éste método fue descrito por vez primera en 1985 para el diagnóstico de anemia de células falciformes<sup>16</sup>, y desde entonces se ha convertido en una de las técnicas más





utilizadas y recomendada por organismos internacionales como la ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics), EFI (European Federation For Immunogenetics) y EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation). En ésta técnica se utilizan mezclas de *primers* específicos de secuencias de alelos o grupos para amplificar el DNA; para ello, se utiliza una bandeja de 96 pocillos en cada uno de los cuales existen pares de *primers* multiplexado que dan origen a distintos amplicones, por lo que varios pocillos tienen dos o más tamaños posibles de productos de PCR (dependiendo del alelo presente). El análisis de la ausencia o presencia de un producto amplificado se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al cual se le ha adicionado bromuro de etidio como agente para teñir DNA. Una vez terminada la electroforesis, los patrones de fragmentos de DNA son sistemáticamente investigados para determinar si tienen correlación con las especificidades de HLA-A, B, DR o DQ, para lo cual se utiliza el software UniMatch<sup>®</sup> Plus y los resultados confirmados mediante una hoja de trabajo (fig.6).

Inicialmente, se obtiene la concentración del DNA extraído utilizando un espectrofotómetro (GeneQuant<sup>®</sup> pro RNA/DNA Calculator) y a partir de éste se hace el ajuste de la concentración de trabajo de DNA (que para ésta técnica es de 75 – 125 ng /  $\mu$ L). Una vez realizado lo anterior se prepara la mezcla que contiene el *buffer* de PCR, Taq polimerasa y el DNA, se procede a introducirla al termociclador (Techne<sup>®</sup> TC-412) para su amplificación, y al final se corre la electroforesis (para más detalles vea el apéndice).





### 2.2.10.2.1.1 Electroforesis

Los productos del PCR son fragmentos de DNA, los cuales pueden ser secuenciados, o bien visualizados mediante una técnica muy simple: electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Esta técnica se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su masa; de ésta forma, las moléculas de DNA que poseen una carga negativa a pH alcalino (para lo cual se utiliza un *buffer*) migran hacia el ánodo (polo positivo) y la discriminación entre los diferentes fragmentos de DNA se da por la diferencia de masas<sup>18</sup>.

Independientemente del tipo de gel que se utilice como soporte, se preparan en concentraciones distintas en función del tamaño de los fragmentos de DNA que se requiera separar; así, modificando la concentración es posible variar la resolución. Desde el punto de vista de la naturaleza del soporte, para los fragmentos de tamaño pequeño (por ejemplo, de 1 kpb) se suelen utilizar geles de poliacrilamida, mientras que para los de tamaño un poco mayor (hasta 20 kpb) se usan los de agarosa.

Una vez separados los fragmentos de DNA, estos se visualizan mediante tinción con compuestos fluorescentes. El más utilizado es el bromuro de etidio, un agente intercalante de gran estabilidad, pero de carácter mutagénico.



#### 2.2.10.2.1.2 Nivel y ambigüedad

El nivel de resolución de los métodos moleculares es dado por la especificidad del *primer* utilizado para la tipificación; así, algunos pueden distinguir un antígeno (métodos de bajo nivel de resolución), mientras que otros *primer* hacen posible distinguir alelos (alto nivel de resolución). Ciertos *primer* utilizados pueden detectar la presencia de múltiples alelos del mismo gen, pero no determinan con precisión que alelo específico es el que está presente. Cuando este es el caso, hablamos entonces de ambigüedad o nivel de resolución medio.

Los procedimientos de tipificación tales como SSP (Sequence Specific Primer) o SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) proveen un nivel de resolución de bajo a medio<sup>12</sup>.



### 2.2.11. PREVALENCIA DE HLA

Como ya se ha mencionado, el sistema HLA muestra un gran polimorfismo no solo entre los individuos de una misma población, sino también entre las poblaciones; ésta característica es muy importante no solo para el estudio de los fenómenos de migración e integración de su estructura, sino que también permite la evaluación de la susceptibilidad a una enfermedad (relación HLA – enfermedad) y en la búsqueda de compatibilidad donador – receptor entre los habitantes no relacionados de una población. Los genes más frecuentes en la población mestiza mexicana son, HLA de Clase I: HLA- A2, -A9, -B35, -B39, -B60, -B5; mientras que de Clase II los de mayor prevalencia son HLA- DR4, -DR1, -DR3, -DR5, -DR8 y DQ3<sup>10, 20-24</sup>. Sin embargo, si bien es cierto en nuestro país ya no hay grupos indígenas puros, pueden encontrarse especificidades que aparecen con mayor frecuencia en estos grupos en las diferentes regiones de nuestro país en que habitaban; así, es posible observar la presencia de especificidades como HLA-B51, de alta frecuencia en poblaciones Mayas, o –DR2 en poblaciones Mazatecas y Nahuas<sup>20</sup>. También es posible encontrar especificidades de poblaciones ajenas a nuestro continente y que por razones históricas han sido introducidas a nuestro país, como es el caso de las regiones de las costas del golfo y pacífico (sobre todo al sur) donde pueden hallarse altas frecuencias de especificidades de raza negra, o algunos marcadores de origen español, que se encuentran ampliamente distribuidos en algunos sectores sociales; al respecto también se ha establecido que la distribución de algunas frecuencias se halla directamente relacionada con la condición socioeconómica de la población, de tal forma que es más probable



encontrar marcadores de origen caucásico en los estratos sociales altos que en los bajos, donde predominan los de origen indígena<sup>25</sup>.

Por lo anterior, es importante conocer el perfil genético de una la población y en el caso particular de la terapia de trasplantes, es de gran utilidad para predecir las probabilidades de encontrar donadores compatibles entre individuos no relacionados en una población determinada, probabilidad que en los BSCU se ve aumentada por las características de expresión antigénica ya explicadas de las USCU.



## 2.2.12 EL CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE HLA

Como ya hemos visto, la calidad de las unidades de SCU así como la compatibilidad HLA entre donante y receptor son los principales factores que influyen en el resultado de un trasplante, independientemente del tipo de acondicionamiento que reciba el paciente<sup>1</sup>. Es por esto que los procesos llevados a cabo en el BSCU deben cubrir una serie de requisitos que permitan asegurar la calidad de los servicios proporcionados por éste. De ahí que organismos internacionales como NETCORD o AABB (American Association of Blood Banks) hayan establecido una serie de estándares con el fin de promover la calidad en los procesos realizados por los BSCU. En lo referente a las pruebas de histocompatibilidad, también existen estándares internacionales desarrollados por asociaciones y organismos (como ASHI o EFI), con el propósito de asegurar que los resultados que emitan los laboratorios que los realicen, tengan cierto grado de certeza. Estos estándares, establecen los criterios mínimos que deben cumplir todos los laboratorios de histocompatibilidad para que sus servicios sean aceptables y deben cubrirse en su totalidad si se desea tener certificación por parte de alguna de éstas asociaciones.

Estos estándares cubren prácticamente todos los aspectos relacionados con los procesos llevados a cabo por el laboratorio, desde la calificación de las instalaciones, hasta las condiciones de operación de los estudios realizados, pasando por los controles de calidad (control pre-analítico, control analítico y

---

<sup>1</sup> Comúnmente, un trasplante puede ser de acondicionamiento mieloablativo, o bien mieloablativo de intensidad reducida (minitransplante).



control post-analítico). En este último contexto, se establece que el laboratorio debe establecer programas de control de calidad internos y participar en programas de control de calidad externos. En el primer caso, el laboratorio debe, al menos una vez al año, dar a cada miembro del personal responsable de realizar las pruebas de histocompatibilidad una muestra caracterizada así como una no caracterizada para verificar sus habilidades para reproducir los resultados de las pruebas<sup>27</sup>. Para el segundo caso, se establece que el laboratorio debe participar en programas de evaluación de proeficiencia con otros laboratorios o instituciones certificadas por alguna de las asociaciones internacionales (ASHI, EFI, etc.) y las muestras de estas evaluaciones deben ser manejadas de la misma forma en que se hace rutinariamente con las muestras de los pacientes<sup>27,28</sup>, en caso de no obtener resultados satisfactorios, el laboratorio debe implementar los mecanismos apropiados para corregir los errores detectados. Con respecto a la técnica utilizada para la realización de las pruebas de histotipificación, los estándares internacionales también recomiendan las más adecuadas de acuerdo al propósito del mismo, así como las características de calidad que deben reunir.

En lo que respecta a la técnica PCR-SSP se establece que deben incluirse controles internos que den como resultado productos distinguibles (bandas de control interno), las cuales sirven para determinar si algunas condiciones de reacción tales como la actividad de la Taq polimerasa, presencia de inhibidores (como la heparina), calibración del termociclador, etc. se encuentran bajo control. Además también debe incluirse un control de contaminación (control negativo) en cada ensayo.





### 3. OBJETIVOS

- Validar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa por *primer* específico de secuencia(PCR-SSP) para la tipificación de los antígenos HLA en muestras de sangre de cordón umbilical para su uso en estudios pre-trasplante de médula ósea.
- Realizar las pruebas de Control de Calidad Interno y Control de Calidad Externo necesarios para la implementación del laboratorio de histocompatibilidad en el BSCU.
- Evaluar el impacto del laboratorio de histocompatibilidad en el BSCU, destacando los criterios de control de calidad implementados y la similitud antigénica en la población mexicana.



## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Validación

La validación de la técnica empleada se llevó a cabo mediante la realización de los controles de calidad interno y externo.

### 4.2 Control de Calidad Interno

Para la realización de las pruebas de control de calidad interno, se prepararon varias alícuotas (1 mL cada una) de una misma unidad de sangre periférica elegida al azar, formándose así un lote de muestras. Dichas muestras son procesadas mediante las mismas técnicas de extracción y amplificación de DNA que se utilizan de rutina y se llevan a cabo con una frecuencia mínima de una vez al mes. Los resultados de estas muestras deben ser concordantes entre sí.

Adicionalmente y como parte de los estudios de control de calidad pre-trasplante, se emplearon fragmentos de unidades de SCU congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$  en el bioarchivo (Thermogenesis<sup>®</sup>). Estas unidades de SCU cumplieron previamente con los criterios de inclusión del BSCU-CNTS (CordMX) para su criopreservación.

La selección de las unidades de SCU para la realización de esta prueba se hizo al azar y todas habían sido tipificadas previamente en el mismo laboratorio de histocompatibilidad de CordMX.

Una vez realizada la selección de la unidad de SCU, se retira la unidad del bioarchivo manteniéndola siempre sumergida en Nitrógeno líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ) y se corta



el fragmento más externo de la antena de la bolsa de *buffy coat* (ver fig.5) ; el fragmento obtenido se coloca dentro de un criovial y se coloca en N<sub>2</sub>L hasta su utilización. Con éste fragmento se realiza la extracción y posterior amplificación de DNA para determinar el HLA y verificar que éste coincida con el de la histotipificación inicial. Las unidades elegidas fueron: MX-431, MX-462, MX-477, MX-479, MX-484, MX-517, MX-567 y MX-598. Las muestras reprocesadas a partir de los fragmentos se identifican de la siguiente forma: MX-431FRAGMENTO, MX-462FRAGMENTO, MX-477FRAGMENTO, MX-479FRAGMENTO, MX-484FRAGMENTO, MX-517FRAGMENTO, MX-567FRAGMENTO y MX-598FRAGMENTO. Los resultados de la tipificación de los fragmentos deben coincidir con los del estudio de HLA inicial.

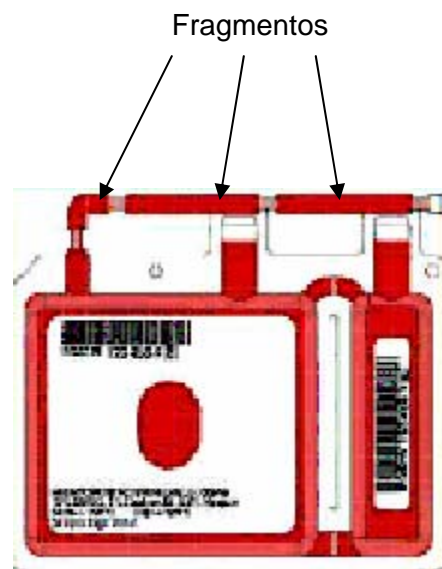


Fig. 6. Los fragmentos que se hacen en la bolsa de *buffy coat* se utilizan para estudios pre-trasplante y de Control de Calidad.



### 4.3 Control de Calidad Externo

Para realizar las pruebas de control de calidad externo, se llevó a cabo la tipificación HLA de unidades de SCU validadas a las que simultáneamente se les realizó el mismo estudio con la misma técnica en un laboratorio independiente que fue tomado como referencia y que cuenta con certificación de calidad internacional. Las unidades fueron seleccionadas al azar del inventario de CordMX y las pruebas se realizaron en ciego, verificándose posteriormente que los resultados reportados por los dos laboratorios fueran concordantes entre sí. Las unidades utilizadas en este estudio fueron las siguientes: MX-140, MX-151, MX-155, MX-199, MX-210 y MX-354. Las muestras estudiadas por el laboratorio de referencia se identifican como sigue: MX-140LABEXT, MX-151LABEXT, MX-155LABEXT, MX-199LABEXT, MX-210LABEXT y MX-354LABEXT.

### 4.4 Búsquedas

Se analizaron las solicitudes de búsqueda de unidades de SCU recibidas desde el año 2003, fecha en que inició sus actividades el BSCU del CNTS; dichas solicitudes provenían de diversos centros hospitalarios de varios estados de la república mexicana y del extranjero. La búsqueda de las histocompatibilidades HLA de las unidades que integran el inventario de CordMX, se llevó a cabo utilizando el programa TESI Hemodata (como ya se ha mencionado), incluyéndose sólo las unidades con compatibilidades 4/6, 5/6 y 6/6 en el reporte de resultados.



Lo reportado al médico responsable de la solicitud, se fundamenta en la compatibilidad HLA, el número de células CD34<sup>+</sup>, número de células nucleadas totales, grupo sanguíneo y sexo del recién nacido; es en base a estos parámetros, que el médico elige la unidad más adecuada, CordMX sólo le presenta las opciones disponibles.



## 5. RESULTADOS

Los resultados de los estudios realizados se presentan a continuación. En primer término, presentamos los obtenidos de los controles de calidad interno (lote y fragmentos) y externo. Posteriormente en la figura 7 se muestra en porcentaje las unidades de SCU compatibles encontradas para las solicitudes de búsqueda recibidas en CordMX; en la figura 8 se presentan las compatibilidades de antígenos HLA encontrados a las solicitudes de búsqueda que sí encontraron alguna unidad de SCU disponible, y finalmente en la figura 9 se presentan las compatibilidades de los trasplantes realizados.

