

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD
LUIS FELIPE MONCADA
UNAN-MANAGUA**



Departamento de Bioanálisis Clínico

Seminario de Graduación para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Tema:

APLICACION DE DIAGNOSTICO DE INMUNOHEMATOLOGIA EN BANCO DE SANGRE.

Sub Tema:

BIOLOGIA DEL SISTEMA ANTIGENO LEUCOCITARIO HUMANO Y SU IMPORTANCIA EN LA HEMATOLOGIA

AUTORES:

- ❖ **Bra. Laleska Massiel Rugama Castillo.**
- ❖ **Tec.sup. Kareling del Carmen Luna Valdivia**
- ❖ **Tec.sup. Manuel Bernabé Balladarez Munguía.**

TUTORA:

- ❖ **Lic. Maniuska Herrera Espinosa**

Managua, Nicaragua. Febrero de 2017

DEDICATORIA

A Dios, por guiarnos en cada momento de nuestras vidas y a lo largo de esta carrera con entusiasmo, salud y amor.

A nuestras familias y seres amados, que han estado en todos los momentos vividos, que constantemente nos han apoyado para seguir adelante y llegar a culminar nuestras metas.

A todas las personas que nos han dado siempre su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por la vida, salud y amor.

A nuestras familias que nos apoyan siempre para que alcancemos nuestras metas y sueños.

Al Instituto Politécnico de la Salud y a los Profesores que nos han brindado la oportunidad de lograr y alcanzar nuestras metas, por enseñarnos todos los conocimientos adquiridos durante estos cinco años de la carrera.

A todas aquellas personas que de una u otra forma nos dieron su apoyo incondicional.

VALORACIÓN DEL ESPECIALISTA

En el sistema HLA, el material genético se transmite de padres a hijos. El ADN transmitido de padres a hijos se encuentra en el cromosoma del núcleo de las células de todo el organismo incluidos los glóbulos blancos de la sangre. Es un sistema muy complejo que desempeña un papel muy importante en una serie de eventos relacionados con la transfusión y enfermedades hematológicas, sin embargo, en la actualidad solo los países desarrollados han logrado establecer la detección de estos anticuerpos de forma rutinaria para la evaluación de los pacientes.

Con el presente trabajo los autores proporcionan una información actualizada que enriquecerá el patrimonio bibliográfico sobre el tema, brindando al lector una ilustración clara de fácil comprensión sobre cada uno de los aspectos científicos que se han logrado investigar acerca del HLA relacionados a la hematología.

Aspectos como estos los autores trataron en este estudio tipo documental con el **Tema:** APLICACION DE DIAGNOSTICO DE INMUNOHEMATOLOGIA EN BANCO DE SANGRE y **Sub Tema:** BIOLOGIA DEL SISTEMA ANTIGENO LEUCOCITARIO HUMANO Y SU IMPORTANCIA EN LA HEMATOLOGIA, reúne todas las condiciones metodológicas y científicas para ser presentado y defendido por sus autores.

Lic. Maniuska Herrera Espinosa

Tutora

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo principal describir la biología del sistema antígeno leucocitario humano y su importancia en la hematología, además de determinar la importancia de este sistema característicamente polimórfico e importante en la terapia transfusional, también se estudiaron otros aspectos, tales como: el rol que desempeña el HLA en la hematología, los haplotipos del sistema y la utilidad de las pruebas que se utilizan para la investigación del mismo. El diseño de la investigación se basó en un estudio documental descriptivo donde se abordaron los aspectos señalados en los objetivos propuestos. Para obtener la información que sustenta este trabajo se utilizaron técnicas para la recolección de datos como, análisis de literatura y documentos encontrados vía internet para lograr el propósito de la investigación.

El antígeno leucocitario humano es un conjunto de moléculas implicadas en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario. Las formas en que son transmitidas de padres a hijos constituyen un sistema también denominado de complejo principal de histocompatibilidad o de la individualidad para diferenciar lo propio de lo ajeno. En el reconocimiento de aloantígenos, las células del donante reconocerían los antígenos HLA extraños del receptor, que podrían activarse, proliferarse y atacar al huésped. Las pruebas celulares, serológicas y moleculares se utilizan en la tipificación HLA para determinar el grado de compatibilidad que exhibe el receptor-donador, detectar en el receptor anticuerpos anti-HLA clínicamente relevantes dirigidos en contra de las especificidades antigénicas de su potencial donador, conocer el grado de aloinmunización humoral del paciente (sensibilización) y conocer la especificidad del anticuerpo anti HLA presente para evaluar el estatus inmunológico del paciente y la selección del donador. Finalmente se concluye que el sistema antígeno leucocitario humano tiene relación entre la hematología y la inmunología, en donde la inmunología le sirve a la hematología para salvar la vida de un paciente y mejorar la sobrevida libre de eventos después de la aplicación farmacoterapéutica. La aplicación de la biología molecular en esta área ha hecho posible la identificación más precisa y de nuevas variantes antigénicas anteriormente no conocidas, que han contribuido a ampliar las posibilidades del trasplante hematopoyético a donantes no familiares y con células del cordón umbilical, lo que incrementa las opciones de curación de diversas enfermedades.

Contenido

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
VALORACIÓN DEL ESPECIALISTA	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN	2
III. OBJETIVOS.....	3
Objetivo General:.....	3
Objetivos Específicos:	3
IV. DESARROLLO DEL SUBTEMA.....	4
4.1 Datos históricos del sistema HLA	4
4.2 Sistema HLA	9
4.4 Tipificación de los alelos HLA clases I y II	24
4.5 Importancia en la hematología	28
V. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
VI. CONCLUSIONES	35
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	36
VIII. Anexos.....	38

I. INTRODUCCIÓN

La función básica del sistema inmune en los humanos incluye la generación de respuestas a diferentes tipos de organismos, como las bacterias y los virus. Las sumas de todas estas respuestas representan el repertorio del sistema inmune el cual puede analizarse en términos de los dos tipos básicos de respuesta: la humoral, que implica la activación de los linfocitos B, con la consiguiente formación de anticuerpos y la celular, que incluye la activación y las respuestas efectoras de citotoxicidad específica, que resultan en la destrucción de las células blancas por el linfocito T citotóxico. La activación de los dos tipos de células T y B depende de la acción de otro linfocito T, el T cooperador. Por lo general el linfocito T cooperador se activa al fijar varios determinantes antigénicos presentes sobre las células presentadoras de antígenos, como los macrófagos, los que inician una respuesta inmune normal.

Los HLA (Sistema Mayor de Histocompatibilidad descubierto por Jean Dausset en 1954), forman un sistema complejo organizado bajo determinaciones de bases genéticas (genes) de donde resultan productos moleculares que son de vital importancia en la regulación inmune, las transfusiones y los trasplantes de órganos y tejidos. Los anticuerpos y antígenos leucocitarios humanos (HLA), desempeñan un papel en la determinación de anticuerpos anti-HLA, es una prueba que en los países más desarrollados se utiliza de manera cotidiana en la evaluación periódica de los pacientes multitransfundidos o inscritos en listas de espera de órganos provenientes de donadores fallecidos. (Martínez J., 2013).

Las moléculas del sistema HLA actúan como antígenos debido al extenso polimorfismo que las caracteriza y constituyen la mayor barrera para la práctica del trasplante en los seres humanos. Estos antígenos fueron descubiertos como resultado de la investigación efectuada para entender el alotrasplante en seres humanos y animales, por lo que se también se les denomina antígenos de histocompatibilidad.

II. JUSTIFICACIÓN

El sistema antígeno leucocitario humano en Nicaragua no ha sido desarrollado como método diagnóstico en la determinación de algunas enfermedades hematológicas. Basándose en el principio del reconocimiento de lo propio y lo ajeno e identificando las diversas pruebas disponibles para su aplicación, es importante conocer como el sistema antígeno leucocitario (HLA) actúa y elabora una respuesta inmune en cuanto a las actividades que desarrolla para la protección del organismo ante diversos agentes extraños y cómo incide desde el punto de vista hematológico.

Las pruebas de histocompatibilidad proporcionan los datos necesarios para evaluar el riesgo inmunológico del paciente, por lo que este estudio con el objetivo: Describir la biología del sistema Antígeno Leucocitario Humano y su importancia en la Hematología, tiene la finalidad de ser un aporte para el desarrollo de la inmunoterapia ejercida en el país.

Al mismo tiempo, el estudio servirá como guía de futuras investigaciones relacionadas a la temática desarrollada, para consultas a futuros estudiantes, personal relacionado en esta especialidad y personas que estén interesadas con el tema, que quieran enriquecerse sobre el mismo, tan importante en la medicina transfusional como en la clínica del paciente.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

Describir la Biología del sistema Antígeno Leucocitario Humano y su importancia en la Hematología.

Objetivos Específicos:

1. Especificar el rol que desempeña el Sistema Antígeno Leucocitario Humano en la Hematología.
2. Establecer la dinámica del Sistema HLA en cuanto a los haplotipos y su relación con la Hematología.
3. Explicar la utilidad que tienen las pruebas utilizadas en la investigación del sistema HLA.

IV. DESARROLLO DEL SUBTEMA

4.1 Datos históricos del sistema HLA

El CMH fue descubierto en los años 50. Previamente, en el año 1900 el campo de la inmunogenética se abrió con el descubrimiento de los grupos sanguíneos, seguido por el descubrimiento del factor Rh en 1940.

En 1936, Peter Gorer fue el primero que describió un complejo de histocompatibilidad en ratones. Su investigación fue seguida por George Snell quién planteó que el rechazo de tejidos por el ratón era debido a incompatibilidad en algunos antígenos. Este CMH fue denominado «H-2» (en honor al antígeno 2 descrito por Gorer) y es similar al CMH de varias especies.

