



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

Título

Análisis de la Diversidad Genómica en Población Mexicana Mediante la Tipificación Molecular del HLA en Unidades de Sangre de Cordón Umbilical.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

P R E S E N T A

RANGEL SÁNCHEZ JOCELYN MONTSERRAT.

ASESORA:

DRA. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. LUZ E. ALCÁNTARA QUINTANA.

COASESORA:

DRA. EN CIENCIAS. NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES.

Cuatitlán, Izcalli, Edo. de Mex. 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

***EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
HISTOCOMPATIBILIDAD DEL CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA.***

AGRADECIMIENTOS.

Todo final tiene un inicio...

Es por ello que mi agradecimiento por ser partícipe de este final, inicia con la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de sus aulas durante los años en que me forme como profesionista y como ser humano, desde el Colegio de Ciencias y Humanidades hasta mi egreso de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Al profesor Ladislao Palomares, por depositar su confianza en mí y ser parte del inicio de esta tesis.

Al CNTS, por darme la oportunidad de escribir mi final en sus instalaciones y por permitirme conocer a una gran mujer y ejemplo a seguir; que me ha guiado hasta este punto y sobre todo por ser mi asesora, a la Doctora Luz Eugenia Alcántara Quintana por acogerme en su laboratorio y enseñarme cada detalle de este maravilloso mundo de la genética molecular, por su tiempo y dedicación a mi formación profesional.

A la Doctora Nayeli Rodríguez por su amistad con mi asesora lo que me permitió conocer su calidez como ser humano, y el apoyo brindado a mi gran aventura para poder terminar este trabajo.

A todos mis compañeros de facultad que caminaron conmigo, por compartir su tiempo y su vida, por su apoyo incondicional, por los desvelos y los sueños.

Serch, Jhony y Zole gracias por ser mis emisarios, ayudándome en esta travesía y su amistad incondicional.

A mí amada familia por entender mis idas y vueltas, y estar siempre a mi lado.

Adair, tu que eres el centro de mi mundo; por comprender mis ausencias y las noches a mi lado apoyando mis desvelos; por tu amor incondicional y ser mi luz; grazie amore mio.

Edgar, mi compañero de vida, gracias por entenderme cuando yo no lo hago, por tu irritante forma de alentarme a seguir mejorando, grazie amore mio tutto ciò che viene nel tempo.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	10
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 Complejo Principal de Histocompatibilidad	13
1.1.2 Estructura genética de la región HLA	14
1.1.3 Características principales del MHC	17
1.2 Moléculas del MHC	19
1.2.1 Estructura molecular HLA Clase I	19
1.2.2 Estructura molecular HLA Clase II	21
1.2.3 Distribución tisular de las moléculas clase I y II	22
1.3 Función biológica del HLA	23
1.3.1 Papel biológico del HLA Clase I	24
1.3.2 Papel biológico del HLA Clase II	25
1.4 Nomenclatura	25
1.5 HLA y su asociación a enfermedades	27
1.6 Aplicaciones del sistema HLA	28
1.6.1 Antropológicas	28
1.6.2 Legales	31
1.6.3 Clínicas	31
1.7 HLA en los trasplantes de Pcs en México	33
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
3 OBJETIVOS	37

4 MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1 Selección de la muestra	40
4.2 Métodos	41
4.2.1 Obtención de ADN por columnas	43
4.2.2 Tipificación génica del HLA	45
4.3. Tipificación HLA mediante SSP	46
4.3.1 Material necesario	47
4.3.2 Protocolo de tipificación HLA DNA Micro SSP™	47
4.3.3 Evaluación de las placas de gel	49
4.3.4 Tipificación de los resultados del protocolo SSP	50
4.4 Protocolo de tipificación HLA (Clase I y II) mediante SSO	52
4.4.1 Material necesario	53
4.4.2 Configuración previa	54
4.4.3 PCR	55
4.4.4 Desnaturalización / Neutralización	56
4.4.5 Hibridación	57
4.4.6 Marcaje	57
4.4.7 Tipificación de resultados del protocolo SSO	59
5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
6 RESULTADOS	62
7 ANÁLISIS DE RESULTADOS	83
8 CONCLUSIONES	94
9 REFERENCIAS CONSULTADAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Inmunólogo francés Jean Dousset.	13
Figura 2. Localización del Sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6.	14
Figura 3. Mapa extendido del Complejo Principal de Histocompatibilidad.	16
Figura 4. Forma en la que se heredan los haplotipos de padres a hijos.	18
Figura 5. Esquema de las moléculas de clase I.	19
Figura 6. Representación de la molécula HLA clase II.	21
Figura 7. Vía del MHC clase I para la presentación de antígeno.	24
Figura 8. Vía de presentación del antígeno clase II.	25
Figura 9. Esquematización de los diferentes haplotipos mostrados en las poblaciones Humanas.	29
Figura 10. Representación geográfica de las donaciones de sangre placentaria.	41
Figura 11. Esquematización General del Protocolo de Trabajo.	42
Figura 12. Imagen del mini kit para extracción de ADN por columna de QIAGEN®.	43
Figura 13. Protocolo de obtención de ADN mediante columnas QIAamp® DNA Blood Mini Kit.	44
Figura 14 Imagen del kit DNA Micro SSP™.	46
Figura 15. Confirmación de las bandas positivas.	49
Figura 16. Tipificación de los Resultados.	50
Figura 17. Esquematización del protocolo DNA Micro SSP™.	51
Figura 18. Equipo con tecnología Luminex® y kit LABType®SSO.	52
Figura 19. Pantalla principal del equipo Luminex® 100.	54
Figura 20. Iconos de inicio y su orden de ejecución en el sistema Luminex®.	55
Figura 21. Imagen de arranque de las pruebas en el sistema Luminex®.	58
Figura 22. Pantalla de inicio del Software HLA Fusion 2.0.	59
Figura 23. Imagen de la pantalla para importar las corridas del Luminex®.	60
Figura 24. Pantalla de análisis para muestra en el programa HLA Fusion 2.0.	61

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Distribución nacional de las USCU.	63
Gráfico 2. Distribución alélica HLA-A.	64
Gráfico 3. Distribución alélica HLA-B.	65
Gráfico 4. Distribución alélica HLA-DRB-1.	66
Gráfico 5. Distribución alélica HLA-DQB1.	67
Gráfico 6. Distribución USCU Zona Norte.	68
Gráfico 7. Frecuencias HLA-A Zona Norte.	69
Gráfico 8. Distribución HLA-B Zona Norte.	70
Gráfico 9. Distribución HLA-DRB1 Zona Norte.	71
Gráfico 10. Distribución HLA-DQB1 Zona Norte.	72
Gráfico 11. Distribución de las USCU en la zona Centro de México.	73
Gráfico 12. Distribución en la zona centro de HLA-A.	74
Gráfico 13. Distribución HLA-B zona centro.	75
Gráfico 14. Distribución HLA-DRB1 zona centro.	76
Gráfico 15. Distribución HLA-DQB1 zona centro.	77
Gráfico 16. Distribución USCU en la zona sur.	78
Gráfico 17. Distribución HLA-A zona sur.	79
Gráfico 18. Distribución HLA-B zona sur.	80
Gráfico 19. Distribución HLA-DRB1 zona sur.	81
Gráfico 20. Distribución HLA-DQB1 zona sur.	82

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Nombres de los genes de la región HLA.	15
Tabla 2. Características de las moléculas HLA clásicas clase I y II.	22
Tabla 3. Características del reconocimiento de Antígenos por linfocitos T.	24
Tabla 4. Nomenclatura de los alelos HLA.	27
Tabla 5. Números de Alelos HLA descritos y validados durante 1987-Marzo 2013.	27
Tabla 6. Algunas enfermedades asociadas al HLA.	28
Tabla 7. Haplotipos HLA más frecuentes encontrados en la población mexicana.	30
Tabla 8. Instituciones mexicanas que llevan a cabo el TCPH.	34
Tabla 9. Preparación de la mezcla Master Mix.	55
Tabla 10. Ciclos para la PCR.	56
Tabla 11. Dilución de las perlas de hibridación.	57
Tabla 12. Preparación de la solución de trabajo SAPE.	57
Tabla 13. Distribución nacional de las USCU.	63
Tabla 14. Frecuencias de los alelos HLA-A.	64
Tabla 15. Frecuencias de los alelos HLA-B.	65
Tabla 16. Frecuencias de los alelos HLA-DRB1.	66
Tabla 17. Frecuencias de los alelos HLA-DQB1.	67
Tabla 18. Distribución nacional de las USCU en la zona Norte de México.	68
Tabla 19. Frecuencias de los alelos HLA-A en la zona norte de México.	69
Tabla 20. Frecuencias de los alelos HLA-B en la zona norte de México.	70
Tabla 21. Frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en la zona norte de México.	71
Tabla 22. Frecuencias de los alelos HLA-DQB1 en la zona norte de México.	72
Tabla 23. Distribución de las USCU en la zona centro de México.	73
Tabla 24. Frecuencias de los alelos HLA-A en la zona centro de México.	74
Tabla 25. Frecuencias de los alelos HLA-B en la zona centro de México.	75
Tabla 26. Frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en la zona centro de México.	76

Tabla 27. Frecuencias de los alelos HLA-DQB1 en la zona centro de México.	77
Tabla 28. Distribución de las USCU en la zona sur de México.	78
Tabla 29. Frecuencias de los alelos HLA-A en la zona sur de México.	79
Tabla 30. Frecuencias de los alelos HLA-B en la zona sur de México.	80
Tabla 31. Frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en la zona sur de México.	81
Tabla 32. Frecuencias de los alelos HLA-DQB1 en la zona sur de México.	82

ABREVIATURAS.

Å: Armstrong.

α: Alfa.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

aa: Aminoácidos.

β: Beta.

β_{2m}: beta₂-microglobulina.

BSCU: Banco de Sangre de Cordón Umbilical.

CPA: - Células presentadoras de antígeno.

CTLs: Linfocitos T citotóxicos.

CNTS: Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

CU: Cordón Umbilical.

DC: Células Dendríticas.

DMID: Diabetes Mellitus Insulinodependiente.

EA: Espondilitis Anquilopoyética.

EC: Enfermedad Celíaca.

EICH: Enfermedad Injerto Contra Huésped.

HLA: (Human Leukocyte Antigen) - Antígenos de los leucocitos humanos.

Ig: Inmunoglobulina.

MHC: (Major Histocompatibility Complex) - Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

μL: micro litro.

Mb. Mega Bases.

MO: Médula Ósea.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

pb: (Pair bases) - Pares de bases.

PCR: (Polymerase Chain Reaction) - Reacción en cadena de la polimerasa.

PCR-SSO: (PCR Sequence Specific Oligonucleotide) - PCR con sondas específicas de oligonucleótidos.

PCR-SSP: (PCR Sequence Specific Primers) - PCR con cebadores específicos de secuencia.

Pcs: Progenitor Stem Cells (Células Progenitoras Hematopoyéticas).

SCU: sangre del cordón umbilical.

SP Sangre periférica.

Tc: Linfocitos T citotóxicos.

Th: Linfocitos T helper.

TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

TCR: (T-cell receptor) - Receptor de células T.

TMO: Trasplante de Médula Osea.

xMHC (Extended MHC): MHC extendido.

V: Volt

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Complejo Principal de Histocompatibilidad.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex) se encuentra constituido por un grupo de genes cuya función principal radica en la presentación de antígenos asociados a células y posteriormente son reconocidos por los linfocitos T, mediando en la respuesta inmunológica adaptativa. Este conjunto de genes se encuentra en todos los vertebrados ⁽¹⁾, denominándose Antígenos Leucocitarios Humanos (Human Leukocyte Antigen, HLA) en el humano y siendo una de sus principales características su alto polimorfismo.

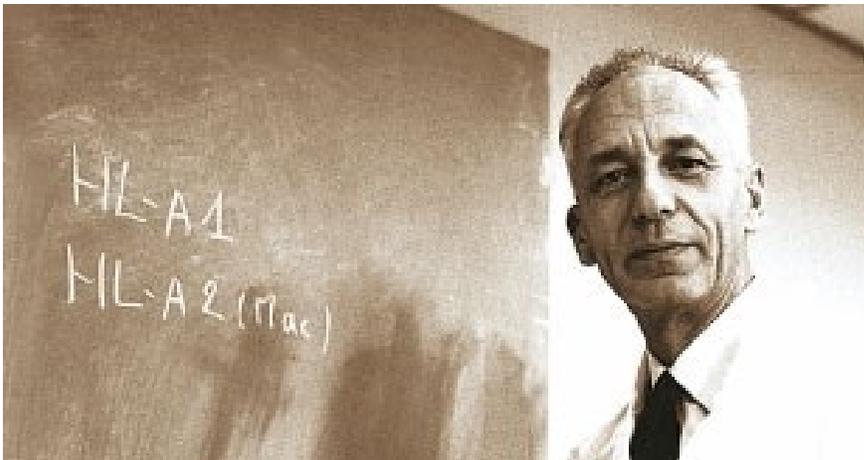


Figura 1. Inmunólogo francés Jean Dausset. Descubridor del sistema HLA en humanos. Modificada de [European Federation for Immunogenetics, 2013](#).

En la década de 1940 George Snell y colaboradores realizaron estudios para analizar el rechazo a implantes entre ratones de distintas cepas y ratones de la misma cepa, posteriormente Jean Dausset (Figura 1) Jan Van Rood y colaboradores demostraron que los pacientes que rechazaron los trasplantes de riñón presentaron elevadas concentraciones de anticuerpos en el suero dirigidos hacia los leucocitos del donante. A este suero que reacciona en contra de células de individuos alogénicos (expresión de alelos diferentes) se le conoce como aloantisuero, y se dice que contiene aloanticuerpos que están dirigidos contra los aloantígenos. Se supuso que, al igual que en los ratones estos eran genes polimórficos que variaban de un individuo a otro ⁽¹⁾.

INTRODUCCIÓN.

Estos anticuerpos también se encontraron en mujeres multíparas, debido a que habían desarrollado inmunidad contra los antígenos leucocitarios paternos presentes en el feto ⁽²⁾, se comprobó que estos Antígenos (Ags) representaban el Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano. Así se estudiaron a familias completas en busca de armar el mapa del loci del HLA.

1.1.2 Estructura genética de la región HLA.

Los genes de histocompatibilidad humanos se encuentran localizados en la parte distal del brazo p en el cromosoma 6 en la banda 21.3 (6p21.3). Con aproximadamente más de 224 genes, pseudogenes y fragmentos génicos siendo un total de 4 Mb; que representan un 2.5% de la longitud total del cromosoma.

Las regiones (figura 2) en las que se encuentran divididos los genes HLA son 3, clase II (centrómerica, exón 2); Clase I (Telómerica, exones 2 y 3) y Clase III (Telómerica).

El primer mapa se completó en 1993, y se conoce como “Mapa Clásico”, con el avance de las tecnologías moleculares en 1997 se realizó la secuenciación del cromosoma 6 mostrando la existencia de nuevos genes y generando la ampliación del mapa clásico, ampliando las dimensiones de la región HLA hasta 7.6 Mb, esta modificación al anterior mapeo se conoce como: MHC Extendido (figura 3).

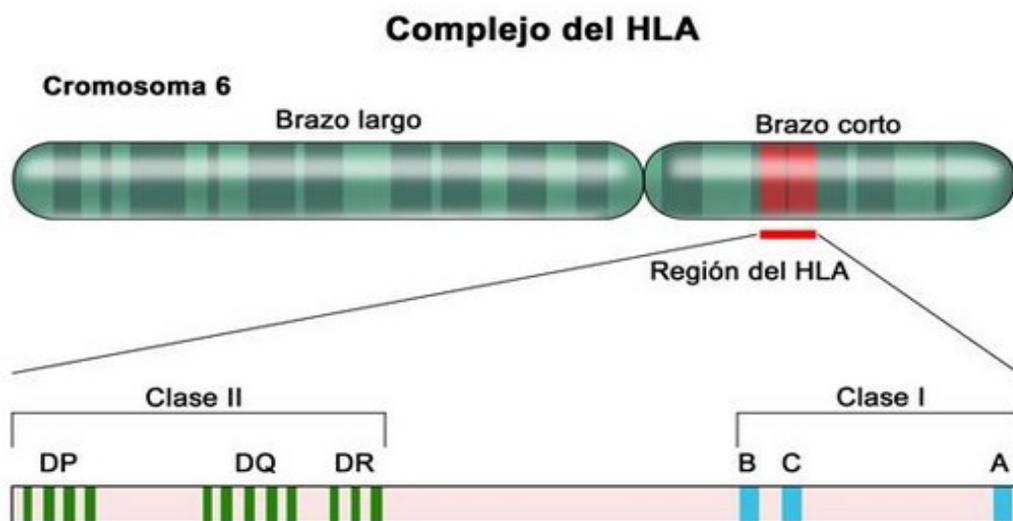


Figura 2. Localización del Sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6. Winslow Terese 2012.

Tabla 1. Nombres de los genes de la región HLA. IMGT⁽³⁾.

Nombre	Equivalentes	Características moleculares
HLA-A	—	Class I α -chain
HLA-B	—	Class I α -chain
HLA-C	—	Class I α -chain
HLA-E	E, '6.2'	Associated with class I 6.2-kB Hind III fragment
HLA-F	F, '5.4'	Associated with class I 5.4-kB Hind III fragment
HLA-G	G, '6.0'	Associated with class I 6.0-kB Hind III fragment
HLA-H	H, AR, '12.4', HLA-54	Class I pseudogene associated with 5.4-kB Hind III fragment
HLA-J	cd12, HLA-59	Class I pseudogene associated with 5.9-kB Hind III fragment
HLA-K	HLA-70	Class I pseudogene associated with 7.0-kB Hind III fragment
HLA-L	HLA-92	Class I pseudogene associated with 9.2-kB Hind III fragment
HLA-N	HLA-30	Class I gene fragment associated with a 1.7kb Hind III fragment
HLA-P	HLA-90	Class I gene fragment associated with 9.0-kB Hind III fragment
HLA-S	HLA-17	Class I gene fragment associated with a 3.0kb Hind III fragment
HLA-T	HLA-16	Class I gene fragment associated with 16.0-kB Hind III fragment
HLA-U	HLA-21	Class I gene fragment associated with 2.1-kB Hind III fragment
HLA-V	HLA-75	Class I gene fragment associated with 7.5-kB Hind III fragment
HLA-W	HLA-80	Class I gene fragment associated with 8.0-kB Hind III fragment
HLA-X	HLA-X	Class I gene fragment
HLA-Y	HLA-BEL/COQ/DEL	Class I gene fragment
HLA-Z	HLA-Z1	Class I gene fragment located within the HLA Class II region
HLA-DRA	DR α	DR α chain
HLA-DRB1	DR β 1, DR1B	DR β 1 chain determining specificities DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 etc
HLA-DRB2	DR β 11	Pseudogene with DR β -like sequences
HLA-DRB3	DR β 11, DR3B	DR β 3 chain determining DR52 and Dw24, Dw25, Dw26 specificities
HLA-DRB4	DR β 1V, DR4B	DR β 4 chain determining DR53
HLA-DRB5	DR β 11	DR β 5 chain determining DR51
HLA-DRB6	DRBX, DRB ϵ	DRB pseudogene found on DR1, DR2 and DR10 haplotypes
HLA-DRB7	DRB γ 1	DRB pseudogene found on DR4, DR7 and DR9 haplotypes
HLA-DRB8	DRB γ 2	DRB pseudogene found on DR4, DR7 and DR9 haplotypes
HLA-DRB9	M4.2 β exon	DRB pseudogene, isolated fragment
HLA-DQA1	DQ α 1, DQ1A	DQ α chain
HLA-DQB1	DQ β 1, DQ1B	DQ β chain
HLA-DQA2	DX α , DQ2A	DQ α -chain-related sequence, not known to be expressed
HLA-DQB2	DX β , DQ2B	DQ β -chain-related sequence, not known to be expressed
HLA-DQB3	DV β , DQB3	DQ β -chain-related sequence, not known to be expressed
HLA-DOA	DNA, DZ α , DO α	DO α chain
HLA-DOB	DO β	DO β chain
HLA-DMA	RING6	DM α chain
HLA-DMB	RING7	DM β chain
HLA-DPA1	DP α 1, DP1A	DP α chain
HLA-DPB1	DP β 1, DP1B	DP β chain
HLA-DPA2	DP α 2, DP2A	DP α -chain-related pseudogene
HLA-DPA3	DPA3	DP α -chain-related pseudogene
HLA-DPB2	DP β 2, DP2B	DP β -chain-related pseudogene
TAP1	ABCB2, RING4, Y3, PSF1	ABC (ATP Binding Cassette) transporter
TAP2	ABCB3, RING11, Y1, PSF2	ABC (ATP Binding Cassette) transporter
PSMB9	LMP2, RING12	Proteasome-related sequence
PSMB8	LMP7, RING10	Proteasome-related sequence
MICA	MICA, PERB11.1	Class I chain-related gene
MICB	MICB, PERB11.2	Class I chain-related gene
MICC	MICC, PERB11.3	Class I chain-related pseudogene
MICD	MICD, PERB11.4	Class I chain-related pseudogene
MICE	MICE, PERB11.5	Class I chain-related pseudogene

En base al mapa extendido la región HLA consta de 421 genes, de ellos el 60% expresan proteínas funcionales, el 33% son pseudogenes (expresan proteínas aberrantes o no se expresan) y el 7% se transcriben dando lugar a moléculas de ARN de transferencia (ARNt), que participan en el proceso de traducción del ARN mensajero (ARNm) en el ribosoma. La región de la clase III, contiene 58 genes funcionales (23%) en 0.7 Mb, lo que la convierte en la región de mayor densidad génica de todo el genoma humano (Tabla 1).

INTRODUCCIÓN.

1.1.3 Características principales del MHC.

Desde el descubrimiento del Complejo Principal de Histocompatibilidad en el ser humano, se han realizado diferentes estudios a nivel serológico y molecular con el fin de realizar la secuenciación del gen; en este proceso se descubrió y se confirmó que el sistema HLA presenta las siguientes características principales:

- A. Los dos tipos de genes del MHC clase I y II polimórficos; codifican dos grupos de proteínas diferentes pero homólogas.

Las moléculas de clase I presentan péptidos que son reconocidos por los linfocitos T CD8+, y las moléculas de clase II presentan péptidos a los linfocitos T CD4+.

- B. Es muy polimórfico; existen múltiples alelos para cada locus.

Para algunos locus se han identificado más de 250 alelos por métodos serológicos. La secuenciación molecular ha demostrado que un alelo definido serológicamente consta de múltiples variantes que difieren ligeramente.

Los distintos alelos difieren entre sí en la habilidad para unir y presentar con mayor eficacia diferentes antígenos proteicos; dando como resultado la baja probabilidad de que dos individuos sin ser parientes sean idénticos en el sistema HLA.

Estas variantes en el polimorfismo son revisadas y publicadas periódicamente por el Comité de Nomenclatura, así se aseguran la existencia y validación de los nuevos alelos descubiertos y se mantienen los ya descritos.

- C. Se expresan en forma codominante en cada individuo.

Los haplotipos se expresan en forma codominante y son heredados mediante las leyes de Mendel; las frecuencias y distribuciones varían significativamente en las diferentes poblaciones (grupos étnicos, mestizaje).

Los haplotipos heredados (el conjunto de alelos presente en cada cromosoma se denomina Haplotipo) de cada padre van a determinar el genotipo del hijo. El genotipo del hijo será la suma de un haplotipo materno y de otro paterno (figura 4).

INTRODUCCIÓN.

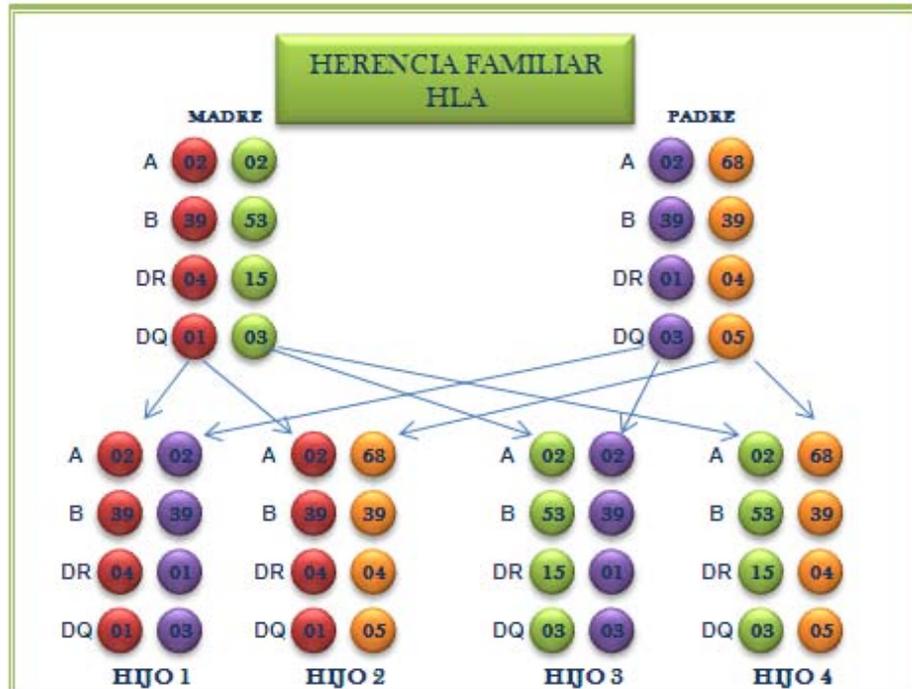


Figura 4. Forma en la que se heredan los haplotipos de padres a hijos.
Rangel Sánchez 2013.

- D. Presenta desequilibrio de ligamiento, es decir, diferentes alelos de distintos genes se encuentran en el mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la teóricamente esperada en una combinación al azar.

Los haplotipos se pueden obtener de familias tipificadas o pueden ser calculados de poblaciones que no estén relacionadas, y que sean representativas con el fin de reducir el error estadístico.