### 5.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

#### 5.1.1 Muestras de Lote

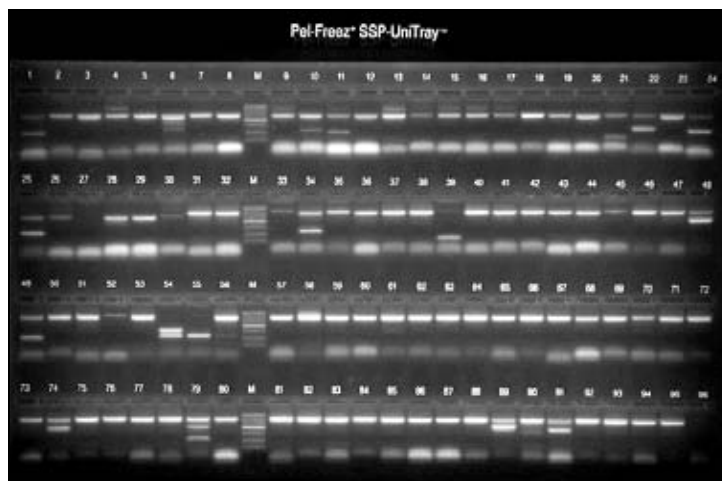
Los resultados obtenidos de la amplificación del DNA extraído de las muestras del lote se presentan a continuación.



MUESTRA: **MX-CCI-JFT**

BANDAS POSITIVAS: 1,10,11,21,22,24,25,34,39,48,49,54,74,79,89,91

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*11</b>	<b>B*38</b>	<b>DRB1*01</b>	<b>DQB1*05</b>
<b>A*26</b>	<b>B*44</b>	<b>DRB1*13</b>	<b>DQB1*06</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

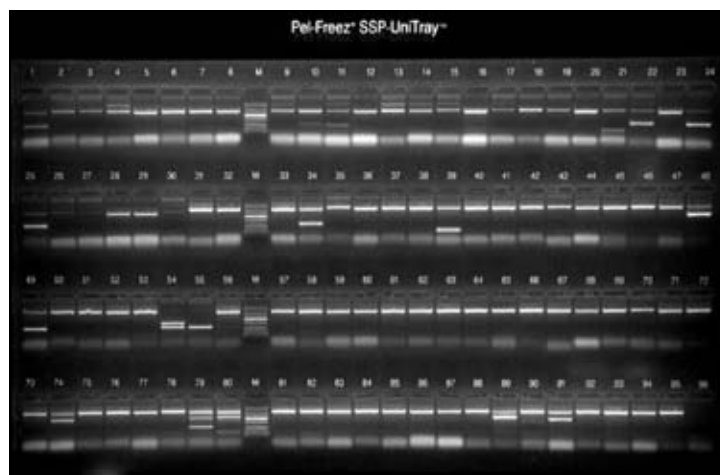
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A11</b>	<b>B38(16)</b>	<b>DR1</b>	<b>DQ5(1)</b>
<b>A26(10)</b>	<b>B44(12)</b>	<b>DR13(6)</b>	<b>DQ6(1)</b>



MUESTRA: **MX-CCI-JFT1**

BANDAS POSITIVAS: 1,10,11,21,22,24,25,34,39,48,49,54,74,79,80,89,91

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*11</b>	<b>B*38</b>	<b>DRB1*01</b>	<b>DQB1*05</b>
<b>A*26</b>	<b>B*44</b>	<b>DRB1*13</b>	<b>DQB1*06</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A11</b>	<b>B38(16)</b>	<b>DR1</b>	<b>DQ5(1)</b>
<b>A26(10)</b>	<b>B44(12)</b>	<b>DR13(6)</b>	<b>DQ6(1)</b>





### 5.1.2 Fragmentos

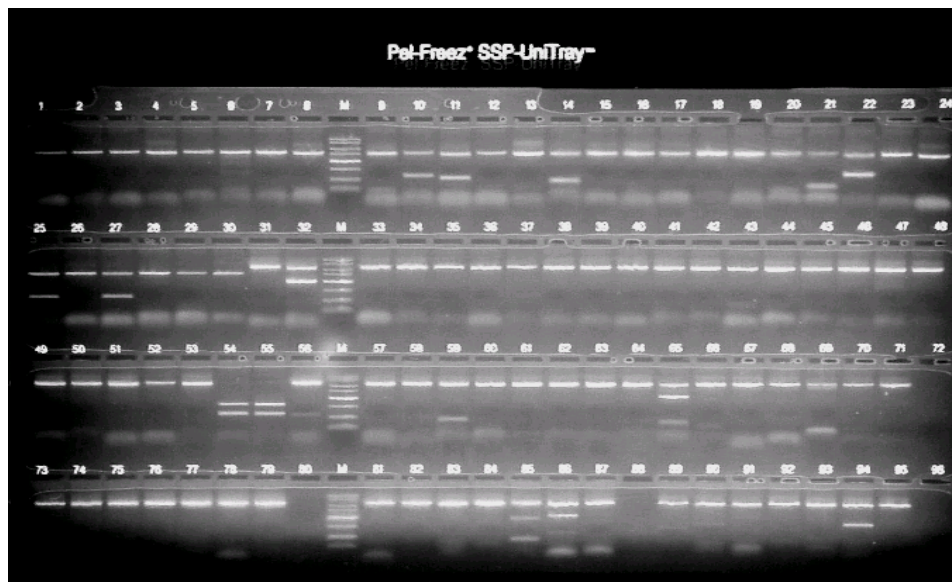
Los resultados obtenidos de la amplificación del DNA extraído de los fragmentos del *buffy coat* descongelados para trasplante se presentan a continuación.



MUESTRA: **MX-431**

BANDAS POSITIVAS: 10, 11, 14, 21, 22, 25, 27, 32, 54, 55, 59, 65, 85, 86, 94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*48</b>	<b>DRB1*13</b>	<b>DQB1*03</b>
<b>A*02</b>	<b>B*51</b>	<b>DRB1*1402</b>	<b>DQB1*06</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

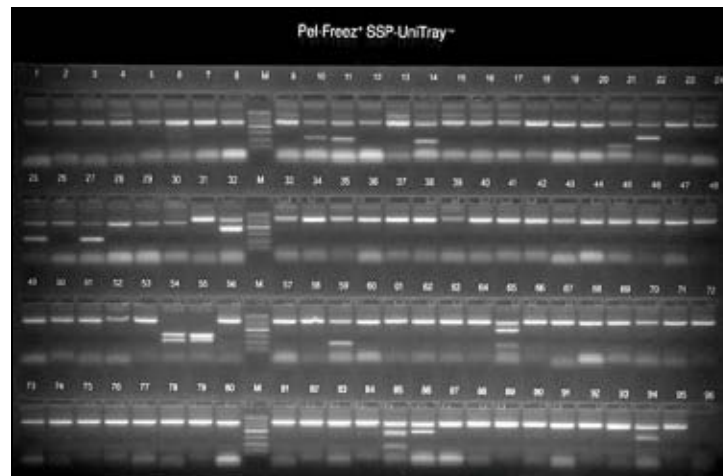
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B48</b>	<b>DR13(6)</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B51(5)</b>	<b>DR14(6)</b>	<b>DQ6(1)</b>



MUESTRA: **MX-431 FRAGMENTO**

BANDAS POSITIVAS: 10,11,14,21,22,25,27,32,54,55,59,65,85,86,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02	B*48	DRB1*13	DQB1*03
A*02	B*51	DRB1*14	DQB1*06

Equivalencia serológica de la tipificación

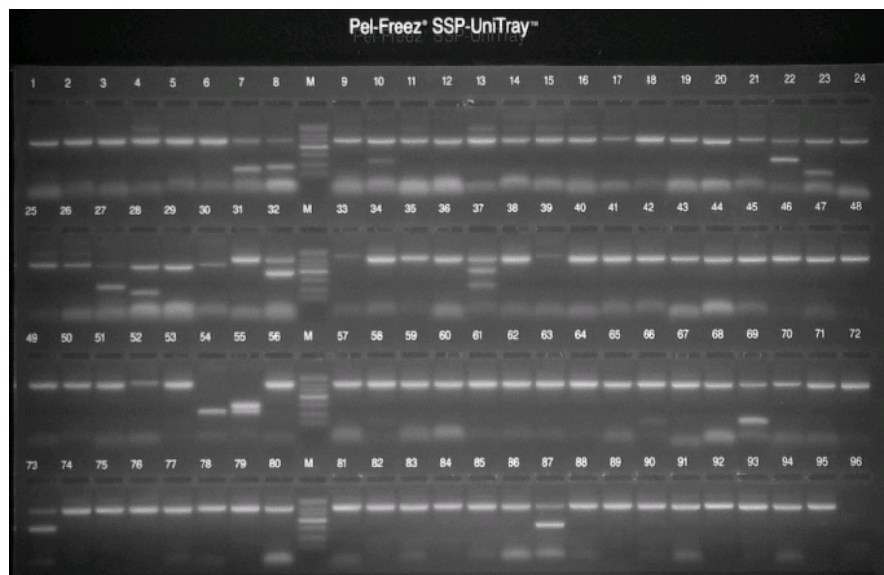
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2	B48	DR13(6)	DQ7(3)
A2	B51(5)	DR14(6)	DQ6(1)



MUESTRA: **MX-462**

BANDAS POSITIVAS: 7,8,10,22,23,27,28,32,37,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DR*04</b>	<b>DQ*0301</b>
<b>A*24</b>	<b>B*35</b>	<b>DR*11</b>	<b>DQ*0302</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

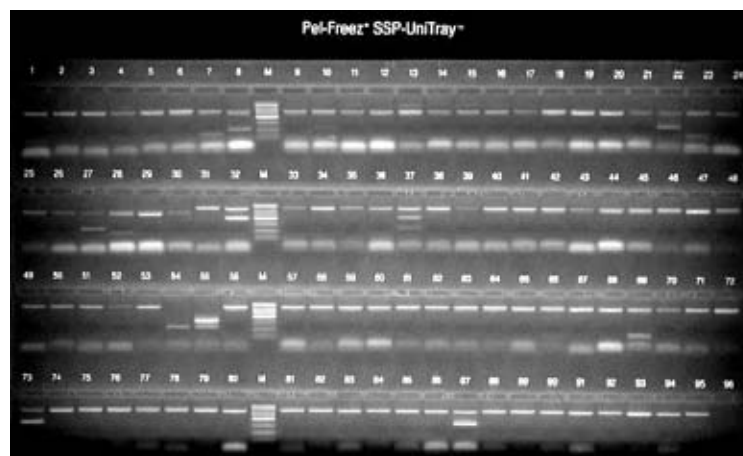
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR4</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A24(9)</b>	<b>B35</b>	<b>DR11(5)</b>	<b>DQ8(3)</b>



MUESTRA: **MX-462 FRAGMENTO**

BANDAS POSITIVAS: 7,8,10,22,23,27,28,32,37,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02 A*24	B*35 B*35	DRB*04 DRB*11	DQB*0301 DQB*0302

Equivalencia serológica de la tipificación

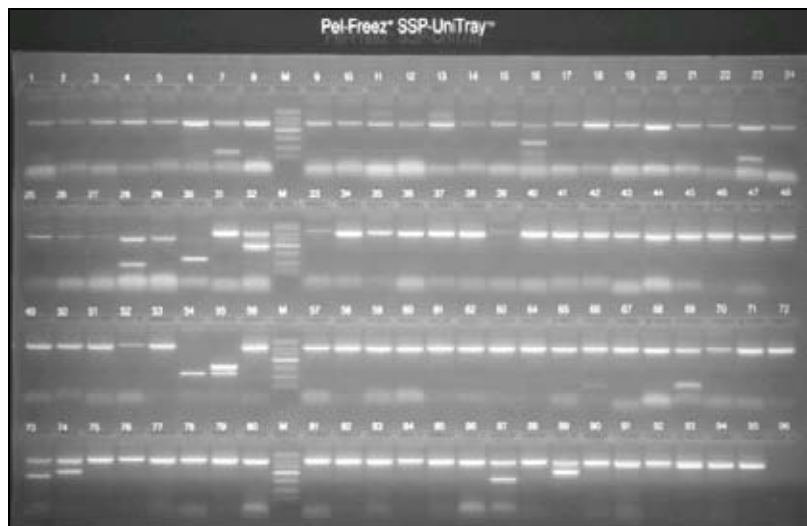
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2 A24(9)	B35 B35	DR4 DR11(5)	DQ7(3) DQ8(3)



MUESTRA: **MX-477**

BANDAS POSITIVAS: 7,16,23,28,30,32,55,69,73,74,87,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02010101 A*02010101	B*350101-04 B*390101-0104	DRB1*040101-11 DRB1*080101-0302	DQB1*030201 DQB1*0401

Equivalencia serológica de la tipificación

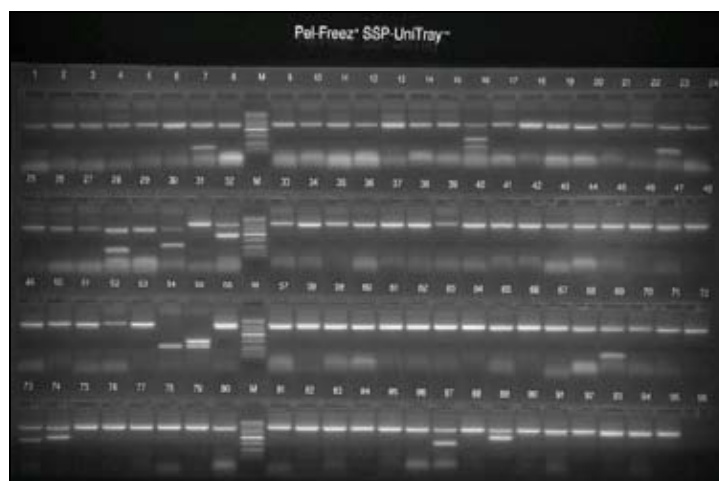
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2 A2	B35 B39(16)	DR4 DR8	DQ8(3) DQ4



MUESTRA: **MX-477 FRAGMENTO**

BANDAS POSITIVAS: 7,16,23,28,30,32,55,69,73,74,87,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*04</b>	<b>DQB1*03</b>
<b>A*02</b>	<b>B*39</b>	<b>DRB1*08</b>	<b>DQB1*04</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR4</b>	<b>DQ8(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B39(16)</b>	<b>DR8</b>	<b>DQ4</b>