En 1952, Jean Dusset planteó la hipótesis de que un sistema de histocompatibilidad similar al de los glóbulos rojos debía estar presente en los glóbulos blancos. Logró demostrarlo con la aglutinación de leucocitos en el suero de un paciente politransfundido.

La primera identificación concreta de un producto del CMH, fue hecha en el año 1958, mediante el estudio de suero reactivo. Se identificó el antígeno MAC, correspondiente al actual HLA-A2. En los años 1960, el polimorfismo fue confirmado con el trabajo de Jon van Rod, Rose Payne y Walter Bodmer, quienes describieron los antígenos 4a y 4b (Bw4 y Bw6), y los HLA-A2 y HLA-A3 en un estudio de mujeres multíparas.

En el año 1964, se inició un esfuerzo internacional para la caracterización del complejo, denominado Taller Internacional de Histocompatibilidad (IHW, acrónimo del inglés International Histocompatibility Workshop). Se definió entonces el área del cromosoma 6 donde se codifican los HLA A, B y C, que por entonces se creía que sólo era expresado por leucocitos (por eso el nombre HLA: human leucocytic antigen); también se mapeó el sistema del complemento como proveniente de la misma zona. En los años 1970, se identificaron los HLA de clase II y luego, con los avances de la biología molecular, la investigación se centró a nivel de genes más que en sus productos.

En el año 1967 se ocupó por primera vez el término haplotipo en relación con el CMH. En el año 1969, Baruj Benacerraf demostró que el CMH no sólo era el causante de la aloreactividad, sino

que permitía activar la respuesta inmune en contra de un antígeno en particular. Este descubrimiento le significó obtener el premio Nobel de medicina en 1980.

En 1987, Bjorkman logró elucidar la estructura del HLA-A2 y también de las moléculas de clase II. El año 1999 se logró definir la secuencia de nucleótidos del CMH, mediante los esfuerzos combinados del Consorcio de Secuenciación del CMH bajo la dirección de Stephen Beck, Daniel Geraghty, Hidetoshi Inoko y Lee Rowen.

Entre los años 1980 y 2000 el conocimiento de los alelos presentes en el CMH pasó de unas pocas decenas, con varios millones de posibles combinaciones alotípicas a alrededor de 15,000 alelos. La región HLA-B se convirtió en la región genética más polimórfica del genoma humano, seguida de la región del HLA-A. La región de genes MHC contiene una densidad y diversidad de genes extremadamente alta; la variación genética dentro de esta región juega un papel vital en la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes, infecciosas, y otras enfermedades.

4.1.1 Características de su utilización en la era moderna

Los primeros trabajos con trasplantes de tumores en ratones habían demostrado que las diferencias genéticas entre dador y receptor eran las que determinaban el Sistema HLA y Medicina Transfusional éxito del injerto: si el dador tenía un determinante genético que no estaba expresado en el receptor, el injerto era rápidamente rechazado, y viceversa. Este modelo experimental llevó al desarrollo de cepas endocriados (homocigotas entre sí) lo que permitió a Gorer descubrir el sistema H-2 del ratón, o sistema mayor de Histocompatibilidad cuyos determinantes fueron denominados “antígenos de Histocompatibilidad” por Snell en 1948. Este sistema murino ha servido de modelo para el desarrollo en el hombre del sistema correspondiente, designado HLA. Los primeros estudios que detectaron aglutininas contra leucocitos en sueros de politransfundidos fueron hechos por Dausset, seguidos por los de Van Rood y Payne en 1958, empleando sueros de multíparas.

En 1964 el Dr. Paul Terasaki desarrolla prueba de microlinfocitotoxicidad o test NH1, en el cual los linfocitos viables (T-B) de la persona en estudio son expuestos a un panel de antisueros debidamente caracterizados en donde están incluidos los distintos tipos de HLA. La rápida acumulación de antígeno diferentes llevó a una terminología confusa hasta que en el mismo año

de 1964 se iniciaron los International Histocompatibility Workshops a realizarse cada 2 años, seguidos de una reunión de un comité de nomenclatura auspiciado por WHO (OPS).

Así fue que surgió la denominación de sistema HLA, H por humanos (según algunos, por Histocompatibilidad), L por leucocitos y A por el primer locus descrito (y no por el antígeno). Inicialmente se le asignaba un número correlativo a cada nuevo antígeno, pero debido a la complejidad de sus interrelaciones, se decidió adjudicar una tarea mayúscula para cada locus (sitio del gen en el cromosoma), reservando el prefijo HLA para todo el sistema. Actualmente se conocen los diferentes locus A, B, C y D (o DR).

Los antígenos A, B y C están presentes en la membrana de leucocitos, plaquetas y reticulocitos, pero no sobre glóbulos rojos, y en forma soluble se encuentran en el suero. Los antígenos D se detectan por cultivo mixto de linfocitos. En 1971, Cepellini y col. observaron que algunos sueros empleados para tipificar HLA-A y – Sistema HLA y Medicina Transfusional B inhibían una reacción positiva en cultivo mixto de linfocitos. Por otra parte, se había observado que se conseguían títulos más altos con algunos sueros frente a linfocitos periféricos normales. Ambas observaciones llevaron al descubrimiento del locus DR, cuyos antígenos están presentes sobre linfocitos B y no sobre linfocitos T, lo que explica los bajos títulos obtenidos con linfocitos periféricos, donde el 80% son linfocitos T y los mejores resultados obtenidos con líneas celulares ya que son, casi exclusivamente, compuestas por linfocitos B (con excepción de las establecidas específicamente a partir de linfocitos T). (Carrea R., 1979).

Estos antígenos DR corresponderían a los del ratón y suelen designarse como DRw con números de 1 a 8, por ahora. Uno de los propósitos del VII Workshop fue identificar estos antígenos y diferenciarlos o no, de los locus D; se llegó a una conclusión provisoria según la cual las diferencias serían mínimas, usándose D o DR indistintamente, por ahora. Por otra parte, Barnstable demostró en 1978 que la expresión de los antígenos A, B y C depende de la presencia de $\beta 2$ microglobulina, con la cual están estrechamente asociados en la membrana, lo que permite eliminarlos mediante anticuerpos preparados contra esa substancia. La $\beta 2$ microglobulina ha sido asociada con el supuesto receptor del linfocito T, lo que asocia aún más los antígenos A, B y C a la respuesta inmune T-dependiente. (Carrea R., 1979)

La técnica descrita por el Dr. Terasaki en 1964, se ha utilizado históricamente por más de 30 años en los laboratorios de histocompatibilidad y logró estandarizarse a todo el mundo, actualmente y debido al alto grado de polimorfismo que exhibe el HLA con numerosas variantes alélicas la tipificación basada a nivel del DNA ha permitido mejorar la asignación del fenotipo HLA del individuo en estudio.

Existen una serie de protocolos multicéntricos, así como tendencias de investigación en todo el mundo para desentrañar los mecanismos que permitan optimizar la buena evolución de un trasplante. Entre éstas encontramos:

- Estudios de los antígenos HLA no clásicos. Entre estas, los estudios de las moléculas HLA no clásicas como HLA-E o G. Así, se ha apuntado que la mayor expresión de HLA-G en trasplante cardiaco previene el rechazo agudo y crónico. También se ha apuntado su papel benéfico para establecer tolerancia en trasplante de córnea y de hígado. Por otro lado, la molécula polimórfica MICA (cadena A relacionada con MHC de clase I), se ha mostrado como una diana para aloanticuerpos específicos en el suero de receptores de riñón, corazón y pulmón, aunque su papel durante el rechazo queda por demostrar.
- Estudio de aparición de anticuerpos HLA post-trasplante. Los estudios de monitorización relacionando la aparición de anticuerpos DSA (Anticuerpos específicos contra donantes) con el desarrollo de rechazo vascular y rechazo crónico, sobre todo en trasplante renal, cardiaco y pulmonar, se están estableciendo como práctica a desarrollar en el futuro en los centros de trasplante. Así mismo es importante desentrañar si los anticuerpos anti-HLA de clase II contribuyen claramente a los procesos en estudio.
- Estudio de otros sistemas de histocompatibilidad menores en trasplante. Entre estos, por citar alguno, como ejemplo, los sistemas HA-1 y HPA1-5 en trasplante de médula ósea, o la enzima GSTT1 (glutathion S-transferasa de la clase theta), recientemente descrito, que se comporta como aloantígenos y que da lugar a la formación de aloanticuerpos.
- Estudios de genes KIR en trasplante. El estudio de esta familia génica está en pleno proceso de experimentación. Estos KIR regulan la actividad de las células NK y algunas células T, y su ligando predominante es HLA-C. En trasplante de médula ósea parecen jugar un papel interesante, y es de esperar que en trasplante de órganos sólidos también sea así.