El origen del desequilibrio de ligamiento y la existencia de los haplotipos aún no está determinado específicamente, pero se puede explicar mediante el efecto fundador y la presión selectiva ⁽⁴⁾.

- Efecto Fundador; por el cual una población es modificada genéticamente por el establecimiento de otra población específica, en la misma área geográfica.
- Presión Selectiva; se ha sugerido que las combinaciones de los haplotipos HLA es necesaria para un avance en la respuesta inmunitaria a patógenos endémicos.

Estas propiedades hacen que el MHC sea uno de los sistemas genéticos más complejos en la naturaleza.

INTRODUCCIÓN.

1.2 Moléculas del MHC.

Lograr detallar la estructura de las moléculas del MHC clase I y II, es considerado uno de los mayores logros dentro del campo de la Inmunología moderna, este avance fue gracias a Don Wiley, Jack Strominger y cols ⁽⁵⁾ (Tabla 2). Posteriormente mediante técnicas cristalográficas se determina la estructura tridimensional de las moléculas del HLA y se clasifican en dos grupos: moléculas de clase I y clase II.

Dentro de las primeras se encuentran las moléculas clásicas clase I: HLA-A, HLA-B, HLA-Cw; y las no clásicas HLA-E, HLA-F, HLA-G. Esta clasificación excluye a las proteínas expresadas mediante los genes MIC y HFE.

Las moléculas HLA clase II son HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP.

1.2.1 Estructura molecular HLA clase I.

Estas moléculas están formadas por dos cadenas polipeptídicas mediante unión no covalente. La cadena α (cadena pesada) codificada por el MCH de 44-47 kD y una subunidad denominada β_2 -microglobulina (12 kD) ⁽⁵⁾, nombrada así debido a su movilidad electroforética, su tamaño y solubilidad (figura 5).

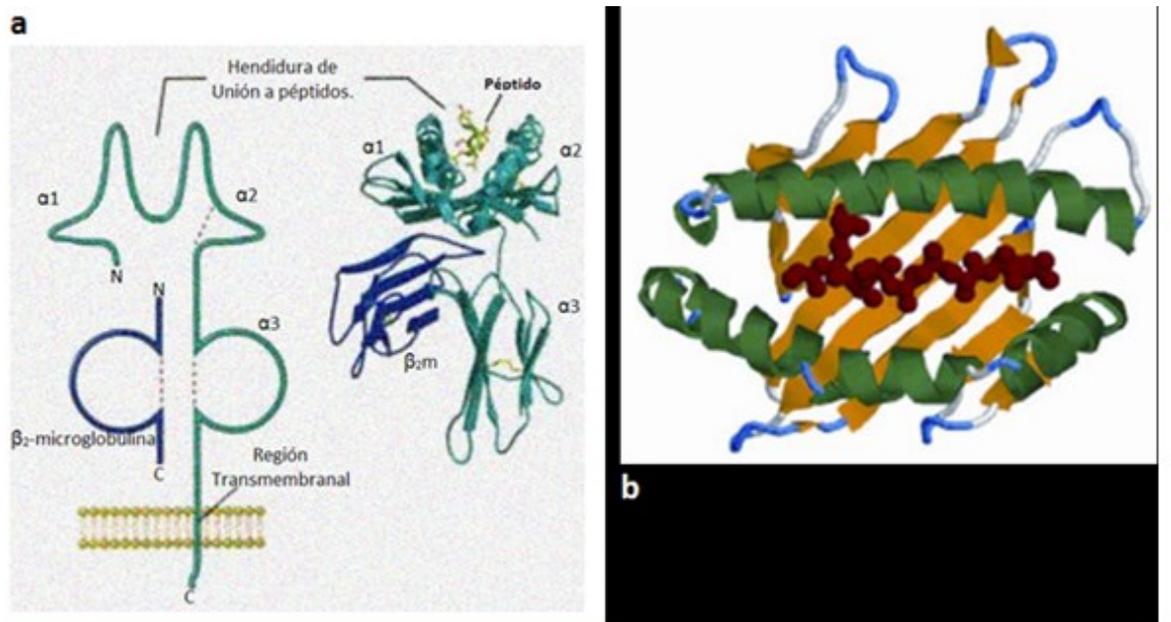


Figura 5. Esquema de las moléculas de clase I.

(a) Vista lateral de las diferentes regiones de la molécula.

(b) Vista superior de la hendidura de unión al péptido (en rojo se representa el péptido unido, en amarillo las láminas β y en verde las hélices α) Abbas. A.K. (2008)

INTRODUCCIÓN.

La molécula consta de una región extracelular de 274 aminoácidos formada por los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$; un segmento transmembrana de unos 25 aminoácidos y una región citoplásmica de alrededor de 30 aminoácidos. β_2m , interacciona con $\alpha 3$, así como con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, contribuyendo decisivamente a la estabilidad de la molécula; posee dos puentes disulfuro. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ generan una cavidad denominada: sitio de unión de péptido ⁽⁵⁾.

Esta hendidura consta de una base formada por 8 láminas β antiparalelas y 2 hélices α sobre ella. Una de estas hélices y cuatro láminas β provienen de $\alpha 1$ y la otra hélice α con las otras cuatro láminas β restantes, de $\alpha 2$. Las dimensiones del sitio de unión (25 Å de longitud x 12 Å de anchura x 10 Å de profundidad) permiten alojar un péptido de entre 8 y 13 aminoácidos en su interior, con los extremos amino y carboxilo anclados mediante puentes de hidrógeno ⁽⁵⁾.

Los residuos situados en la región central del péptido suelen estar orientados hacia el solvente, determinando la interacción con el receptor de células T (TCR).

Los aminoácidos polimórficos que están únicamente en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los que confieren su carácter variable de un individuo a otro y genera en propiedades únicas en la unión del péptido y del TCR a cada molécula del MHC ⁽⁶⁾, el segmento $\alpha 3$ de la cadena se pliega sobre un dominio Ig con una secuencia de aminoácidos altamente conservados en todas las moléculas clase I; dicho segmento contiene un bucle que funge como sitio de unión para CD8.

Cuando la molécula de clase I se encuentra totalmente ensamblada es un heterotrímero que consta de una cadena α , β_2m y un péptido antigénico unido; para que la expresión de estas moléculas en la membrana celular sea estable requiere de la existencia de estos tres componentes ⁽⁵⁾.

Cada uno de nosotros (individuos normales heterocigotos) expresamos 6 moléculas HLA clase I diferentes, esta expresión se denota en cada célula que contienen las cadenas α derivadas de los dos alelos heredados de nuestros padres.

INTRODUCCIÓN.

1.2.2 Estructura molecular HLA clase II.

La región II es la zona centrómerica subdividida del telómero al centrómero en: HLA-DP, -DQ y -DR. Cada subregión se compone a su vez de varios genes.

Las proteínas para las que codifican estos genes están implicadas en fenómenos de restricción del reconocimiento antigénico mediado por linfocitos T cooperadores $CD4^+$. Las moléculas de la clase II del CPH están formadas por una cadena α (33-35 kD) y una cadena β (26-28 kD), mediante una unión no covalente, y difieren de las moléculas de clase I debido a que estas dos cadenas son generadas por genes del CPH (figura 6).

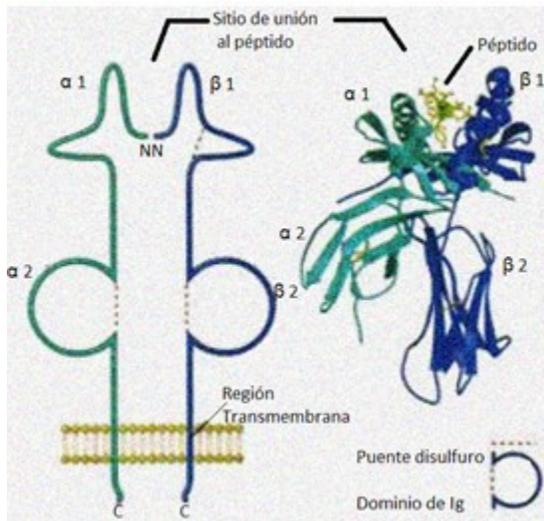


Figura 6. Representación de la molécula HLA de clase II.
Abbas. A.K. (2008)

Cada cadena tiene dos dominios extracelulares ($\alpha 1$ y $\alpha 2$ en la cadena alfa; $\beta 1$ y $\beta 2$ en la cadena beta), un dominio transmembrana y una región citoplásmica.

Los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\beta 1$ contienen los extremos amino terminales (NH^{3+}), mientras que los extremos carboxilo terminales (COO^-) se encuentran en la porción citoplásmica de cada cadena. Nuevamente, los dominios extracelulares más cercanos a la membrana (alfa 2 y beta 2) forman una subestructura similar a la de las inmunoglobulinas ⁽⁵⁾.

Los extremos amino terminales de las cadenas $\alpha 1$ y $\beta 1$ interactúan formando el sitio de unión al péptido, que es similar estructuralmente a los de clase I, de una base formada por 8 láminas β antiparalelas y 2 hélices sobre ella provenientes de $\alpha 1$ y $\beta 1$, y permite la unión a péptidos de 10-30 aa.

En estas moléculas la región más polimórfica está en la cadena β ; de cada progenitor heredamos un gen DPB1 y DPA1, que son los encargados de codificar las cadenas β y α , de una molécula HLA-DP, sucede lo mismo con las moléculas HLA-DR y HLA-DQ; en la molécula DR, hay un gen DRB1 y uno DRB duplicado que es capaz de codificar los alelos 3,4 y 5, de esta manera heredamos entre 6 y 8 alelos HLA de la clase II ⁽⁵⁾.

Tabla 2. Características de las moléculas HLA clásicas clase I y II. Abbas A.K. 2008.

Características	Clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C)	Clase II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP)
Cadenas polipeptídicas	β_2m (12 kD) α (44-47 kD)	β (26-28 kD) α (33-35 kD)
Aminoácidos polimórficos	α 1 y α 2	α 1 y β 1
Punto de unión para TCR	Segmento α 3 se une a CD8 ⁺	Segmento β 2 se une a CD4 ⁺
Tamaño de la hendidura de unión al péptido	Se une a péptidos de 8-13 aa.	Se une a péptidos de 10-30 aa.

1.2.3 Distribución Tisular de las moléculas clase I y II.

Las moléculas de la clase I clásicas están ampliamente distribuidas en todo el organismo mediante la mayoría de las células nucleadas; intervienen directamente como marcadores de lo propio, ante el sistema inmunitario adaptativo activando a los linfocitos T citotóxicos.

Mientras que las moléculas clase II interactúan con los linfocitos T cooperadores y están restringidas fundamentalmente a los macrófagos en sus diferentes células: monocitos, linfocitos B y en NK y linfocitos T, siempre que estas dos células estén activadas y células dendríticas.

La localización tisular de los antígenos HLA clase I, clase II y su función en el sistema inmunológico son factores ligados con el rechazo de un trasplante.

1.3 Función biológica del HLA.

Una persona sana está protegida contra los microorganismos mediante diversos mecanismos inmunológicos, que se engloban en dos tipos de respuestas inmunitarias: la innata y la adquirida (específica).

La innata, engloba a los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), eosinófilos, basófilos, células dendríticas, células NK y la vía del complemento. La adquirida está mediada por los linfocitos B y T.

Ambas respuestas conjuntan un sistema integrado de defensa, en el que numerosas células y moléculas realizan una cooperación. La inmunidad innata, es la encargada de proporcionar una primera línea de defensa contra microorganismos y desempeña un papel fundamental en la inducción de respuestas inmunitarias adquiridas, que a su vez está dividida en la inmunidad humoral, en la que participan los linfocitos B, productores de anticuerpos y la inmunidad celular, en la que participan los linfocitos T citotóxicos (LTc CD8⁺).

Las respuestas humoral y celular poseen características fundamentales: especificidad, diversidad, memoria inmunológica, especialización, auto-limitación y discriminación de lo propio y lo extraño.

La falta de respuesta inmunológica se denomina tolerancia. Las anomalías en inducción o en mantenimiento de la tolerancia, dan como resultado respuestas inmunitarias contra antígenos propios, derivando en las enfermedades autoinmunes.

Cuando un antígeno es expuesto mediante una célula presentadora de antígenos (CPA) unida a una molécula del CPH es reconocida por los linfocitos T. Existen diferencias importantes en el reconocimiento antigénico de las moléculas de clase I y II por parte de las células T. La restricción de clase I o clase II del MHC por parte de los linfocitos T se correlaciona más con la presencia de moléculas correceptoras en la membrana celular (CD4, CD8) que con las características funcionales de las mismas (Tabla 3).

El papel biológico de las moléculas de clase II es poder presentar antígenos exógenos, mientras que las moléculas de clase I presentan a los antígenos endógenos.

INTRODUCCIÓN.

Tabla 3. Características del reconocimiento de Antígenos por linfocitos T.
Abbas A.K. (2008).

Características.	Explicación.
La mayoría de linfocitos T reconoce solamente péptidos.	Únicamente los péptidos se unen a moléculas del MHC.
Los linfocitos T únicamente reconocen Antígenos asociados a células y no solubles.	Las moléculas del MHC son proteínas de membrana y presentan péptidos sobre las superficies celulares unidos establemente.
Los linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ reconocen (de preferencia) Antígenos que se obtienen mediante los compartimientos extracelular y citosólico; respectivamente.	Las vías de ensamblaje de las moléculas MHC garantizan que las moléculas de clase I presenten péptidos de proteínas citosólicas y la presentación de péptidos derivados de proteínas extracelulares y que se captan en las vesículas de las CPA, en las moléculas de clase II. CD4 ⁺ y CD8 ⁺ se unen respectivamente a las regiones no polimorfas de las clases II y I.

1.3.1 Papel biológico del HLA clase I.

En general, las CPA convierten los antígenos proteínicos procesados en el citoplasma en péptidos, dentro de estructuras llamadas proteosomas y realizan el acoplamiento del péptido, esto ocurre en el retículo endoplásmico; una vez formado el complejo MHC-péptido lo muestran en la superficie celular para que estos sean reconocidos por el TCR en los linfocitos T CD8⁺ (figura 7).

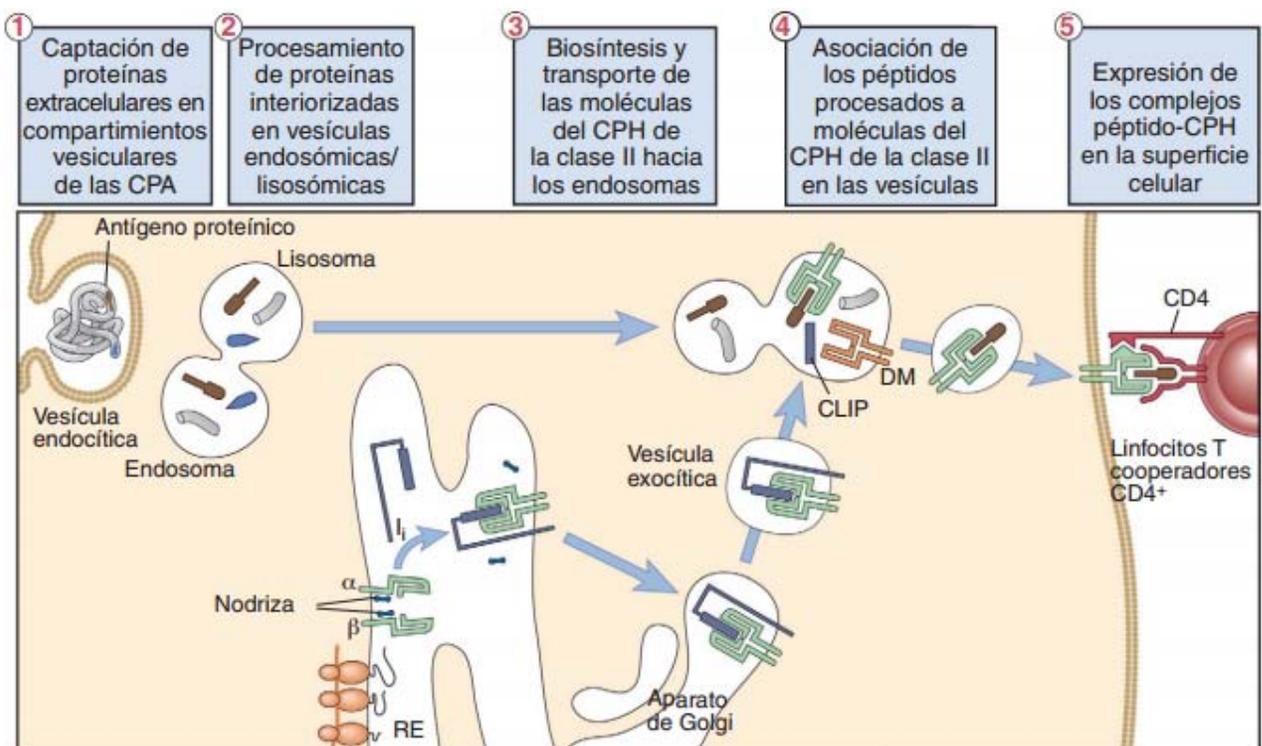


Figura 7. Vía del MHC clase I para la presentación del Antígeno. Abbas A.K. (2008)

INTRODUCCIÓN.

1.3.2 Papel biológico del HLA clase II.

Las moléculas de clase II presentan péptidos de proteínas extracelulares endocitadas por las CPA, procesadas en los lisosomas para obtener el péptido y acoplarlo dentro de dicha vesícula, a la molécula clase II previamente formada en el retículo endoplásmico. El complejo formado es presentado a los linfocitos TCD4⁺ y reconocido por el TCR para desencadenar la respuesta inmune, y lograr diferenciar lo propio de lo extraño (figura 8).

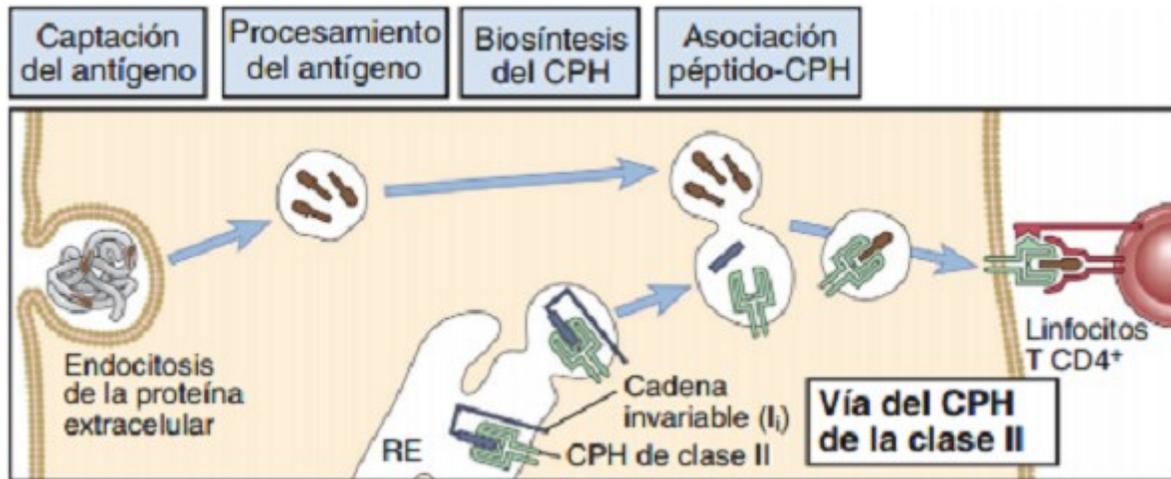


Figura 8. Vía de presentación del Antígeno clase II. Abbas. A.K. (2008)

1.4 Nomenclatura.

Existen dos formas de nomenclatura HLA: la serológica y la molecular. Aunque en términos generales están interrelacionadas se observan diferencias entre ambas; y a partir del 2010 derivado de las necesidades, avances tecnológicos y de unificar estas nomenclaturas se realizó el acuerdo de emitir los resultados en nomenclatura molecular.

- Serológica: establecida en 1975 y modificada en 1984. Basada en las especificidades (epítopes) de los productos de los genes HLA definidos por técnicas inmunológicas serológicas o celulares.

- Molecular: establecida en 1987 y se basa en alelos definidos por secuenciación; el locus HLA (A, B, C, DR, DQ y DP) se separa mediante el símbolo [*] de un número que

INTRODUCCIÓN.

puede tener diferentes dígitos; actualmente se introducen dos puntos (:) entre cada dos dígitos, se añade un cero delante de nomenclaturas con un solo dígito.

La nomenclatura oficial fue establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y en base a esto:

Los alelos de clase I se definen por la letra A, B o C (en función de su locus genético HLA) seguido de una serie de números, y en ocasiones de una letra. Los dos primeros números definen la especificidad serológica (cuando ha sido identificado con un anticuerpo) o en su defecto, definen la familia con la que posee mayor homología de secuencia de DNA.

Los dos números siguientes indican el alelo dentro de esa familia y se asigna por orden cronológico consecutivo.

Existe un quinto dígito para aquellos alelos con cambios en la secuencia primaria de DNA (normalmente en la tercera base de uno o más codones) que no producen cambio en la proteína codificada (por ejemplo, B*39061 y B*39062).

También se han identificado alelos que no se expresan (nulos o en inglés "Null") y que se nombran incluyendo la letra N como último carácter en el nombre del alelo (Tabla 4).

Los alelos de clase II siguen las mismas reglas de nomenclatura genética, los genes de clase II se definen con la letra D, seguida de la inicial de la subregión (P, Q o R) seguidos de A o B para indicar que codifican respectivamente para la cadena α o β .

Seguido de un número que indica la versión del gen, y por último los caracteres alfanuméricos, por ejemplo, DRA1*0101-DRB1*0301. A diferencia de clase I, para clase II no existe una correlación lógica entre la nomenclatura genética y la serológica, puesto que ambos genes, A (α) y B (β), son polimórficos (excepto DRA). Así, el antígeno DQ5 (variante de DQ1) está codificado a nivel genético por los loci DQA1*0102 y DQB1*0602.

La OMS ha decidido asignar solamente nombre oficial a aquellos patrones de reacción serológicos que correlacionen con secuencias de DNA, ya que puede haber patrones de reacción cruzada entre diferentes antígenos por compartir determinados epítopes.

INTRODUCCIÓN.

El estudio con los dos primeros dígitos se denomina baja resolución, debido a que no llegan a discriminar entre alelos, pero indica similitud con los miembros de un grupo ya definido, incluso aunque estos puedan no ser serológicamente similares.

Los estudios de alta resolución (al menos 4 dígitos) sí permiten discriminar entre alelos. En concreto son los dígitos tercero y cuarto los que definen la especificidad alélica.

Tabla 4. Nomenclatura de los alelos HLA.

Nomenclatura	Indica
HLA	Región
HLA-A	Locus
HLA-A*02	Alelo
HLA-A*0201	Alelo específico
HLA-A*0215N	Alelo Nulo

1.5 HLA y su asociación a enfermedades.

Al avanzar en el descubrimiento de nuevos alelos (Tabla 5) y desarrollarse el mapa extendido se observaron ciertas relaciones estadísticas entre los haplotipos HLA y el padecimiento de enfermedades, se define como un factor de riesgo o “RR” (Riesgo Relativo) ⁽⁷⁾.

**Tabla 5. Números de Alelos HLA descritos y validados durante 1987-Marzo 2013.
(Datos de IMGT/HLA) ⁽³⁾.**

Alelos HLA	Datos
Alelos HLA Clase I	7,089
Alelos HLA Clase II	2,065
Alelos Confidenciales	12

Las enfermedades asociadas a la clase II se presentan en mayor incidencia en comparación con aquellas enfermedades asociadas a la clase I, las asociaciones entre el haplotipo y la enfermedad aun no son conocidas del todo, es un área de investigación en desarrollo; las enfermedades del tipo autoinmune son las más estudiadas hasta el día de hoy ya que presentan mayor relación entre determinado

INTRODUCCIÓN.

haplotipo y la expresión y padecimiento de la enfermedad (ya sea por presentarse el alelo o por presentar desequilibrio de ligamiento con el).

En la tabla 6 se enlistan algunos de los genes implicados en el padecimiento de alguna enfermedad ^(6, 7, 8, 9,10).

Tabla 6. Algunas enfermedades asociadas al HLA.