MUESTRA: **MX-479**

BANDAS POSITIVAS: 7,16,23,28,30,32,55,59,69,73,74,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02010101	B*3505	DRB1*040101	DQB1*030201
A*02010101	B*3903	DRB1*080101	DQB1*0401

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2	B35	DR4	DQ8(3)
A2	B39(16)	DR8	DQ4

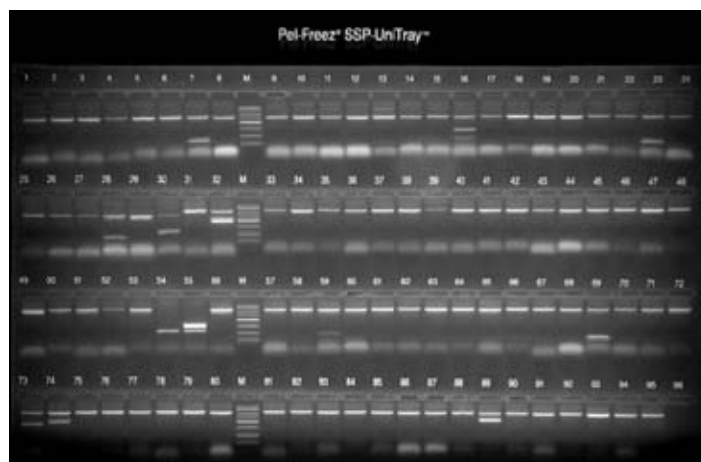




MUESTRA: **MX-479 FRAGMENTO**

BANDAS POSITIVAS: 7,16,23,28,30,32,55,59,69,73,74,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02	B*35	DRB1*04	DQB1*03
A*02	B*39	DRB1*08	DQB1*04

Equivalencia serológica de la tipificación

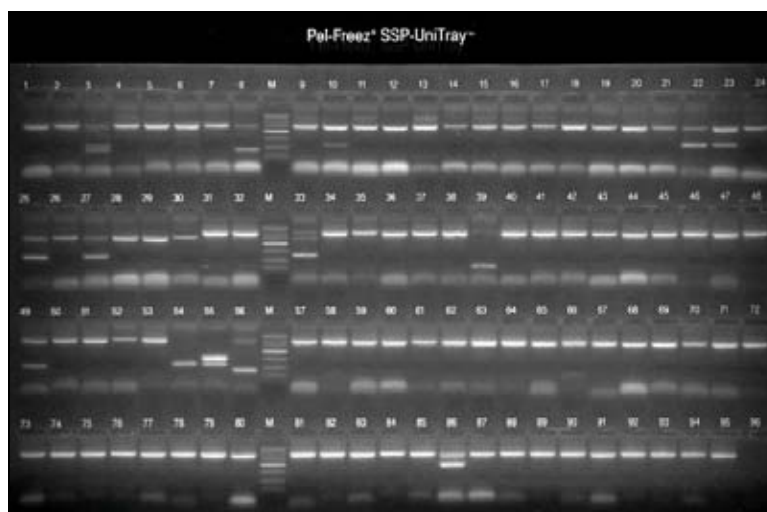
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2	B35	DR4	DQ8(3)
A2	B39(16)	DR8	DQ4



MUESTRA: **MX-484**

BANDAS POSITIVAS: 3,8,10,22,23,25,27,33,39,49,55,56,86

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*03010101-0103</b> <b>A*2601</b>	<b>B*070201-06</b> <b>B*070201-06</b>	<b>DRB1*110101-0402</b> <b>DRB1*150101-14</b>	<b>DQB1*030101</b> <b>DQB1*060101-21</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

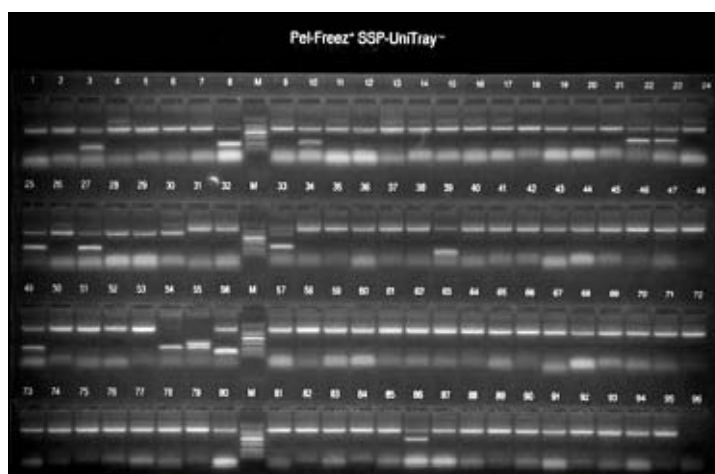
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A3</b> <b>A26(10)</b>	<b>B7</b> <b>B7</b>	<b>DR11(5)</b> <b>DR15(2)</b>	<b>DQ7(3)</b> <b>DQ6(1)</b>

MUESTRA: **MX-484 FRAGMENTO**



BANDAS POSITIVAS: 3,8,10,22,23,25,27,33,39,49,55,56,86

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*03	B*07	DRB1*11	DQB1*03
A*26	B*07	DRB1*15	DQB1*06

Equivalencia serológica de la tipificación

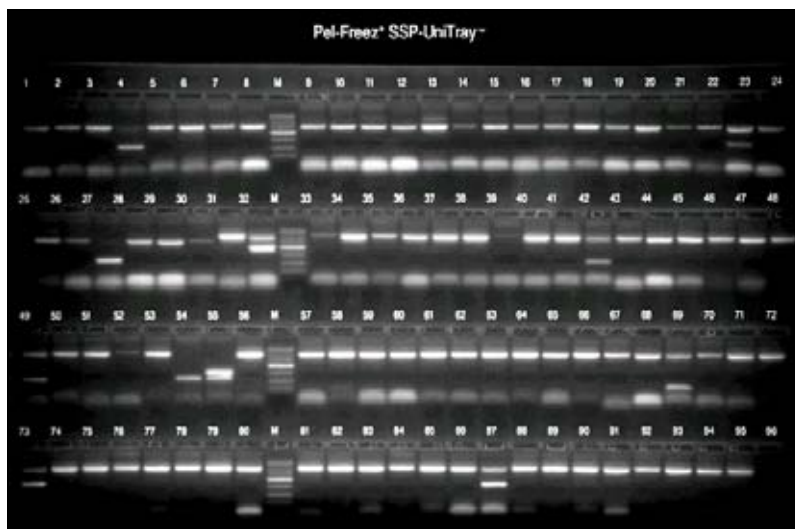
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A3	B7	DR11(5)	DQ7(3)
A26(10)	B7	DR15(2)	DQ6(1)



MUESTRA: **MX-517**

BANDAS POSITIVAS: 4,23,27,32,42,49,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



**Clase I**

**Clase II**

Fenotipo HLA:

HLA - A	HLA - B	HLA - DR	HLA - DQ
A*02010101-02 A*310102	B*350101-04 B*350101-04	DRB1*160101-0502 DRB1*160101-0502	DQB1*030101 DQB1*030101

Equivalencia serológica

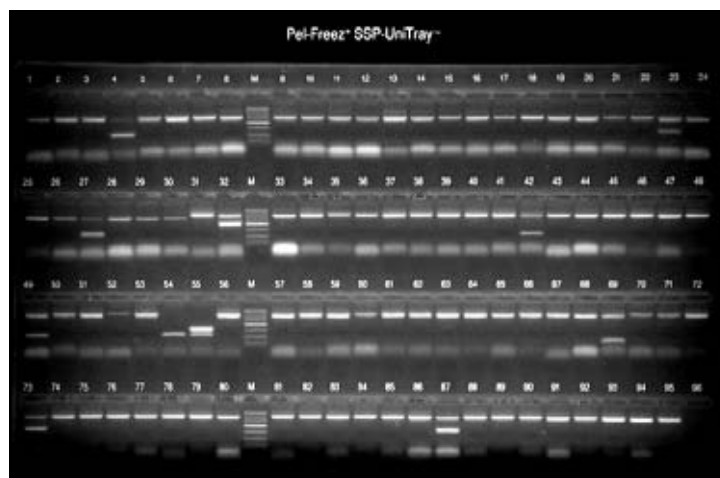
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2 A31(19)	B35 B35	DR16(2) DR16(2)	DQ7(3) DQ7(3)

MUESTRA: **MX-517 Fragmento**



BANDAS POSITIVAS: 4,23,27,32,42,49,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



**Clase I**

**Clase II**

Fenotipo HLA:

HLA - A	HLA - B	HLA - DR	HLA - DQ
A*02	B*35	DRB1*16	DQB1*03
A*31	B*35	DRB1*16	DQB1*03

Equivalencia serológica :

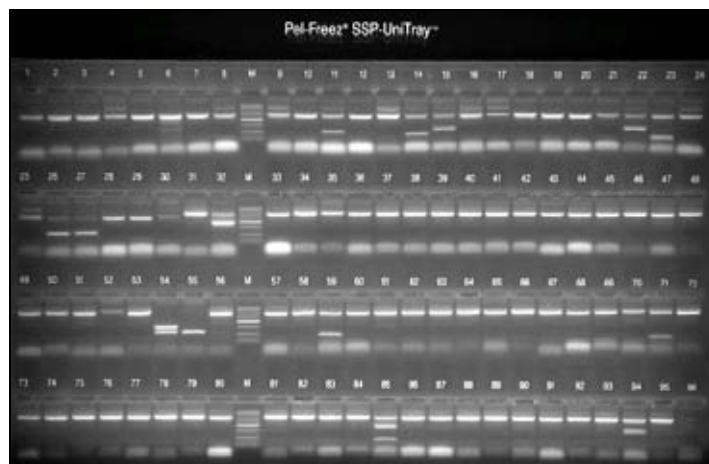
	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A	2	B 35	DR 16(2)	DQ 7(3)
A	31(19)	B 35	DR 16(2)	DQ 7(3)



MUESTRA: **MX-567**

BANDAS POSITIVAS: 11,14,15,22,23,26,27,32,54,59,71,85,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A* 02	B* 51	DRB1*07	DQB1*02
A* 02	B* 52	DRB1*14	DQB1*03

Equivalencia serológica de la tipificación

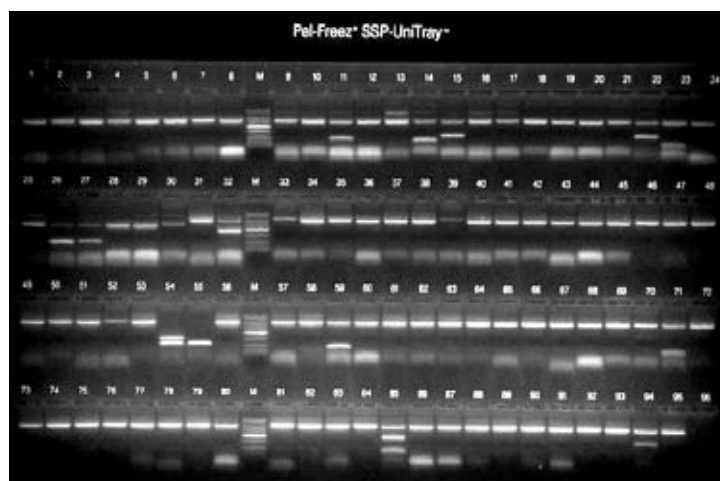
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2	B51(5)	DR7	DQ2
A2	B52(5)	DR14(6)	DQ7(3)



MUESTRA: **MX-567 FRAGMENTO**

BANDAS POSITIVAS: 11,14,15,22,23,26,27,32,54,59,71,85,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A* 02	B* 51	DRB1*07	DQB1*02
A* 02	B* 52	DRB1*14	DQB1*03

Equivalencia serológica de la tipificación

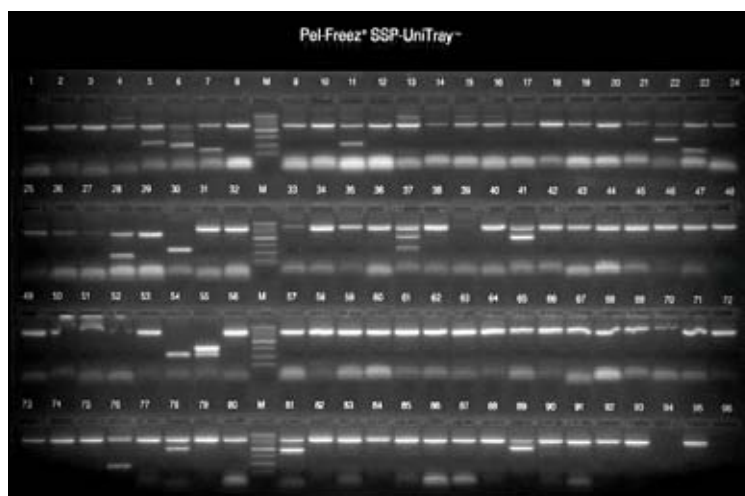
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2	B51(5)	DR7	DQ2
A2	B52(5)	DR14(6)	DQ7(3)



MUESTRA: **MX-598**

BANDAS POSITIVAS: 5,6,7,11,22,23,28,30,37,41,55,76,78,81,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*24 A*30	B*40 B*42	DRB1*03 DRB1*04	DQB1*03 DQB1*04

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A24(9) A30(19)	B61(40) B42	DR18(3) DR4	DQ8(3) DQ4

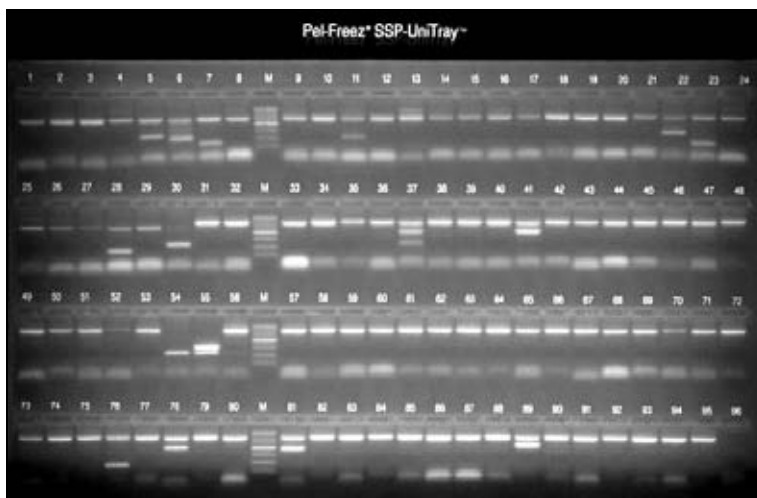




MUESTRA: **MX-598 FRAGMENTO**

BANDAS POSITIVAS: 5,6,7,11,22,23,28,30,37,41,55,76,78,81,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*24 A*30	B*40 B*42	DRB1*03 DRB1*04	DQB1*03 DQB1*04