4.1.2 Tipificación de los antígenos HLA

Se entiende que la mayoría de alelos HLA son altamente polimórficos, como ya se explicó anteriormente, y cada especificidad definida en la superficie celular representaría un alelo diferente a nivel genómico. Se han descrito numerosos alelos para los diferentes loci HLA. Por lo tanto, se denomina tipaje HLA al análisis llevado a cabo en el laboratorio para conocer los alelos HLA de un determinado individuo mediante métodos serológicos, análisis de genes por biología molecular y métodos celulares. Este análisis de los antígenos de histocompatibilidad tradicionalmente se ha realizado con un sistema de tipificación serológica basados en la citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento, prueba denominada “Microlinfocitotoxicidad” donde se utilizan sueros que contienen anticuerpos específicos contra antígenos HLA. Estos aloantisueros se obtienen de mujeres multíparas o individuos politransfundidos previamente caracterizados en lo referente a la especificidad que ellos reconocen. Se han obtenido también numerosos anticuerpos monoclonales, a partir de hibridomas, murinos o humanos. Los anticuerpos anti-HLA son muy específicos para los determinantes estructurales individuales que caracterizan a los diferentes antígenos del sistema HLA. Así, si los sueros que contienen anticuerpos anti-HLA se mezclan con linfocitos, los anticuerpos se unirán únicamente a sus antígenos blancos específicos (Tristam et al., 1998). El advenimiento de las técnicas de biología molecular proporciona hoy en día una gran ventaja en la tipificación de los antígenos HLA, ya que permiten determinar la presencia de alelos que con los métodos de serología eran imposibles distinguir. Los niveles de resolución de los antígenos que permiten alcanzar los métodos moleculares son muy superiores a los serológicos, por lo que ahora los alelos HLA de clase II pueden ser determinados con gran precisión por el uso de amplificaciones de ADN e hibridación con oligonucleótidos. El método define alelos sobre las bases de sus secuencias variables, proporcionando una información más amplia que no podría obtenerse por las antiguas técnicas. Es así que desde que se descubrió la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés polymerase chain reaction) se han diseñado diferentes tipos de reacciones para amplificar el ADN genómico y facilitar su posterior análisis. Existen procedimientos que permiten realizar una tipificación molecular de “baja resolución” que brinda información equivalente a las especificidades serológicas y que para muchas aplicaciones de rutina son muy adecuadas. Actualmente, se cuenta con técnicas de tipificación molecular de “alta resolución” que permiten definir con precisión alelos DRB que posee un individuo (Fernández et al., 1990; Gao et al., 1990; Gao et al., 1991; Bodmer et al., 1990; Lindel et al., 1997).

Aunque todos los protocolos comienzan con una amplificación genómica, los mismos difieren en la estrategia de análisis del ADN amplificado. El producto de la PCR puede ser hibridado a una colección de sondas oligonucleotídicas secuencias específicas y esta metodología recibe el nombre de PCR-SSOP (del inglés polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide-probe).

Alternativamente, los iniciadores (primers) pueden ser diseñados para amplificar exclusivamente un alelo o un grupo de alelo en cuyo caso si se obtienen producto de amplificación, la muestra es positiva para ese alelo. Esta metodología recibe el nombre de PCR-SSP (polymerase chain reaction sequence-specific-primers) (Arrazola-García, 2005).

4.2 Sistema HLA

Uno de los bastiones principales del sistema inmunitario para la defensa del organismo frente a cualquier agresión externa es el reconocimiento de los antígenos, después de transformados y presentados sobre las moléculas de histocompatibilidad. Los sistemas de histocompatibilidad, por tanto, juegan un papel muy importante en el desarrollo y función del sistema inmunitario, gracias a su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T encargados de la defensa. El sistema más conocido es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC o HLA en el hombre), cuya característica fundamental es su alto grado de polimorfismo. Este polimorfismo conduce a diferentes especificidades de ligamiento de péptidos por diferentes alelos y podría contribuir a diferencias en la respuesta inmunitaria entre individuos, jugando un papel importante en los trasplantes de órganos y la susceptibilidad a ciertas enfermedades.

Debido a su implicación en el rechazo de aloinjertos (éste ocurre cuando la respuesta inmunitaria del receptor contra el tejido extraño se induce por los antígenos presentes en el injerto, pero ausentes en el receptor), clásicamente, se conocen como antígenos de trasplante.

El sistema HLA (antígeno leucocitario humano) consta de 4 millones de pares de bases, localizados en la porción distal de la banda 6p21.3, en el brazo corto del cromosoma 6, habiéndose identificado unos 400 genes en el MHC humano. Las moléculas HLA son estructuralmente altamente polimórficas y se expresan como heterodímeros en la superficie celular. Este polimorfismo extremo ha permitido conocer al menos 490 alelos para HLA-B, 250 para HLA-A, 119 para HLA-C y 315 para HLA-DRB1. Estudios familiares demuestran que la recombinación en esta región es rara, y el conjunto completo de alelos se heredan, habitualmente, como una unidad denominada

haplotipo, siendo el conjunto de los 2 haplotipos (uno heredado de cada progenitor) el genotipo del individuo, éste se hereda en codominancia. Por otro lado, estudios de población han demostrado que ciertas combinaciones de alelos se heredan juntos más frecuentemente de lo esperado debido al azar.

Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento, varía con la población y con la etnia, y a veces incluso entre grupos de población de una misma etnia. Otro hecho clave en el avance del estudio del complejo mayor de histocompatibilidad lo ha supuesto la demostración de que un número de enfermedades autoinmunes y de otras etiologías tienen una asociación genética con el sistema HLA.

Respecto a sus características estructurales y funcionales los genes y moléculas HLA principales se separan en clase I y clase II. Los aspectos funcionales están en relación a su capacidad para procesamiento y presentación antigénica. Ésta y el posterior reconocimiento del antígeno es un proceso inmunológico de reconocimiento de lo propio y la capacidad para desarrollar una respuesta inmune específica de antígeno hacia los antígenos no propios. Por tanto, la aloreactividad solamente representa un aspecto menor de la función de las moléculas HLA, pero médicamente importante. La incompatibilidad es aún hoy un problema principal en la medicina del trasplante. El riesgo de alorechazo depende del grado de disparidad genética entre donante y receptor con respecto a las moléculas HLA u otras moléculas de histocompatibilidad. Las secuelas inmunológicas de un injerto incompatible pueden no solamente incluir una disminución en la supervivencia del injerto en trasplante de órganos sólidos o el desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped en trasplante de médula ósea. Además, pueden ocurrir fenómenos de sensibilización mediante la formación de aloanticuerpos HLA que pueden ser lesivos para el futuro del trasplante.

Aparte de los antígenos mayores de histocompatibilidad, existen los denominados antígenos menores de histocompatibilidad, con especial relevancia en trasplante de médula ósea, que se siguen definiendo aún hoy en día. Entre estos, encontramos los antígenos H-Y, HA-1, GSST, etc.

4.2.1 Organización génica y estructura del sistema HLA

La región HLA se puede subdividir en tres subregiones: clase I, clase II y clase III. La región de clase I, más cercana al telómero, contiene los loci HLA-A, -B y -C que agrupan genes que codifican

la cadena pesada de un gen de clase I, conocidos como HLA clásicos y también como de clase MHC1a, para diferenciarlos de los demás genes de clase I, denominados MHC1b o no clásicos. Entre éstos, existen los genes HLA-E, -F, -G, HFE o MIC que codifican moléculas cuya función hasta hace poco no era muy clara, pero ya comienzan a conocerse algunas posibles funciones muy interesantes. Avanzando hacia el centrómero, se encuentra la región de clase III que originariamente se creía circunscrita a los genes del complemento C4, C2 y Bf, e incluye también genes tan importantes como los del factor de necrosis tumoral (TNF), los de la enzima 21-hidroxilasa y los que codifican para tres miembros de la familia de las proteínas HSP. La región de clase II está situada en posición más centromérica y engloba los genes: HLA-DR, -DQ y -DP.

4.2.2 Aplicaciones al estudio del sistema HLA

El conocimiento cada vez más preciso adquirido en los últimos años respecto a la evolución y función de genes y moléculas HLA ha permitido su estudio aplicado a múltiples disciplinas (Gómez-Casado, 2002):

- a) **Legales:** el polimorfismo del sistema HLA permite realizar estudios de paternidad, ya que es muy improbable que dos personas no relacionadas genéticamente posean los mismos antígenos HLA. Su poder de discriminación supera el de otros sistemas de proteínas.
- b) **Evolutivas:** el polimorfismo y el desequilibrio de ligamiento del sistema HLA sirven como herramienta para relacionar filogenéticamente grupos poblacionales humanos, alelos y loci genéticos entre intra e inter especies.
- c) **Clínicas:** Una de las aplicaciones clínicas del HLA es intentar establecer la relación entre la compatibilidad HLA y la supervivencia de los trasplantes de órganos. Por otra parte, existen estudios que relacionan ciertas moléculas HLA, e incluso determinadas secuencias de ADN, como factores de protección y susceptibilidad a padecer enfermedades. Se ha postulado que el mimetismo molecular entre ciertos patógenos y péptidos autólogos podría desencadenar una respuesta específica autoinmune. De allí la importancia de la tipificación de los antígenos HLA empleando diferentes métodos para la identificación de los mismos.

4.2.3 Asociación HLA y enfermedad

Durante los estudios de asociación se investiga la contribución de los genes de susceptibilidad a una enfermedad (o cualquier otro fenotipo). Desde hace varias décadas se sabe que el padecimiento

de ciertas enfermedades se asocia con el incremento en la frecuencia de un determinado alelo HLA. Esta asociación cuando tiene un valor estadísticamente significativo, se viene considerando como un factor de susceptibilidad o un marcador de riesgo a padecer una determinada enfermedad. Esto puede cifrarse estadísticamente como “riesgo relativo” (RR) y da una idea de la mayor o menor probabilidad que tiene un sujeto a padecer una determinada enfermedad si presenta dicho marcador o alelo HLA con respecto a aquellos individuos que no lo tienen (Murphy et al., 2010). Así que el primer intento por correlacionar un sistema polimórfico con susceptibilidad a enfermedades se realizó después del descubrimiento de los grupos sanguíneos, cuando se encontró en 1953 la primera asociación entre grupo sanguíneo A y cáncer en el estómago. Pero es a partir del descubrimiento de los sistemas H-2 en el ratón y HLA en humano, cuando el CPH se constituyó el objetivo de estudios extensos de asociación con enfermedad.