Enfermedad.	Alelo HLA
Artritis Reumatoide	DR4
Artritis Reumatoide Juvenil	DR5/DR8
Dermatitis Herpetiforme	DR3
DMID	DR3,DR4;DQ7/8
Espondilitis Anquilosante	B27
Enfermedad Celiaca	DR3
Enfermedad de Behcet	B5 (B51,52); DR5
Esclerosis múltiple	DR15,DQ6
Hemocromatosis idiopática	A3
Hiperplasia Adrenal Congénita	B47
Lupus Eritematoso Sistémico	DR3,DR2
Narcolepsia	DR15
Uveítis Anterior Aguda	B27
Vitiligo	DR4
Psoriasis	DR7
Síndrome de Goodpasture	DR2

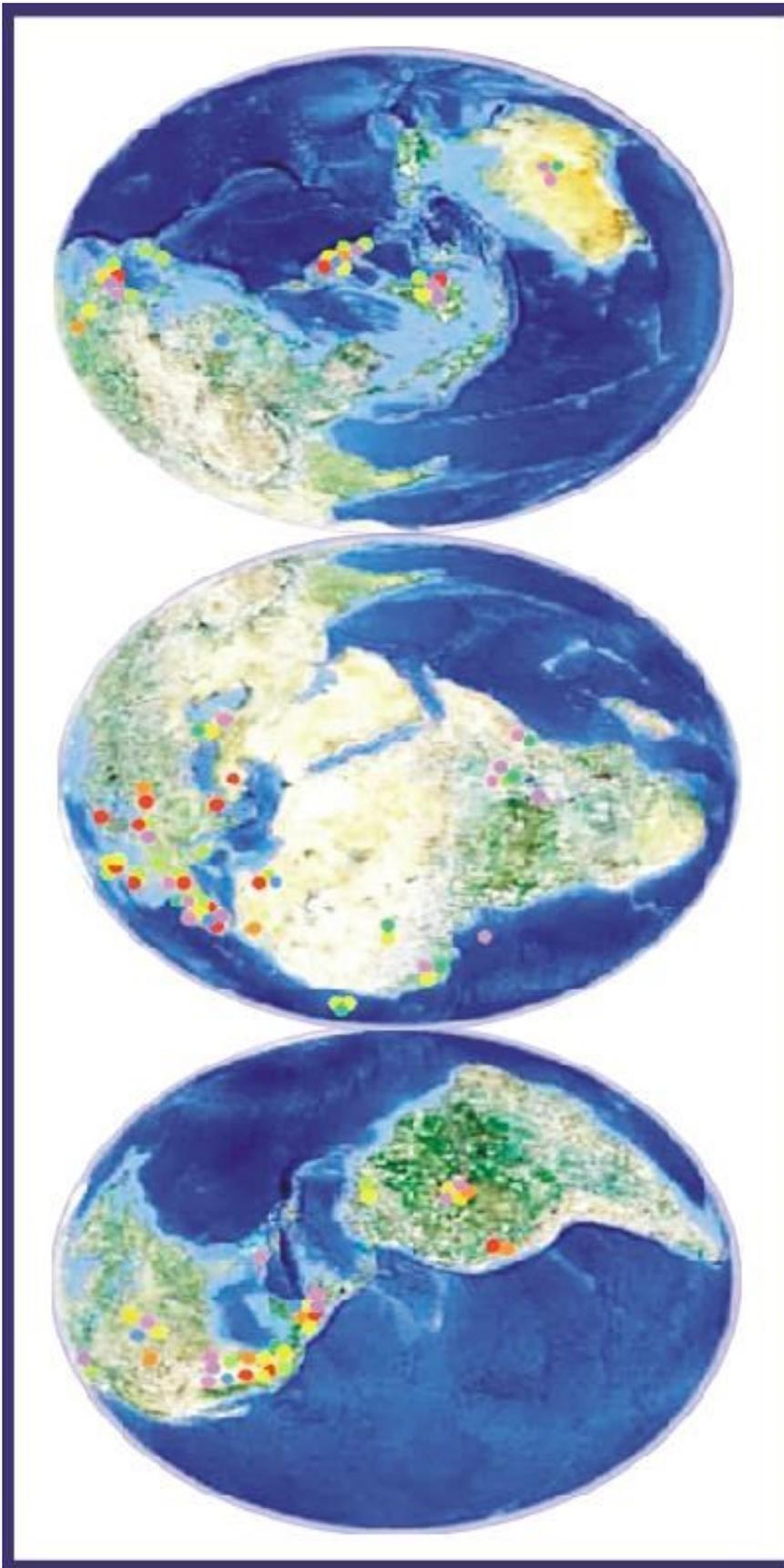
1.6 Aplicaciones del sistema HLA.

Debido a su alto grado de polimorfismo, su distribución tisular, y su función biológica el sistema HLA está siendo ampliamente estudiado en los diversos campos de la ciencia y han logrado encaminar sus características en otras disciplinas en base a las necesidades del ser humano.

1.6.1 Antropológicas.

Por su grado de polimorfismo y su desequilibrio de ligamiento el sistema HLA y cada uno de sus alelos es un medio para poder relacionar diferentes grupos poblacionales humanos, mediante la restricción de una etnia o el seguimiento de las diferentes migraciones a través de la historia. Las diferentes razas humanas muestran un patrón genético que no se diluye con el tiempo, se hereda de padres a hijos (figura 9).

INTRODUCCIÓN.



OCEANIA

A*02-B*15-03-C*08-DRB1*12-DQB1*03:01
 A*24-B*40:01
 B*35-DRB1*12
 B*40:01-DRB1*09
 B*40:01-C*03
 B*40:02-DRB1*15
 B*48-DRB1*11
 DRB1*11-DQA1*01-DQB1*05
 DRB1*09-DQB1*03:01
 DRB1*12-DQA1*01-DQB1*03:01
 DRB1*012-DQB1*05
 DRB1*14-DQA1*01-DQB1*05

A*02-B*15:01-C*03-DRB1*04-DQB1*03:01
 A*02-B*27-C*01-DRB1*01-DQB1*05
 A*02-B*40:01-C*03-DRB1*01-DQB1*05
 A*02-B*41-DRB1*07-DQB1*02
 A*02-B*46-C*01-DRB1*08-DQB1*06
 A*02-B*46-C*01-DRB1*12-DQB1*03:01
 A*02-B*58-DRB1*07-DQB1*02
 A*11-B*13-C*03-DRB1*15
 A*24-B*54-C*01-DRB1*04-DQB1*04
 A*30-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02
 A*30-B*53-C*04-DRB1*03:01-DQB1*02

A*02-B*49-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*23-B*15:03-C*02-DRB1*11
 A*23-B*53-DRB1*09
 A*23-B*58-C*06-DRB1*11-DQB1*03:01
 A*30-B*08-DRB1*03:02
 A*30-B*18-C*05-DRB1*03:01-DQB1*02
 A*30-B*49-C*17-DRB1*08:02-DQB1*06
 A*32-B*41-DRB1*13-DQB1*05
 A*68-B*49-DRB1*13-DQB1*06
 A*68-B*53-C*06-DRB1*08
 A*74-B*15:03-C*02

A*01-B*57-C*06-DRB1*07-DQB1*02
 A*01-B*57-C*06-DRB1*07-DQB1*03:03
 A*02-B*15:01-C*03-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*02-B*44-C*05-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*02-B*44-DRB1*07-DQB1*02
 A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06
 A*24-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05
 A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQB1*03:01
 A*29-B*44-C*16-DRB1*07-DQB1*02
 A*30-B*18-DRB1*03:01-DQB1*02
 A*33-B*14:02-DRB1*01-DQB1*05

A*02-B*25-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*02-B*35-DRB1*03-DQB1*04
 A*02-B*39-DRB1*08-DQB1*04
 A*02-B*39-C*07-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*24-B*35-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*24-B*39-DRB1*08-DQB1*04
 A*24-B*39-C*07-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*31-B*15-DRB1*09-DQB1*03:01
 A*31-B*37-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*68-B*39-C*07-DRB1*04-DQB1*03:02
 A*68-B*40:02-DRB1*08-DQB1*04
 A*68-B*35-DRB1*04-DQB1*03:02

Figura 9. Esquematación de los diferentes haplotipos mostrados en las poblaciones humanas. Lozano R. B. (2012)

INTRODUCCIÓN.

En el caso de la población mexicana (Tabla 7) se exhibe una mezcla génica y demográfica ampliamente compleja, esto como resultado de las diferentes etnias que se han restringido a una zona endémica, a las diversas migraciones poblacionales actuales, a todas y cada una de las combinaciones derivadas de los sucesos históricos coloniales de nuestro país y sobretodo el resultado del mestizaje; que es un factor único y que se ve involucrado en la modificación de las frecuencias alélicas. De los alelos presentes en nuestra población hay algunos que son específicos en ciertas poblaciones humanas, y otros que se han mantenido con el paso del tiempo y se han conservado en muchas de las poblaciones humanas desde la dispersión de los primeros homo sapiens que salieron de África del Este ^(4, 11,12).

Tabla 7. Haplotipos HLA más frecuentes encontrados en la población mexicana.

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DQB1	Ubicación
A*02	B*39	DRB1*04	DQB1*0302	Mazatecos, mayas, D.F, Ver, Torr, Pue.
A*02	B*35	DRB1*04	DQB1*0302	Mazatecos, mayas, nahuas, D.F., Mty, Pue, Ver, Torr, Sin, Son
A*68	B*39	DRB1*04	DQB1*0302	Mayas, D.F, Ver, Torr, Pue, Yuc.
A*02	B*35	DRB1*08	DQB1*04	Nahuas, mayas, D.F, Mty, Ver, Pue, Torr, Yuc.
A*33	B*1402	DRB1*01	DQB1*05	Mor, Mty, D.F., Torr, Ags, Sin, Son
A*24	B*35	DRB1*04	DQB1*0302	Mazatecos, Yuc, D.F., Ver, Torr
A*02	B*4002	DRB1*04	DQB1*0302	Mayas, D.F., Yuc, Torr
A*68	B*35	DRB1*04	DQB1*0302	Mayas, nahuas, Yuc, Ver, D.F., Oax, Pue
A*68	B*4002	DRB1*04	DQB1*0302	Teenek, Yuc, Ver
A*24	B*35	DRB1*16	DQB1*0301	Zapotecos, mixtecos, Ver, D.F.
A*29	B*44	DRB1*07	DQB1*02	Torr, D.F., Qro, Sin, Son
A*01	B*08	DRB1*0301	DQB1*02	Torr, Ver, D.F., Mty, Sin, Qro
A*24	B*39	DRB1*04	DQB1*0302	Mazatecos, D.F., Ver, Torr, Yuc, Mor
A*02	B* 1501	DRB1*04	DQB1*0302	D.F., Torr, Pue, Sin

D.F.: Distrito Federal y Zona Metropolitana del Valle de México; Ver: Veracruz; Torr: Torreón; Pue: Puebla; Mty: Monterrey; Sin: Sinaloa; Yuc: Yucatán; Ags: Aguascalientes; Son: Sonora; Oax: Oaxaca; Qro: Querétaro; Mor: Morelia.

Adaptado de Barquera Lozano R.

1.6.2 Legales.

El sistema HLA permite realizar estudios de paternidad, en base a la forma de heredar los haplotipos paternos, es muy improbable que dos personas no relacionadas genéticamente posean los mismos antígenos HLA. Su capacidad de discriminación supera el de otros sistemas de proteínas como el sistema ABO (Método de exclusión de paternidad por el sistema ABO).

Incluido en determinaciones legales mediante la genética forense ⁽¹³⁾, esta área está en desarrollo conjuntamente con las asociaciones del HLA-Enfermedad.

1.6.3 Clínicas.

El papel del sistema HLA es muy amplio y en constante desarrollo para garantizar la salud y estabilidad de los pacientes, esto se observa día a día desde una transfusión sanguínea, trasplante de órganos o de células progenitoras hematopoyéticas (Psc, Progenitor Stem Cells), trasplante de medula osea (TMO). La respuesta inmunológica generada contra antígenos en general, y contra cada combinación específica trasplantada de antígenos HLA del donador en particular, está influida por el código genético HLA del receptor.

Las moléculas del MHC son los principales blancos de la respuesta inmune en contra de aloinjertos y este reconocimiento de aloantígenos del MHC por parte de las células T es el evento central que inicia el rechazo al trasplante. ⁽¹⁴⁾

➤ Transfusión sanguínea.

Es un procedimiento a través del cual se suministra sangre o cualquiera de sus componentes a un ser humano, solamente con fines terapéuticos, la sangre se podrá obtener por extracción venosa y debe cubrir las determinaciones y características establecidas con las Normas Oficiales vigentes en México. ⁽¹⁵⁾

La transfusión sanguínea puede tener un doble impacto inmunológico en los trasplantes de órgano sólidos y células progenitoras hematopoyéticas; desarrollando un efecto inmunosupresor aumentando la supervivencia del injerto o contribuyendo al rechazo del injerto por la sensibilización del paciente a los antígenos HLA. Las células inmunocompetentes alorreactivas del injerto reaccionan contra las células de los tejidos del receptor que presentan antígenos menores o mayores de histocompatibilidad distintos a los suyos, lo que puede desencadenar la enfermedad injerto contra huésped aguda (EICHa) o crónica (EICHc); esta aloinmunización puede

INTRODUCCIÓN.

prevenirse con el uso de hemodrivados leucorreducidos o irradiados con el fin de inactivar a los linfocitos remanentes. ⁽¹⁶⁾

Las reacciones pos transfusión generadas por la interacción de antígenos del donante frente al HLA del receptor van desde una lesión pulmonar aguda hasta la destrucción inmediata de las plaquetas transfundidas. ⁽¹⁷⁾

➤ Trasplante de órganos.

El injerto de un órgano o tejido que proviene de un donador genéticamente disímulo al receptor, puede producir una compleja y poderosa variedad de respuestas; algunas se desarrollan rápidamente, mientras que otras lo hacen de manera considerablemente tardía. Debido al polimorfismo tan elevado de las moléculas HLA, no se considera estudiar todos los loci. Así en el trasplante de órganos sólidos se tienen en cuenta HLA-A, HLA-B y HLA-DR. ^(2, 14)

➤ Trasplante de médula ósea.

En el inicio de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas, éstas eran obtenidas de la médula ósea (MO), este tipo de trasplante se aplica en aquellos pacientes que no tienen otra alternativa de tratamiento, consta de la infusión endovenosa de células progenitoras hematopoyéticas que se obtienen mediante la punción de hueso iliaco, que resulta ser doloroso para el donador, tipificándose HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DRB1 para los trasplantes alogénicos de MHC y al igual que los trasplantes de órganos sólidos presenta la misma dificultad al enfrentarse a los antígenos del sistema HLA, si el receptor del Trasplante de Médula Ósea es muy diferente al donador se presentara una reacción mediada por los linfocitos desarrollando el rechazo de las células ^(18, 19).

➤ Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (Sangre de Cordón Umbilical).

Debido a la dificultad de obtener las donaciones de Células Progenitoras Hematopoyéticas (Pcs) mediante MO se logró obtener células a partir de sangre de cordón umbilical, este procedimiento no es invasivo para la madre y tampoco para el recién nacido; proporciona una fuente constante de células sanas y en cantidades adecuadas para los trasplantes, y debido a que es un trasplante alogénico se ve

INTRODUCCIÓN.

afectado por el sistema HLA, en la misma proporción y mecanismos inmunológicos que el resto de los trasplantes anteriormente descritos.

1.7 HLA en los trasplantes de Pcs en México.

La sangre del cordón presenta menos problemas de compatibilidad; las células troncales presentes en ella difieren de las de médula ósea y son más tolerantes. Son capaces de generar hematíes normales y leucocitos por lo que se pueden usar para ayudar a renovar los hematíes en personas con diferentes problemas de dichas células o para restablecer el sistema inmunitario de niños nacidos con una inmunodeficiencia⁽²⁰⁾. La historia de los trasplantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas en México inicia en 1990 cuando el Doctor Ricardo Sosa y colaboradores realizaron el primer trasplante en el Instituto Nacional de la Nutrición, a este trasplante le siguieron otros en modo aislado y se mantuvo en espera, en 1995 se reactivó este tratamiento con la llegada de médicos actualizados⁽¹⁹⁾ (Tabla 8). Las células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de la sangre de cordón umbilical tienen algunas ventajas sobre las células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de Médula Ósea y Sangre Periférica:

- Facilidad de obtención sin riesgo para el donador.
- Disponibilidad de unidades.
- Elevado potencial hematopoyético
- Obtención de etnias minoritarias.

Derivado de la demanda de Psc y la poca probabilidad de encontrar donadores HLA idénticos se crearon redes nacionales e internacionales (NETCORD) para poder solicitar un donador no emparentado, las instituciones encargadas de contar con un listado de unidades disponibles son los BSCU mediante la obtención de las células, su preservación, tipificación dentro del sistema HLA y regulación de los procesos de calidad. En el caso de México fue Centro Nacional de la Trasfusión Sanguínea que mediante apoyo gubernamental fundo el primer BSCU con el CordMX, como un programa de donación de sangre placentaria^(21, 22).

Para la realización del trasplante se deben seguir determinados criterios y dentro de ellos está la compatibilidad HLA, el donante ideal sería un hermano HLA idéntico para locus A, B, C y DRB1. Debido al polimorfismo y herencia del sistema HLA si no existiera un hermano o familiar se recurre a las redes de bancos de células progenitoras hematopoyéticas.

Para la sangre de cordón umbilical se tipifican los locus: HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, debido a su grado de polimorfismo generan una respuesta inmune más drástica; un

INTRODUCCIÓN.

donante ideal comparte 6/6 compatibilidades, aunque se aceptan hasta 4/6 (en baja resolución). Si el paciente presenta un alelo o haplotipo menos frecuente, este es buscando en primera instancia dentro de la familia, ya que es menos probable encontrarlo en la población general y siempre será más frecuente encontrar al azar el otro alelo (alelo común) en la población. ^(4, 11, 23, 24)

Los trasplantes en los niños son los que más aceptación tienen; en el caso de los adultos la cantidad de células requeridas para observar una mejoría es mayor por lo cual para intentar resolver esto, se ha comenzado a hacer trasplantes de células hematopoyéticas provenientes de dos o más cordones umbilicales (doble trasplante).⁽²⁵⁾

Los BSCU, así como los trasplantes de Psc están en mejora continua, para cumplir las expectativas de las demandas de células por parte de los pacientes, y la tipificación molecular de los alelos del sistema HLA para reducir el riesgo de que el paciente

Tabla 8. Instituciones mexicanas que llevan a cabo el TCPH.
Adaptado de Ruelas Agüelles (2006)

INSTITUCION	UBICACION
Centro de Hematología y Oncología Interna	Puebla
Centro Médico del Norte	Monterrey
Centro Médico Nacional La Raza	Distrito Federal
Centro Médico Nacional	Distrito Federal
Centro Medico M. Ávila Camacho	Puebla
Centro Médico de Occidente	Guadalajara
Instituto Nacional de Cancerología	Distrito Federal
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Dr. Salvador Zubirán	Distrito Federal
Hospital Ángeles Lomas	Distrito Federal
Hospital 20 de Noviembre	Distrito Federal
Hospital Infantil de México	Distrito Federal
Hospital San José	Monterrey
Hospital Universitario de Monterrey	Monterrey

presente una reacción inmune de injerto contra huésped (EICH).

Generar el conocimiento de las frecuencias de haplotipos y de parámetros genéticos relacionados con la población es relevante para el planteamiento estratégico de los registros de donantes, como para tomar decisiones en el proceso de búsqueda de donante para los distintos pacientes.

INTRODUCCIÓN.

Una vez disponibles, estos estudios de los alelos y haplotipos presentes en una región determinada, pueden ser también de utilidad para otros propósitos prácticos y científicos, como estudios de genética de poblaciones.⁽²⁶⁾

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido al amplio polimorfismo del sistema HLA, este puede variar de forma importante entre dos zonas geográficas distintas y aun no existen estudios suficientemente amplios de los alelos y haplotipos HLA locales, por lo cual se hace necesario el conocimiento de los rasgos diferenciales de cada lugar. Al no tener una determinación de los alelos y haplotipos más comunes y aquellos que son menos frecuentes en nuestro país; la búsqueda de unidades con células progenitoras hematopoyéticas de SCU se ve afectada en el tiempo de espera del paciente y en su recuperación.

Por lo cual se plantea establecer una base de datos para lograr minimizar los tiempos y las posibilidades de encontrar un donador de células progenitoras hematopoyéticas dentro de nuestra área geográfica, que sirva a mediano largo plazo para estimar los riesgos relativos de padecer ciertas enfermedades asociadas a HLA ; las probabilidades en los estudios de filiación de paternidad.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS.

Mediante el desarrollo y análisis de los objetivos particulares del presente trabajo se plantean los siguientes objetivos.

➤ OBJETIVO GENERAL.

Determinar la diversidad genómica del sistema HLA en la población mexicana mediante Unidades de Sangre de Cordón Umbilical (USCU) almacenadas en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, para estimar las frecuencias del sistema HLA en la población mexicana.

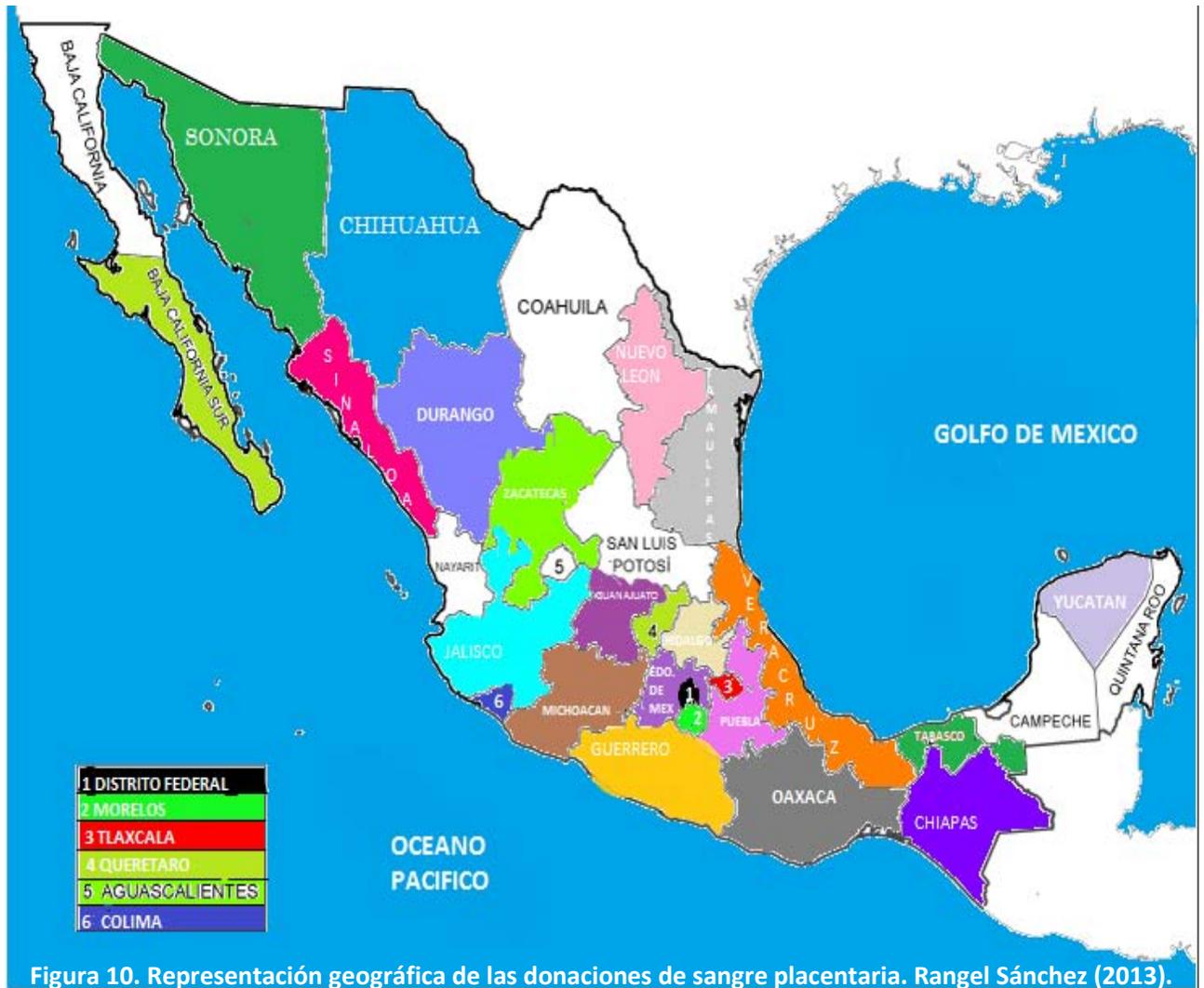
➤ OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✓ Determinar en las USCU la frecuencia de los alelos HLA-A, B, DRB1, DQB1 en la población mexicana por medio de la tipificación molecular.
- ✓ Identificar en las USCU los alelos predominantes dentro de la República Mexicana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

- a) Se estudiaron los haplotipos de 838 muestras de sangre placentaria de recién nacido (cordón umbilical) cuyas madres son de nacionalidad mexicana y que han sido cedidas por diferentes familias a partir de Julio de 2003 a Enero de 2013, mediante consentimiento informado y validación médica al Banco de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS) ⁽²⁸⁾ para la donación de progenitores hematopoyéticos.
- b) Estas madres donadoras proceden de 24 estados y del Distrito Federal de la República Mexicana (representados por diversos colores en el mapa, (figura 10).
- c) Para su obtención y transporte se emplean los Kits de recolección, a su llegada al CNTS se les realizan determinaciones serológicas y mediciones clínicas para asegurar la inocuidad y calidad de las unidades, para poder ofertarlas a una donación.
- d) El laboratorio de histocompatibilidad está acreditado ante la European Federation Immunogenetics (efi) y por las continuas certificaciones ante la UCLA.
- e) Los datos de los donantes son protegidos en cumplimiento con lo establecido por la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.



4.2 MÉTODOS.

De las Unidades de Sangre de Cordón Umbilical que logran acreditar los controles serológicos, microbiológicos y el conteo celular se procede a determinar los haplotipos del sistema HLA presentes en la muestra mediante SSP y SSO.