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A24(9) A30(19)	B61(40) B42	DR18(3) DR4	DQ8(3) DQ4

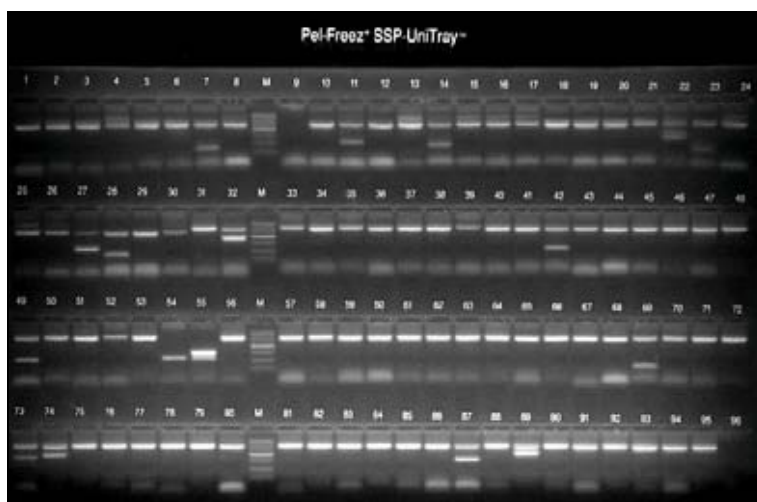
## 5.2 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO



MUESTRA: **MX-140**

BANDAS POSITIVAS: 7,11,14,22,23,27,28,32,42,49,55,69,73,74,87,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b> <b>A*31</b>	<b>B*35</b> <b>B*39</b>	<b>DRB1*04</b> <b>DRB1*14</b>	<b>DQB1*03</b> <b>DQB1*03</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

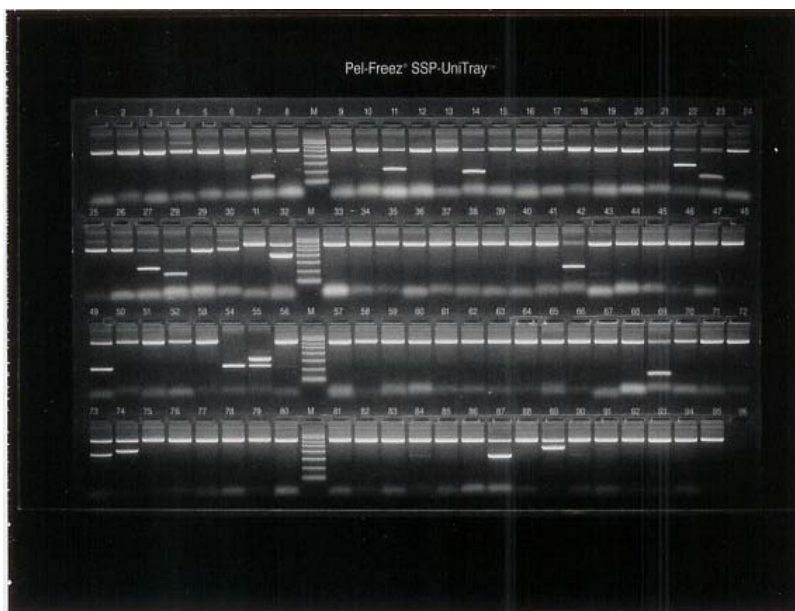
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b> <b>A31(19)</b>	<b>B35</b> <b>B39(16)</b>	<b>DR4</b> <b>DR14(6)</b>	<b>DQ7(3)</b> <b>DQ8(3)</b>



MUESTRA: **MX-140LABEXT**

BANDAS POSITIVAS: 7,11,14,22,23,27,28,32,42,49,55,69,73,74,87,89

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*2 A*31	B*35 B*39	DRB1*04 DRB1*14	DQB1*0302 DQB1*0301

Equivalencia serológica de la tipificación

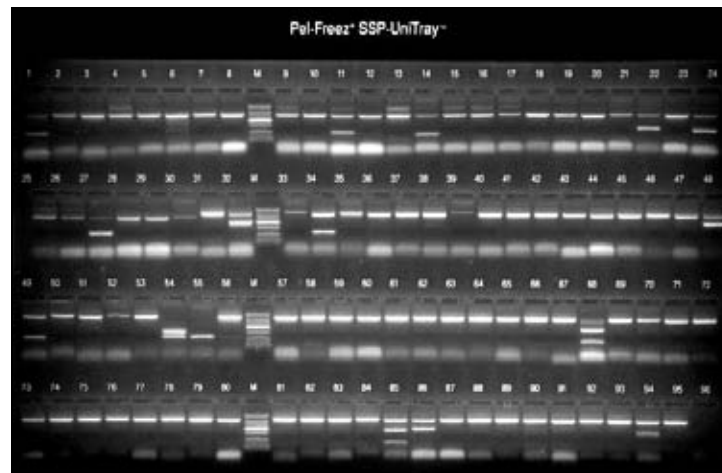
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2 A31 (19)	B35 B39(16)	DR4 DR14(6)	DQ8(3) DQ7(3)



MUESTRA: **MX-151**

BANDAS POSITIVAS: 1,11,14,22,24,27,32,34,48,49,54,68,85,86,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*27</b>	<b>DRB1*01</b>	<b>DQB1*03</b>
<b>A*11</b>	<b>B*51</b>	<b>DRB1*14</b>	<b>DQB1*05</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

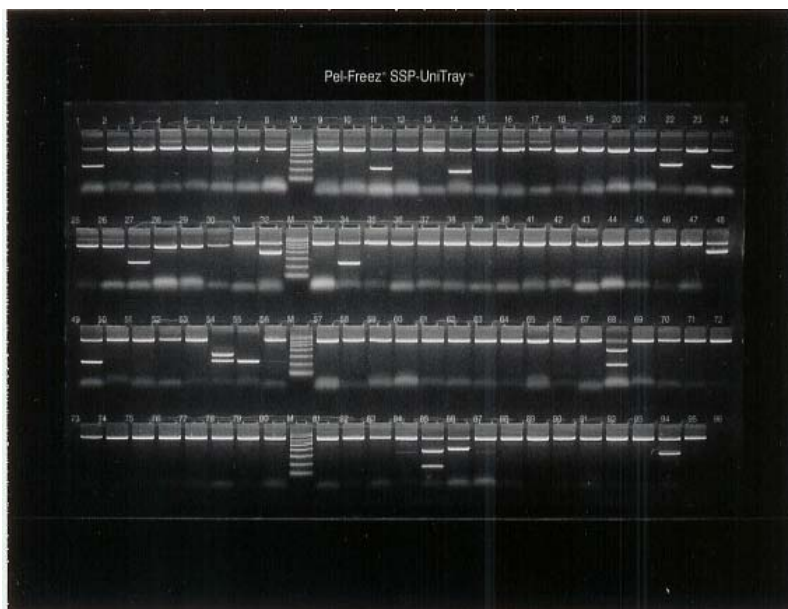
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B27</b>	<b>DR1</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A11</b>	<b>B51(5)</b>	<b>DR14(6)</b>	<b>DQ5(1)</b>



MUESTRA: **MX-151LABEXT**

BANDAS POSITIVAS: 1,11,14,22,24,27,32,34,48,49,54,68,85,86,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



**CLASE I**

**CLASE II**

Fenotipo HLA:

<b>HLA – A</b>	<b>HLA – B</b>	<b>HLA – DR</b>	<b>HLA – DQ</b>
<b>A*02</b>	<b>B*27</b>	<b>DRB1*01</b>	<b>DQB1*0301</b>
<b>A*11</b>	<b>B*51</b>	<b>DRB1*14</b>	<b>DQB1*05</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

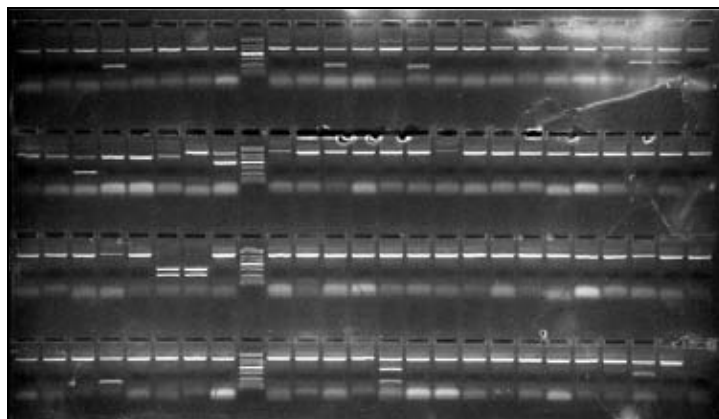
<b>HLA-A</b>	<b>HLA-B</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>HLA-DQ</b>
<b>A2</b>	<b>B27</b>	<b>DR1</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A11</b>	<b>B51(5)</b>	<b>DR14(6)</b>	<b>DQ5(1)</b>

MUESTRA: **MX-155**



BANDAS POSITIVAS: 4,11,14,22,23,27,32,54,55,76,85,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02	B*40	DRB1*14	DQB1*03
A*02	B*51	DRB1*16	DQB1*03

Equivalencia serológica de la tipificación

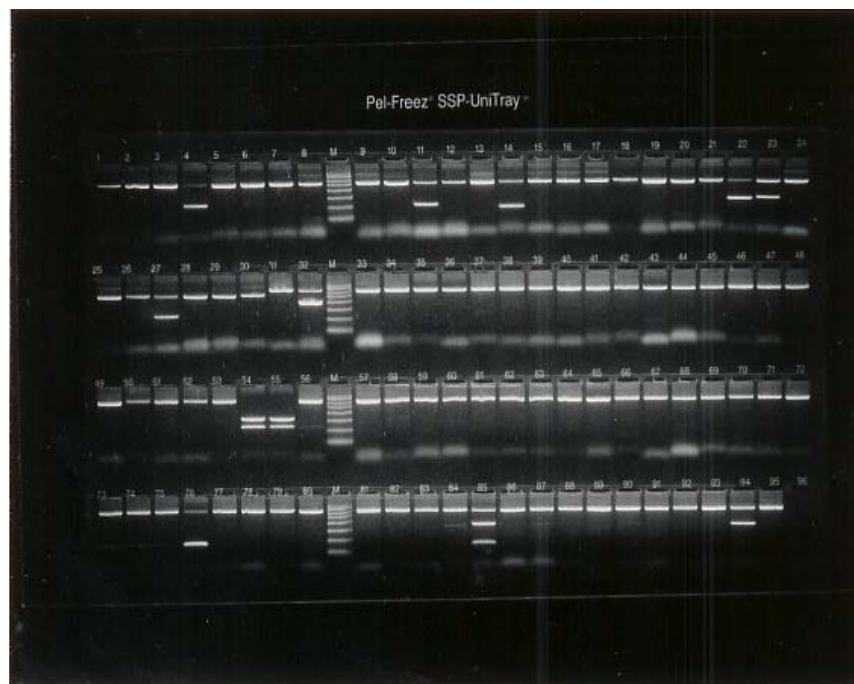
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2	B61(40)	DR14(6)	DQ7(3)
A2	B51(5)	DR16(2)	DQ7(3)



MUESTRA: **MX-155LABEXT**

BANDAS POSITIVAS: 4,11,14,22,23,27,32,54,55,76,85,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*40</b>	<b>DRB1*14</b>	<b>DQB1*0301</b>
<b>A*02</b>	<b>B*51</b>	<b>DRB1*16</b>	<b>DQB1*0301</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

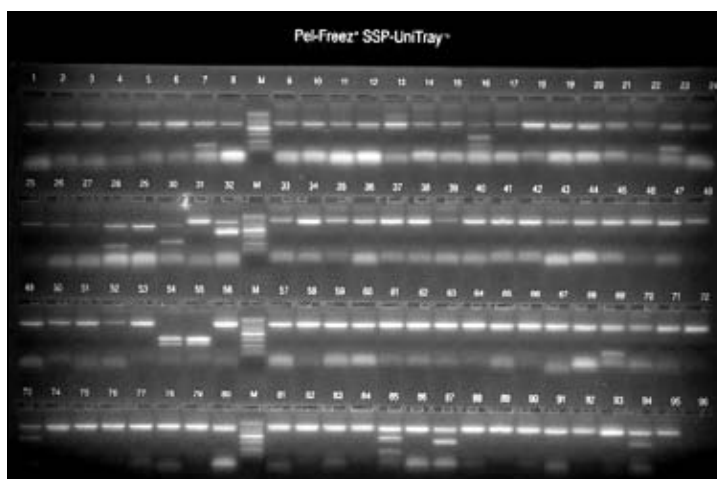
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B61(40)</b>	<b>DR14(6)</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B51(5)</b>	<b>DR16(2)</b>	<b>DQ7(3)</b>



MUESTRA: **MX-199**

BANDAS POSITIVAS: 7,16,23,28,30,32,54,55,69,73,85,87,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*04</b>	<b>DQB1*03</b>
<b>A*02</b>	<b>B*51</b>	<b>DRB1*08</b>	<b>DQB1*04</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR4</b>	<b>DQ8(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B51(5)</b>	<b>DR8</b>	<b>DQ4</b>

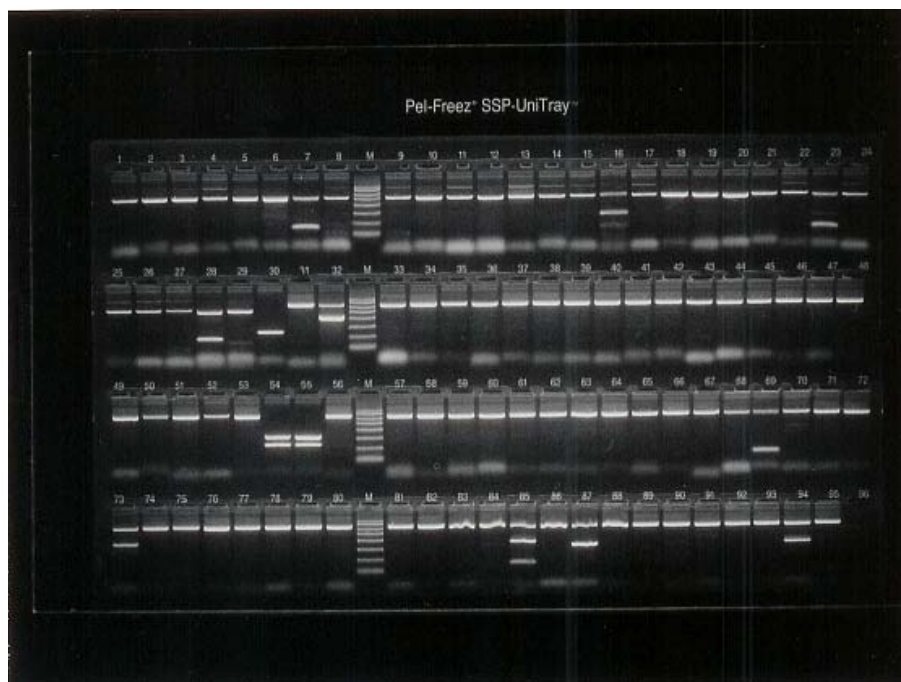




MUESTRA: **MX-199LABEXT**

BANDAS POSITIVAS: 7,16,23,28,30,32,54,55,69,73,85,87,94

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*04</b>	<b>DQB1*0302</b>
<b>A*02</b>	<b>B*51</b>	<b>DRB1*08</b>	<b>DQB1*04</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