4.2.4 Asociación HLA con enfermedades diferentes a leucemias

Existen diversos tipos de estudios tanto poblacionales como familiares que demuestran la relación entre un marcador genético particular HLA y diversos estadios de la enfermedad. Estos estudios han proporcionado dos tipos distintos de información; los de población han servido para determinar estadísticamente la frecuencia de la relación entre un marcador genético particular HLA y una enfermedad determinada. En contraste, los estudios familiares han servido para demostrar eslabonamiento entre un gen de susceptibilidad a la enfermedad y el marcador HLA (Parslow et al., 2002).

Se ha postulado una serie de hipótesis para tratar de explicar el mecanismo de asociación como (Pérez-Rodríguez, 2005):

1. Mimetismo molecular entre moléculas HLA y agentes infecciosos. Esta hipótesis del mimetismo molecular comprende dos alternativas. La primera sostiene que debido a la similitud entre el agente causal y el antígeno HLA, el agente etiológico se aprecia como propio y no se desencadena una respuesta inmunitaria, por lo que el agente causal produce la enfermedad sin interferencia con la respuesta inmunitaria del receptor.

La segunda alternativa sugiere que el agente causal se mira como ajeno, y se origina una respuesta inmunitaria vigorosa contra el agente etiológico. Debido a la similitud del agente y el antígeno

HLA la respuesta inmunitaria se dirige contra el antígeno HLA y es esta respuesta “autoinmunitaria” la que produce la enfermedad (Parslow et al., 2002).

2. Modificación de la estructura de las moléculas HLA. Propone que el agente que causa la enfermedad altera moléculas constituyentes normales del individuo y las transforma en blancos de una respuesta autoinmune.

3. Moléculas HLA como receptores. Los antígenos HLA pueden actuar como receptores de agentes infecciosos o de sus productos antigénicos, de esta forma, la presencia de las moléculas HLA sobre la célula blanco se considera un prerequisite para la penetración del patógeno a nivel celular y para el desarrollo de la enfermedad (Pérez-Rodríguez, 2005; Trabace, 2000).

4. Deficiencias en la respuesta inmune. Los antígenos del sistema HLA participan en la regulación de la respuesta inmunitaria, por lo tanto, cualquier trastorno que se manifieste como aumento o defecto en la respuesta inmunitaria podría implicar a los antígenos HLA y explicar su participación en la predisposición genética a la enfermedad (Pérez-Rodríguez, 2005; Trabace, 2000).

5. Deficiencias de los antígenos HLA clase III. Las deficiencias de antígenos clase III, solas o en desequilibrio génico con otro antígeno HLA, pueden asociarse con la susceptibilidad a algunas enfermedades, por ejemplo: la deficiencia del factor C2 del complemento se ha encontrado asociada con DR3 en el lupus eritematoso sistémico, y el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa se ha asociado con HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita.

6. Falla en la selección. Existe la posibilidad que las moléculas HLA asociadas con la enfermedad participen en la selección de las células T, con un receptor (TCR) particular durante la selección positiva o negativa en el timo. La selección de linfocitos T autorreactivos o moléculas deficientes en la presentación de péptidos antigénicos pueden contribuir en la patogénesis de la enfermedad. Dependiendo de los péptidos presentados por las moléculas HLA, se originará una respuesta inmunitaria protectora o una deficiencia en la respuesta inmunitaria que pudiera favorecer el desarrollo de una enfermedad (Pérez-Rodríguez, 2005; Trabace, 2000).

Debido a la asociación existente entre los alelos HLA y las enfermedades autoinmunes, vale la pena tomarlas en cuenta para indicar los hallazgos encontrados en estos últimos años. Aunque los mecanismos subyacentes a la asociación del CPH no están claramente entendidos, se ha sugerido

como una vía de explicación la ruptura en la tolerancia inmunológica a antígenos propios a través de la presentación aberrante de péptidos extraños o propios por las moléculas clase II a los linfocitos T autorreactivos (Fernando et al., 2009). Dentro de las enfermedades autoinmunes asociadas con HLA se pueden mencionar: La Esclerosis Múltiple (EM). Es un desorden desmielinante inflamatorio crónico del sistema nervioso que se asocia con el haplotipo HLA-DR2. Esto se observó por primera vez en 1972 y sigue siendo uno de los hallazgos más reproducibles en la genética del CPH. Debido al fuerte desequilibrio de enlace (del inglés Linkage Disequilibrium o LD) de todo el haplotipo asociado, no está claro si el conductor principal de la asociación es el alelo HLA-DQB1*06:02 o el DRB1*15:01. Sin embargo, hay más evidencia de la estrecha relación del alelo HLA-DRB1 *15:01 con el *15:03 en los afro-americanos y posiblemente, la población europea en comparación con el HLA-DQB1* 06:02 (Fernando et al., 2009).

La Diabetes Tipo 1 (DT1): Es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la destrucción de células T que median la destrucción de células beta de los islotes pancreáticos. Hasta la fecha, la mayoría de las evidencias apoyan la variación en el HLA-DQ como el principal locus de predisposición a esta enfermedad. El papel predominante de los haplotipos DRB1*04-DQA1*03:01- DQB1*03:02 y DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 en la susceptibilidad a DT1 en poblaciones europeas, se ve confirmada por varios estudios (She, 1996). La heterocigocidad para ambos haplotipos de riesgos confiere el importantísimo riesgo genético conocido para la DT1. La formación de dímeros DQ trans específicos por transcomplementación entre los alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en cromosomas homólogos (DQA1*03:01/DQB1*02:01 y DQA1*05:01/DQB1*03:02) pueden ser los responsables del incremento en el riesgo heterocigoto. El HLA-DR4 (DRB1*04:05-DQB1*04:01) y DR9 (DRB1*09:01- DQB1*03:03) han mostrado asociación con DT1 en poblaciones japonesas y coreanos. El alelo DQB1* 06:02 se ha reportado de protección, de igual manera es importante recalcar que en la población latinoamericana se confirmó la asociación de los alelos de riesgo DRB1*03, DQA1*05:01, DQB1*02y DQB1*03:02 con la DT1 y los alelos de protección DQB1*05:01 (Cifuentes et al., 2010).

En general, los estudios hasta la fecha sugieren que tanto los genes HLADR y HLA-DQ son importantes para determinar el riesgo de la enfermedad; sin embargo, los efectos de los alelos individuales pueden ser modificados por los haplotipos que lo portan (Fernando et al., 2009). El genotipo DPA1*01- DPB1*02:02:02 fue el único genotipo asociado significativamente con

Diabetes Mellitus insulino dependiente (DMID) en una población venezolana (Dausset, 1958). En estudios familiares, el alelo DPB1*03:01 haplotipo DPA1*01:03-DPB1*03:01 se encontró asociado con susceptibilidad, mientras que el DPB1* haplotipo DPA1*01:03-DPB1*04:02y el haplotipo DPA1*01:03-DPB1*01:01 resultaron de protección en la DMID (Benacerraf, 1981).

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Se ha vinculado al CPH como el principal factor de riesgo genético en la susceptibilidad a esta enfermedad. Sin embargo, la contribución exacta atribuible al CPH con respecto al riesgo genético total queda por determinar. Las asociaciones HLA más firme con LES reside con los alelos clase II HLA-DR3 (DRB1*03:01) y HLA-DR2 (DRB1*15:01) y sus respectivos haplotipos principalmente en poblaciones blancas. Estudios en poblaciones no blancas han mostrado resultados contradictorios (Fernando et al., 2009). Mientras que en la población del noroeste de Irán mostraron que el alelo DQ6 (*06:01-*06:09) probablemente sea el asociado genéticamente con susceptibilidad a LES. Esta asociación de LES con varios antígenos HLA sugiere que los péptidos presentados por los antígenos HLA son numerosos y con diferentes afinidades en los sitios de unión al péptido de las moléculas HLA (Rezaieyazdi et al., 2008). Los análisis anteriores ponen de relieve la importancia del polimorfismo dentro de HLA-DR3-que contiene los haplotipos en la susceptibilidad a lupus. El resto de las señales de asociación en gran parte surgen de los alelos de los genes de clase II HLA-DRB*1, HLA-DQA*1 y HLA-DQB*1 (Fernando et al.,2009).

La Artritis Reumatoide (AR). El CPH representa aproximadamente un tercio del total de los componentes genéticos de riesgo a la AR. Probablemente no todos los riesgos atribuibles al CPH están asociados con la variación en el HLADRB1*. Cuando los subtipos HLA-DR susceptibles fueron considerados como un grupo, Gregersen et al. (1987), notó una secuencia de aminoácidos compartida en las posiciones 70–74 de la proteína de HLA-DRB1*. Estos alelos ahora se conocen colectivamente como "epítipo compartido". El epítipo compartido llevado por la gran mayoría de los pacientes con artritis reumatoide, es un motivo de secuencia 5-bis en la tercera región alélica hipervariable del HLA-DR de la cadena. Los alelos más comunes de susceptibilidad HLA-DRB1* con epítipo compartidos incluyen: *01:01, *04:01 y *04:04 presentes en personas de ascendencia europeas y *04:04 y *09:01 en individuos de ascendencia asiática(Fernando, 2009).En los estudios realizados en pacientes ecuatorianos que padecían de artritis reumatoide se encontró una asociación positiva entre los alelos DR4 y el DR14 (Aguirre et al., 2010), al igual que en otras

investigaciones similares realizados en poblaciones de Turquía e Italia, allí se revela una alta frecuencia de los alelos DRB1*01, *04, *09 y *10 con la artritis reumatoide, mientras que el alelo DRB1*13 y el DRB1*03 lo han reportado de protección(Uçar et al., 2011; Sandoughi et al., 2011).