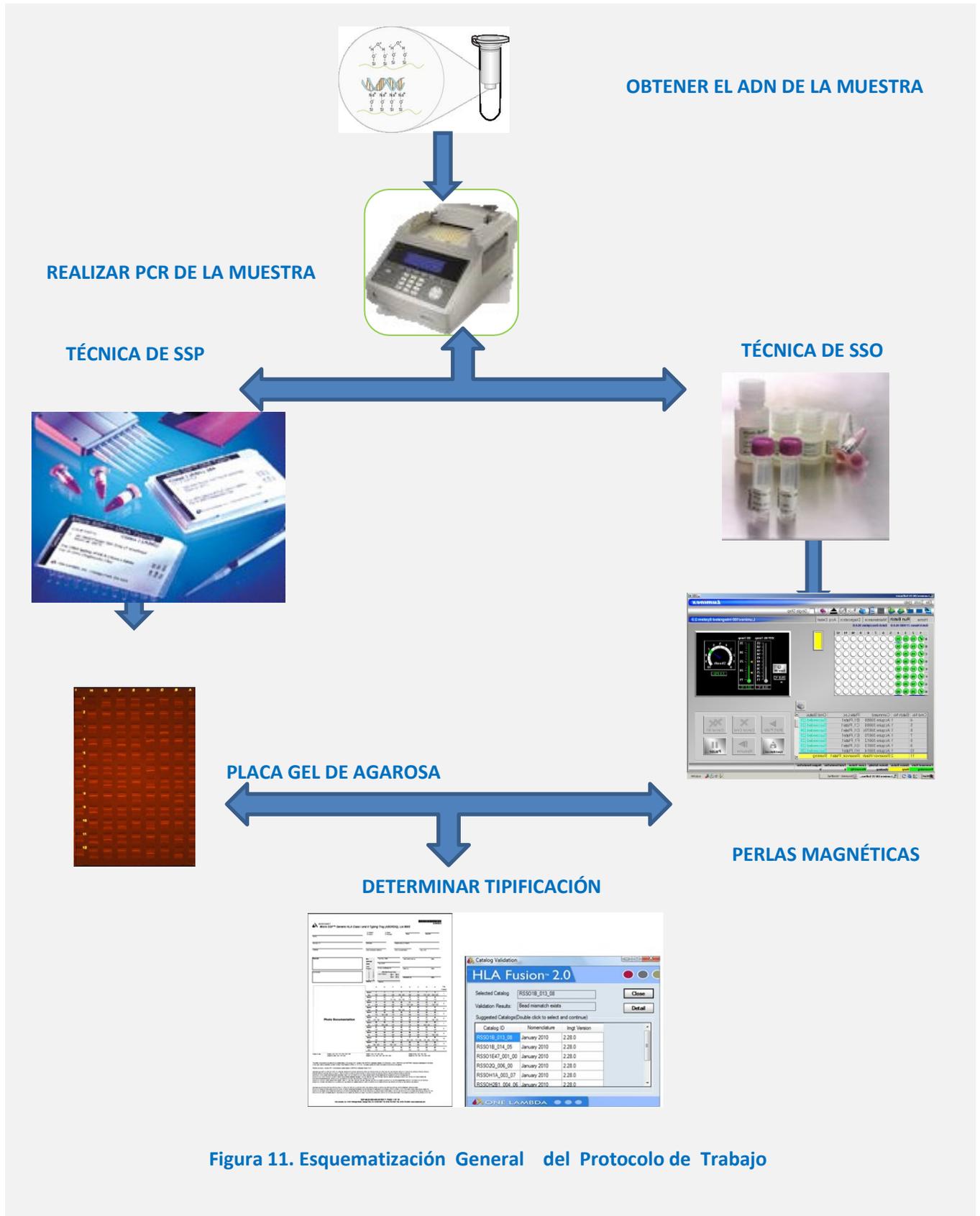


Figura 11. Esquemización General del Protocolo de Trabajo

4.2.1 Obtención de ADN por columnas.

En el área I (preamplificación) se emplea QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania, figura 12) que consigue una rápida purificación de 1 µL a 200 µL de sangre (4-12 µg/200 µL de sangre).



Figura 12. Imagen del mini kit para extracción de ADN por columna de QIAGEN®, obtenida de <http://www.qiagen.com>

Finalmente el ADN (con una concentración aproximada de 600 ng/µL) listo para su uso, es eluído en agua o en un buffer (que es suministrado en el equipo) con baja concentración de sales.⁽²⁹⁾ y se debe almacenar a 2 – 8 °C o usarse inmediatamente (figura 13).

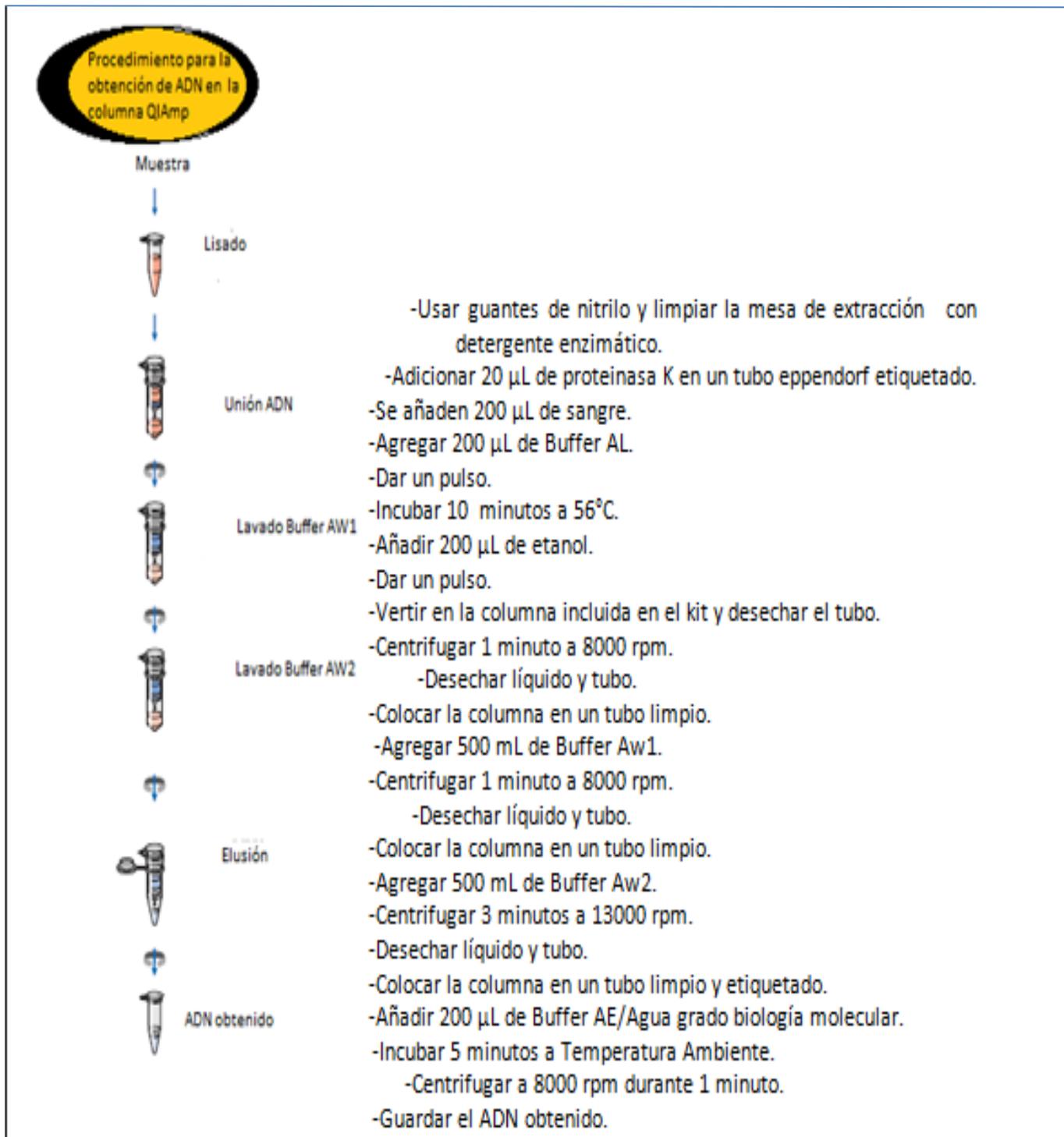


Figura 13. Protocolo de obtención de ADN mediante columnas QIAamp® DNA Blood Mini Kit.

4.2.2 Tipificación génica del HLA.

En todos los casos se realiza una amplificación previa de ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

A través de esta metodología obtendremos un número elevado de copias a partir de un segmento de ácido nucleico a estudiar por medio de una repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: se obtiene separando las cadenas de ADN con temperaturas elevadas, generando un molde de hebra simple, se lleva a cabo a 94°C.
- Alineación e Hibridación: ocurre una hibridación de iniciadores a sus secuencias homólogas del ADN sustrato sólo bajo condiciones específicas de temperatura, a 55°C.
- Elongación de los iniciadores: es la extensión en sentido 5'- 3' del complejo iniciador-sustrato. Se obtiene con la utilización de Taq polimerasa que va incorporando los deoxinucleótidos, se realiza a 72°C.

Se tipificarán los loci HLA-A, B, DRB1 y DQB1 con resultado de baja/mediana resolución a dos dígitos por los protocolos de SSP (Secuence Specific Primer) y SSO (Secuence Specific Oligonucleotide).

- ✓ PCR-SSP (Secuence Specific Primer) en donde la especificidad de los alelos HLA se determina empleando iniciadores (primers perfectamente coincidentes) que son capaces de amplificar uno o varios alelos.
- ✓ PCR-SSO (Secuence Specific Oligonucleotide) emplea iniciadores específicos de locus para la amplificación de las secuencias alélicas codificadas por un solo locus, y a su vez son determinados por sondas de oligonucleótidos marcadas, empleando la tecnología Luminex® para el método de tipificación inversa de ADN SSO^(22,30).

4.3 Tipificación HLA mediante SSP.

Se realiza mediante el método de tipificación del DNA Micro SSP™ (One Lambda Inc., EE. UU) que logra una alta discriminación entre los diferentes alelos durante el proceso de la PCR⁽³¹⁾.

El método PCR-SSP es una técnica basada en que los primers de oligonucleótidos completamente coincidentes son más eficaces en la amplificación de una secuencia diana (utiliza cebadores específicos de secuencia para la tipificación de tejidos basada en ADN).



Figura 14 Imagen del kit DNA Micro SSP™ .Obtenida de www.onelambda.com

Las placas de tipificación DNA Micro SSP™ proporcionan los primers de oligonucleótidos específicos de la secuencia para la amplificación de los alelos HLA (figura 14), consta de 96 pocillos de pared fina de 0.2 mL para PCR que ya está lista para añadir las

muestras de ADN, Taq polimerasa recombinante y un mezcla tampón de dNTP (D-MIX de Micro SSP™).

La asignación de los alelos se realiza determinando si la amplificación se ha producido o no, es decir, mediante la visualización y la detección de la amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa y su interpretación mediante el rayado de las hojas de trabajo (Micro SSP™ Generic HLA Class I and II Typing Tray ABDRDQ) y el programa HLA Fusion 2.0 (figura 17).

4.3.1 Material necesario.

- Placas con el juego de primers de DNA Micro SSP™. Se debe almacenar a 2-8°C.
- Tubos con la mezcla D-MIX en alícuotas. Se debe almacenar a 2 – 8 °C.
- Hojas de sellado para PCR (PCR Tray Seals).
- CD ROM: instrucciones de uso y hojas de trabajo; específica del lote.
- Taq ADN polimerasa, 5 unidades/μl. (Thermo Scientific™).
- Pipetas y puntas de filtro desechables: 1-10, 2-20,10-200 y 100-1000 μl.
- Soporte para placa de 96 pocillos.
- Dispositivo multipipeteo (96 Well Transfer Device, One Lambda Inc.), capaz de dispensar alícuotas de 10 μl.
- Termociclador GeneAmp PCR9700 (Programa ssp oli cnts) que incluya adaptador de plástico y almohadilla de presión.
- Tampón de electroforesis TBE5X (Tris-borato 0.45 M; EDTA di sódico 0.01 M, pH=8.3, contiene 2.5 μg de Bromuro de Etidio), diluido a 1X. One Lambda Inc.
- Marcadores de peso molecular de ADN (DNA Size Markers One Lambda Inc., rango de 50–2.564 pb).
- Agarosa de grado electroforesis.
- Fuente de alimentación para la electroforesis.
- Sistema de electroforesis Power Pac Basic BIO RAD®: 96 líneas para muestras más líneas de carga de marcadores por separado.
- Sistema de documentación del gel: Cámara polaroid y filtro para documentación del gel
- Transiluminador UV
- Vortex Maxi Mixi, Thermo Scientific™.
- Centrifuga (Spectrafuge 16M™).

4.3.2 Protocolo de tipificación HLA DNA Micro SSP™.

- ❖ Sacar del congelador el tubo de D-MIX, la placa con el juego de primers DNA Micro SSP™, la muestra de ADN y dejar atemperar en el área II (postamplificación) previa limpieza con detergente enzimático de la mesa de amplificación.
- ❖ Agitar la muestra de ADN en vórtex, colocar la placa DNA Micro SSP™ en una gradilla o soporte de 96 pozos y retirar la etiqueta de la placa.

MATERIALES Y MÉTODOS.

- ❖ Sacar la Taq Polimerasa recombinante del congelador y mantenerla en hielo hasta su uso.
- ❖ Identificar la posición 1H en la placa, control negativo y dispensar 1 μ L de diluyente de ADN.
- ❖ Añadir con micropipeta 5.6 μ L de Taq polimerasa recombinante al tubo de mezcla D-MIX de DNA Micro SSP™.
- ❖ Tapar y agitar el tubo D-MIX en vórtex 5 segundos, centrifugar 10 segundos en microcentrifuga, para recuperar el líquido de las paredes del tubo.
- ❖ Tomar 9 μ L de la mezcla D-MIX + Taq polimerasa y dispensarlos en el pozo 1H (control negativo).
- ❖ Adicionar al tubo D-MIX 111 μ L de ADN muestra, agitar en vórtex 5 segundos y centrifugar brevemente por 10 segundos.
- ❖ Dispensar 10 μ L del tubo D-MIX + Taq polimerasa a los 95 pozos restantes. (Tener la precaución de no dispensar esta mezcla en el control negativo).
- ❖ Terminado el paso anterior, verificar la existencia de muestra en todos los pozos y tapar la placa con la etiqueta autoadherible (PCR Tray Seals) que incluye el kit e identificarla.
- ❖ Una vez colocada la etiqueta deslizar el dedo índice por los 96 pozos y a los costados de la placa, ejerciendo presión para asegurar el sellado correcto de cada pozo.
- ❖ Encender el Termociclador GeneAmp PCR9700 y colocar la placa Micro SSP™ en el adaptador de plástico, encima colocar la almohadilla de presión con el lado texturizado hacia arriba y acomodarlo en la parte de reacción.
- ❖ Seleccionar el Programa SSP OLI CNTS, verificar la opción de volumen a 10 μ L e iniciar la amplificación (los ciclos tienen un tiempo aproximado de 1 hora 30 minutos).
- ❖ Terminada la amplificación depositar los 10 μ L de muestra con el transfer en el gel de agarosa al 2.5% (0.75g de agarosa con 30 mL de TBE 1X), y adicionar 4 μ L de marcador de peso molecular (DNA Size Markers). Dejar estabilizar 2 minutos.
- ❖ La electroforesis se realiza en gel de agarosa al 2.5% a 150 V por 3 minutos, con el equipo de BIO RAD.
- ❖ Realizar la fotodocumentación con el Transiluminador UV y cámara fotográfica digital.

MATERIALES Y MÉTODOS.

- ❖ Las bandas positivas se revisan y se interpretan los resultados con el programa HLA FUSION 2.0™ y el rayado de las hojas de trabajo de One Lambda Inc. (específicas del lote).
- ❖ Cada adición de reactivo o muestra se realiza usando siempre una punta con filtro nueva y empleando guantes de nitrilo (libres de polvo) y los RPBI son separados y depositados con base a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002⁽³²⁾.

4.3.3 Evaluación de las placas de gel.

Primero se examina la fotografía del gel (fotodocumentación) (figura 15) con detenimiento y se determinan las líneas positivas, se observa una banda de control interno (de migración más lenta) en los pocillos negativos (excepto en el pocillo de control negativo) como control de una amplificación satisfactoria.

Se observa una banda de tipificación positiva de migración más lenta en el gel de electroforesis debida a la amplificación de un gen HLA específico durante la PCR, lo que indica un resultado positivo de la prueba.

La banda de control interno puede ser débil en los pocillos positivos debido a la competencia por el sustrato. La ausencia de amplificación de 3 pocillos es causal de anular los resultados de la prueba.

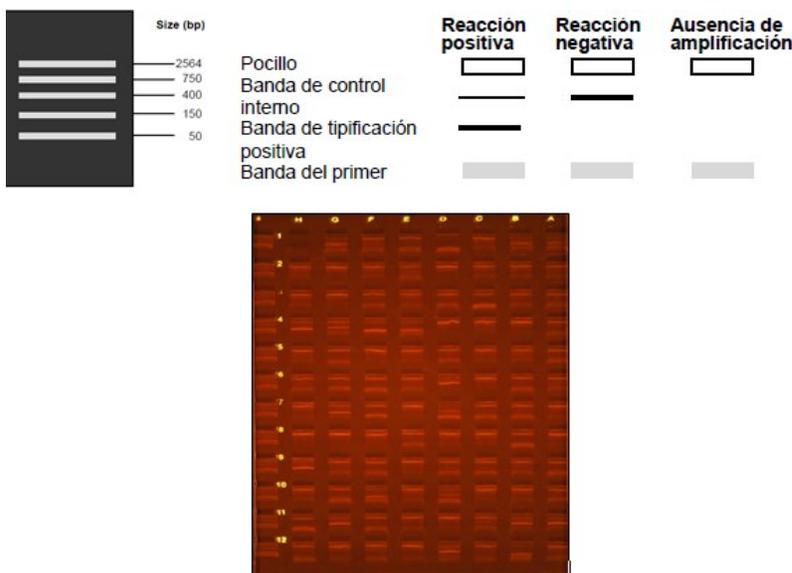


Figura 15. Confirmación de las bandas positivas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

4.3.4 Tipificación de resultados del protocolo SSP.

Para obtener la tipificación de la muestra de DNA, se empareja el patrón de los pocillos positivos con la información que aparece en la hoja de trabajo Micro SSP™ .

Mediante el rayado de las hojas de trabajo de acuerdo a los pocillos que si amplificaron, primero verticalmente y después horizontalmente, para lograr la tipificación del alelo.

Los resultados son verificados mediante el software de One Lambda Inc. HLA Fusion 2.0 (figura 16).

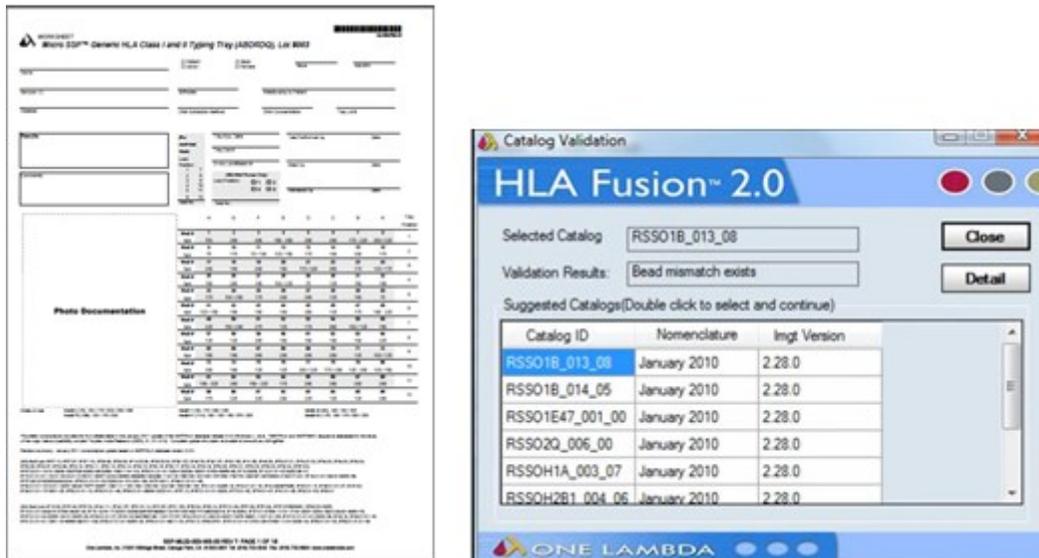


Figura 16. Tipificación de los Resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS.

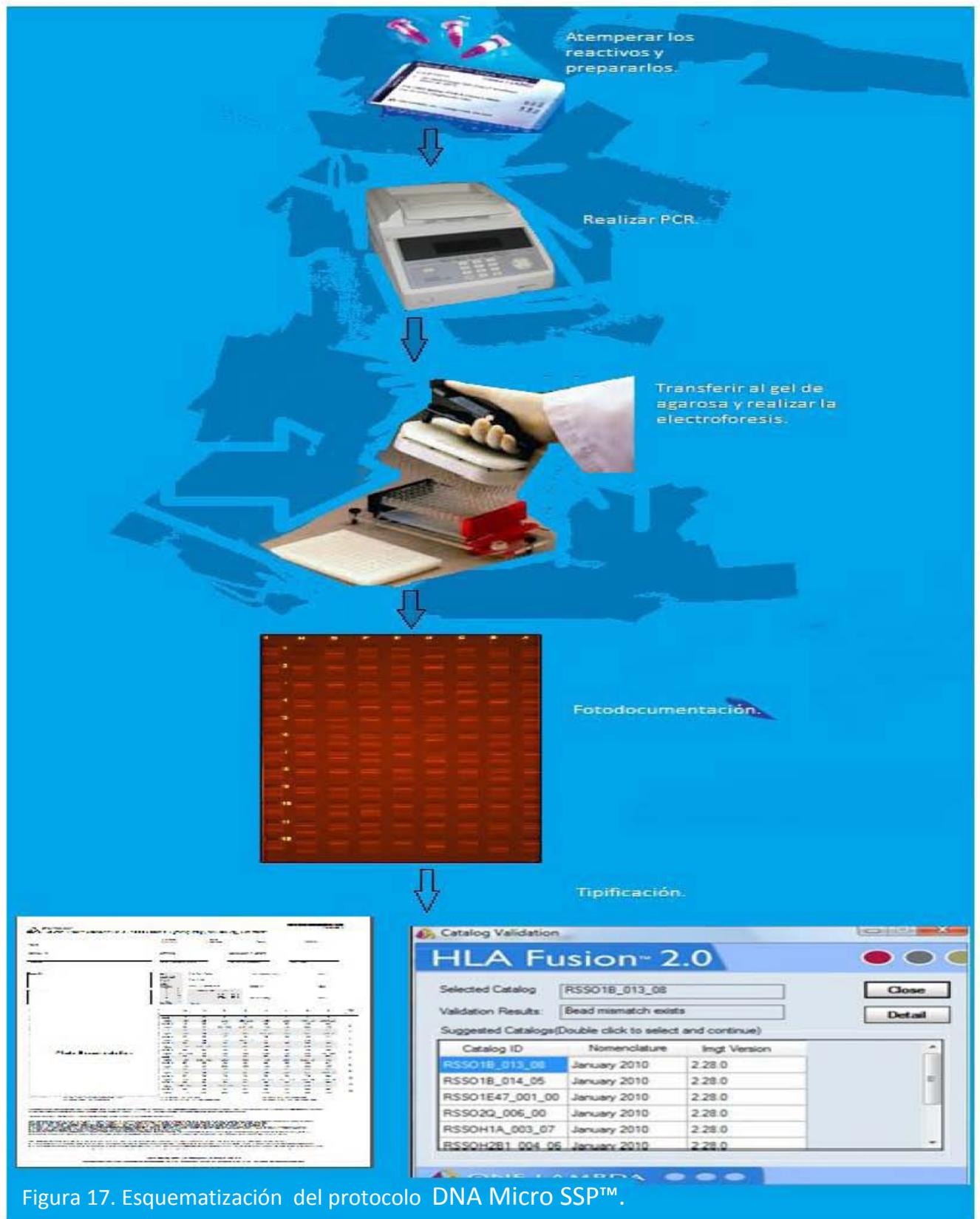


Figura 17. Esquemización del protocolo DNA Micro SSP™.

4.4 Protocolo de tipificación HLA (Clase I y II) mediante SSO.

Para realizar la tipificación mediante la técnica de SSO se emplea LABType®SSO (cada kit está diseñado por separado para la tipificación de los alelos HLA-A, B, DRB1 Y DQB1) que utiliza sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia unidas a microesferas cifradas de forma fluorescente para identificar los alelos codificados mediante el ADN de muestra.

La introducción de un paso para amplificar el ADN destino mediante la reacción en cadena de la polimerasa unida a la hibridación y a la detección en una mezcla de reacción aislada, hace que el método sea adecuado para pruebas a pequeña y a gran escala.

LABType®SSO aplica la tecnología Luminex® (figura 18) para el método de tipificación inversa de ADN de SSO, después de la amplificación con un cebador específico el producto está biotilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE). La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA.



Figura 18. Equipo con tecnología Luminex® y kit LABType®SSO.

4.4.1 Material necesario.

El kit LABType SSO® incluye:

- Mezcla de perlas (cebador de amplificación).
- Tampón de reacción de hibridación.
- Tampón de desnaturalización.
- Tampón de neutralización.
- Tampón de lavado.
- Tampón de SAPE.
- Conjunto de cebadores y D-mix.
- Conjunto de cebadores específico de locus.

Material, reactivos y equipos no suministrados.

- Pipetas y puntas de filtro desechables: 1-10, 2-20, 10-200 y 100-1000 μ l.
- Viales de 2 mL (tubos eppendorf)
- Soporte para placa de 96 pocillos.
- Taq ADN polimerasa, 5 unidades/ μ l. (Thermo Scientific™)
- Estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE).
- Agua desionizada.
- Etanol 70%.
- Hojas de papel aluminio.
- Placa Whatman de poliestireno.
- Etiquetas autoadherible para PCR.
- Termociclador GeneAmp PCR9700 que incluya adaptador de plástico y almohadilla de presión.
- Fuente de alimentación para el equipo Luminex®.
- Vortex Maxi Mixi, Thermo Scientific™.
- Centrifuga (Spectrafuge 16M™).

Requisitos del instrumento:

- Analizador de flujo LABScan™ 100 (kit LABType SSO®).
- Luminex® XY Plataforma (accesorio para la lectura automatizada de las muestras en el analizador de flujo LABScan™ 100, de Luminex Corporation.

4.4.2 Configuración previa.

-Encender al analizador LABScan™ 100, este proceso de calentamiento del sistema lleva aproximadamente 30 minutos (figura 19).