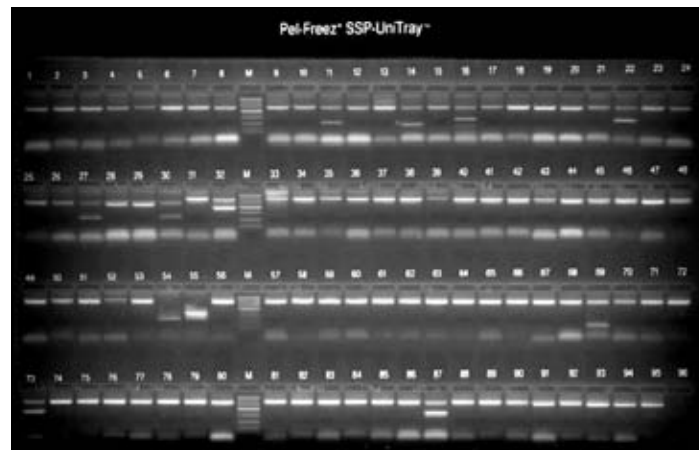
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR4</b>	<b>DQ8(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B51(5)</b>	<b>DR8</b>	<b>DQ4</b>



MUESTRA: **MX-210**

BANDAS POSITIVAS: 11,14,16,22,27,30,32,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



**CLASE I**

**CLASE II**

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*08</b>	<b>DQB1*03</b>
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*14</b>	<b>DQB1*04</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

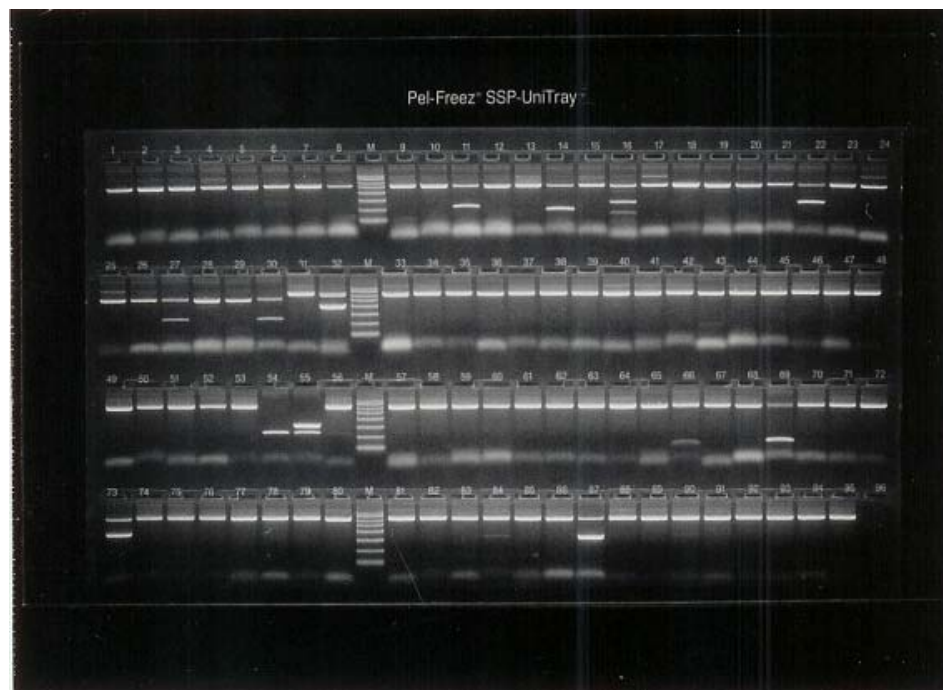
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR8</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR14(6)</b>	<b>DQ4</b>



MUESTRA: **MX-210LABEXT**

BANDAS POSITIVAS: 11,14,16,22,27,30,32,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



**CLASE I**

**CLASE II**

Fenotipo HLA:

<b>HLA – A</b>	<b>HLA – B</b>	<b>HLA – DR</b>	<b>HLA – DQ</b>
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*08</b>	<b>DQB1*0301</b>
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*14</b>	<b>DQB1*04</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

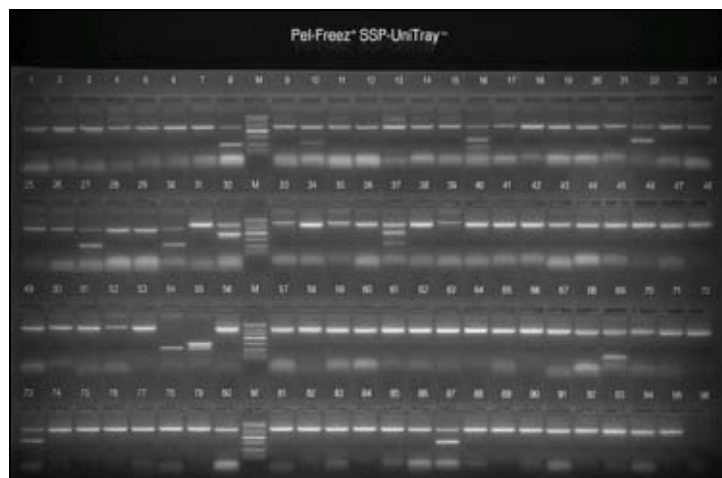
<b>HLA-A</b>	<b>HLA-B</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>HLA-DQ</b>
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR8</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR14(6)</b>	<b>DQ4</b>



MUESTRA: **MX-354**

BANDAS POSITIVAS: 8,10,16,22,27,30,32,37,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



### CLASE I

### CLASE II

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
<b>A*02</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*08</b>	<b>DQB1*03</b>
<b>A*24</b>	<b>B*35</b>	<b>DRB1*11</b>	<b>DQB1*04</b>

Equivalencia serológica de la tipificación

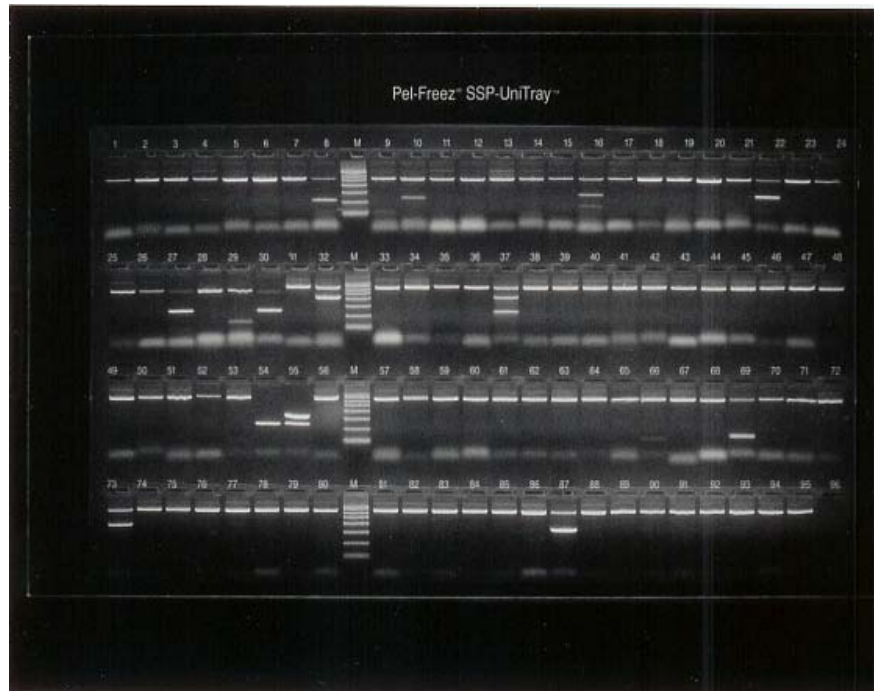
HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
<b>A2</b>	<b>B35</b>	<b>DR8</b>	<b>DQ7(3)</b>
<b>A24(9)</b>	<b>B35</b>	<b>DR11(5)</b>	<b>DQ4</b>



MUESTRA: **MX-354LABEXT**

BANDAS POSITIVAS: 8,10,16,22,27,30,32,37,55,69,73,87

CONTROL NEGATIVO: BANDA 96



**CLASE I**

**CLASE II**

Fenotipo HLA:

HLA – A	HLA – B	HLA – DR	HLA – DQ
A*02 A*24	B*35 B*35	DRB1*08 DRB1*11	DQB1*0301 DQB1*04

Equivalencia serológica de la tipificación

HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ
A2 A24(9)	B35 B35	DR8 DR11(5)	DQ7(3) DQ4



### 5.3 Búsquedas

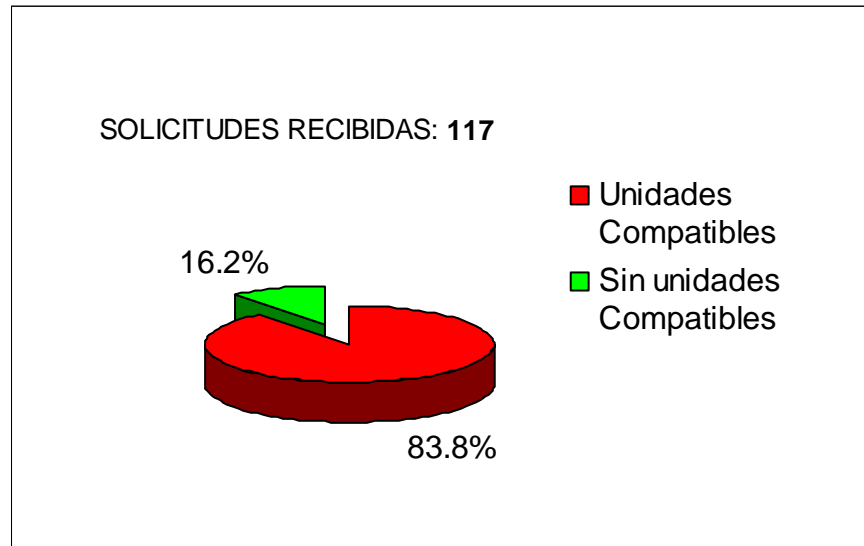


Fig. 7 Unidades compatibles encontradas para las solicitudes

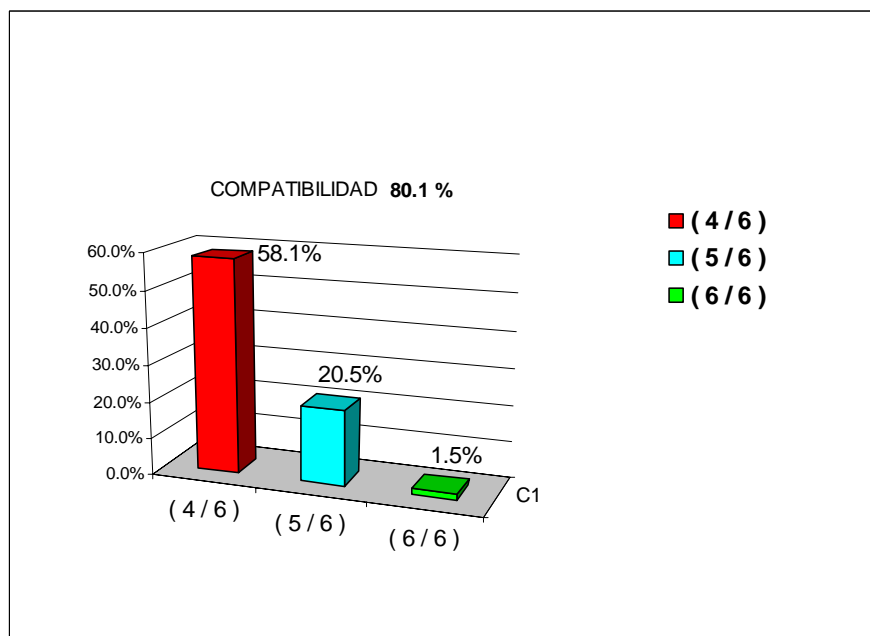


Fig. 8 Compatibilidades encontradas para las solicitudes

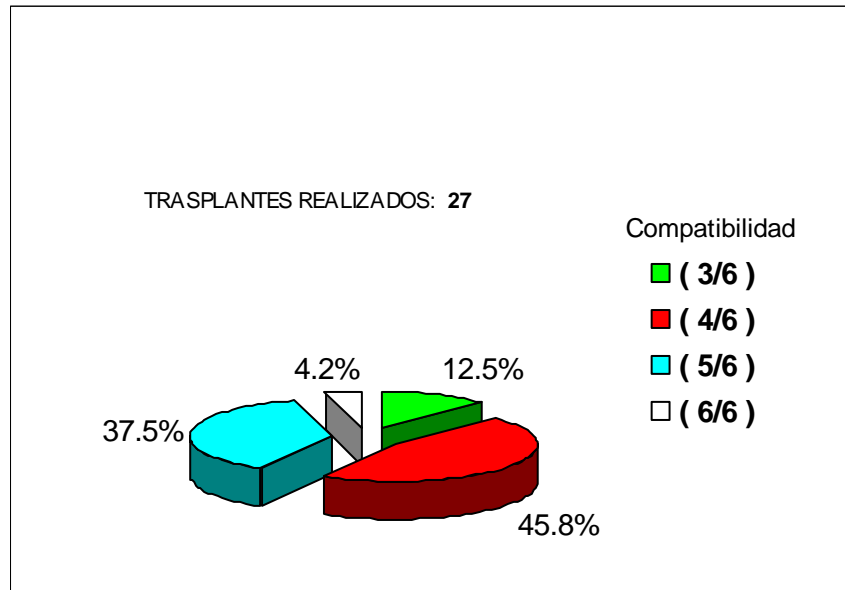


Fig. 9 Compatibilidad de Trasplantes realizados



## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en los geles correspondientes a las muestras del lote para el control de calidad interno, se observa que los patrones de banda muestran una diferencia entre las muestras, que corresponde a la banda positiva en el pocillo 80 de la muestra **MX-CCI-JFT1** y que se encuentra ausente en la muestra **MX-CCI-JFT**; sin embargo, las interpretaciones de los geles dan como resultado la misma compatibilidad HLA. En todos los geles aparecen las bandas de control interno (en algunos geles las bandas son más tenues que en otras), además en ninguno de ellos se observaron bandas en el pocillo de control de contaminación (pocillo 96). La ausencia de amplificación en este pocillo en las histotipificaciones realizadas en CordMX nos sugiere que el procedimiento de pre-amplificación realizado en CordMX se llevó a cabo en las condiciones de operación adecuadas (no hay contaminación con DNA), tanto de instalaciones como de manejo de muestras en la realización del procedimiento de extracción de DNA. Además, en todos los geles de CordMX las bandas aparecen bien definidas, y no se observan los problemas habituales debidos a la utilización de cantidades inadecuadas de reactivos, tales como reacciones débiles y productos de reacción inespecíficos, lo que nos indica que las concentraciones de los reactivos fueron convenientemente utilizadas.