Otras patologías de curso infecciosas e inflamatorias también se han asociado con los alelos HLA en el caso de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF, por sus siglas en inglés Idiopathic Pulmonary Fibrosis), se ha observado que el alelo DRB1*15:01 está sobre expresado entre los caucásicos con IPF. Los genotipos DPA1*02:02-DPB1*05:01 y DPA1*02:02:02-DPB1*03:01, respectivamente, se asociaron fuertemente con el riesgo de infección persistente con el virus de la hepatitis B en asiáticos (Balducci-Silanoa y Layrisse, 1995; Kamatani et al., 2009). El alelo DPA1*02:02:02 se asoció positivamente con hiperseropositividad de niveles de anticuerpo después de la vacunación anti sarampión en niños escolares en Estados Unidos (Ovsyannikova et al., 2004).

4.2.5 Asociación HLA con leucemias

El estudio de la asociación HLA con las leucemias, se inició con la investigación de la susceptibilidad en el ratón para desarrollar leucemias y se realizó con conocimientos limitados del complejo H-2. Gross (1961) demostró que cuando los filtrados libres de células de ratones AKR o C58 (cepa pura con una incidencia muy alta de leucemia espontánea) eran inyectados a los ratones recién nacidos de estirpe C3H/Bi o C57BR/cd (con baja incidencia natural de leucemias) estos desarrollaban leucemia, mientras que los ratones adultos eran resistentes. Interesantemente estas cuatro cepas (AKR, C58, C57BR, C3H) todas tienen el mismo haplotipo del CPH H-2 k (Gorer, 1956 y Gross, 1961). Lilly et al. (1964) demostraron el papel del haplotipo H-2 en el desarrollo de leucemia por inoculación de extractos leucémicos en ratones de las generaciones segregadas con diferentes tipos de H-2 k. El haplotipo H-2 k causó incremento en la susceptibilidad para ambas leucemias, la “virus- inducida” y la “espontánea”, pero solamente en homocigotos. Estudios posteriores continuaron demostrando que el desarrollo de la leucemia espontánea y la inducida por virus estaban influenciados por H-2 k (Lilly, 1966; Boyse et al., 1972).

Es importante mencionar que las investigaciones de leucemias en modelos de ratones tratados con virus inductores de linfomas, demostraron la susceptibilidad de las cepas de los ratones portadores del alelo del CPH-21-A kk en comparación con la resistencia observada por las cepas de ratones portadores de los alelos H-2 bb o H-2 bk (Lilly, 1973; Lonai et al., 1982; Zijlstra y Mliet, 1986).

Sin embargo, la contribución del CPH en el desarrollo de las leucemias aparece como un elemento secundario dentro de un contexto multifactorial y poligénico. La misma relación de susceptibilidad y resistencia a la leucemia asociada al CPH, ha sido observada en otras especies animales tales como: ratas, bovinos, aves y conejos (Dorak, 2007).

En el humano el estudio sobre el papel del sistema HLA en la susceptibilidad con leucemias comenzó en la década de los 90, cuando se encontró que la frecuencia del alelo HLA-A2 estaba aumentada en todos los pacientes (Dorak, 2007). En 1970 un segundo estudio en LLA amplió la primera asociación HLA-A2 a las asociaciones de los haplotipos HLA-A2-B12 (Walford et al., 1967). Aunque no confirmado en todos los estudios, la asociación HLA-A2 es una de las pocas asociaciones de leucemia señaladas en más de un estudio y, de hecho, una asociación significativa en los datos acumulados (Tiwari y Terasaki, 1985).

De allí en adelante, se han realizado diversos estudios para determinar los alelos del sistema HLA implicados en la susceptibilidad a los diferentes tipos de leucemias, ya sean crónicas o agudas, en niños y en adultos. La mayoría de esos trabajos examinaron un gran número de pacientes y controles empleando las mejores técnicas de tipificación disponibles para el tiempo. Pero el estudio de asociación HLA más extenso en leucemias se realizó con los datos del registro Internacional de trasplante de médula en el año 77 y 78. Estos estudios analizaron un total de 1.834 pacientes con LLA, LMA y LMC tratados entre 1969 y 1985 (D'Amato et al., 1984 y Bortin et al., 1987). Es interesante mencionar el estudio de Navarrete et al. (1986) en pacientes con LMA y LLA donde encontró que existía una disminución de la frecuencia del alelo HLA-Aw19 en todos los pacientes con LLA, mientras que en los pacientes con LMA, observó una disminución de los antígenos HLA-B18 y HLA-DR5 (DRw11). Estos resultados sugieren que el antígeno Aw19 puede conferir cierto grado de resistencia al desarrollo de LLA y que el HLA-B18 y/o el antígeno DR5 pueden ser factores de resistencia para desarrollar LMA (Tristram et al., 1998).

Siendo la base los estudios realizados por Gorer (1956) en ratones, las leucemias siguen siendo la patología que más dedicación ha tenido en cuanto a su asociación con HLA. A medida que avanza la tecnología para la determinación de estos genes, también se perfecciona su búsqueda e identificación especialmente para LLA y LMC.

En la LLA, se han reportado alelos asociados tanto de clase I como de clase II. En los estudios realizados por Dorak et al. (2002) en pacientes varones con LLA infantil se describe una fuerte asociación de las LLA con homocigocis HLA-DRB4* (DR53). Esta especificidad DR53 está codificada por el locus DRB4* en la región de HLA clase II. El DRB4* es uno de los loci que existen solo en haplotipos que poseen HLA-DRB1*04, DRB1*07 y DRB1*09. Los niveles de expresión de DRB4* es variable, (Leen MP y Goroski J. 1997) y se expresa no solo por el haplotipo HLAB57, DR7, Dw11 (Knowles RW et al., 1986). El gen HLA-DRB4* o su producto de proteína DR53 se han asociado con un mayor riesgo para todos los tipos principales de leucemias. La mayoría de los haplotipos HLA-DR53 portan el alelo HLA-A2 de susceptibilidad (Dorak et al., 2002).

Otro alelo asociado a la LLA que muestran una frecuencia elevada considerada de alto riesgo en niños iraníes con LLA es el HLA-DRB1*04. Mientras que el alelo DRB1*13 con una frecuencia disminuida en esta población se muestra como un marcador de protección (Yari F. et al., 2008). De igual manera el alelo HLA-DRB1*15 en otra población de pacientes infantiles con LLA, fue reportado de riesgo para esa patología (Wang et al., 2009).

En cuanto a la región HLA-DP, es poco lo que se conoce acerca de la relevancia del polimorfismo en la respuesta inmunitaria; sin embargo, se han descrito algunas asociaciones con diferentes leucemias. Pawelec et al. (1988), utilizando a 254 pacientes con diferentes tipos de leucemias, fueron de los primeros en señalar la influencia de la región DP en la susceptibilidad o resistencia a la LLA, mostrando una asociación positiva con el DPw2 y DPw5, ninguna con la LMC, mientras que el HLA-DPw1 solo se observó asociado positivamente a pacientes con leucemia aguda no linfoidea (Sánchez-Pérez et al., 1986; Moent et al., 1984; De Jongh et al., 1984).

Estudios realizados por Taylor et al.(2002), revelan que la susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda común (LLA-c) en niños, estaba asociada con un alelo DPB1*02:01 en el locus HLA-DPB1, apuntando esta susceptibilidad a mecanismos que involucran la presentación de péptidos antigénicos específicos, derivados probablemente de agentes infecciosos, por proteínas alotípicas relacionadas a DPB1*02:01 que conducen a la activación de células T colaboradoras que median la proliferación de células pre-leucémicas. Recientemente, el gen HLA-DRB1*15 se señaló como factor de riesgo en niños con LLA (Wang XJ et al., 2009) Se especula que la molécula HLA-

DPB1*06:01 puede estar funcionalmente involucrada en leucemias infantiles (Taylor GM et al., 2009).

Ciertas hipótesis se han tejido en torno a la posibilidad de participación de estas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en la patogenia de las leucemias (Taylor M, et al., 2009). Todos estos antecedentes apuntan a que la región DP, conformada por los alelos HLA-DPB1* y HLA-DPA1*, ambas cadenas con diferentes polimorfismos, aparecen involucradas en la patogenia de las leucemias. Así como en la leucemia linfocítica aguda se ha reportado una serie de asociaciones positivas y negativas con las moléculas de HLA clase I y II, también en la leucemia mieloide crónica se han encontrado alelos de susceptibilidad y de protección en el padecimiento de esta patología. Estudios realizados en pacientes iraníes con LMC reportó una asociación negativa del alelo HLA-DRB1*11 con la LMC considerándolo de protección; mientras que con los alelos HLA-DQA1*05:05 y el HLA-DQB1*03011 se encontró una asociación positiva indicando estos alelos de riesgos para la LMC (Amirzargar et al., 2007). El alelo DRB1*11 y el DRB1*04 se han reportado también de protección (Oguz et al., 2004; Postuma et al., 2000). Algunos virus imitan epítomos comunes HLA, como los adenovirus que emplean un mecanismo de evasión y mencionado anteriormente. En la leucemia mieloide crónica (LMC) una traslocación entre en el cromosoma 9 y 22 da como resultado la formación de una proteína quimérica de bcr y abl detectada en el 95% de los casos de LMC. La proteína quimérica bcr-abl se expresa solamente en células de LMC, pero no en las células normales. Por tal motivo, la secuencia de fusión puede actuar como blanco potencial del ataque de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T frente a las LMC. Postuma et al. (2000) describe la expresión del DR4 asociada a la disminución de la incidencia de LMC, posiblemente por la presentación de péptidos de fusión bcr-abl en esa molécula HLA sobre la membrana de la célula leucémica. Se ha demostrado generar linfocitos TCD8+ citotóxicos específicos de bcr-abl in vitro. El producto de la traslocación b3a2 es presentado por los alelos HLA-DRB1*1101 (Pawelec G, et al., 1996), DRB1*04:01 y DRB1*09:01 in vitro. Ninguno de estos alelos ha sido asociado in vivo con protección en pacientes con LMC (Yasukawa M. et al 2001).