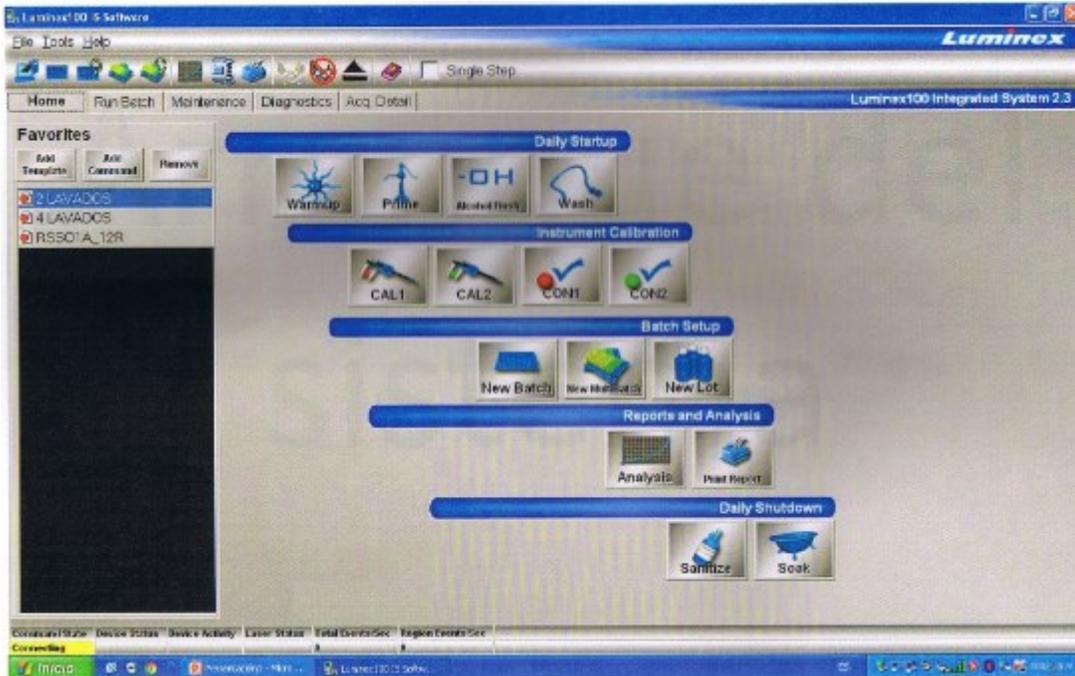


Figura 19. Pantalla principal del equipo Luminex® 100.

-Comenzar el procedimiento de puesta en marcha:
Warmup, Prime, Alcohol flush y Wash.

-Terminado el proceso de mantenimiento, proceder a colocar las muestras de los calibradores y controles (figura 20), en el orden que marca el equipo y realizando un lavado doble entre cada determinación con el agua desionizada que se encuentra en el reservorio.

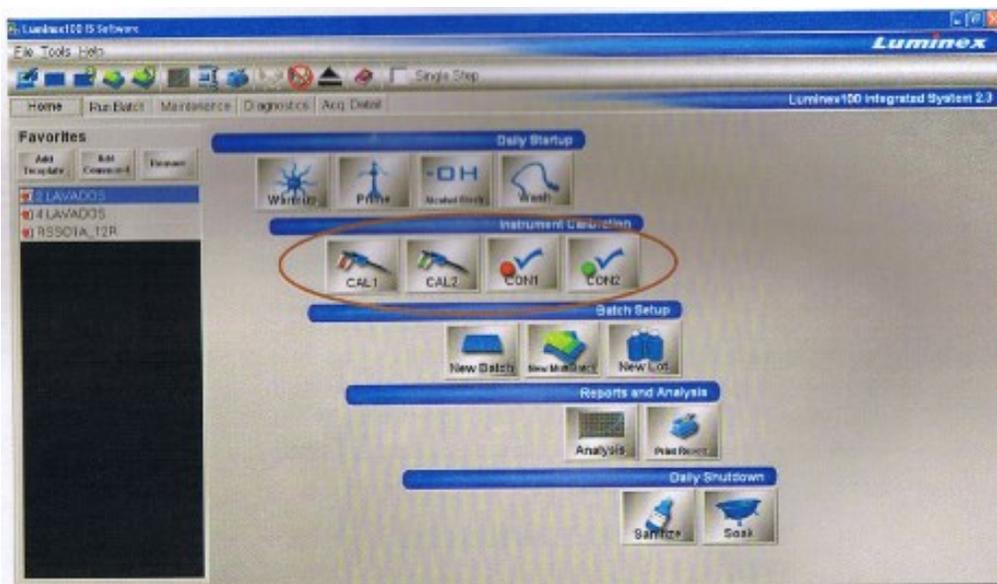


Figura 20. Iconos de inicio y su orden de ejecución en el sistema Luminex®

4.4.3 PCR.

- Obtener la muestra de ADN a una concentración de 20 ng/μL y una pureza de 1.65 a 1.80.
- A una placa nueva de 96 pozos (basados en los pozos a utilizar, del 1-96) agregar 2 μL de ADN a cada pozo.
- Preparar la mezcla D-mix y cebadores (primers set) específicos y adicionar Taq polimerasa recombinante, dependiendo del número de reacciones a tipificar en base a la tabla 9. (Master Mix).

Tabla 9. Preparación de la mezcla Master Mix.

Nº de reacciones	D-mix (μl)	Cebador de amplificación (μl)	Taq polimerasa (μl)
1	13,8	4	0,2
10	138,0	40	2,0
50	690,0	200	10,0
96	1491,0	432	21,6 (22)

- Adicionar a cada pozo 18 μL de la mezcla Master Mix preparado en base al locus a tipificar, tapar la placa con las etiquetas autoadheribles.

MATERIALES Y MÉTODOS.

-Realizar la PCR en el Termociclador Gene Amp PCR 9700, con el programa PCR RSSO OLI (Tabla 10).

Tabla 10. Ciclos para la PCR.

Paso	Temperatura y tiempo de incubación	N.º de ciclos
Paso 1:	96°C 03:00	1
Paso 2:	96°C 00:20:00	5
	60°C 00:20:00	
	72°C 00:20:00	
Paso 3:	96°C 00:10:00	30
	60°C 00:15:00	
	72°C 00:20:00	
Paso 4:	72°C 10:00:00	1
Paso 5:	4°C para siempre	1

4.4.4 Desnaturalización/Neutralización.

- Precalentar el Termociclador con el programa Hibridación oli (60°C).
- En el soporte colocar una placa nueva y limpia en base a los pozos a utilizar y adicionar 2.5 µL de buffer de desnaturalización a cada uno.
- Adicionar 5 µL del producto de la PCR a cada pozo junto al buffer de desnaturalización, la coloración se observará más intensa.
- Tapar la placa con la etiqueta autoadherible, agitar en vortex e incubarla a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 10 minutos.
- Agregar 5 µL de buffer de neutralización a cada pozo (la coloración se tornara más intensa).
- Tapar la placa y colocarla en un baño de hielo, el tiempo necesario para preparar la mezcla de perlas para el proceso de hibridación.

4.4.5 Hibridación.

-Preparar la mezcla de perlas según el locus a tipificar, diluyendo las perlas en el buffer de hibridación, proteger la mezcla de la exposición a la luz (Tabla 11).

Tabla 11. Dilución de las perlas de hibridación.

No. De reacciones	Buffer de hibridación. (µL)	Mezcla de perlas (µL)
1	34	4
5	170	20
10	340	40
20	680	80
50	1700	200
100	3400	400

- Agregar a cada pozo 38 µL de perlas diluidas, de acuerdo al locus a tipificar.
- Tapar la placa con una etiqueta autoadherible, sellándola perfectamente.
- Incubar la placa en el Termociclador durante 15 minutos, con el programa de hibridación (HOLD 60°C).
- Terminado el tiempo de incubación retirar la placa del Termociclador, quitar la etiqueta y adicionar 100 µL de buffer de lavado, mezclar y centrifugar a 3070 rpm durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante, tapar la placa, agitar en vortex para resuspender las perlas con el buffer residual y repetir los pasos del lavado, hasta completar 3 lavados.

4.4.6 Marcaje.

-Durante la última centrifugación del paso de lavado, preparar la solución de trabajo para marcaje SAPE (Tabla 12), proteger la solución de la exposición a la luz.

Tabla 12. Preparación de la solución de trabajo SAPE.

No. De reacciones	SAPE (µL)	Buffer de SAPE (µL)
1	0.5	49.5
5	2.5	247.5
10	5	495
20	10	990
50	25	2475
100	50	4950

MATERIALES Y MÉTODOS.

- Adicionar a cada pozo 50 μ L de solución de trabajo, tapar la placa, agitar en vortex e incubar en el Termociclador 5 minutos con el programa de hibridación (HOLD 60°C).
- Sacar la placa y retirar la etiqueta, realizar un último lavado adicionando 100 μ L de buffer de lavado, tapar la placa, agitar en vortex y centrifugar a 3070 rpm por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante y resuspender las perlas con 70 μ L de solución de lavado para realizar la lectura.
- Transferir un volumen total de 80 μ L a una placa Whatman de poliestireno, adecuada para la lectura en el equipo Luminex®.

Terminado el proceso anterior, seleccionar el locus a tipificar, el lote del reactivo y asignar la posición de la muestra en el mapa de la placa. Iniciar la lectura de las muestras en el equipo Luminex® 100, como se muestra en la figura 21.

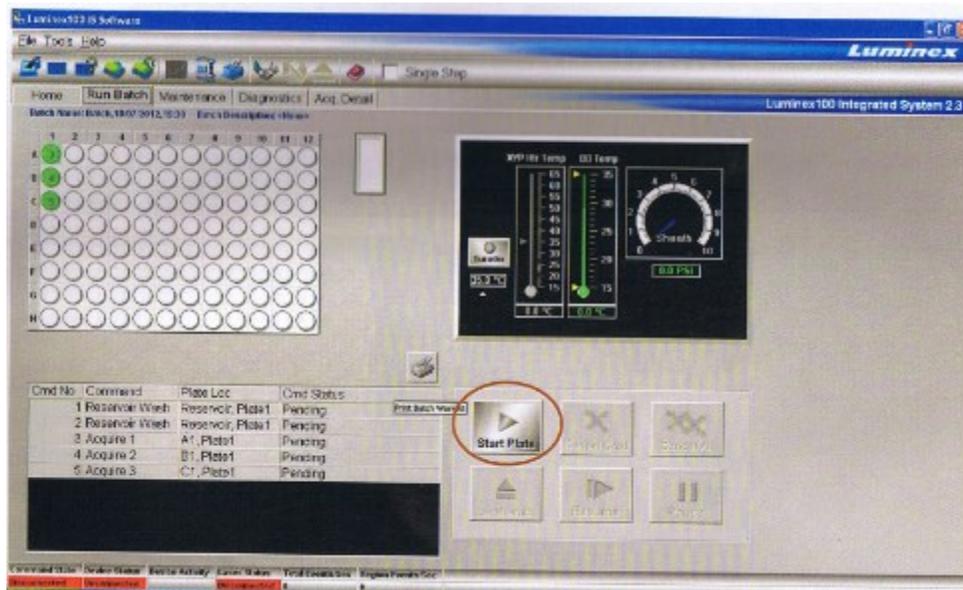


Figura 21. Imagen de arranque de las pruebas en el sistema Luminex®

4.4.7. Tipificación de resultados del protocolo SSO.

Al terminar la lectura de las perlas mediante el equipo Luminex® 100, se emplea el software HLA Fusion 2.0, instalado en el mismo equipo (figura 22).

Seleccionar el módulo de LABType, para la interpretación de la tipificación de HLA por SSO e importar las corridas obtenidas en el equipo Luminex® 100, mediante el icono de folder que aparece en el lado superior derecho de la pantalla (figura 23).

- Las corridas importadas, aparecen en una pestaña del lado izquierdo de la pantalla con letras azules, seleccionarla y esperar a que finalice la interpretación de la lectura de las perlas.
- Seleccionar a un paciente para observar la pantalla de análisis respectiva (figura 24).

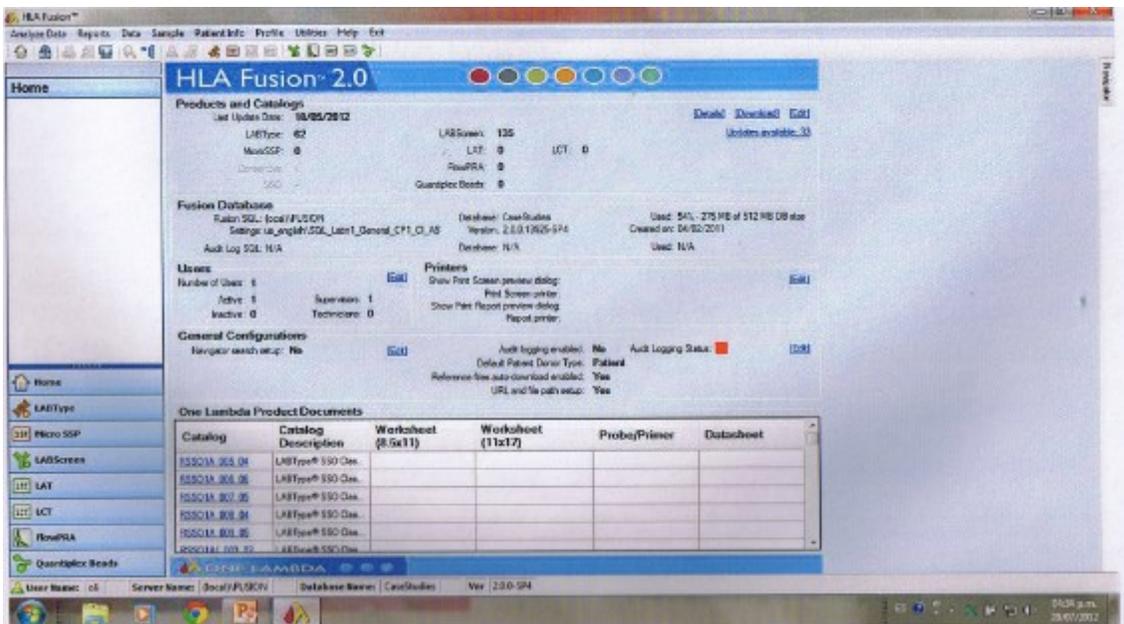


Figura 22. Pantalla de inicio del Software HLA Fusion 2.0

MATERIALES Y MÉTODOS.

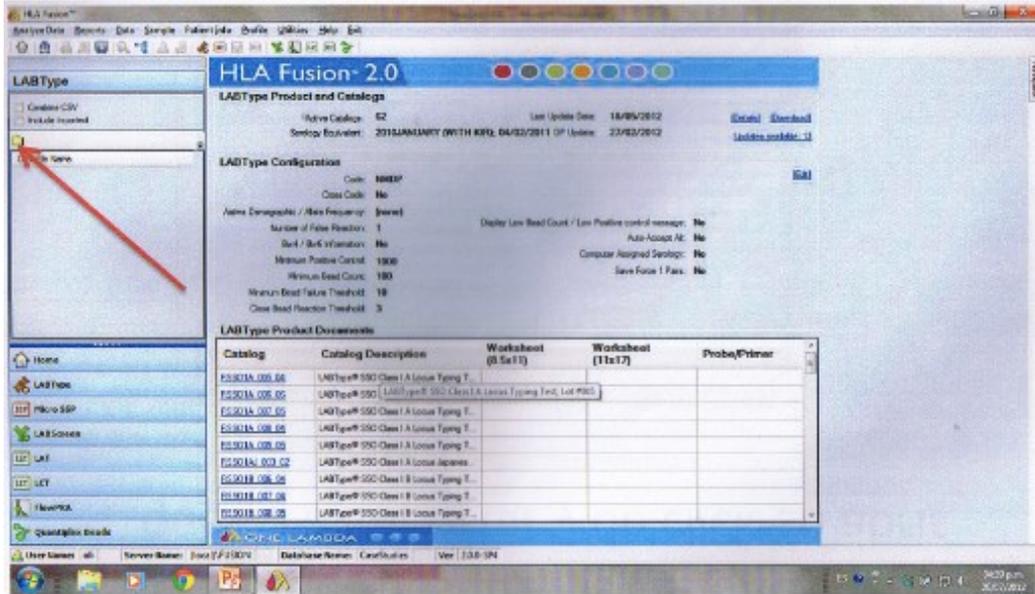
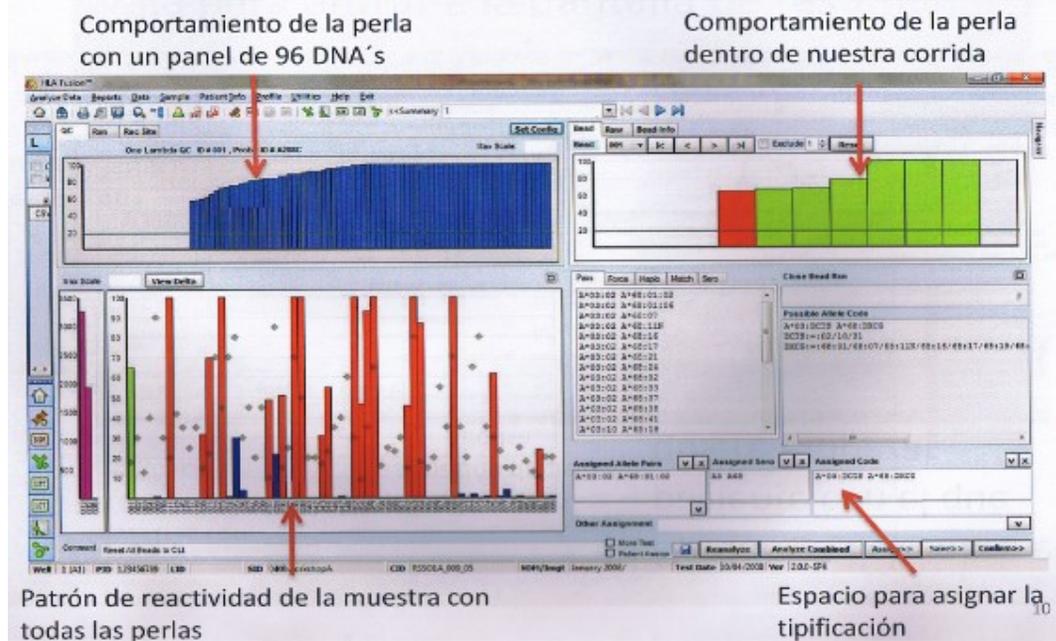


Figura 23. Imagen de la pantalla para importar las corridas del Luminex®.



Comportamiento de la perla con un panel de 96 DNA's

Patrón de reactividad de la muestra con todas las perlas

Comportamiento de la perla dentro de nuestra corrida

Espacio para asignar la tipificación

Figura 24. Pantalla de análisis para muestra en el programa HLA Fusion 2.0

5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se lleva a cabo mediante ecuaciones programadas en el programa Microsoft Excel ⁽³³⁾ y el software Arlequín ⁽³⁴⁾ que maneja grandes cantidades de datos genéticos de poblaciones (fragmentos de restricción de polimorfismo/rflp, secuencias de ADN, microsatélites, etc.) mientras mantiene la capacidad de analizar datos genéticos convencionales (datos estandarizados de multilocus, o datos de frecuencia génica). Tiene implementados una variedad de métodos a nivel intra e inter-población, y pueden seleccionarse y parametrizarse a través de una interfaz gráfica. Este software ha sido diseñado para manipular distintos tipos de datos moleculares convencionales, y también maneja datos presentados en forma de frecuencia genotípica o haplotípica, así como la posibilidad de tratamiento codominante o datos recesivos.

6. RESULTADOS.

TABLA 13. DISTRIBUCIÓN NACIONAL DE LAS USCU.

RESULTADOS.

ESTADO	n	%
BCS	1	0.1
CHIAPAS	5	0.6
CHIHUAHUA	2	0.2
COLIMA	1	0.1
D.F.	422	49.6
DURANGO	1	0.1
EDO. MEX	151	17.7
GUANAJUATO	4	0.5
GUERRERO	13	1.6
HIDALGO	10	1.2
JALISCO	3	0.3
MICHOACÁN	5	0.6
MORELOS	38	4.5
NVO. LEÓN	2	0.2
OAXACA	22	2.6
PUEBLA	102	12
QUERÉTARO	1	0.1
SINALOA	4	0.5
SONORA	2	0.2
TABASCO	4	0.5
TAMAULIPAS	1	0.1
TLAXCALA	7	0.8
VERACRUZ	42	5
YUCATÁN	1	0.1
ZACATECAS	7	0.8
TOTAL	851	100

BCS: Baja California Sur; EDO. MEX: Estado de México.

GRÁFICO 1. DISTRIBUCIÓN NACIONAL DE LAS USCU.

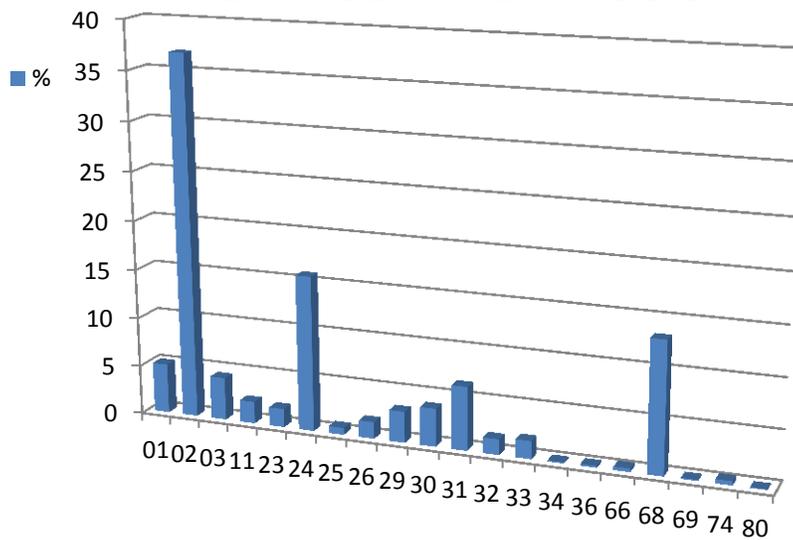


Distribución porcentual de las USCU a nivel nacional.

RESULTADOS.

TABLA 14. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-A			
HLA-A	n	%	Fr (esperada)
01	86	5.06	0.083
02	627	36.84	0.322
03	74	4.35	0.041
11	38	2.23	0.0496
23	32	1.88	0.021
24	269	15.80	0.174
25	12	0.70	0.021
26	29	1.70	0.021
29	54	3.17	0.025
30	66	3.87	0.029
31	110	6.46	0.05
32	27	1.58	0.008
33	31	1.82	0.017
34	2	0.11	0
36	3	0.17	0.004
66	6	0.35	0
68	226	13.27	0.128
69	2	0.11	0.004
74	7	0.41	0
80	1	0.05	0

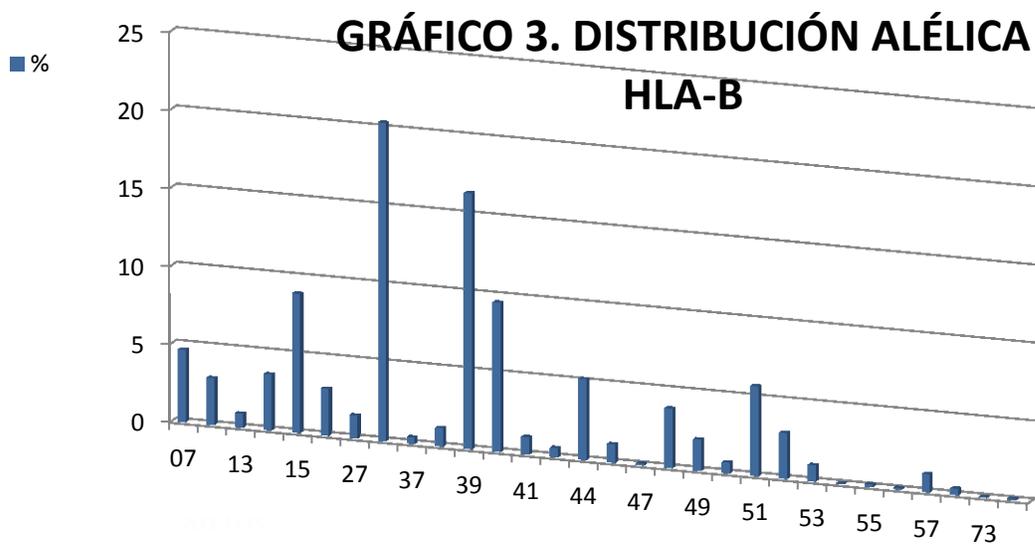
GRÁFICO 2. DISTRIBUCIÓN ALELICA HLA-A



Distribución porcentual del alelo HLA-A a nivel nacional.

RESULTADOS.