En cuanto a las muestras tipificadas para el control de calidad de los estudios pre-trasplante (y que son utilizadas también para el control de calidad interno), se aprecia que las bandas obtenidas de los geles de electroforesis de la tipificación de los fragmentos siguen el mismo patrón de sus respectivas tipificaciones





iniciales para todas las unidades de SCU utilizadas en el estudio. Al no haber variación alguna, sus interpretaciones nos dan como resultado que las tipificaciones HLA de los fragmentos son las mismas que las reportadas inicialmente.

Asimismo, igual que en el caso anterior, las bandas positivas y las bandas de control interno del kit se observan con claridad y en ninguno de ellos se muestra una reacción positiva en el pocillo 96 que corresponde al control de contaminación, lo que nos da la certeza de que el proceso se llevó a cabo adecuadamente.

En lo que respecta a las tipificaciones realizadas en el laboratorio de referencia para el control de calidad externo, podemos observar que los patrones de banda no mostraron variación alguna con las de los geles obtenidos de las tipificaciones realizadas en el laboratorio de CordMX, por lo que la interpretación fue la misma en ambos casos. De la misma manera que se describe para los casos anteriores, las bandas de control interno del kit y la amplificación en el pocillo de control de contaminación mostraron el mismo comportamiento (amplificación eficiente y no amplificación respectivamente).

En cuanto a la respuesta dada a las solicitudes de búsqueda de unidades de SCU, a partir de un inventario de 561 unidades estudiadas, se han recibido 112 solicitudes, de las cuales se han encontrado 100 unidades compatibles en HLA (4/6, 58.1%, 5/6, 20.4% y 6/6, 1.5%), y sólo 12 solicitudes no encontraron alguna unidad compatible dentro del inventario (ver fig.7). Puesto que los antígenos del sistema HLA corresponden a una de las tantas características particulares de una población, la alta proporción de solicitudes con al menos una unidad de SCU



compatible encontrada dentro del inventario nos sugiere que la población mestiza mexicana tiene una gran similitud antigénica; lo anterior también se ve reflejado en el hecho de que CordMX se encuentra posicionado en cuarto lugar respecto al resto de los BSCU que conforman Netcord en eficiencia de trasplantes respecto al inventario (4.6%), debajo solo de Japón (Tokio, 10.51%), E.U (New York, 7.3%), y Francia (6.3%). Los países que ocupan los tres primeros lugares tienen un inventario en número muy superior a CordMX (>5000 unidades), no obstante, esto no explica la posición del banco mexicano, pues países como Italia (Milán) y España (Barcelona) también tienen un inventario superior, pero a diferencia de CordMX éstos no tienen una eficiencia en trasplante tan alta como el BSCU del CNTS y ocupan los lugares quinto (3.84%) y sexto (3.47%) respectivamente. En el continente europeo la mezcla de poblaciones de los países que la conforman hace que la diversidad genética sea mayor, lo que dificulta encontrar unidades de SCU para trasplante alogénico; es por esto que el número de trasplantes respecto al inventario de CordMX es mayor, pues aunque no cuenta con un inventario comparable a la de los países antes mencionados, la similitud antigénica aparente que existe en la población mexicana hace que sea más probable encontrar una unidad de SCU para trasplante de donador no emparentado. Dentro de las cifras que corresponden a las solicitudes sin unidad compatible encontrada, se incluyen aquellas a las que se les encontraron unidades con una identidad 3/6 como única opción, sin embargo se engloban dentro de las no compatibles por la inviabilidad de la elección de tales unidades para la realización de algún trasplante (por las razones anteriormente expuestas). Los trasplantes realizados hasta el momento suman un total de 27, 58.3% de los cuales se han realizado con una



compatibilidad 4/6, 37.5% han sido 5/6 y 4.2% se realizaron con una identidad de 6/6. Esto a su vez, también es un indicativo de las características biológicas de la sangre placentaria, pues trasplantes con estas compatibilidades no podrían realizarse con CPH provenientes de otras fuentes tales como médula ósea y sangre periférica movilizada.



## 7. CONCLUSIONES

Con los resultados de la histotipificación de las muestras de lote y los fragmentos para el control de calidad interno, se puede aseverar que el personal responsable de realizar las pruebas de histotipificación tiene la capacidad de operar eficientemente, y por lo tanto es adecuado para realizar las pruebas en el laboratorio de histocompatibilidad.

Los resultados obtenidos de los estudios de HLA realizados en el laboratorio de referencia tienen el 100% de concordancia con los obtenidos en el laboratorio de histocompatibilidad de CordMX, por lo que con estos y con los resultados del control de calidad interno queda validada la utilización de la técnica de PCR-SSP en CordMX. De esta forma, se implementa su utilización para los estudios de histocompatibilidad HLA necesarios en el BSCU.

La gran similitud antigénica del sistema HLA en la población mexicana, aumenta la probabilidad de encontrar una unidad compatible a una solicitud de trasplante. Sin embargo esta probabilidad se ve disminuida si los estudios de histocompatibilidad HLA de las unidades que ingresan al inventario no se realizan en el menor tiempo posible; en CordMX los estudios de histocompatibilidad HLA de cada unidad que ingresa se llevan a cabo hasta en un tiempo máximo de 72 horas lo que disminuye el tiempo de respuesta a las solicitudes de búsqueda. Asimismo, los controles de calidad implementados le dan a este laboratorio la pauta para garantizar la calidad de los servicios que ofrece y al mismo tiempo avanzar con paso firme hacia la certificación internacional. De lo anterior, podemos concluir que el establecimiento



de un laboratorio de histocompatibilidad es de vital importancia para aumentar la eficiencia de los servicios que ofrece el BSCU a los centros de trasplante.



## 8. REFERENCIAS

- 1) Abbas A., Lichtman A. **Inmunología Celular y Molecular**. 5ª Ed. Elsevier Imprint Grafos S.A. España 2003.
- 2) Yuhki N, Beck T, Stephens R, Nishigaki Y, Newmann K, O'Brien S. **Comparative Genome Organization of Human, Murine, and Feline MHC Class II Region**. Genome Research 2003; 13:1169-1179.
- 3) Lechler Robert, Warrens Anthony. **HLA in Health and Disease**. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press. Great Britain 2000.
- 4) Van Rood, J.J. **Women, pregnancy and serendipity: A personal story about the discovery of HLA**. J NEPHROL 2004; 17: 467-474
- 5) Madrigal,A., Pay,A., Dodi,A. **The role of HLA in Stem Cell Transplantation**. In The EBMT Handbook 2000. 39-53
- 6) Trowsdale, John. **HLA genomics in the third millennium**. Current Opinion in Immunology 2005, 17:498–504.
- 7) Martínez-Álvarez, Julio César.**Importancia del CMH en el trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas de Cordón Umbilical y seguimiento del injerto**. Gac Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 3, 2004.
- 8) Beutler E., Lichtman M., Coller B., Kipps T., Seligsohn U. **William's Hematology**. 6<sup>th</sup> Ed. Mc Graw-Hill Companies. United States of America 2001.
- 9) S.G.E. Marsh, E.D. Albert, W.F. Bodmer, R.E. Bontrop, B. Dupont, H.A. Erlich, D.E. Geraghty, et.al. **Nomenclature for factors of the HLA system, 2004**. Tissue Antigens 2005: 65: 301–369
- 10) Granados Arriola, J., Zúñiga Ramos,J. Inmunogenética del complejo principal de histocompatibilidad. En Guízar-Vázquez,J.J. **Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias**. Ed. Manual Moderno. México 2001. pág 763-779
- 11) Klein, J., Sato, A. **THE HLA SYSTEM. First of Two Parts**. The New England Journal of Medicine September 7, 2000 Volume 343 Number 10: 702-709.
- 12) European Group for Blood and Marrow Transplantation. **HLA MANUAL.A Guide to the completion of the EBMT Form HISTOCOMPATIBILITY**. EBMT 2004.
- 13) Effie W. Petersdorf, Claudio Anasetti, Paul J. Martin, Ted Gooley, Jerald Radich, Mari Malkki, Ann Woolfrey, Anajane Smith, Eric Mickelson, and John A. Hansen. **Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation**. Blood. 2004;104: 2976-2980



- 14) Gluckman, E., Koegler, G., Rocha, V. **Human Leukocyte Matching in Cord Blood Transplantation.** Semin Hematol 42:85-90 2005
- 15) Mullis K., Ferré F., Gibbs R. **The Polymerase Chain Reaction.** The Maple Press Company. United States of America 1994.
- 16) Kyung-Ok Lee, Tack-Kyu Park, Young-Suk Park, Moon-Ju Oh and Yoon-Jung Kim. **DNA Polymorphism Analysis of the HLA-DRB1 Gene Using Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) among Korean Subjects.** J. Biochem. Mol. Biol. Vol. 29, No, 1 pp. 45-51.
- 17) Hui, kam M., Bidwell, Jeffrey L. **Handbook Of HLA Typing Techniques.** CRC Press. United States of America 1993. Pág 1-7, 149-247
- 18) Luque-Cabrera, J., Herráez-Sánchez, A. **Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud.** Harcourt Ediciones. España 2001. pág 187-195, 122-139, 169-173.
- 19) Mayani, H., Lansdorp, P.M., **Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells.** STEM CELLS 1998;16:153-165
- 20) Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Zuniga J, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Rangel C, Villarreal-Garza C, Martinez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A. **Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations.** Immunogenetics. 2003 Feb;54(11):756-60. Epub 2003 Jan 16.
- 21) Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Gamboa R, Zuniga J, Flores C, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A. **Polymorphism and distribution of HLA-DR2 alleles in Mexican populations.** Hum Immunol. 2001 Mar;62(3):286-91.
- 22) De Leo C, Castelan N, Lopez M, Gonzalez N, Weckmann AL, Melin-Aldana H, Vargas-Alarcon G, Bordes J, Alarcon-Segovia D, Granados J, Ramirez E, Lisker R. **HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families.** Hum Biol. 1997 Dec;69(6):809-18.
- 23) Loeza F, Vargas-Alarcon G, Andrade F, Vergara Y, Rodriguez-Perez JM, Ruiz-Morales JA, Alarcon-Segovia D, Granados J. **Distribution of class I and class III MHC antigens in the Tarasco Amerindians.** Hum Immunol. 2002 Feb;63(2):143-8
- 24) Gorodezky C, Castro-Escobar LE, Escobar-Gutierrez A. **The HLA system in the prevalent Mexican Indian group: the Nahuas.** Tissue Antigens. 1985 Jan;25(1):38-46.
- 25) Lisker, R., Armendares, S. **Introducción a la Genética Humana.** El Manual Moderno 2001. Pág. 218-221
- 26) Dynal<sup>®</sup> Biotech. **SSP Unitray<sup>®</sup> Instructions for use.** Inserto.



- 27) European Federation For Immunogenetics. **Standards for Histocompatibility Testing. Ver. 5.4.** December 2005. pp. 23.
- 28) American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. **Standards for Accredited Laboratories.** December 2005. pp. 59
- 29) Maenaka, Katsumi, Jones, Yvonne. **MHC superfamily structure and the immune system.** Current Opinion in Structural Biology 1999, 9:745–753
- 30) Walker, J.M., Gingold, E.B. **Molecular Biology and Biotechnology.** 3<sup>rd</sup>. Ed. The Royal Society of Chemistry. The Bath Press. U.K. 1993.
- 31) Silva Ramírez Beatriz. **Frecuencia de antígenos del complejo HLA en una población mestiza Mexicana.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México 1983.
- 32) Mendoza Martínez Ma. De Los Ángeles. **Estudio de las frecuencias de los antígenos HLA en la población mestiza Mexicana y su aplicación en trasplante renal y en trabajos de asociación HLA-enfermedad.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México 1983.
- 33) Roche<sup>®</sup> kit no. 1667327. **DNA Isolation Kit for Mammalian Blood.** Inserto
- 34) Rodríguez, R., Tait, R. **Recombinant DNA techniques: An introduction.** The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Canada 1983. Pág 37-44
- 35) Kreuzer, H., Massey, A. **Recombinant DNA and Biotechnology.** 2<sup>nd</sup>. Edition. ASM Press. United States of America 2001. Pág. 182-187.
- 36) Wagner, J., Rosenthal, J., Sweetman, R., et.al. **Successful Transplantation of HLA-Matched and HLA-Mismatched Umbilical Cord Blood From Unrelated Donors: Analysis of Engraftment and Acute Graft-Versus-Host Disease.** Blood, Vol 88, NO 3 (August I), 1996: pp 795-802
- 37) Cairo, Mitchell S., Wagner, John E. **Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation.** Blood, Vol 90, No 12 (December 15), 1997: pp 4665-4678
- 38) Stewart, C., Horton, R., Allcock, R. Et.al. **Complete MHC Haplotype Sequencing for Common Disease Gene Mapping.** Genome Research. Mayo 2005: 1176-1187.
- 39) Laughlin, Mary J. **Transplantation of 2 UCB units in adults.** Blood, 1 Feb 2005 I Vol 105 (3): 915-916
- 40) Frassoni F., Podesta M., Maccario R., Giorgiani G., Rossi R., Zecca M., et.al. **Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation.** Blood, 1 Aug 2003 Vol 102 (3): 1138-1141.