Se ha publicado la asociación positiva del alelo HLA DRB1*14 con la LMC (Rosas-Cabral et al., 2003), donde algunos subtipos de este alelo se han postulado como posibles blancos de reacciones autoinmunes por mimetismo molecular con péptidos virales oncogénicos. Esta observación es de

particular interés debido al mimetismo mostrado por varios virus oncogénicos para el epítipo HVR3 del DR53 que se extiende a los alelos DRB1*01, DRB1*10 y DRB1*14 (Dorak et al., 1999; Schlehofer et al., 1996). En este caso en particular, interesa el mimetismo molecular entre el adenovirus y los subtipos del alelo DRB1*14 (14:01, 14:07, 14:08, 14:10, 14:11, 14:14, 14:18, 14:23,14:26, 14:28, 14:31, 14:32, 14:34, 14:35, 14:36, 14:38 y 14:39), los cuales presentan el mismo cambio de posición observado en el aminoácido del epítipo DR53 (Dorak et al., 1996). Este segmento mimetizado ha sido identificado como un polipéptido de 7 aminoácidos de secuencia LLERRRA de acuerdo a trabajos realizados por Dorak et al. (1994). Es de acotar también que existen varios reportes que indican una asociación entre t (9; 22) (q34; q11) y diferentes alelos HLA.

Esta asociación sugiere un posible papel de las células T citotóxicas en la patogénesis de la enfermedad relacionado a las proteínas de fusión bcr-abl, los resultados de algunas asociaciones negativas significantes fueron observadas HLA-A* 02(b2a2, a1a2), B*14(b2a2, b3a2, a1a2). DQB1*03:03 (b2a2, b3a2), DQB1*06:03 (b2a2) DRB1* 04:01 (a1a2), DRB1*07:01 (b3a2) y DRB1*11 (b2a2) (Mundhada et al., 2007). Así, individuos portadores de ciertos alelos HLA capaces de unirse a péptidos derivados de los transcritos de fusión bcr-abl presenta una ventaja biológica cierta para enfrentar esta enfermedad en comparación de aquellos que carecen de estos alelos. En estudios previos, usando tipaje de alta resolución para HLA-DRB, Yasukawa et al. (2000) reportaron una asociación positiva con HLA-DRB1*12:01/(b2a2) y DRB1*04:03, DRB1*08:02, DRB1*14:03, DRB1*14:05 / (todos b3a2), además de una asociación negativa con DRB1*04:05, DRB1*08:03:02, DRB1*15:02/ (todos b2a2) y DRB1*08:03:02, DRB1*15:01/ (ambos b3a2) en la población japonesa.

En la literatura está ampliamente descrita la importancia de la presentación de péptidos antigénicos previamente procesados por las moléculas HLA de clase I o clase II a los linfocitos T CD4+ ó CD8+, para generar una respuesta inmunitaria eficaz en la eliminación de ese patógeno. Sin embargo, investigaciones han evidenciado que eventualmente esa misma respuesta que pudiera ser de protección, se convierte en generador de respuestas dañinas para el organismo. Diversos hallazgos sugieren una respuesta por parte de los linfocitos T que es autorreactiva, y que son inducidas por la presencia de virus que desencadenan procesos descontrolados de proliferación celular involucrándose en neoplasias. Las leucemias son un tipo de neoplasia que pudiera estar

asociada a tal evento, y una explicación de este hallazgo podría ser, que la expresión antigénica favorecería el reconocimiento en la célula leucémica de determinados péptidos y supondrían una señal de activación del mecanismo citotóxico mediado por los linfocitos CD8+. Todo ello sugiere la participación de un determinado patrón inmunofenotípico en la célula leucémica, con expresión de un mayor número de moléculas antigénicas y cambios en el patrón de dispersión, que podría ir asociado a un aumento de linfocitos TCD8+. De igual manera se han descrito asociaciones positivas y negativas de haplotipos con LMC. La combinación HLA-DR4/DR53/DQ8 de susceptibilidad en pacientes alemanes. (Manchilla et al. 2003) y los haplotipos DRB*11/DQB1*03011/DQA1*05:05 y HLA-DRB1*04/DQB1*03:02/DQA1*03011 en iraníes (Amirzargar et al., 2007) muestran una asociación positiva y de riesgo para esta leucemia. La información hasta ahora descrita sobre los estudios de asociación, ha permitido identificar la presencia de genes HLA de susceptibilidad para las leucemias, y que aun cuando no permiten explicar los mecanismos que desencadenan esta patología, sin embargo, conllevan a concentrar las futuras investigaciones en esos alelos asociados a la enfermedad. Es así oportuno desarrollar estudios más profundos utilizando entre otros, modelos experimentales que imiten los eventos que suceden in vivo de esta patología. De esta manera, se obtendría respuesta para resolver incógnitas que hasta ahora han bloqueado la posibilidad de ofrecer a los pacientes que padecen leucemias la esperanza de solventar su salud. Es necesario elaborar tratamientos eficaces y oportunos, así como la elaboración de vacunas de protección.

Por tal motivo, en base a los antecedentes mencionados y conociendo la importancia de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad en la respuesta inmunitaria mediante el procesamiento y presentación antigénica. Se plantea estudiar una vez que se ha identificado los alelos de susceptibilidad para la LLA y LMC, luego de identificar los subtipos del alelo de riesgo en este caso del HLA-DRB1*14, proceder a valorar los mecanismos inmunitarios antivirales de los pacientes con LMC mediante la determinación serológica de anticuerpos contra adenovirus y la determinación de linfocitos TCD8+ contra el epítipo HVR3 y contribuir al planteamiento ulterior de una asociación entre la infección viral, presencia de alelos HLA asociados y una enfermedad neoplásica.

4.2.5 Genes y moléculas HLA de clase I

Estructuralmente, un gen clásico de MHC clase I consta de 8 exones, incluyendo por delante del 1er exón, un péptido señal que ocupa 3.5 Kb. La transcripción de este gen da lugar a un ARNm de 1.6 Kb, y la traducción de éste a una proteína de 340 aminoácidos (aas). Los exones 2, 3 y 4 codifican las regiones extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente; la mayor variación polimórfica se localiza en las secuencias que codifican los aas 60 a 100 del dominio $\alpha 1$, y 150 a 200 del dominio $\alpha 2$. El exón 5 codifica la región transmembrana y, los exones 6, 7 y 8 codifican la región citoplásmica.

Las moléculas HLA de clase I constan de una cadena pesada α de 45 kDa que se une a una cadena ligera de 12 kDa, la $\beta 2$ -microglobulina, que en el hombre es codificada en el cromosoma 15. Ésta se une no covalentemente al dominio $\alpha 3$ de la cadena pesada, y es necesaria para la expresión de la molécula HLA de clase I en la superficie celular.

Las cadenas α son glicoproteínas de membrana tipo I. Su región extracelular posee unos 300 aas, la porción hidrofóbica transmembrana (TM) 25 aas, que es muy parecida a la de otras proteínas expresadas en membrana, y la región citoplásmica que tiene unos 30 aas. Los tres dominios extracelulares tienen, cada uno, cerca de 90 aas y se extienden desde la región $\alpha 3$, adyacente a la membrana, a las regiones más distales $\alpha 2$ y $\alpha 1$, las cuales tienen restos de carbohidratos. La mayor cantidad de polimorfismo en la secuencia de estas moléculas se localiza en unas regiones hipervariables (HVR) dentro de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. El dominio $\alpha 3$ tiene un plegamiento del tipo de dominio de Igs, es menos polimórfico que los anteriores, y en su estructura se encuentra el sitio de unión a la molécula CD8 del linfocito T. Un dato importante en la determinación del polimorfismo es el hecho de que varios antígenos diferentes pueden compartir una ó más especificidades de reacción cruzada (del inglés, crossreacting groups-CREGs).

La $\beta 2$ -microglobulina es una proteína no polimórfica de 100 aas que presenta una estructura de dominio de Igs y se codifica fuera del complejo MHC. Esta molécula, a diferencia de la cadena α de HLA de clase I, no posee una región TM, por lo que se mantiene unida a través de su interacción con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Su principal función es la de estabilizar todo el conjunto para que las moléculas de clase I adquieran la estructura terciaria adecuada.

4.2.6 Genes y moléculas HLA de clase II

En cuanto a la organización génica de la región HLA de clase II se ha subdividido en las subregiones que conocemos hoy en día, HLA-DR, -DQ y -DP. Así, en la subregión HLA-DR, hay un solo gen que codifica para la cadena α (HLA-DRA), cinco genes para las cadenas β (HLA-DRB1-5), y 4 pseudógenes (HLA-DRB6-9). No todos los genes HLA-DRB están presentes en todos los haplotipos, de modo que algunas combinaciones son específicas de haplotipos, ya que pueden ocurrir varios reordenamientos dentro de este locus.

Las subregiones HLA-DQ y -DP constan, cada una de ellas, de 2 genes para las cadenas α y 2 para las cadenas β , HLA-DQA1, -DQA2, -DQB1, -DQB2 y -DPA1, -DPA2, -DPB1, -DPB2. Los productos de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 se asocian para formar los antígenos HLA-DQ y, análogamente, los productos de los genes HLA-DPA1 y -DPB1 se asocian para formar los antígenos HLA-DP.