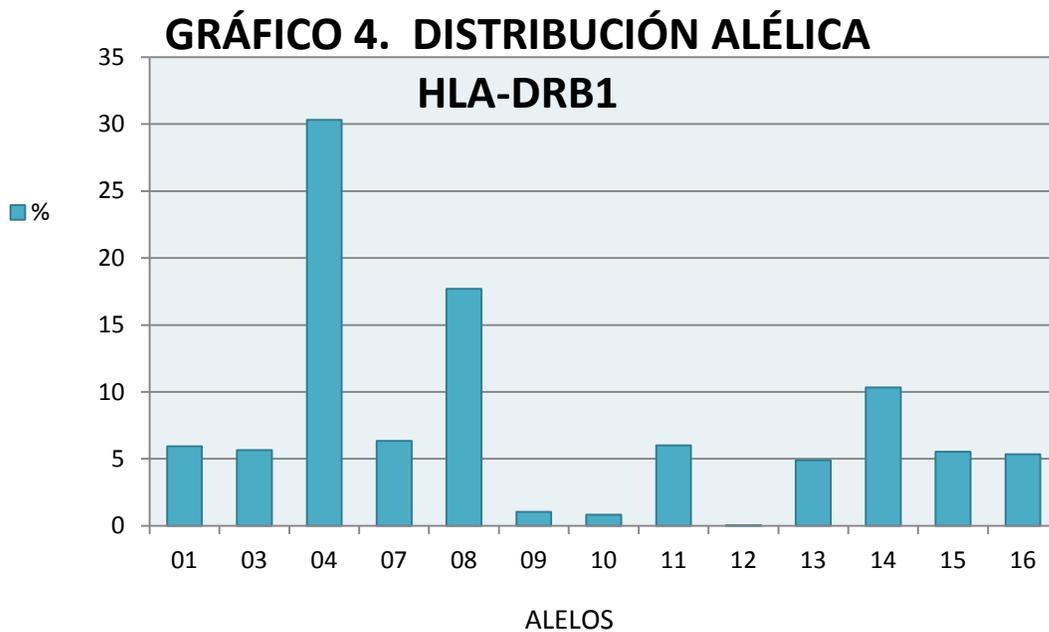
TABLA 15. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-B			
HLA-B	n	%	Fr (esperada)
07	79	4.65	0.033
08	51	3.0	0.037
13	15	0.89	0.004
14	61	3.59	0.061
15	152	8.94	0.171
18	51	3.0	0.021
27	25	1.47	0.017
35	347	20.39	0.198
37	7	0.41	0.004
38	20	1.18	0.021
39	279	16.40	0.095
40	163	9.58	0.061
41	19	1.12	0.025
42	10	0.59	0.004
44	88	5.18	0.062
45	20	1.18	0.008
47	2	0.11	0
48	65	3.82	0.029
49	34	2	0.041
50	12	0.70	0.012
51	98	5.76	0.079
52	50	2.94	0.017
53	18	1.05	0.012
54	1	0.05	0
55	3	0.17	0.012
56	2	0.11	0
57	20	1.17	0.021
58	7	0.41	0.012
73	1	0.05	0
81	2	0.11	0



Distribución porcentual del alelo HLA-B a nivel nacional.

RESULTADOS.

TABLA 16. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DRB1			
HLA-DRB1	n	%	Fr (esperada)
01	101	5.94	0.07
03	96	5.64	0.083
04	516	30.32	0.26
07	108	6.34	0.095
08	302	17.74	0.112
09	18	1.05	0.008
10	14	0.82	0.012
11	102	6	0.05
12	1	0.05	0.021
13	83	4.88	0.095
14	176	10.34	0.099
15	94	5.53	0.05
16	91	5.34	0.046

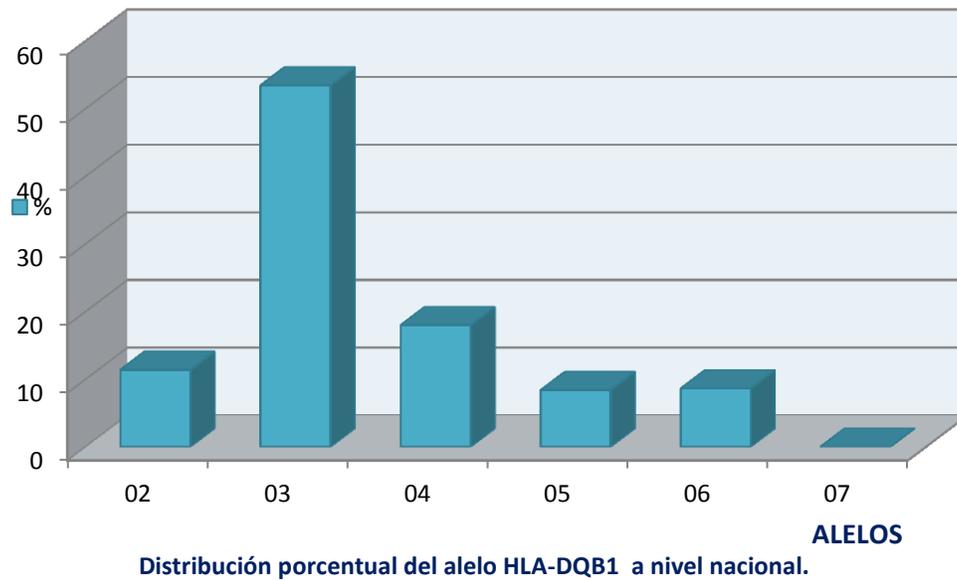


Distribución porcentual del alelo HLA-DRB1 a nivel nacional.

RESULTADOS.

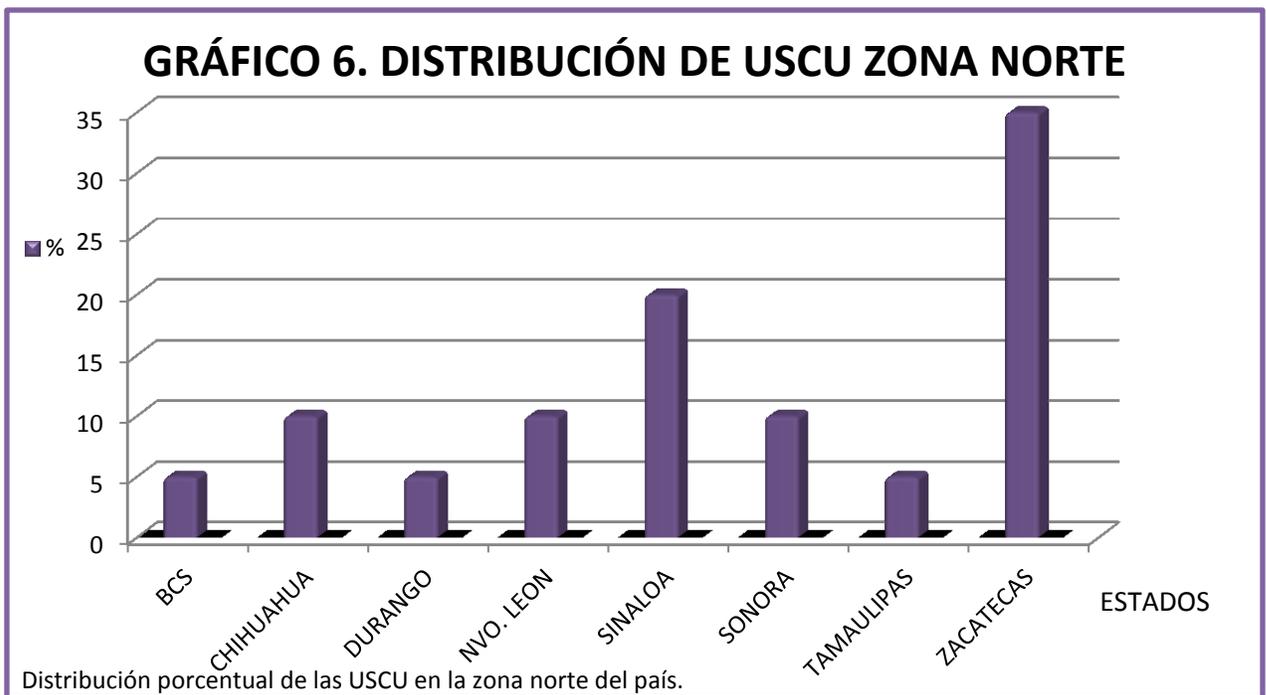
TABLA 17. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DQB1		
HLA-DQB1	n	FR
02	191	11.40
03	896	53.47
04	302	18.01
05	141	8.42
06	145	8.65
07	1	0.05

GRÁFICO 5. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA HLA-DQB1



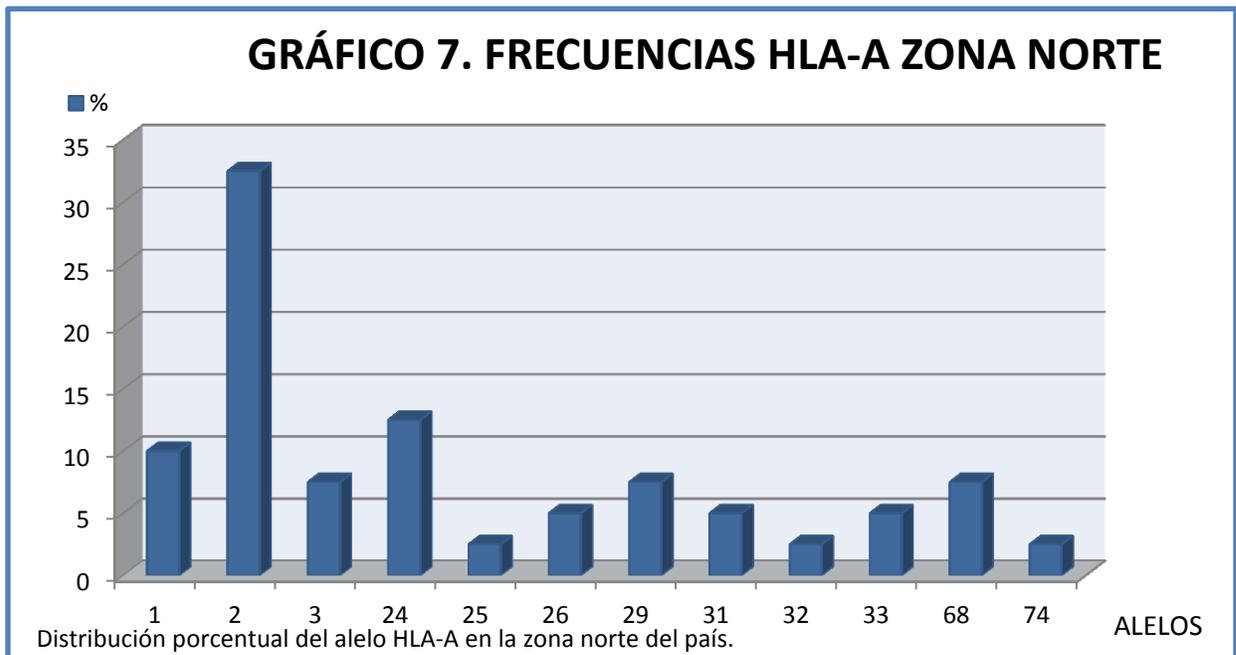
RESULTADOS.

TABLA 18. DISTRIBUCIÓN DE LAS USCU EN LA ZONA NORTE DE MÉXICO.		
ESTADO	n	%
BCS	1	5
CHIHUAHUA	2	10
DURANGO	1	5
NVO. LEÓN	2	10
SINALOA	4	20
SONORA	2	10
TAMAULIPAS	1	5
ZACATECAS	7	35
TOTAL	20	100



RESULTADOS.

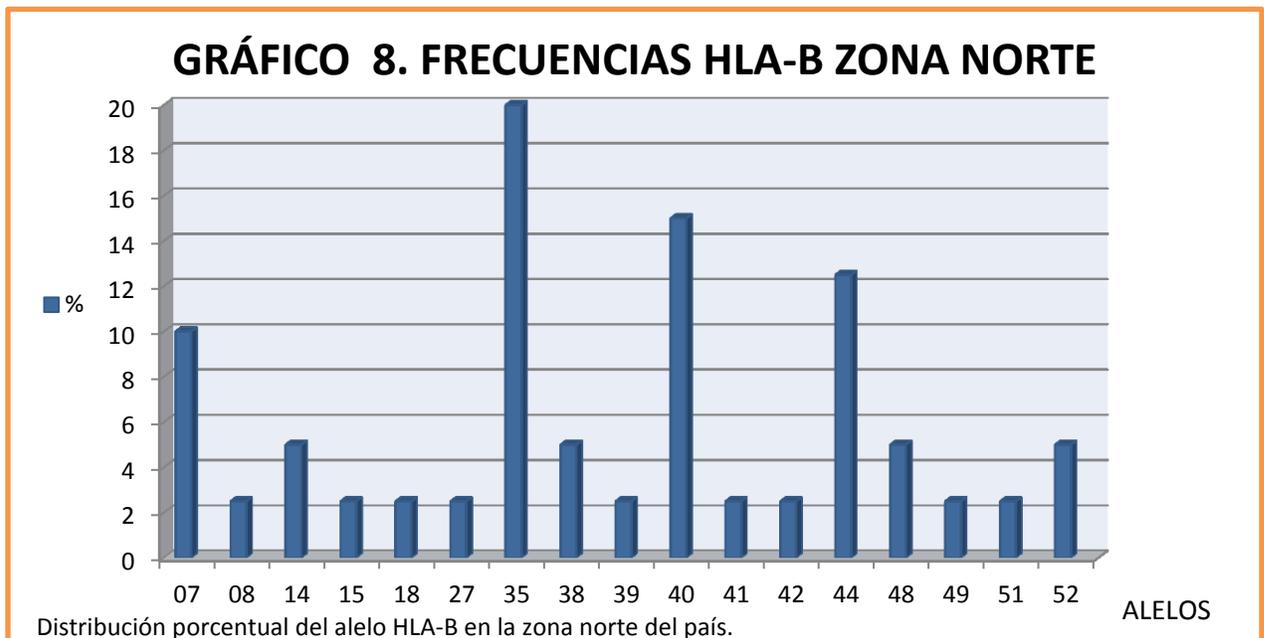
TABLA 19. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-A EN LA ZONA NORTE DE MÉXICO.			
HLA-A	n	%	Fr (esperada)
01	4	10	0.083
02	13	32.5	0.322
03	3	7.5	0.041
24	5	12.5	0.174
25	1	2.5	0.021
26	2	5	0.021
29	3	7.5	0.025
31	2	5	0.05
32	1	2.5	0.008
33	2	5	0.017
68	3	7.5	0.128
74	1	2.5	0
TOTAL	40	100	0.083



RESULTADOS.

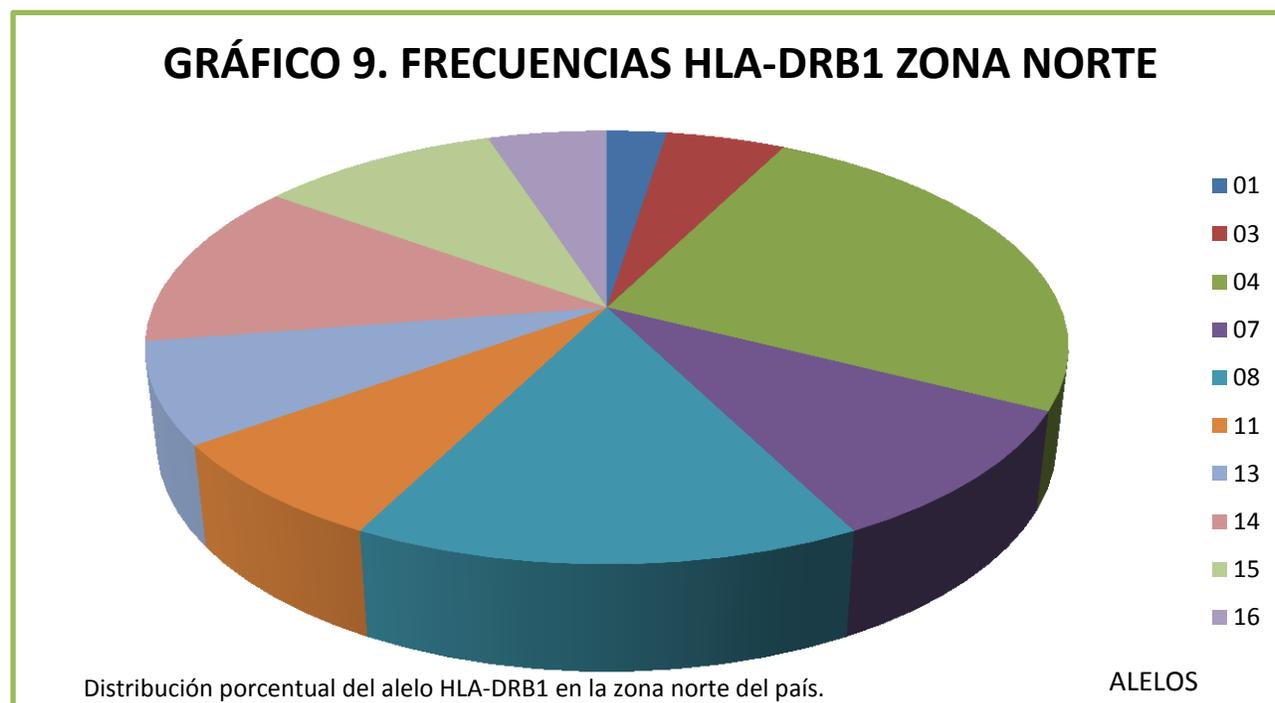
TABLA 20. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-B EN LA ZONA NORTE DE MÉXICO.

HLA-B	n	%	Fr (esperada)
07	4	10	0.033
08	1	2.5	0.037
14	2	5	0.061
15	1	2.5	0.171
18	1	2.5	0.021
27	1	2.5	0.017
35	8	20	0.198
38	2	5	0.021
39	1	2.5	0.095
40	6	15	0.061
41	1	2.5	0.025
42	1	2.5	0.004
44	5	12.5	0.062
48	2	5	0.029
49	1	2.5	0.041
51	1	2.5	0.079
52	2	5	0.017



RESULTADOS.

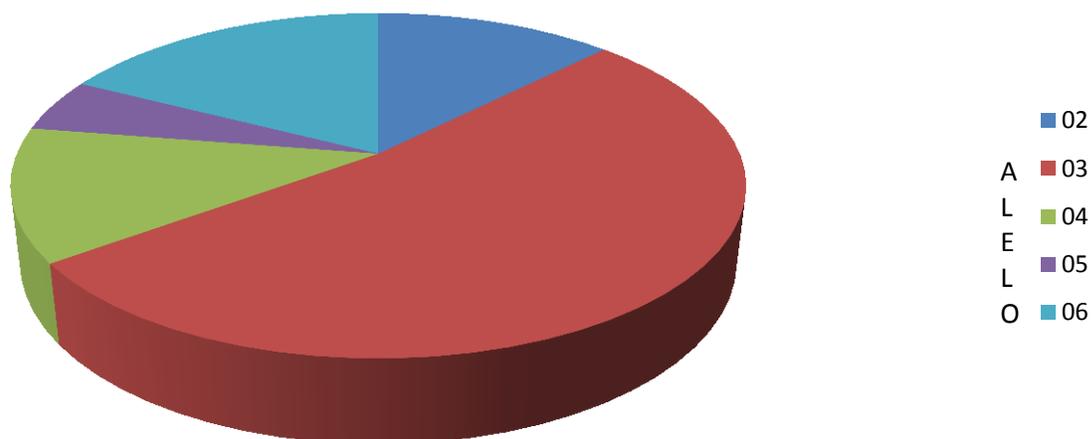
TABLA 21. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DRB1 EN LA ZONA NORTE DE MÉXICO.			
HLA-DRB1	n	%	Fr (esperada)
01	1	2.5	0.07
03	2	5	0.083
04	10	25	0.26
07	4	10	0.095
08	6	15	0.112
11	3	7.5	0.05
13	3	7.5	0.095
14	5	12.5	0.099
15	4	10	0.05
16	2	5	0.046



RESULTADOS.

TABLA 22. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DQB1 EN LA ZONA NORTE DE MÉXICO.			
HLA-DQB1	n	%	Fr (esperada)
02	5	12.5	0.169
03	21	52.5	0.236
04	5	12.5	0.112
05	2	5	0.136
06	7	17.5	0.107

GRÁFICO 10. FRECUENCIAS HLA-DQB1 ZONA NORTE



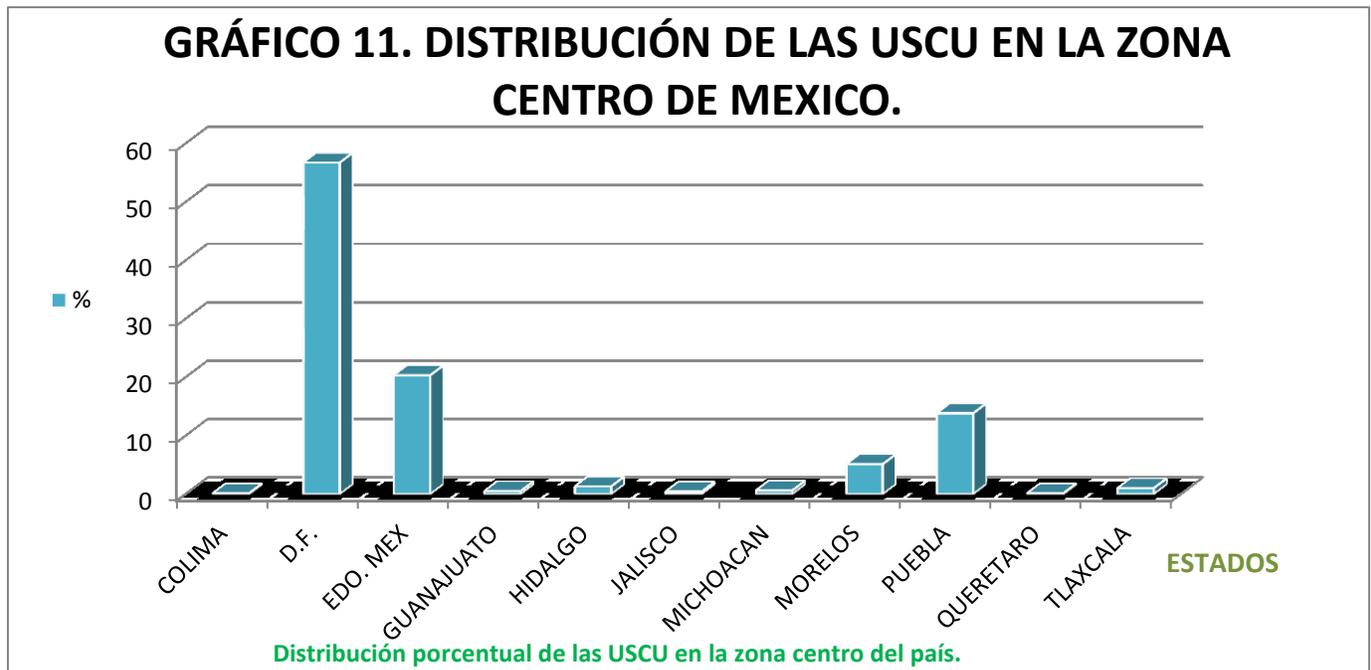
Distribución porcentual del alelo HLA-DQB1 en la zona norte del país.

RESULTADOS.

TABLA 23. DISTRIBUCIÓN DE LAS USCU EN LA ZONA CENTRO DE MÉXICO.

ESTADO	n	%
COLIMA	1	0.13
D.F.	422	56.7
EDO. MEX	151	20.3
GUANAJUATO	4	0.5
HIDALGO	10	1.3
JALISCO	3	0.4
MICHOACÁN	5	0.6
MORELOS	38	5.1
PUEBLA	102	13.8
QUERÉTARO	1	0.13
TLAXCALA	7	1.0
TOTAL	744	100

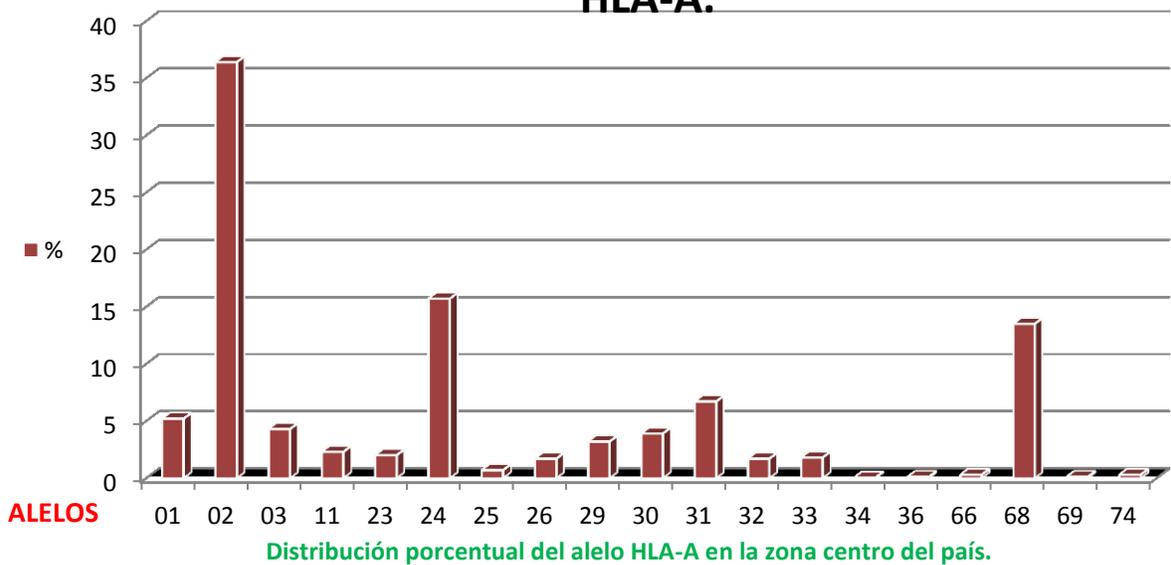
GRÁFICO 11. DISTRIBUCIÓN DE LAS USCU EN LA ZONA CENTRO DE MEXICO.



RESULTADOS.

TABLA 24. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-A EN LA ZONA CENTRO DE MÉXICO.			
HLA-A	n	%	Fr (esperada)
01	78	5.2	0.083
02	542	36.4	0.322
03	64	4.3	0.041
11	35	2.3	0.0496
23	30	2.0	0.021
24	233	15.7	0.174
25	10	0.7	0.021
26	26	1.7	0.021
29	48	3.2	0.025
30	58	3.9	0.029
31	99	6.7	0.05
32	25	1.7	0.008
33	27	1.8	0.017
34	1	0.06	0
36	2	0.1	0.004
66	4	0.3	0
68	200	13.5	0.128
69	2	0.1	0.004
74	4	0.3	0

GRÁFICO 12. DISTRIBUCIÓN EN LA ZONA CENTRO DE HLA-A.