- 41) Barker J., Weisdorf D.J, DeFor T., Blazar B., McGlave P., Miller J., Verfaillie C., Wagner J.E. **Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy.** Blood, 1 Feb 2005 Vol 105 (3): 1343-1347.
- 42) Wagner J.E., Barker J., DeFor T.E, Baker K.S., Blazar B., Eide C., et.al. **Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival.** Blood, 1 Sept 2002 Vol 100(5): 1611-1618.
- 43) Rubinstein Pablo, Rosenfield Richard, Adamson John, Stevens Cladd. **Stored Placental Blood for Unrelated Bone Marrow Reconstitution.** Blood, Vol81, No 7 (April 1). 1993: pp 1679-1690
- 44) Wagner J.E., Broxmeyer H.E., Byrd R., Zehnbauser B., Schmeckpeper B., et.al. **Transplantation of Umbilical Cord Blood After Myeloablative Therapy: Analysis of Engraftment.** Blood, Vol79, No 7 (April 1). 1992: pp 1874-1881
- 45) Barker J., Weisdorf D., DeFor T.E, Blazar B., Miller J.S., Wagner J.E. **Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning.** Blood, 1 Sept 2003 Vol 102 (5): 1915-1919.
- 46) Locatelli F., Rocha V., Bernaudin F., Ertem E., et.al **Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease.** Blood, 15 March 2003 Vol 101 (6): 2137-2143.
- 47) To L.B, Haylock D.N., Simmons P.J., Juttner C.A. **The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells.** Blood, Vol 89, No 7 (April 1), 1997: pp 2233-2258
- 48) Sanz G., Saavedra S., Planelles D, Senent L., Cervera J., Barragán E., Jiménez C., et.al. **Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies.** Blood, 15 Oct 2001 Vol 98(8): 2332-2338.
- 49) Thomson B., Robertson K., Gowan D., Heilman D., et.al. **Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation.** Blood, 15 Oct 2000 Vol 96 (8): 2703-2711.
- 50) Migliaccio A., Adamson J., Stevens C., Dobrila L., Carrier C., Rubinstein P. **Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity.** Blood, 15 Oct 2000 Vol 96 (8): 2717-2722.
- 51) Barker J.N., Davies S., DeFor T., Ramsay N., Weisdorf D.J., Wagner J.E. **Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis.** Blood, 15 May 2001 Vol 97 (10):2957-2961.



- 52) Rocha V., Cornish J., Sievers E.L., Filipovich E., Locatelli F., Peters C., et.al. **Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia.** Blood 15 May 2001 Vol 97(10): 2962-2971.
- 53) Locatelli F., Rocha V., Chastang C., Arcese W., Michel G., Abecasis M. **Factors Associated With Outcome After Cord Blood Transplantation in Children With Acute Leukemia.** Blood, Vol 93, No 11 (June 1), 1999: pp 3662-3671
- 54) Grewal S., Barker J.N., Davies S.M., Wagner J.E. **Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood?.** Blood, 1 June 2003 Vol 101(11): 4233-4244.
- 55) Michel G., Rocha V., Chevret S., Arcese W., Kah-Wah Chan, et.al. **Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis.** Blood, 15 Dec 2003 Vol. 102 (13): 4290-4297.
- 56) Ooi J., Iseki T., Takahashi S., Tomonari A., Ishii K., et.al. **Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome.** Blood, 15 June 2003 Vol. 101 (12): 4711-4713
- 57) Sharon D Adams S., Barracchini K., Chen D., Robbins F. et.al. **Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification.** Journal of Translational Medicine 2004, 2:30
- 58) Heimfeld S. **HLA-identical stem cell transplantation: is there an optimal CD34 cell dose?.** Bone Marrow Transplantation (2003) 31, 839–845
- 59) Sanz M.A., Sanz G.F. **Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults.** Leukemia (2002) 16, 1984–1991
- 60) Klein, J., Sato, A. **THE HLA SYSTEM. Second of Two Parts.** The New England Journal of Medicine September 14, 2000 Volume 343 Number 11: 782-786.
- 61) López-Pérez G., Juárez-Nicolás F., Rojas-Garrido A., García-Álvarez R. **Inmunogenética del asma. Participación de los genes HLA en la susceptibilidad al asma.** Acta Pediatr Mex 2005 Vol.26 (1): 29-34.
- 62) Falfán-Valencia Ramcés. **MHC: Polimorfismos genéticos en autoinmunidad.** Rev Inst Nal Enf Resp Mex . Vol.17 Núm.2 Abril-Junio 2004: 126 – 134
- 63) Jaime-Facundo J., Dorticós-Balea E., Pavón-Morán V., Cortina-Rosales L. **Transplante de células progenitoras hematopoyéticas: Tipo, Fuentes e indicaciones.** Rev Cubana Hematol 2004: 20(2)
- 64) Morera-Barrios L., Vianed Marsan-Suárez V., Guerreiro M., y col. **Estudio de los haplotipos HLA en leucemias.** Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1997;13(2): 138-141



- 65) González-Cortiñas M., Faurés-Vergara L., Rodríguez-Viera R., Gómez-Arbesú J. **HLA B27 y las espondilartropatías seronegativas**. Rev Cubana Med 36(1): 24-28, 1997
- 66) International Human Genome Sequencing Consortium. **Initial sequencing and analysis of the human genome**. Nature Vol. 409, 15 Feb 2001.
- 67) Neal Flomenberg N., Baxter-Lowe L., Confer D., Fernandez-Vina M., et.al. **Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome**. Blood. 2004;104: 1923-1930



## 9. APÉNDICE

### PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR-SSP

Versión: 2.0

Este procedimiento se puede dividir en tres secciones:

- a) Aislamiento y extracción del DNA
- b) Amplificación del DNA
- c) Electroforesis y análisis del DNA amplificado

#### Definiciones

HLA	Antígeno Leucocitario Humano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
Histocompatibilidad	Relación que existe en los antígenos de superficie de un tejido u órgano, y los del paciente para saber si es posible realizar un trasplante.
G.R.	Glóbulos Rojos
G.B.	Glóbulos Blancos
Hb	Hemoglobina
SSP	Single Secuence Primer (Iniciador de secuencia única)

#### 9.1 Material y reactivos

- *Buffer* de lisis de células rojas
- *Buffer* de lisis de células blancas
- Solución de precipitación de proteínas
- Etanol absoluto 100 %, anhidro
- Etanol al 70 %, refrigerado de +2° a +6° C
- Tubos Falcon de 15 mL con tapón de rosca
- Termómetro calibrado (- 20° a +110° C)
- Gradilla para tubos Falcon
- Tubos eppendorf
- Gradilla para tubos eppendorf
- Pipetas Pasteur desechables de plástico de 3 mL
- Micropipeta de 100 a 1000 µL
- Micropipeta de 10 a 100 µL
- Micropipeta de 0 a 10 µL
- Puntas de plástico con filtro para micropipetas
- Termociclador
- Espectrofotómetro con celda



- Bromuro de Etidio (10 mg/mL)
- Cámara de Electroforesis con accesorios
- Nivelador de burbuja
- Transiluminador UV con cámara digital
- Panel Fluorescente
- Vial con Taq Polimerasa DNA (5 U/  $\mu$ L) o Taq polimerasa Platinum
- Amortiguador PCR
- Amortiguador TBE 10X (usarlo a 0.5X)
- Placa SSP UniTray ABDRDQ (Pel Freez)
- Gasas y sanitas de papel
- Plumón indeleble
- Probeta de 1000 y 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Balanza analítica
- Espátula
- Agitador Vortex
- Centrífuga con camisas ( o a 4000 rpm ) para tubos Falcon de 15 mL
- Ultra centrífuga 13,000 rpm
- Contenedor de punzocortantes
- Contenedor de desechos líquidos
- Guantes desechables sin polvo
- Agua inyectable
- Agitador armónico para tubos
- Papel parafilm.
- Horno de microondas

## 9.2 AISLAMIENTO Y EXTRACCIÓN DEL DNA

Esta técnica sirve para aislar el DNA a partir de sangre total con EDTA o ACD y buffy coat. Es muy importante saber que por ninguna razón se debe usar sangre con Heparina, ya que esta puede inhibir la amplificación del DNA.

### 9.2.1 Técnica

- En un tubo Falcon colocar 1 mL de SCU descongelada (a temperatura ambiente) y 3 mL de lizante de G.R. Identificar con plumón indeleble tanto el tubo como el tapón de rosca con el número de la unidad (si se usa más de 1 mL, se adiciona proporcionalmente el *buffer* de lisis)
- Agitar de 10 a 20 minutos en agitador armónico.
- Centrifugar a 2000 rpm, por 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante con pipeta de plástico desechable dejando aproximadamente 1 o 2 mm de líquido sobre el botón o decantando rápidamente el tubo procurando no tirar el botón,
- Resuspender el botón muy bien en vortex.
- Adicionar 1.0 mL de reactivo de lisis de G.B.
- Agitar en vortex por 15 segundos.
- Agitar suavemente de 15 a 30 minutos, dentro de este tiempo, agitar de vez en cuando en vórtex; si no se logra lisar por completo, incubar a 37° C de 15 a 30 minutos.
- Adicionar 0.52 mL de reactivo precipitante de proteínas.
- Agitar en vortex por 25 segundos.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Transferir todo el contenido a un tubo eppendorf.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos.



- Transferir el sobrenadante a un tubo Falcon de 15 mL, dejando un mínimo de líquido en el botón. Este botón son restos de proteínas, los cuales se desechan.
- Adicionar lentamente 2 veces el volumen de Etanol absoluto anhidro a temperatura ambiente al tubo Falcon.
- Mezclar suavemente el tubo por inversión; poco a poco, se forma la hebra de DNA (tiene un aspecto mucoso).
- Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de etanol al 70 % refrigerado.
- Aspirar con la micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L, ajustada a 100, la hebra de DNA recién formado con un mínimo de líquido en la punta y transferir al tubo que contiene el etanol al 70 % refrigerado; mezclar con la micropipeta, dejando la hebra en el eppendorf (usar punta con filtro).
- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.
- Decantar y retirar el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar el DNA.
- Quitar el exceso de etanol con micropipeta de 0 a 100  $\mu$ L (ajustada a 100  $\mu$ L) usando punta con filtro.
- Dejar secar el DNA. Para esto, existen tres formas de hacerlo:
  - a) a 37° C durante 30 minutos con el tubo destapado o
  - b) de un día para otro con el tubo destapado o
  - c) centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos con el tubo destapado; retirar y dejar otros 5 min. al aire.

Resuspender en 100  $\mu$ L de agua inyectable (si el rendimiento es mayor, se pueden adicionar hasta 200  $\mu$ L de agua) ; dejar 24 horas a temperatura ambiente o a 4° C durante máximo una semana. Este último tubo eppendorf que contiene el DNA, se puede rotular con alguna de las etiquetas que sobraron durante el procedimiento P-IC-45 Gestión de Datos de SCU, o bien identificarlo con plumón indeleble.

#### 9.2.2 Técnica para aislar el DNA a partir de un fragmento de unidad de SCU congelada (*buffy coat*)

Esta técnica se realiza con el fin de llevar a cabo un control de calidad pre-trasplante de la unidad, para garantizar que el HLA determinado coincida con el HLA inicial de dicha unidad y se de una seguridad transfusional al paciente.

- Obtener un segmento o fragmento de SCU congelada.
- Aún congelado el segmento, cortar con una navaja de bisturí un extremo del mismo.
- Cuando se descongele, aspirar con una micropipeta de 100  $\mu$ L todo el volumen (está entre 50 y 100  $\mu$ L) y colocarlo en un tubo eppendorf previamente rotulado con el número de la unidad.
- Adicionar 250  $\mu$ L de *buffer* de lisis de G.R.
- Agitar en vórtex de 3 a 5 segundos.
- Agitar suavemente en un agitador armónico por 5 minutos; de vez en cuando vortear.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos en microcentrífuga.
- Retirar el sobrenadante decantando rápidamente o bien con pipeta de plástico, dejando únicamente el botón y algo mínimo de líquido.
- Resuspender en vórtex.
- Adicionar 250  $\mu$ L de *buffer* de lisis de G.B.
- Agitar suavemente en agitador armónico por 15 minutos.
- Vortear de 3 a 5 segundos 3 veces; si no hay lisis total, vortear y agitar otros 5 minutos más.
- Adicionar 180  $\mu$ L de precipitante de proteínas.
- Vortear 3 a 5 segundos.
- Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos.
- Transferir todo el líquido a un tubo falcon (rotulado previamente).
- Adicionar 2 veces el volumen de etanol anhidro (aproximadamente 1 mL) y a temperatura ambiente.



- Agitar suavemente hasta la formación de la hebra de DNA.
- Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de etanol al 70% refrigerado.
- Aspirar con la micropipeta de 0 a 100  $\mu$ L (ajustada a 100), la hebra de DNA recién formada con un mínimo de líquido en la punta, y transferir al tubo que contiene el etanol al 70% refrigerado; mezclar con la micropipeta dejando la hebra en el eppendorf (usar punta con filtro).
- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
- Decantar y retirar el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar el DNA.
- Quitar el exceso de etanol con micropipeta de 0 a 100  $\mu$ L (ajustada a 100), usando punta con filtro.
- Dejar secar el DNA. Para esto existen tres formas de hacerlo:
  - a) a 37° C durante 30 minutos con el tubo destapado o
  - b) de un día para otro con el tubo destapado o
  - c) centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos con el tubo destapado; retirar y dejar otros 5 min. al aire.

Resuspender en 70  $\mu$ L de agua inyectable y dejar a temperatura ambiente hasta que el DNA se disuelva.

### 9.3 AMPLIFICACIÓN DEL DNA (USAR GUANTES SIN POLVO)

Una vez transcurridas las 24 horas a temperatura ambiente, el DNA se resuspende perfectamente; si no se logra resuspender, se puede incubar a 37° C por un lapso no mayor de 15 a 30 minutos, pero cada 5 minutos se agita en vórtex. En primera instancia, se debe determinar la concentración del DNA para hacer una mezcla maestra a partir de la cual se calculará el volumen necesario para la amplificación.

#### 9.3.1 Dilución y calibración en espectrofotómetro. Cálculo de la concentración de DNA.

- Encender el espectrofotómetro (parte posterior) y esperar unos minutos a que realice la autocalibración. En este lapso, se hace una dilución 1: 20 de DNA resuspendido en agua inyectable (190  $\mu$ L de agua + 10  $\mu$ L de DNA) en un tubo eppendorf, cambiando el factor de dilución en el espectro, en este caso a 20. Agitar en vortex.
- Colocar de 100 a 500  $\mu$ L de agua inyectable en la celda. Esta celda se toma de los lados que son ásperos dejando libres los lados brillosos y sin tocarlos; uno de estos lados brillosos, tiene en la parte frontal superior un “cero” 0, este debe quedar de frente en el espectrofotómetro (antes de colocar la celda, limpiarla con gasa). El agua inyectable es el blanco de la calibración. Tapar la celda con su tapón.
- Presionar la tecla “DNA” y, cuando cambien los valores, presionar la tecla “set ref”.
- Dejar que ajuste y cuando marque 0.000, sacar la celda y retirar toda el agua de la misma.
- Colocar 100  $\mu$ L de dilución 1: 20 de DNA
- Tapar la celda con su tapón y colocar en el espectrofotómetro.
- Presionar la tecla DNA y anotar la concentración de DNA obtenida (ng/ $\mu$ L). También, anotar la relación de absorbancia de 260/280; esta relación es la pureza de la solución de DNA y puede estar entre 1.400 a 1.900, o más.
- Sacar la celda y lavarla tres veces con agua inyectable.
- Al terminar de usar el espectro, presionar la tecla “stop” y luego apagarlo.