El típico gen HLA de clase II para la cadena α , consta de 5 exones: la secuencia líder que contiene una región 5' no transcrita, la secuencia señal, y además codifica los primeros 5 aas de la proteína. Dos exones, el II y el III, codifican para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mientras el péptido de conexión y los dominios transmembrana y citoplásmico son codificados por el cuarto exón. La mayor parte de la región 3' no transcrita (UT) es codificada por el quinto exón. La estructura del gen de la cadena β es muy similar, excepto para el dominio citoplásmico que contiene 2 ó 3 exones codificantes. El polimorfismo de estos genes se concentra en el exón II, que es el responsable de codificar la estructura de la unión al péptido.

Las moléculas HLA de clase II son también glicoproteínas de membrana de tipo I y constan de un heterodímero formado por una cadena α de 31-34 kDa y una cadena β de 26-29 kDa (figura 2B). Esta diferencia de tamaño se debe a la cantidad de carbohidratos de cada cadena. Cada una de ellas consta de una región citoplásmica de 12 a 15 aas, una región TM de 20-25 aas, y una región extracitoplásmica formada por dos dominios de unos 90-100 aas. Los dominios próximos a la membrana de cada cadena, $\alpha 2$ y $\beta 2$, poseen una estructura del tipo de la súper familia de las Igs, mientras que los dominios distales, $\alpha 1$ y $\beta 1$, forman la estructura de unión al péptido. La cadena α de HLA-DR hasta ahora se ha considerado monomórfica, aunque ya se han encontrado 3 alelos de este gen. Las regiones hipervariables, para las moléculas HLA-DRB1, se sitúan entre las

posiciones aminoacídicas 25 a 40 y 65 a 80, y son las regiones diana de los métodos de tipaje usados para definir los polimorfismos en el ADN mediante PCR. Las moléculas HLA-DQ y -DP son polimórficas en ambas cadenas α y β .

La estructura tridimensional de las moléculas HLA de clase II es similar a la estructura de las moléculas de clase I. Las posiciones más polimórficas de las moléculas se encuentran en las regiones terminales de los dominios extracelulares. El péptido que ligan las moléculas HLA de clase II suele ser de origen exógeno, en contraste al carácter endógeno del que ligan los de HLA de clase I.

Las moléculas HLA de clase II presentan los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ proximales a membrana, y un bolsillo de unión al péptido, constituido por una base formada por ocho plegamientos en hoja β , cuatro procedentes de $\alpha 1$ y cuatro de $\beta 1$, y dos plegamientos en hélices α flanqueando el bolsillo, procedentes una de la cadena α y otra de la β . Este bolsillo presenta ligeras diferencias estructurales con respecto al de las moléculas de clase I, y ellas van a condicionar las características de los péptidos que son capaces de unir. Lo más importante, es el hecho de que, sus extremos se encuentran abiertos y permiten la unión de péptidos de mayor tamaño que las de clase I.

4.4 Tipificación de los alelos HLA clases I y II

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

Los métodos de detección de los antígenos y alelos HLA pueden dividirse en tres grupos: pruebas celulares, serológicas y moleculares (basadas en ADN). Según la situación clínica, puede preferirse un método particular de detección o tipificación de antígenos HLA.

4.4.1 Métodos Celulares

En el pasado se empleaban los cultivos linfocitarios mixtos (CML) (o reacciones mixtas – RLM) para identificar las diferencias genéticas en la región de clase II. En las RML se cultivan linfocitos de distintos individuos, que pueden reconocer los antígenos HLA-D extraños y responder multiplicándose. (AABB, 2007)

4.4.2 Métodos Moleculares (Hibridación, Electroforesis, DNA conformacional)

El uso de métodos moleculares para la tipificación de los alelos HLA clase I y II tienen un papel importante dentro de las técnicas utilizadas en un laboratorio de histocompatibilidad, por ofrecer algunas ventajas en comparación con los métodos serológicos tradicionales: flexibilidad en la resolución, reproducibilidad y mayor precisión. Las ventajas de los métodos de tipificación basados en la reacción en cadena de polimerasa (polymerase chain reaction) han permitido su amplia utilización a tal grado que en algunos centros de trasplantes han reemplazado en su totalidad a los métodos serológicos.

PCR-SSOP

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

De esta manera, muchas de las secuencias tienden a compartir alelos y no son alelo-específicas, urgiendo el uso de sondas de secuencia específica. Para estudiar los alelos se requiere un juego de sondas y el patrón de reactividad de estas sondas es lo que permite diferenciar los alelos HLA. El sistema de detección utilizado consiste en marcar las sondas con digoxigenina y la detección de la hibridación de estas sondas. La secuencia complementaria presente en el producto amplificado del alelo HLA de un individuo se realizará adicionando un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, el cual utiliza CSPD como sustrato quimioluminiscente y la luz emitida es detectada por autorradiografía.

PCR-SSP

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

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

Una prueba exitosa muestra la banda control en cada reacción negativa y la banda de tamaño apropiado en los pozos positivos. Si una reacción de amplificación no muestra bandas después de la electroforesis, el proceso de amplificación falló, lo que puede deberse al control inadecuado de la temperatura del bloque del termociclador, cantidad insuficiente de DNA o falla al adicionar la Taq polimerasa.

La principal desventaja de la técnica es la necesidad de utilizar gran número de par de iniciadores para realizar la tipificación de un solo paciente, el cual ocupa un termociclador (96 pozos), por lo que no es recomendable para grandes volúmenes de trabajo, siendo la limitante el número de termocicladores y las unidades de electroforesis sin embargo para altos volúmenes de trabajo, la técnica PCR-SSO se considera más práctica. SSP puede ser utilizado para complementar la técnica de SSO, dando resolución a nivel alélico cuando sea necesario.

4.4.3 Métodos Serológicos

La tipificación serológica es una técnica importante para la identificación de los alelos HLA presentes en una persona puesto que los resultados se obtienen de manera rápida y eficaz, además, de servir como apoyo para pruebas confirmatorias como la PCR SSP en cuanto a HLA. (<http://www.monografias.com>)

El método serológico es más sencillo, económico y rápido para la tipificación HLA; se utilizan antisueros que contienen anticuerpos contra los antígenos leucocitarios humanos a estudiar. Los anticuerpos anti-HLA son altamente específicos para los determinantes estructurales que caracterizan a los diferentes antígenos del sistema HLA. (Arrazola M., 2005).

Estos estudios serológicos como el de microlinfocitotoxicidad; genotípicos, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o consisten en técnicas de cultivo celular, como el cultivo mixto de linfocitos. La adecuada histocompatibilidad entre receptor y donador establecida a través del estudio de los antígenos del sistema HLA es esencial para garantizar el establecimiento y la larga duración del aloinjerto y la óptima supervivencia del receptor.

La Prueba de Microlinfocitotoxicidad puede emplearse para detectar los antígenos HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR y HLA-DQ, se utilizan linfocitos porque es fácil obtenerlos de sangre periférica anticoagulada y, a diferencia de los granulocitos, proporcionan resultados reproducibles. Se colocan sueros HLA de especificidad conocida en microcubetas y se agrega una suspensión de linfocitos. Luego se añade complemento de conejo y, si el monto de anticuerpos fijados a la membrana linfocitaria es suficiente, el complejo de ataque a la membrana activa la cascada del complemento, que lleva a la linfocitotoxicidad. El daño de la membrana celular se detecta mediante colorantes; las células sin anticuerpo adheridos, que no activan el complemento y no experimentan lesión de la membrana, no permiten el ingreso de colorantes vitales, mientras que aquellas con membranas dañadas permeables sí. Las pruebas serológicas pueden usarse para evaluar muestras séricas y células seleccionadas. Se llevan a cabo en la compatibilidad HLA cruzada, que consiste en examinar el suero de un receptor potencial y linfocitos no fraccionados (o linfocitos T y B fraccionados) de un donante potencial. Una variante de esta técnica, que emplea un reactivo antiglobulínico, se utiliza para incrementar la sensibilidad.

En la actualidad se han desarrollado también métodos más sensibles que la prueba convencional. Estas son las técnicas por Citometría de Flujo y la Prueba Cruzada con Globulina Antihumana (AGH), las cuales permiten detectar niveles muy bajos de anticuerpos circulantes, lo que facilita una mejor evaluación de la pareja receptor/donador para el trasplante. Aunque la citometría de flujo es muy sensible, su alto costo no permite todavía su uso rutinario, al menos en nuestro medio. (AAHI, 2007).

4.5 Importancia en la hematología

A través de esta investigación documental se desea actualizar a los lectores interesados a fin de proponerles dos aspectos esenciales en la materia inmunológica, el primero consiste en actualizarlos acerca de la temática HLA y sus aplicaciones debido a que es hoy en día uno de los temas de mayor trascendencia y aplicación en los países desarrollados, la hematología hace uso de instrumentos modernos de diagnóstico con el propósito de brindar mayores oportunidades a los pacientes leucémicos y no leucémicos para que sean beneficiarios de un trasplante de medula ósea alogénico o de algún órgano donde las posibilidades de rechazo sean las mínimas y la opción terapéutica sea la salida hacia la curación del paciente hematológico.

En segunda instancia se debe resaltar la importancia de las relaciones entre la hematología, la inmunología y la medicina Transfusional y el banco de sangre entre sí con las otras ramas del laboratorio clínico, esta vinculación aún no ha sido suficientemente comprendida, pero esta investigación permite visualizar la ciencia del laboratorio como un sistema donde la inmunología le sirve a la hematología para salvar la vida de un paciente y mejorar la sobrevida libre de eventos después de la aplicación farmacoterapéutica.