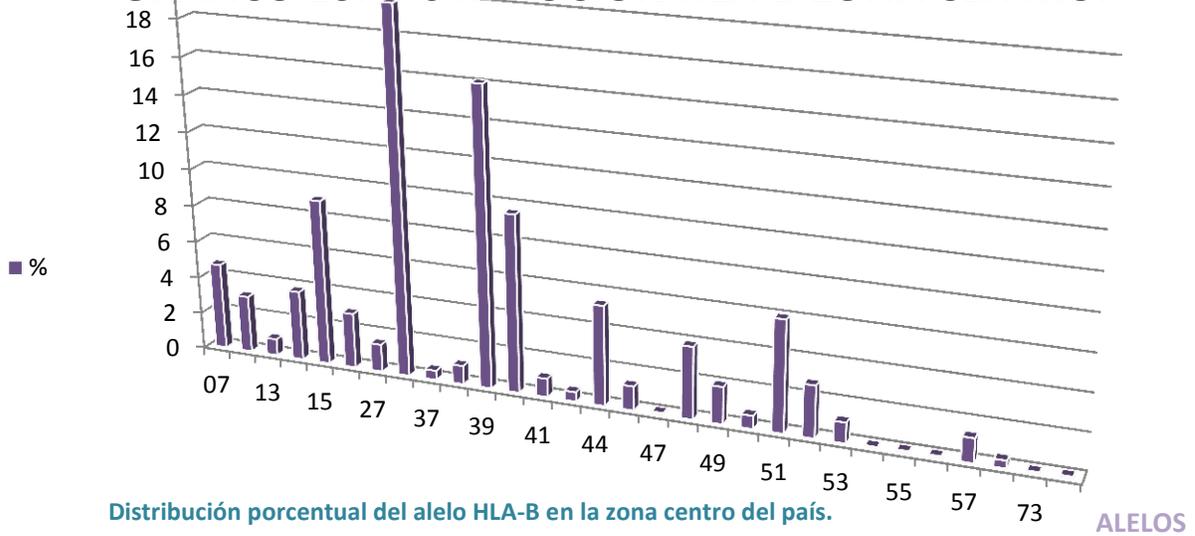


RESULTADOS.

TABLA 25. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-B EN LA ZONA CENTRO DE MÉXICO.

HLA-B	n	%	Fr (esperada)
07	70	4.7	0.033
08	46	3.1	0.037
13	14	0.9	0.004
14	56	3.8	0.061
15	134	9.0	0.171
18	44	3.0	0.021
27	23	1.5	0.017
35	294	19.7	0.198
37	7	0.5	0.004
38	15	1.0	0.021
39	240	16.1	0.095
40	143	9.6	0.061
41	15	1.0	0.025
42	8	0.5	0.004
44	80	5.4	0.062
45	20	1.3	0.008
47	2	0.1	0.029
48	57	3.9	0.029
49	29	2.0	0.041
50	10	0.7	0.012
51	89	6.0	0.079
52	43	2.8	0.017
53	16	1.1	0.012
54	1	0.06	0
55	2	0.1	0.012
56	2	0.1	0
57	19	1.3	0.021
58	6	0.4	0.012
73	1	0.06	0
81	2	0.1	0

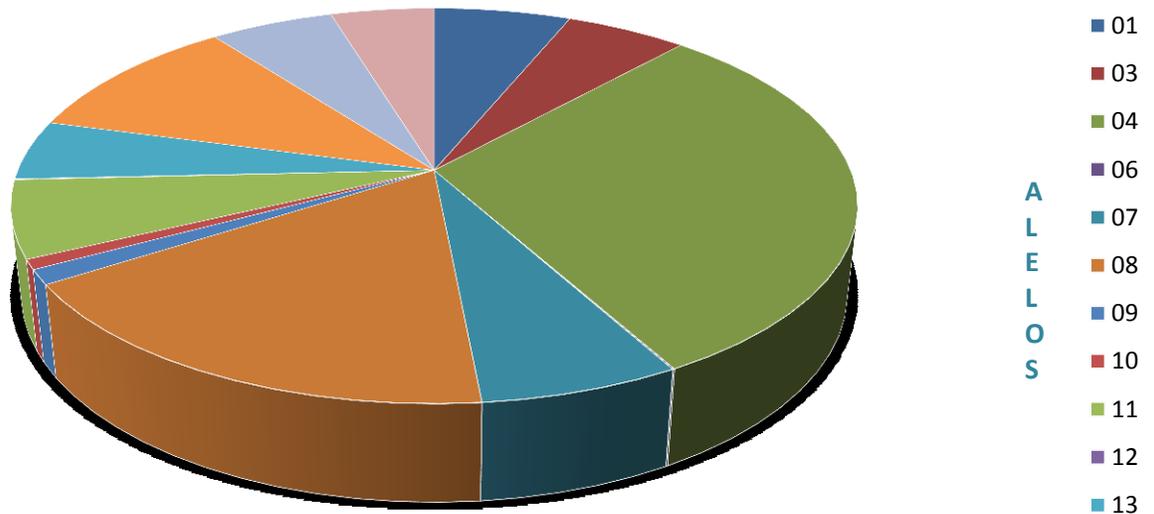
GRÁFICO 13. DISTRIBUCIÓN HLA-B ZONA CENTRO.



RESULTADOS.

TABLA 26. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DRB1 EN LA ZONA CENTRO DE MÉXICO.			
HLA-DRB1	n	%	Fr (esperada)
01	92	6.2	0.07
03	82	5.5	0.083
04	449	30.2	0.26
07	96	6.5	0.095
08	260	17.47	0.112
09	18	1.2	0.008
10	13	0.8	0.012
11	94	6.3	0.05
12	1	0.06	0.021
13	73	4.9	0.095
14	157	10.5	0.099
15	83	5.6	0.05
16	70	4.7	0.046

GRÁFICO 14. DISTRIBUCIÓN HLA-DRB1 ZONA CENTRO

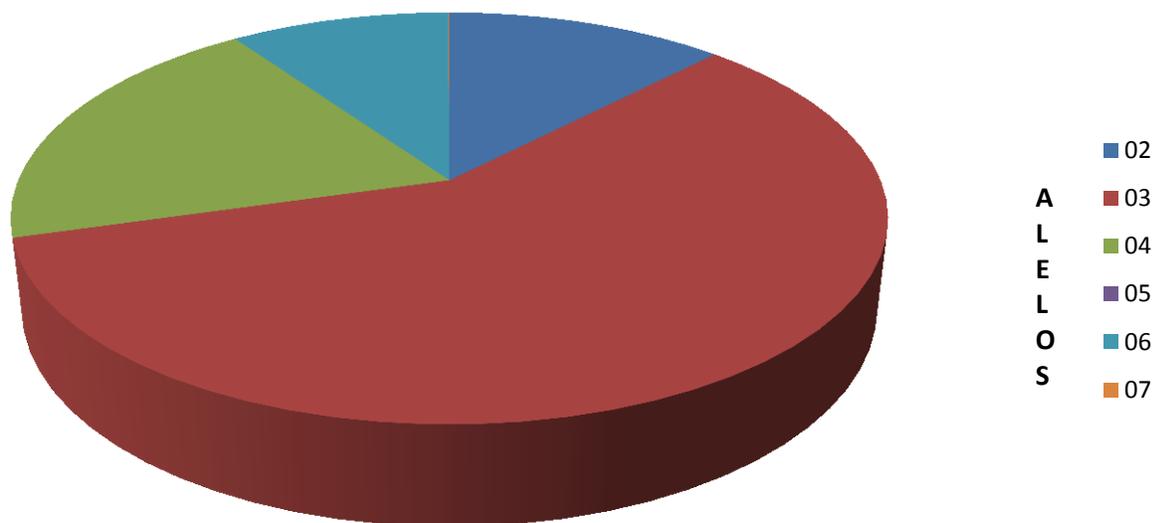


Distribución porcentual del alelo HLA-DRB1 en la zona centro del país.

RESULTADOS.

TABLA 27. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DQB1 EN LA ZONA CENTRO DE MÉXICO.			
HLA-DQB1	n	%	Fr (esperada)
02	166	11.2	0.169
03	787	53.2	0.236
04	267	18	0.112
05	127	8.6	0.136
06	130	8.8	0.107

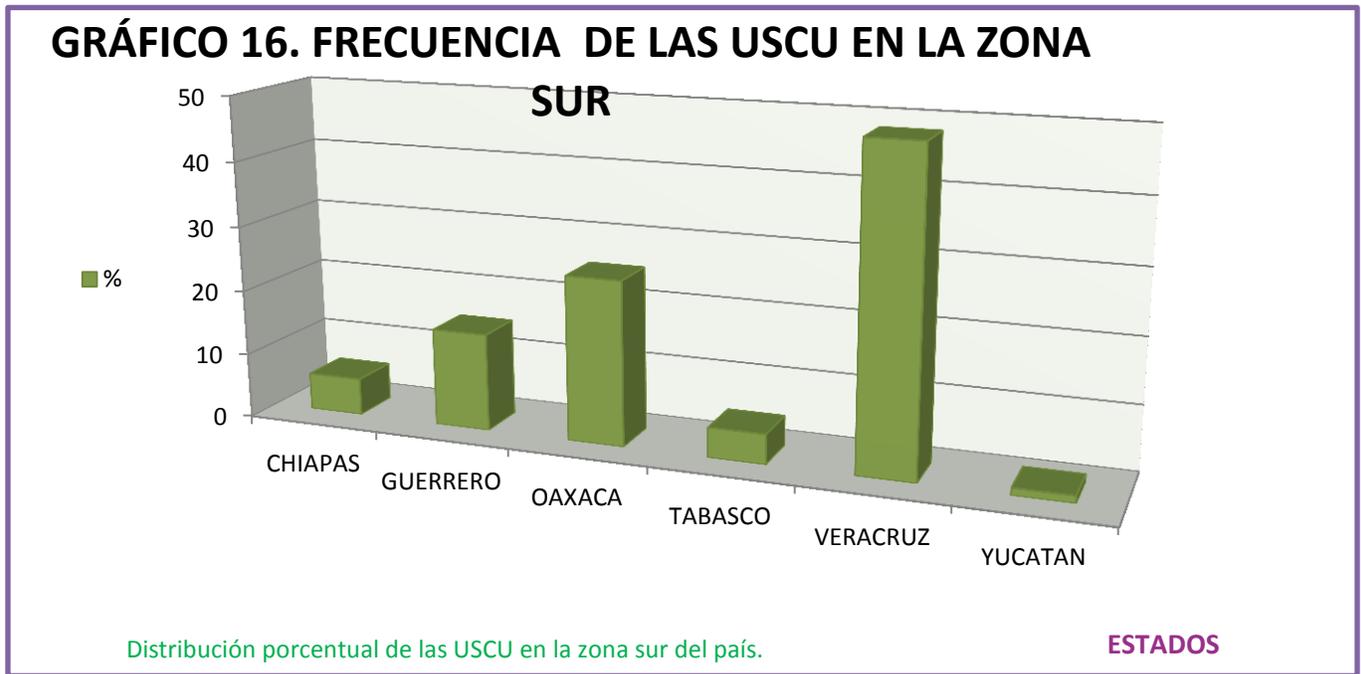
GRÁFICO 15. DISTRIBUCIÓN HLA-DQB1 ZONA CENTRO.



Distribución porcentual del alelo HLA-DQB1 en la zona centro del país.

RESULTADOS.

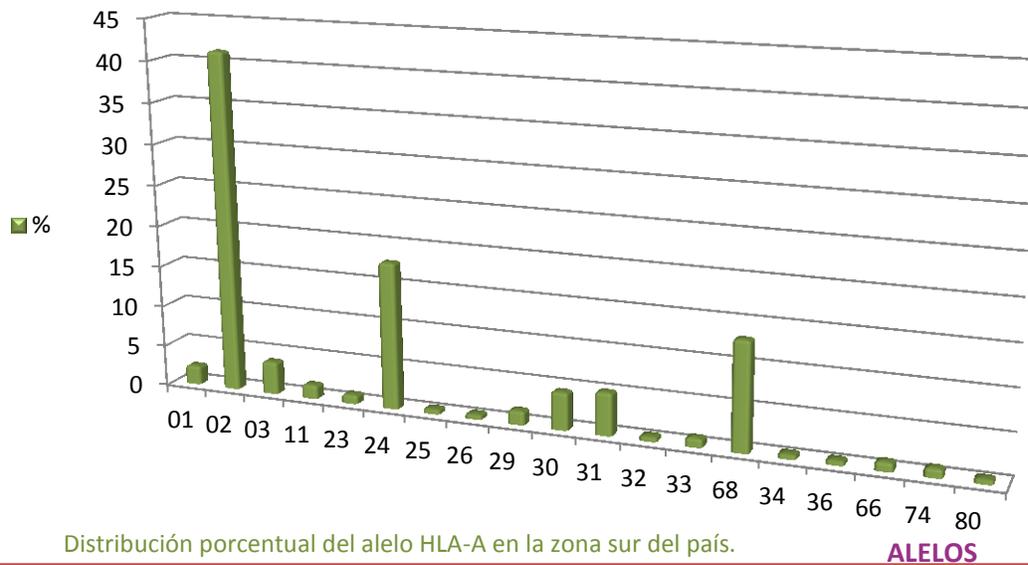
TABLA 28. DISTRIBUCIÓN DE LAS USCU EN LA ZONA SUR DE MÉXICO.		
ESTADO	n	%
CHIAPAS	5	5.7
GUERRERO	13	15
OAXACA	22	25.3
TABASCO	4	4.6
VERACRUZ	42	48.3
YUCATÁN	1	1.1



RESULTADOS.

TABLA 29. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-A EN LA ZONA SUR DE MÉXICO.			
HLA-A	n	%	Fr (esperada)
01	4	2.3	0.083
02	72	41.4	0.322
03	7	4	0.041
11	3	1.7	0.0496
23	2	1.1	0.021
24	31	17.9	0.174
25	1	0.6	0.021
26	1	0.6	0.021
29	3	1.7	0.025
30	8	4.6	0.029
31	9	5.2	0.05
32	1	0.6	0.008
33	2	1.1	0.017
34	1	0.6	0.004
36	1	0.6	0
66	2	1.1	0.128
68	23	13.2	0
74	2	1.1	0
80	1	0.6	0

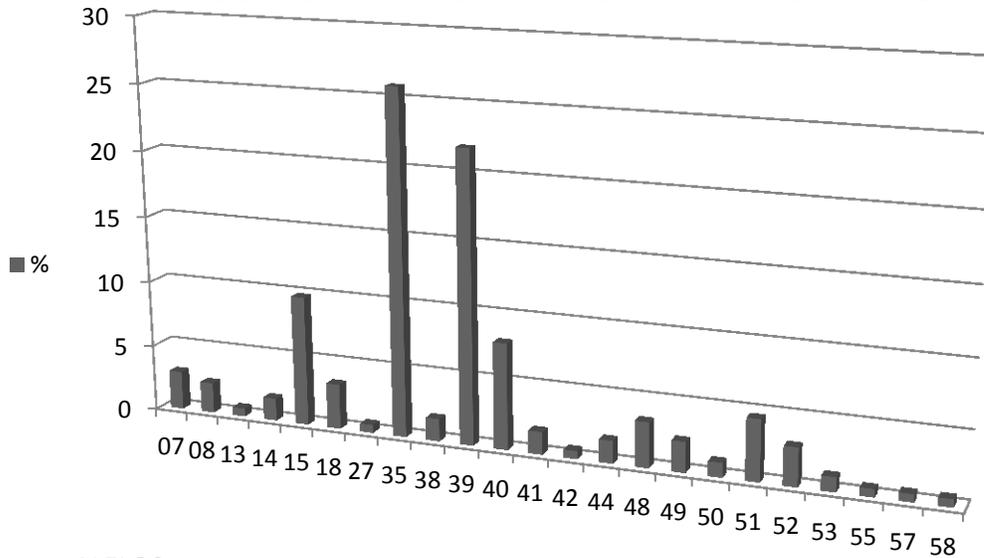
GRÁFICO 17. FRECUENCIAS HLA-A ZONA SUR.



RESULTADOS.

TABLA 30. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-B EN LA ZONA SUR DE MÉXICO.			
HLA-B	n	%	Fr (esperada)
07	5	2.9	0.033
08	4	2.3	0.037
13	1	0.6	0.004
14	3	1.7	0.061
15	17	9.8	0.171
18	6	3.4	0.021
27	1	0.6	0.017
35	45	25.9	0.198
38	3	1.7	0.021
39	38	21.9	0.095
40	14	8.0	0.061
41	3	1.7	0.025
42	1	0.6	0.004
44	3	1.7	0.062
48	6	3.4	0.029
49	4	2.3	0.041
50	2	1.1	0.012
51	8	4.6	0.079
52	5	2.9	0.017
53	2	1.1	0.012
55	1	0.6	0.012
57	1	0.6	0.021
58	1	0.6	0.012

GRÁFICO 18. FRECUENCIAS HLA-B ZONA SUR.

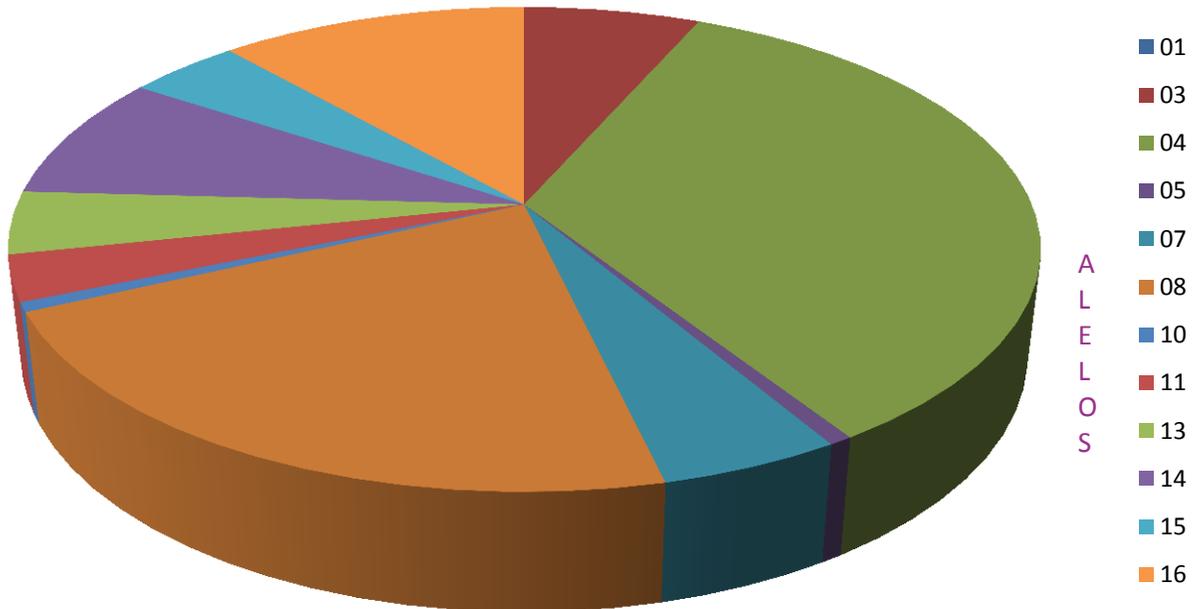


ALELOS Distribución porcentual del alelo HLA-B en la zona sur del país.

RESULTADOS.

TABLA 31. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DRB1 EN LA ZONA SUR DE MÉXICO.			
HLA-DRB1	n	%	Fr (esperada)
01	8	4.6	0.07
03	12	6.8	0.083
04	57	32.7	0.26
07	8	4.6	0.095
08	36	20.7	0.112
10	1	0.6	0.012
11	5	2.9	0.05
13	7	4.0	0.095
14	14	8.0	0.099
15	7	4.0	0.05
16	19	11.0	0.046

GRÁFICO 19. FRECUENCIA HLA-DRB1 ZONA SUR.

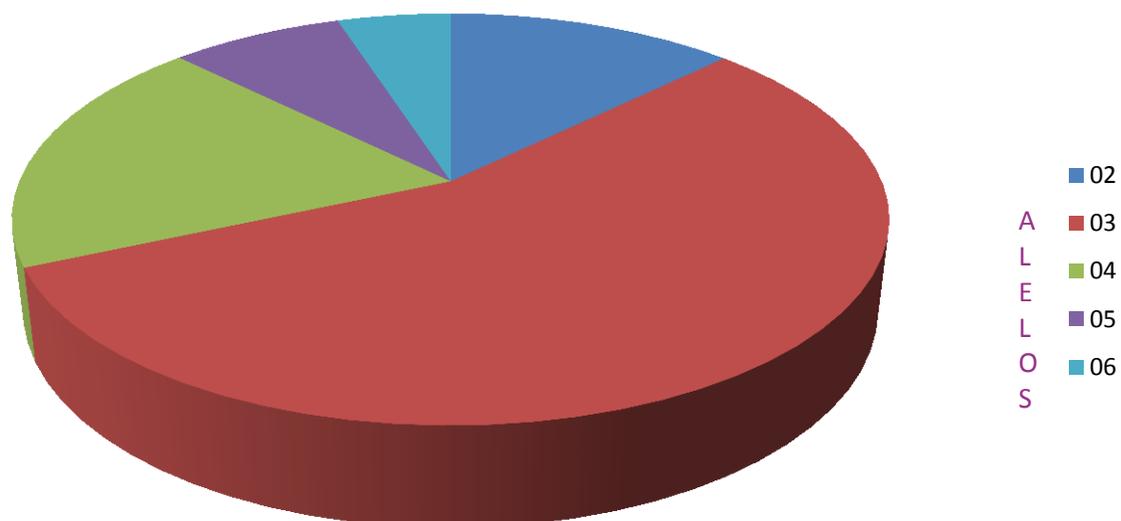


Distribución porcentual del alelo HLA-DRB1 en la zona sur del país.

RESULTADOS.

TABLA 32. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS HLA-DQB1 EN LA ZONA SUR DE MÉXICO.			
HLA-DQB1	n	%	Fr (esperada)
02	20	12.7	0.169
03	88	55.7	0.236
04	30	19.0	0.112
05	12	7.6	0.136
06	8	5.0	0.107

GRÁFICO 20. FRECUENCIA HLA-DQB1 ZONA SUR.



7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

“Para 2013, hay más de 22 millones de voluntarios registrados en 66 registros mundiales y 46 bancos mundiales altruistas de Cordón Umbilical; se necesita un promedio de 4 meses para completar una búsqueda y que resulte en un trasplante.

Un número indefinido de pacientes sucumben por su enfermedad, en espera de la identificación de un donante adecuado compatible HLA y más de la mitad de las búsquedas que se inician fracasan en la búsqueda de un donante compatible para minorías étnicas.

Por estos motivos, el desafío más importante en la identificación de un donante compatible es la bien conocida diversidad genética del MHC.” [Gorodezky Clara, 2013]⁽³⁵⁾

Las frecuencias génicas entre poblaciones cambian por múltiples fenómenos, se pensaría que poblaciones aisladas geográficamente o con algún arraigo cultural (religión, lenguaje, entre otras.) se pueden caracterizar, identificar y diferenciar genéticamente de otras poblaciones, ya que el nivel de endogamia es mayor que en la población general y la inmigración se ve disminuida por el difícil acceso, de hecho se han reportado genes HLA autóctonos, especialmente clase II. Pero los hechos indican lo contrario; por ejemplo, los grupos indígenas mexicanos son heterogéneos, principalmente porque se han mezclado con poblaciones extranjeras durante los últimos 500 años y esto ha derivado en un mestizaje que ha cambiado a lo largo del tiempo, aunado a esto las actuales características de educación y estilos de vida, hacen mayores los cambios y combinaciones genéticas debidas a las migraciones poblacionales constantes.

De ahí que en el 2009 México contará con cerca de un 15% relativo de fenotipos únicos HLA-A,-B-DR⁽³⁵⁾.

La heterogeneidad del acervo genético poblacional mexicano, es un asunto bastante complejo. No sólo se debe tomar en cuenta la contribución de al menos tres fuentes principales de alelos: América, Europa y África, sino también el factor único del mestizaje, que, además de modificar las frecuencias alélicas de generación en generación, puede generar nuevos haplotipos y modificar las asociaciones entre alelos de HLA. Dentro de este

peculiar acervo genético, se han encontrado representantes de prácticamente todos los grupos de alelos principales de este sistema ⁽¹¹⁾.

Se debe entender que entre los alelos presentes en nuestra población, hay algunos que son específicos de determinados grupos humanos, por ejemplo: nativos americanos, africanos, norafricanos, europeos, asiáticos de Oriente Medio y Lejano Oriente o habitantes nativos de Australia e islas del Océano Pacífico y algunos otros que han conservado su presencia en muchas de las poblaciones humanas desde su dispersión a partir de los primeros grupos que salieron de África hace unos 50,000 o 60,000 años⁽¹¹⁾; dentro del sistema HLA sobresalen los alelos HLA-A*02, -A*24, -A*68 y -B*35 como ejemplo de variantes que han viajado con la humanidad desde que dejó su cuna geográfica en el Este de África.

Algunos más se encuentran presentes en los grupos humanos nativos que habitaban grandes extensiones geográficas desde antes de las expansiones coloniales de los siglos XVI a XIX: el alelo HLA-DRB1*04 se encuentra en grupos europeos, asiáticos y nativos americanos; el alelo -B*39, en asiáticos y nativos americanos; alelos del grupo -B*14, distribuidos por el llamado Viejo Mundo, y las variantes del alelo -DRB1*03, en grupos africanos subsaharianos o norafricanos, europeos y mediorientales.

Pero también hay algunos alelos restringidos a ciertas poblaciones o grupos humanos, como el HLA-B*47 encontrado en grupos judíos, el alelo HLA-B*46 de los grupos del Este Asiático (japoneses, chinos, etc.) o el subtipo DRB1*14:02 encontrado en grupos nativos de América, en particular en América del Norte.

Además, no debemos olvidar que el sistema continuamente arroja nuevos alelos, ya sea por mutaciones puntuales, recombinación o conversión génica, lo que hace más complicado el panorama genético poblacional.

También la frecuencia de los alelos juega un papel importante en la interpretación de los datos.

La simple presencia de un alelo en una región geográfica no nos dice mucho sobre su origen y dispersión; sin embargo, la frecuencia de un alelo nos

puede decir un poco más sobre la trayectoria que ha seguido e incluso algunas cuestiones sobre selección de esa variante en particular.