#### 9.3.2 Ajuste de la concentración de DNA que se utilizará en la mezcla maestra (master mix).

Para ello, siempre es necesario ajustar la concentración de DNA a 100 ng/ $\mu$ L utilizando la fórmula  $C1V1 = C2V2$ , donde:

C1 = concentración obtenida en el espectrofotómetro (ng/ $\mu$ L).



$V_1 = ?$ , es el volumen que tomará de esta solución patrón para llevarla a la concentración de 100 ng/ $\mu$ L

$C_2$  = Concentración a la cual quiero trabajar mi DNA en las placas SSP UniTray, y siempre será 100 ng/ $\mu$ L

$V_2$  = Volumen final de solución de DNA en agua en el que deben encontrarse los 100 ng/ $\mu$ L de DNA, y para la técnica ABDRDQ SSP UniTray, siempre será de 80  $\mu$ L (o hasta 100  $\mu$ L).

Ejemplo: la concentración obtenida en el espectro fue de 276 ng/ $\mu$ L de DNA patrón, calcular el  $V_1$ :

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = C_2V_2 / C_1$$

$$V_1 = (100 \text{ ng}/\mu\text{L}) (80 \mu\text{L}) / 276 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$V_1 = 8000 / 276$$

$$V_1 = 28.98 \mu\text{L de DNA patrón. Podemos redondear esta cantidad a } 29 \mu\text{L.}$$

\*La mezcla maestra está compuesta por 580  $\mu$ L de amortiguador PCR (color lila) + 9.3  $\mu$ L de Taq polimerasa + (348  $\mu$ L agua –  $V_1$ )\*

Los 348  $\mu$ L de agua es una constante; sin embargo, es necesario saber que al restar la cantidad calculada de  $V_1$ , no serán 348  $\mu$ L (para el caso del ejemplo anterior se pondrán 319  $\mu$ L de agua: 348 – 29 = 319).

NOTA: Para el caso del fragmento, se adicionan solo 180  $\mu$ L de agua al *buffer* PCR ( en lugar de 348  $\mu$ L ), y todo el volumen de solución de DNA ( que serán 70  $\mu$ L ). Además no se hará la determinación de la concentración en el espectrofotómetro.

### **AGITAR LA MEZCLA MAESTRA CON VORTEX**

**MUY IMPORTANTE:** En ésta parte de pre-amplificación se debe trabajar en una mesa o área independiente a la de aislamiento de DNA, siendo otra opción una campana de bioseguridad.

El control negativo está formado únicamente por amortiguador PCR, Taq polimerasa y agua. Cuando se tiene esta mezcla, se colocan 8  $\mu$ L en el pozo 96. Posteriormente se adiciona el DNA calculado ( $V_1$ ) a este control negativo y se mezcla en vórtex. Una vez hecha esta mezcla, se van colocando 8  $\mu$ L en cada uno de los 95 pozos restantes de la placa para PCR. Esta placa se debe sacar del congelador (- 30° C o menos) justo en el momento en que se vaya a utilizar, de igual manera que la Taq polimerasa; en tal contexto, es importante mencionar que no se debe permitir que el aceite mineral se descongele antes de cortar o retirar el sello, ya que se puede dispersar la mezcla. Además, la Taq polimerasa debe mantenerse en frío (sobre un gel refrigerante o hielo picado, o bien adicionarla rápidamente manteniéndola dentro de su caja de unicel) una vez descongelada. Al adicionar los 8  $\mu$ L en cada pozo, asegurar que el aceite esté descongelado y verificar finalmente que los 96 pozos contengan solución (color lila), y si alguna gota quedara en las paredes del pozo, dar un golpe muy suave para que resbale. Cuando se han adicionado los 8  $\mu$ L de mezcla maestra en los pozos, la placa se cubre con una mica de plástico nueva. “Las secciones anteriores deben realizarse de manera eficiente para reducir al mínimo el tiempo entre la





*adición de la muestra y el inicio del termociclado ya que la incubación prolongada a temperatura ambiente (mayor a 5 minutos) puede provocar reacciones PCR mal hibridadas e inespecíficas”.*

Los datos calculados y obtenidos de la concentración de DNA y volumen de agua, así como la etiqueta de plástico autoadherible de cada placa, se ponen en el formato de “Registro de Cálculos de Concentración de DNA”, Los resultados obtenidos de fragmento, se colocan en la carpeta de Control de Calidad del área de HLA.

### 9.3.3 Operación del termociclador

- Encender el termociclador (parte posterior).
- En la opción programas, dar un enter con la tecla
- Buscar el programa HLA SSP con la flechas
- Presionar enter
- Aquí va aparecer “run program”, dar un enter
- En este momento comenzará el precalentamiento.
- Cuando haya terminado este proceso, el termociclador lo indicará con un sonido.
- Colocar la placa SSP UniTray. Cerrar el termociclador hasta el primer ajuste, no forzar la tapa.
- Presionar la tecla \*continúe\* y enter

Tecla de stop (sirve para salir del programa una vez terminado)

El tiempo total de la amplificación del DNA en el termociclador es de 1 hora y 25 minutos aproximadamente.  
NOTA: Después del termociclado, realizar la electroforesis en gel; si no va a realizarla de inmediato, guardar la placa a -30° C durante un máximo de una semana a un mes.

## 9.4 ELECTROFORESIS Y ANALISIS DEL DNA AMPLIFICADO

Durante el proceso de amplificación, se puede preparar el buffer y gel de agarosa para la electroforesis.

### 9.4.1 Preparación del Buffer TBE X10 para el gel y la cámara de electroforesis. **NOTA: el buffer se preparará al 0.5X**

- En una probeta de 1 litro, poner agua destilada (950 mL) hasta la marca, adicionar 50 mL de buffer TBE (tiene que estar diluido 20 veces aunque diga 10X; es decir, al 0.5X).
- Tapar con papel parafilm.
- Agitar hasta homogeneizar.
- Si el buffer tiene cristales, calentar a 37° C con agitación; filtrar. Si no se disuelven los cristales, desechar el *buffer*.
- También se puede preparar el *buffer* en presentación en polvo (pero siempre debe quedar en concentración 0.5X )

### 9.4.2 Preparación de la agarosa al 2 %

- En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, colocar 4.0g de agarosa (poner el matraz en balanza y tarar a 0.00; luego, adicionar la agarosa con una espátula).
- Adicionar 160 mL de buffer 1:20 recién preparado (0.5 X).
- Agitar suavemente. Se recomienda poner tapón de gasa.
- Meter el matraz en el horno de microondas y seleccionar de 2 a 2.5 minutos.
- Agitar suavemente (CUIDADO, ESTÁ MUY CALIENTE, USAR GUANTES ESPECIALES O UNA GASA QUE CUBRA EL CUELLO DEL MATRAZ).



- Repetir con otros 30 segundos.
- Luego por 20 segundos más; o bien por lapsos de 15 y 10 segundos, agitar (verificar que hierva por 5 a 10 segundos).
- Cuando esté aproximadamente a 60° C (se puede usar termómetro), adicionar 6.4  $\mu$ L de bromuro de etidio (PRECAUCIÓN, USAR GUANTES YA QUE ESTA SUSTANCIA ES CANCERÍGENA) y agitar hasta homogeneizar.
- Cuando la agarosa esté a aproximadamente a 55°C, verterla en la cámara (inciso siguiente).

#### 9.4.3 Preparación de la cámara de electroforesis (antes de que solidifique la agarosa)

- Colocar las gomas en el porta peines de la cámara.
- Colocar el porta peines en el soporte de la cámara.
- Nivelar la cámara hasta que la burbuja esté en el centro del nivelador.
- Colocar los peines en una misma dirección y separación.
- Adicionar la agarosa aún líquida y distribuirla uniformemente (a 55° C).
- Dejar que solidifique (30 minutos aprox.) y retirar los peines con mucho cuidado para no romper el gel.
- Retirar el porta peines junto con el gel del soporte de la cámara; retirar gomas.
- Colocar el porta peines junto con el gel en la cámara de electroforesis.
- Adicionar buffer TBE al 0.5X hasta rebasar 1 cm la marca de nivel.

Una vez que ha quedado armada la cámara de electroforesis y ha concluido la amplificación del DNA (el termociclador emite un *beep* cuando termina), adicionar la muestra de placa en los pozos del gel de agarosa de la siguiente manera:

- Antes de retirar la placa de amplificación del termociclador, dejar que se enfríe a 4° C durante 5 minutos dentro del mismo; de esta manera, el aceite se solidifica y facilita el retiro de la mica autoadherible sin que haya dispersión de muestra.
- Retirar la mica autoadherible de la placa con mucho cuidado (usar un soporte para placas) procurando no poner los dedos sobre la placa; dejar que el aceite se licúe a temperatura ambiente.
- Con una micropipeta multicanal y ajustada a 8  $\mu$ L, tomar toda la columna 1 de la placa (de manera vertical) y depositar en los primeros 8 pozos del gel de manera horizontal. Asegurarse de mantener las puntas en la base del pocillo de la placa mientras se desliza lentamente la muestra; con una toalla de papel, secar el aceite remanente en las puntas. Cargar suavemente las puntas en el gel.
- Repetir pero ahora tomar la columna 2 y depositar en los siguientes 8 pozos del gel dejando un pozo vacío entre la primera y segunda descarga.
- Tomar columna 3 y descargar en los siguientes pozos del gel; en este caso, ya no se deja un pozo vacío). De esta manera queda completa la primera fila del gel de manera horizontal.
- Repetir exactamente, pero ahora con las columnas 4, 5 y 6 dejando un pozo en el gel entre 4 y 5.
- Hacer lo mismo con las columnas 7, 8 y 9; y también con 10, 11 y 12.
- En los pozos vacíos (columna 9), colocar 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular (es de color verde) concentrado, o bien diluido 1 + 1 con agua inyectable (se prepara adicionando 10  $\mu$ L de agua + 10  $\mu$ L de marcador en un eppendorf; agitar en vortex).
- Conectar la cámara a la fuente y dejar correr por 20 minutos a 150 v, o hasta que el frente del colorante del marcador de PM alcance un poco antes la siguiente fila.



#### 9.4.4 Visualización en el transiluminador UV

Usar guantes, ya que el gel de agarosa contiene bromuro de etidio.

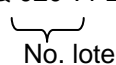
- Desconectar la cámara de electroforesis y retirar la tapa de la cámara.
- Retirar el soporte del gel junto con el gel de la cámara.
- Con gasas ir secando lo que escurre.
- Llevar el soporte al transiluminador y empujar el gel para que resbale sobre el cristal del transiluminador
- Colocar sobre el gel el panel fluorescente; el número queda encima del pozo.

#### 9.4.5 Obtención de fotografía del gel

- Prender la cámara fotográfica.
- Prender el transiluminador UV y cerrar la puerta del mismo.
- En la computadora, abrir el programa "KODAK"
- Seleccionar "Capture DC 290"
- Seleccionar "Take Picture"
- Con "Image Display" se ajusta la saturación.
- Guardar en File con el No. de la muestra.
- Abrir un documento nuevo en Word.
- Seleccionar y copiar cualquier archivo de Word de alguna unidad procesada.
- Pegar en el documento nuevo de Word.
- Cambiar los datos de este nuevo documento, por los de la nueva unidad.
- Para copiar la nueva fotografía (recién tomada), usar el ícono punteado
- Seleccionar la foto con este icono, seleccionar "edit", y luego "copy" (o con el *click* derecho del *mouse*)
- Pegar en el nuevo documento de Word esta nueva fotografía.

#### 9.4.6 Análisis en el programa Unimatch Plus

- Abrir el programa Unimatch Plus
- Seleccionar el No. de Lote (ejemplo: ABDRDQ 020 v1 20040116)  


- Seleccionar "Analyze a Reaction Pattern"
- Poner el número de la muestra y llenar los campos en rojo.
- Seleccionar "Lanes" y aparece una pantalla gráfica donde seleccionamos con el puntero cada línea que haya sido positiva en nuestro gel (de verde cambia a rojo una vez seleccionada) Podemos deseleccionar alguna presionando sobre ella nuevamente con el puntero.
- Seleccionar "Perfect Match" **(aquí es importante analizar y corroborar con la hoja de reporte del Kit que los alelos sean iguales).**
- Después del "Perfect Match", aparecen los alelos correspondientes, según el kit, para el paciente.

La tabla muestra "en columnas"

ALELO 1	EQUIVALENTE SEROLÓGICO 1	ALELO 2	EQUIVALENTE SEROLÓGICO 2
---------	-----------------------------	---------	-----------------------------



Esperamos encontrar al menos 1 alelo para cada *locus* analizado. Por ejemplo, si la placa es ABDRDQ debemos tener 2 alelos A, 2 B, 2 DR y 2 DQ. Si no aparecen todos, presionar "single match" y el software analiza las opciones para asignar alelos que no se encontraron, con base en las bandas identificadas y sugiriendo qué bandas faltan o sobran para encontrar los alelos faltantes. Este nuevo análisis mostrará un signo (+) o (-) en la primera columna, los cuales significan:

(+) es una banda posiblemente falsa negativa (ausente); si esta banda está en el gel, ocurrirá la asignación alélica que se muestra.

(-) es una banda posiblemente falsa positiva (presente); si esta banda está en el gel, ocurrirá la asignación alélica que se muestra.

En ambos casos debe revisarse nuevamente el gel para comprobar que la banda esté o no realmente. Aunque aparezca una banda en el gel, esta solo será real si su peso molecular coincide con el descrito en la hoja de reporte.

- Imprimir 2 veces
- Cerrar programas.
- Las hojas impresas, la hoja de reporte del kit analizada y el reporte de la unidad, se archivan junto con el expediente de la unidad.
- Una de las copias se queda en la subdirección de investigación; otra en el expediente de la unidad donde, además, se capturan resultados en la computadora y bitácora. La otra copia queda en el laboratorio de histocompatibilidad.