Así, el hecho de encontrar alelos en todo el mundo, pero con mayor frecuencia en ciertas regiones, nos guía a un posible grupo humano que portaba la variante original y cómo se dispersa alrededor de su sitio de origen.

Las asociaciones entre alelos, características del sistema HLA, son una manera más precisa de estimar el grado de mestizaje en una población y dibujar los movimientos poblacionales a través de la geografía del planeta.

Más importante aún, la distribución de los alelos predominantes en nuestra muestra estudiada revela grandes semejanzas con los de Oriente, África y USA.

HLA-A

En nuestra muestra hemos hallado un total de 20 alelos HLA-A; a pesar de este relativo bajo número, el polimorfismo total del sistema es muy elevado, teniendo una enorme trascendencia en la búsqueda de donantes; para poder tener un panorama despejado las muestras fueron divididas en 3 secciones, quedando de la siguiente forma:

Zona norte de México queda comprendida por los estados de: Baja California Sur, Chihuahua, Durango, Nuevo León, Sinaloa; Sonora, Tamaulipas y Zacatecas.

Zona Centro de México: Colima, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala.

Zona Sur de México: Chiapas, Guerrero, Oaxaca; Tabasco, Veracruz y Yucatán.

Comprendiendo los datos estadísticos a nivel República los seis alelos más frecuentes:

A*02*, 24, *68, *31, *01,*03, representaban por sí solos el 81.78 % de todos los alelos definidos para HLA-A en esta población. Similares porcentajes fueron notificados por estudios realizados en poblaciones próximas o aquellas en que los registros tienen mayor número de donantes.

Al realizar una comparativa con las poblaciones estudiadas por Barquera ⁽¹¹⁾ el alelo más frecuente fue A*02 como en la nuestra, este alelo es característico en poblaciones caucásicas, orientales e indoamericanas, al igual que A*31. Respecto al alelo A*24, que es el segundo más presente, parece observarse más frecuentemente en Alaska, Europa y Estados Unidos que en nuestra población, y está ligado a un origen indoamericano, oriental y africano .

A*68 posee un origen caucásico, A*01 caucásico y oriental; A*03 negro, caucásico y oriental.

En contraste, 7 alelos HLA-A de los encontrados mostraron una frecuencia inferior al 1%: A*25, *34, *36, *66, *69, *74, *80, por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra poblacional; sus orígenes son caucásicos; islas del pacífico, aborigen australiano; africanos; hispanos y orientales.

En la zona norte del país, se denota la presencia de los alelos A*02, *24 y *01; cuyos orígenes son similares, geográficamente el norte del país es la vía de comunicación con USA, permitiendo la migración y las características genéticas asociadas a poblaciones caucásicas.

El centro del país, es la zona con mayor afluencia poblacional debido a su céntrica posición y urbanismo, en esta región los alelos *02 y *24 siguen encabezando las frecuencias junto al alelo *68, de igual forma el origen caucásico es característico, recordando que los estados que forman el centro del país fueron parte de la historia del mestizaje colonial.

Por parte del sur de nuestro país, obtuvimos las frecuencias características de A*02, *24 Y *68, pero se aprecia la incidencia de los alelos *30; *31 y *03; aquí los orígenes orientales, africanos y caucásicos se hacen presentes.

HLA-B

Hemos encontrado 30 alelos en nuestra población que sólo representan el 57.5% para HLA-B. Este es el locus en el cual existe más polimorfismo; así, a diferencia de HLA-A, cuando se escogen los seis alelos más frecuentes apenas se alcanza a superar el 50% de la población (por casi el 81% en A). De igual o mayor interés, resultan los 11 alelos HLA-B que mostraron una frecuencia inferior al 1%: HLA-B*13, *37, *42, *47, *50, *54, *55, *56, *58, *81, *73, por lo que se deben considerar alelos raros en esta muestra.

Estos alelos raros, deben ser considerados como indicación de inicio de búsqueda familiar ampliada. Ya que su presencia sin necesidad de otros factores dificultan la búsqueda de donante, para aquellos casos que requieren del trasplante como único recurso.

En nuestra población es relativamente frecuente B*35, al igual que en poblaciones de Argentina o Bolivia, siendo muy raro en países como Malasia; B*39 cuyo origen étnico es indoamericano y oriental; B*40 comparte el origen oriental aunado a uno caucásico.

Los alelos B*54 y *73 son los de menos incidencia dentro de los alelos de baja incidencia, ya que solo se cuenta con una muestra de cada uno, presentándose ampliamente en China o Japón, e Italia, respectivamente, esta baja incidencia dentro de nuestra población es debida a las migraciones y la preservación genética basada en las características del efecto fundador y presión selectiva, ya que al ser punto de reunión de distintas variantes caucásicas durante la colonia, actualmente en este trabajo solo contamos con una muestra de estos alelos. Basándonos en las diferentes bases de datos genéticos, se tipificó una frecuencia del 3% del alelo B*18, caracterizado con un origen mestizo

La zona norte, está caracterizada por B*35, *40 y *44; la alta incidencia de estos alelos es visible en países como Argentina; India y Marruecos, respectivamente, la zona centro B*35, *39 y *40, el alelo B*39 nos remonta a orígenes indoamericanos y orientales, estando presente actualmente en países como Bolivia o Camerún, más que en nuestra población.

Por la parte sur del país continuamos con la alta incidencia de B*35 Y *40, siendo B*15 el alelo que marca la diferencia, en la división por zonas pero con orígenes similares a los del alelo B*39.

HLA-DRB1

Se han tipificado 14 alelos comunes en nuestra población del gen HLA-DRB1; siendo los más prevalentes DRB1*04, *08; *14 Y *07 por tanto estos 4 alelos están representando sólo el 64.8% de todos los alelos encontrados, solo 3 alelos se encuentran en una incidencia menor al 1% DRB1*10 y *12, quedando caracterizados como alelos raros en nuestra población.

Así mismo el alelo DRB1*04 se encuentra con gran similitud en poblaciones indígenas como los Mazatecos o Mayas y aparece en otras poblaciones relativamente cercanas geográficamente como Brasil y Costa Rica, esta similitud es derivada de los movimientos poblacionales llevados a cabo durante la época prehispánica, en donde los grupos indígenas de México migraban hacia el sur, en busca de mejores condiciones de vida.

La zona norte del país, mantiene la prevalencia de los alelos *04 y *08, variando en la incidencia del DRB1*07, contando con una mayor frecuencia poblacional en Argentina, Brasil o Australia que en nuestro país; del lado contrario se encuentra el alelo *01 con una baja frecuencia, pero cuyos orígenes son similares: caucásico/oriental; y compartiendo la alta incidencia en los países mencionados.

De igual forma que en los alelos anteriormente descritos, la zona centro del país abarca una mayor diversidad alélica; en la cual se mantiene la prevalencia del alelo característico DRB1*04. Los siguientes alelos son *08 y *14, ambos de origen caucásico y con una mayor prevalencia, nuevamente; en Argentina o Australia. Representando un porcentaje menor a 1 se ubica DRB1*12, con orígenes muy céntricos a las primeras migraciones: africano/oriental/caucásico, siendo la única muestra de esta variante alélica que se encuentra presente en nuestra muestra poblacional.

La zona sur difiere en la alta frecuencia del alelo DRB1*16; nuevamente con un origen caucásico; y su contraparte la frecuencia menor al 1% de la

variante DRB1*10 de origen africano/ oriental y con prevalencia en Bangladesh o India, a diferencia de la escasa frecuencia de nuestro país.

HLA- DQB1

Las asociaciones DRB1-DQB1 son bastante estrictas por lo que un elevado número de parejas donante/receptor compatibles en DRB1 también lo serán en DQB1. Quizás por este motivo, DQB1 no se incluye entre los alelos de obligada tipificación en la selección del donante.

El estudio del locus HLA-DQB1 reveló la presencia de 5 alelos, siendo DQB1*03,*04 y *02 los principales. Por tanto estos 3 alelos representan un 82.9% de toda nuestra población.

De las 6 variantes del alelo DQB1 encontradas en la población todas poseen una frecuencia superior a 8%.

Las 3 variantes principales muestran orígenes caucásicos, indoamericanos, africanos y orientales, el alelo DQB1*03 denota una elevada frecuencia en Argentina, Brasil o Burkina faso, superando la incidencia en nuestra muestra poblacional; la variante *04 es observada en Brasil y en nuestro país, la frecuencia de DQB1*02 a nivel nacional ocupa el tercer lugar, su origen es caucásico y encuentra similitudes de frecuencia alta en países como Albania, Australia o Inglaterra, basándonos en las bases de datos internacionales.

La zona norte del país mantiene la misma frecuencia que a nivel república con los alelos DQB1*04 y *02 con la variante del alelo HLA-DQB1*06 al observar al alelo DQB1*06 se observa con mayor incidencia en Australia, Albania y Bélgica, superando la incidencia reportada para este alelo en nuestra población, en base a los datos internacionales de las variantes alélicas del sistema HLA.

En la zona centro no se observa diferencia en la presencia y frecuencia de los 3 alelos principales a nivel república, ya que se mantiene la incidencia de los alelos DQB1*03,*04 y *02 los principales, manteniendo la misma frecuencia en el sur del país.

Las frecuencias poblacionales obtenidas en nuestra muestra se contrastaron con las frecuencias alélicas esperadas y categorizadas en las bases de datos alélicas internacionales ⁽³⁶⁾ de ahí se hizo posible una comparativa mediante la prueba de chi cuadrado, ya que al ser alelos son variables cualitativas y se emplea una prueba estadística no paramétrica que nos permite entender y determinar si existe o no una relación entre las frecuencias esperadas y las observadas en esta muestra poblacional. Se emplea la fórmula:

$$\chi^2_{calc} = \sum \frac{(f_0 - f_e)^2}{f_e}$$

f_0 : Frecuencia del valor observado.

f_e : Frecuencia del valor esperado.

Las hipótesis formuladas para nuestra población son dos:

H0= Las medias y las varianzas teóricas y observadas son iguales.

H1= Las medias y las varianzas teóricas y observadas no son iguales.

Se corrió una chi cuadrada para una $p \leq .05$, los grados libertad se calcularon (a nivel república y por las 3 zonas antes mencionadas) mediante la siguiente formula: (n-1).

Los datos alélicos se agruparon y se tipifico a nivel república:

HLA	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	χ^2
A	1	0.9976	5.7739E-06
B	0.9983	1.057	0.00325988
DRB1	0.9908	1.001	0.00010394
DQB1	0.9998	0.76	0.07566321

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Observando los valores obtenidos de las muestras esperadas no se observa diferencia significativa entre la chi calculada y la T de tablas, siendo la calculada menor a 0 y a el valor obtenido de tablas, por lo tanto se aceptan las hipótesis nulas, aceptando que las medias y las varianzas teóricas y observadas son iguales, a pesar de que hay poca incidencia de los alelos esperados hay algunos cuya incidencia reportada o esperada es menor a la observada en nuestra muestra, estas variantes de presencia o disminución, es explicada por un factor sencillo: la migración poblacional.

Para poder descartar alguna variante debido a las regiones geográficas, se realiza la prueba de chi cuadrada para las 3 zonas geográficas en las que se divide la presente tipificación alélica.

📍 Zona Norte.

HLA	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	χ^2
A	1	0.89	0.01359551
B	1	0.972	0.00080658
DRB1	1	0.96	0.00166667
DQB1	0.925	0.76	0.03582237

📍 Zona Centro.

HLA	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	χ^2
A	4.297	0.9976	10.9122
B	0.9978	1.086	0.0071632
DRB1	0.9994	1.001	2.5574E-06
DQB1	0.9998	0.76	0.07566321

 Zona Sur.

HLA	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	χ^2
A	0.9988	0.9936	2.7214E-05
B	0.9987	1.045	0.00205138
DRB1	0.9993	0.972	0.00076676
DQB1	0.9997	0.76	0.07560012

Así mismo, al observarse los alelos por zonas geográficas, ocurre lo que se ve reflejado en las frecuencias, no hay diferencia significativa con base a chi cuadrada, ya que los datos de chi calculados siguen siendo menores a los valores de tablas.

Por lo cual se aceptan las hipótesis nulas, para las 3 zonas geográficas.

8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

Después de realizar la base de datos partiendo de las Unidades de Sangre de Cordón Umbilical, almacenadas de 2003 a 2013, en el CNTS, y haber analizado la diversidad genética del HLA se logró determinar la frecuencia de los alelos presentes a nivel república en la población mexicana.

Obteniendo los siguientes alelos predominantes:

-  HLA-A*02, 36.84%.
Origen étnico conocido: Indio americano, caucásico y oriental.
-  HLA-A*24, 15.80%.
Origen étnico conocido: Indio americano, negro y oriental.
-  HLA-A*68, 13.27%.
Origen étnico conocido: Caucasoide.

-  HLA-B*35, 20.39%.
Origen étnico conocido: Caucasoide y oriental.
-  HLA-B*39, 16.40%.
Origen étnico conocido: Indio americano y oriental.
-  HLA-B*40, 9.58%.
Origen étnico conocido: Caucasoide y oriental.

-  HLA-DRB1*04, 30.32%.
Origen étnico conocido: Caucasoide y oriental.
-  HLA-DRB1*08, 17.74%.
Origen étnico conocido: Caucasoide.
-  HLA-DRB1*14, 10.34%.
Origen étnico conocido: Caucasoide.

-  HLA-DQB1*03, 53.47%.
Origen étnico conocido: Indio americano, Negro, caucasoide y oriental.
-  HLA-DQB1*04, 18.01%.
Origen étnico conocido: Oriental.
-  HLA-DQB1*02, 11.40%.
Origen étnico conocido: Caucasoide.

9. REFERENCIAS CONSULTADAS

REFERENCIAS CONSULTADAS.

1. Gómez C.E., Martínez L.J., Arnaiz V.A., (2006) *El sistema principal de histocompatibilidad humano (hla) y el trasplante hepático*. En Vicente E. et al (Ed.) "El Trasplante Hepático en el comienzo del Milenio" (p.37-62) Sao Paulo, Brasil: Editora Atheneu.
2. Van Rood J.J, Eernisse JG, van Leeuwen A. (1958) *Leucocyte antibodies in sera from pregnant women*. Nature: 181: 1735.
3. Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA database. Nucleic Acids Research. 2011 39 Suppl 1:D1171-6
4. Gómez Casado E., (2002) *Relaciones entre Cretenses y otros pueblos Mediterráneos según los genes HLA y las Culturas*, Tesis doctoral publicada en línea. Universidad Complutense de Madrid, España. Consultada el 25 de Abril de 2013 en: <http://tesis.com.es/documentos/relaciones-cretenses-otros-pueblos-mediterraneos-genes-hla-culturas/>
5. Abbas A.K., Litchman A.H., Pillai S., (2008) *Inmunología celular y molecular*, (6ta. Ed.). España: Elsevier.
6. Merino Rodríguez M. E. (2008) *Propiedades moleculares e inmunológicas de HLA-B14 y su papel en la espondilitis anquilosante*. Tesis doctoral publicada en línea. Universidad Autónoma de Madrid, España. Consultada en línea el 28 de Marzo de 2013.
7. Gómez Casado, E., Martínez Laso, J., & Arnaiz Villena, A. (2009). *Enfermedades Autoinmunes ligadas al MHC*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España.
8. Alzamora Barrios, B., Martínez Yactayo, F. (2001) *Enfermedad de Behcet: estudio clínico y tratamiento en el Hospital Arzobispo Loayza*. Rev Med Hered., vol.12, no.2, p.58-64. Consultada el 2 de Mayo de 2013.
9. Salazar Paramo M. (2006) *Estudio Molecular de los genes de antígenos clase II, región DQ, del Complejo Principal de Histocompatibilidad asociados con la Artritis Crónica Juvenil*. Tesis Doctoral publicada en línea. Universidad de Colima, México. Consultada el 1 de Mayo 2013, disponible en http://digeset.uco.mx/tesis_posgrado/Pdf/Mario_Salazar_Paramo.pdf
10. Peña Martínez J. (s.f.) Inmunología en línea. Consultado el 28 de Abril de 2013, de la Universidad de Córdoba y del Hospital Universitario Reina Sofía en <http://www.inmunologiaenlinea.es/>
11. Lozano, R. B. (2012). *El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México*. Gaceta Médica de México, 148, 52-67.

REFERENCIAS CONSULTADAS.

12. Acuña-Alonzo, V., Silva-Ramírez, B., Castillo-Vázquez, M., & Granados-Arriola, J. (2006). *Variación del HLA-B en poblaciones mexicanas*. *Bioquímica*, 31(2), 49-58.
13. Flores-Aréchiga, A., Gómez-Espinel, I. A., Castro-Cárdenas, L. A., Treviño-Zúñiga, J. J. H., Silva-Ramírez, B., & Cerda-Flores, R. M. *Estructura genética de tres poblaciones mexicanas en base al sistema HLA-A*.
14. López-Martínez, A., Chávez-Muñoz, C., & Granados, J. (2005). *Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad*. *Revista de investigación clínica*, 57(2), 132-141.
15. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
16. López A. L. (Ed) (2008) *Fundamentos de Banco de Sangre y Medicina Transfusional*. Ediciones de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. México, ISBN 978-968-9315-17-9.
17. García Mouriz M.A., Fernández B. (Ed) (2008) *Libro Electrónico de Temas de urgencia*. Navarra, España. Consultado el 03 de mayo de 2013, disponible en [http://www.navarra.es/home es/Temas/ Portal +de+la+Salud/Profesionales/Documentacion+y+publicaciones/Otras+publicaciones/Libro+electronico+de+temas+de+urgencia/](http://www.navarra.es/home_es/Temas/Portal+de+la+Salud/Profesionales/Documentacion+y+publicaciones/Otras+publicaciones/Libro+electronico+de+temas+de+urgencia/)
18. Álvarez, J. C. M., & García, A. A. (2009). *El papel del sistema HLA en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas*. *Rev Mex Med Tran*, 2(Supl 1), S38-S42.
19. Ruiz-Argüelles, G. J. (2005). *Historia del trasplante de médula*. *Rev. Biomed*, 16, 207-213
20. Olaya-Vargas, A., Coronel-Moran, R., Rivera-Luna, R., Bravo-Undoro, A., Bejar-Ramírez, Y., & Lormendez-Jacome, D. (2005). *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría: Una alternativa de tratamiento en inmunodeficiencias primarias*. *Revista de investigación clínica*, 57(2), 324-332
21. Calderón Garcidueñas E. D. (2005). *Evaluación del programa nacional de sangre placentaria CordMX. Logros y expectativas*. *Rev Med. Inst Mex Seguro Soc*, 43(Supl 1), 127-129
22. Del Carmen, M. (2006). *Banco de sangre de cordón umbilical. Gestión de calidad*. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 44(Supl 2), 99-105
23. Martínez Álvarez J. C., Arrazola García Araceli. (2009) *El papel del sistema HLA en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas*.

REFERENCIAS CONSULTADAS.

- Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C., 2 Supl.1, pp. S38-S42.
24. Amador, M. M. (2012). *Tipificación genómica HLA de alta resolución y aplicaciones en trasplante de progenitores hematopoyéticos*.
 25. Delgado, G. J. R., Guerra, C. M., Carrillo, M. L. G., López, Y. O., Garcidueñas, E. D. C., López, A. M. & Argüelles, G. J. R. (2007). *Trasplante alogénico de células hematopoyéticas de dos cordones umbilicales*. Medicina Universitaria, 9(36), 112-6.
 26. Bermeo, S., Guerra, M. T., & Alfonso, H. O. (2010) *Frecuencias de HLA-A, B y DRB1 en una población de Huila, Colombia*. Revista Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva – Huila, 2010(2): 9-19
 27. Ruiz-Argüelles, G. J., & Gómez-Almaguer, D. (2006). *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en México*. Acta Médica Hospital Ángeles, 4, 25-28.
 28. Secretaría de Salud. Cordón Umbilical en Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea; consultado el 1 de Abril de 2013 desde: http://cnts.salud.gob.mx/interior/bscu_donsan.html
 29. QIAGEN, (2012) QIAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook.
 30. RSSO-LTYP-PI-ES-00, Rev 21.
 31. SSP-DNAT-PI-ES-00, Rev. 16.
 32. Secretaría de Salud NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
 33. Microsoft Office Professional Plus 2010© Microsoft Corporation.
 34. Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
 35. Gorodezky, C. (2013); *Impacto de la diversidad genética del MHC en el trasplante de CPHs: El registro mexicano, DONORMO*.
 36. Allele Frequencies in Worldwide Populations; Consultado el 15 de Abril de 2014 desde: <http://www.allelefrequencies.net>

**PUBLICACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE
LA PRESENTE TESIS.**



ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIÓN MEXICANA MEDIANTE LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL HLA EN UNIDADES DE SANGRE PLACENTARIA.

RANGEL-SÁNCHEZ MONTSERRAT¹; ALCÁNTARA-QUINTANA LUZ^{2,3}.

1. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN, UNAM, email: rangel.montserrat@gmail, 2. TISSUE SPECIALIST KING COLLEGE DE LONDRES, 3. UCLA FELLOWSHIPS, email: luzalcantara@gmail.com.



ANTECEDENTES.

Los genes de histocompatibilidad humanos se encuentran localizados en la parte distal del brazo p en el cromosoma 6 en la banda 21.3 (6p21.3). Con aproximadamente más de 224 genes, pseudogenes y fragmentos génicos siendo un total de 4 Mb; representando un 2.5% de la longitud total del cromosoma. El papel de sistema HLA es muy amplio y preponderante en la salud, desde una transfusión sanguínea, trasplante de órgano; trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (Progenitor Stem Cell) o trasplante de medula osea (TMO) debido a que son los principales blancos de la respuesta inmune en contra de aloinjertos y este reconocimiento de aloantígenos del MHC por parte de las células T es el evento central que inicia el rechazo al trasplante ⁽¹⁾.



La sangre placentaria presenta menos problemas de compatibilidad; las células troncales presentes en ella son más tolerantes que las de medula osea y son capaces de generar hematíes y leucocitos normales por lo que se pueden usar para ayudar a renovar los hematíes en personas con diferentes problemas de dichas células o para restablecer el sistema inmunitario de niños nacidos con una inmunodeficiencia ⁽²⁾; sin embargo debido al amplio polimorfismo del sistema HLA, puede variar de forma importante entre dos zonas geográficas y en México se hace necesario el conocimiento de los rasgos diferenciales de cada lugar. Una vez disponibles, estos estudios de los alelos y haplotipos presentes en una región determinada, pueden ser también de utilidad para otros propósitos prácticos y científicos.

OBJETIVOS.

Analizar la diversidad genética en la población mexicana a partir de unidades de sangre placentaria almacenadas. Se estudiaron los haplotipos de 838 muestras donadas por diferentes familias a partir de Julio de 2003 a Enero de 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Las muestras se clasificaron conforme al estado de la República Mexicana al cual pertenecen las donadoras. Quedando comprendido en 3 secciones:

Zona norte de México queda comprendida por los estados de: Baja California Sur, Chihuahua, Durango, Nuevo León, Sinaloa; Sonora, Tamaulipas y Zacatecas.

Zona Centro de México: Colima, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala.

Zona Sur de México: Chiapas, Guerrero, Oaxaca; Tabasco, Veracruz y Yucatán.

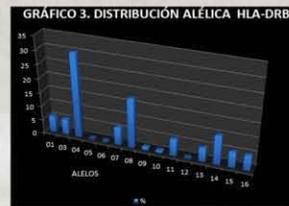
Se realizó extracción de ADN, amplificación por PCR y determinación de los haplotipos mediante PCR-SSP (Secuence Specific Primer) en donde la especificidad de los alelos HLA se determina empleando iniciadores (primers perfectamente coincidentes) que son capaces de amplificar uno o varios alelos y PCR-SSO (Secuence Specific Oligonucleotide) que emplea iniciadores específicos de locus para la amplificación de las secuencias alélicas codificadas por un solo locus, y a su vez son determinados por sondas de oligonucleótidos marcadas, empleando la tecnología Luminex[®](22,30).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.



El gráfico 1 muestra la prevalencia a nivel republicana de 6 alelos: HLA* 02, *24, *68, *01 Y *03, estos alelos representan por si solos el 81.78% de todos los alelos definidos para HLA-A en esta población.

El gráfico 2 muestra el polimorfismo del locus HLA-B mostrando 30 alelos y con la incidencia mayoritaria de 6 alelos, que representan un 66.2% de la población muestreada. Estos alelos son : HLA-B *35,*39,*40,*15,*51 y *44.



El gráfico 3 muestra los 14 alelos tipificados para esta población y la prevalencia de DRB1 *04, *08,*14 Y *07, estos cuatro alelos representan el 64.8% de la población estudiada. El gráfico 4 nos muestra la alta frecuencia de los alelos DQB1 *03,*04 Y *02, de los cinco alelos determinados para este locus, los 3 alelos con mayor incidencia representan el 80.2% de la población.

CONCLUSIONES.

Concluyendo con la predominancia de los siguientes alelos en la población muestreada:

- HLA-A*02, *24 y *68.
- HLA-B*35, *39 y *40.
- HLA-DRB1*04, *08 y 14.
- HLA-DQB1*03, *04 y *02.

REFERENCIAS.

- ¹López-Martínez, A., Chávez-Muñoz, C., & Granados, J. (2005). *Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad*. Revista de investigación clínica, 57(2), 132-141.
- ²Olaya-Vargas, A., Coronel-Moran, R., Rivera-Luna, R., Bravo-Undoro, A., Bejar-Ramirez, Y., & Lormendez-Jacome, D. (2005). *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría: Una alternativa de tratamiento en inmunodeficiencias primarias*. Revista de investigación clínica, 57(2), 324-332.
- ³Lozano, R. B. (2012). *El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México*. Gaceta Médica de México, 148, 52-67.



Trabajo presentado en el XII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Medicina Transfusional (AMMTAC), en la modalidad de Trabajo Libre en formato de cartel.