La histocompatibilidad es la rama de la Inmunología que estudia o tipifica los antígenos expresados en la superficie de los leucocitos, de gran polimorfismo, determinados genéticamente por diferentes variantes alélicas, implicados en el rechazo del trasplante de órganos y tejidos por su alto grado de inmunogenicidad. El desarrollo de la especialidad de Inmunología en Cuba desde la década de los años 70 del pasado siglo, ha permitido la introducción gradual de tecnologías que han posibilitado la tipificación de estos antígenos y el desarrollo del trasplante renal y hematopoyético en nuestro país. La aplicación de la biología molecular en esta área ha hecho posible la identificación más precisa y de nuevas variantes antigénicas anteriormente no conocidas, que han contribuido a ampliar las posibilidades del trasplante hematopoyético a donantes no familiares y con células del cordón umbilical, lo que incrementa las opciones de curación de diversas enfermedades.

La introducción y desarrollo de la histocompatibilidad en Cuba ha sido un objetivo priorizado de los grupos nacionales de Inmunología y Hematología del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba (MINSAP) desde hace más de una década, y en el 2013 se hizo realidad este anhelado sueño. En este año se introdujo el tipaje por biología molecular de baja y media

resolución por electroforesis capilar, para la selección del donante del trasplante renal y familiar de células progenitoras hematopoyéticas, la detección y especificidad de anticuerpos anti-HLA mediante un sistema automatizado por ensayo inmunoenzimático y pruebas cruzadas mediante citometría de flujo, en el Centro de Ingeniería Celular para el trasplante de órganos y tejidos (CICEL), dependencia del IHI. Estas nuevas tecnologías, en su conjunto, garantizan una mejor selección entre posibles donantes y receptor en el desarrollo del trasplante renal, disminución del rechazo del injerto y mayor supervivencia del paciente trasplantado, así como la mejor compatibilidad entre donante y receptor del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) familiar.

En el año 2015, el programa de desarrollo de nuestras especialidades incluye la introducción del tipaje molecular de alta resolución para la selección del donante no relacionado en el TCPH y disminuir las posibilidades de enfermedad injerto contra huésped (del inglés: graft versus host). Lo anterior permitirá la creación gradual en los próximos años, de un registro de donantes no relacionados en Cuba y su incorporación a registros internacionales; la detección de anticuerpos no-HLA en la prueba cruzada pretrasplante; el desarrollo del TCPH con donantes no relacionados en Cuba de manera sistemática; y la creación de un banco de cordón umbilical para trasplante y el tratamiento de otras enfermedades, como las autoinmunes y otras crónicas, con terapia celular de menor inmunogenicidad.

En el Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL) del Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba, en el período de enero a diciembre de 2013, De La Guardia Pena, Odalis M, Garcia M y Ustariz C, analizaron los resultados de los estudios inmunológicos pretrasplante (tipificación de antígenos HLA de donantes y receptores relacionados y determinación de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II en los receptores), para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Las leucemias agudas constituyeron los diagnósticos más frecuentes para la solicitud del estudio. El 45,6 % de todos los posibles donantes resultaron haploidénticos con su receptor; el 21 % totalmente incompatibles y el 33,3 % idénticos. Con relación al polimorfismo HLA en la población de estudio, para la clase I, locus A: los antígenos A*02 y A*24 resultaron los más frecuentes en la totalidad de los individuos; para el locus B, en individuos blancos prevalecieron los antígenos B*35 y B*44; y en no blancos, B*35 y B*18.

4.5.1 Haplotipos y su relación con la Hematología

Los progenitores poseen un haplotipo HLA en común. Por lo tanto, los hijos tienen una posibilidad de uno en cuatro de heredar el mismo haplotipo de cada progenitor y el hijo 1 es homocigoto para ese haplotipo HLA. La transfusión de sangre de esta persona a un receptor no relacionado, sin este haplotipo, no provoca consecuencias deletéreas. No obstante, si el hijo 1 donara sangre a algunos de sus familiares heterocigotos para ese haplotipo (ambos progenitores y el hijo 3), el receptor no reconocería ningún antígeno extraño en los linfocitos transfundidos y no los eliminaría. Sin embargo, las células del donante reconocerían los antígenos HLA extraños del receptor, que podrían activarse, proliferarse y atacar al huésped.

En cuanto a la dinámica de los Haplotipos del sistema HLA y la relación con la hematología y la terapia transfusional, se demuestra en la herencia de haplotipos de los progenitores a sus hijos, estos explican que la transfusión entre familiares heterocigotos para ese haplotipo puede causar reacciones adversas. Lo cual demuestra la función que tienen de diferenciar lo propio de lo ajeno y asegurar la respuesta inmune. El Sistema HLA y la Hematología de acuerdo a la investigación realizada concluye que los haplotipos del sistema HLA juegan un rol importante en las reacciones transfusionales como la refractariedad de las plaquetas, lesiones pulmonares agudas transfusionales, quimerismo y enfermedad.

4.5.2 Reactivos para tipificación de histocompatibilidad

Reactivos monoclonales específicos para formas alélicas del complejo principal de histocompatibilidad humano HLA Clase I y Clase II se encuentran comercialmente disponibles y han reemplazado en muchos casos a sueros policlonales y a células homocigotas (Pistillo et al., 1988). No obstante, es bueno señalar que más recientemente la tipificación

HLA-Clase II ha evolucionado hacia el uso de sondas de ADN y amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Oka et al., 1994; Versluis et al., 1994).

4.5.3 Inmunofenotipificación

Anticuerpos monoclonales contra moléculas de la superficie de células de numerosos tejidos han sido preparados. Muchas de estas moléculas de superficie son utilizadas como marcadores específicos, bien sea de la naturaleza de la célula o del estado de diferenciación en el que se

encuentra. Como ejemplo citaremos anticuerpos monoclonales específicos para un complejo molecular llamado CD3 que se encuentra en todos los linfocitos T, pero no en los linfocitos B, contra las moléculas CD4 y CD8 que son marcadores específicos para linfocitos T cooperadores y T citotóxicos respectivamente y contra la molécula llamada CD34, presente en células pluripotenciales hematopoyéticas (Horejsi, 1991; LDAD, 1993).

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales también se han podido identificar moléculas asociadas a ciertos tumores, por ejemplo, variantes mutantes del oncogen P53 en tumores del tracto gastrointestinal (Odgen et al., 1994) y de la mama (Jacquemier et al., 1994) y algunos carbohidratos asociados a tumores linfohematopoyéticos (de Vries y van den Eijnden, 1992; Sell, 1993). La identificación de estos marcadores en biopsias y en aspirados de tejidos tumorales, secreciones, etc., permite la tipificación del tumor. Muchas veces esto es de gran interés porque no sólo ayuda al diagnóstico, sino que también la presencia o no de ciertas moléculas de diferenciación puede estar asociada a un mejor o peor pronóstico (Geisler et al., 1991; Porter-Jordan y Lippman, 1994). Usualmente la identificación se realiza empleando los anticuerpos monoclonales específicos, seguido de anticuerpos anti-ratón conjugados a fluoresceína y usando luego microscopía de fluorescencia o más modernamente con los aparatos llamados citofluorómetros (Drouet y Lees, 1993; Macey, 1993). Algunos ejemplos recientes de este tipo de aplicaciones se esbozan a continuación.

4.5.4 Inmunofenotipificación de leucemias

Anticuerpos monoclonales son utilizados para la caracterización del fenotipo del blasto leucémico (De Waele et al., 1991; Traweek, 1993). Algunos de los marcadores más utilizados son: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD 11, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD30, CD33, CD34, CD45, CALLA, la enzima TdT, inmunoglobulinas de superficie, RAB1, diversos epítomos del TCR, FcR, CR1, y en general, los marcadores relacionados a células primitivas indiferenciadas, linfoblastos, blastos relacionados a linfocitos T y linfocitos B, células mielomatosas, blastos relacionados a la serie granulocítica, blastos relacionados a monocitos, blastos indiferenciados de tipo mielomonocíticos, etc. La caracterización por la presencia o no de determinados marcadores, como se dijo antes no sólo permite un diagnóstico más preciso del tipo de malignidad, sino que también ayuda a establecer parámetros pronósticos (Mirro 1992) Adicionalmente, puede obtenerse información acerca del grado de eficacia de un tratamiento determinado y del grado de enfermedad

residual mediante la estimación del porcentaje de blastos leucémicos remanentes (De Rossi et al., 1993).

Se determinaron las frecuencias de 33 antígenos HLA de los loci-A, B y C en 144 pacientes leucémicos: 89 con leucemia linfoblástica aguda (LLA), 28 con leucemia aguda no linfoblástica y 27 con leucemia mieloide crónica, estratificados fenotípicamente en blancos, negros y mestizos, para evaluar la posible asociación entre estos marcadores genéticos con dichas enfermedades. Los antígenos HLA-A19 y A29 (19) mostraron asociaciones negativas con la LLA con un riesgo relativo (RR) de 0,08 y de 0,84, respectivamente. Se obtuvieron frecuencias estadísticamente significativas con un $p < 0,002$ para el A19 y $p < 0,002$ para el A-29, al compararlos con controles normales no relacionados. Los enfermos con LLA blancos positivos al antígeno HLA-A19 mostraron asociaciones negativas (RR = 0,10, $p < 0,002$) en relación con los controles blancos. Estos resultados sugieren protección individual y poblacional o ambas (fracción preventiva (FP) > 0), al desarrollo de LLA. El resto de los antígenos, HLA estudiados no mostraron asociación con leucemias.

4.5.5 Diagnóstico e Inmunotipificación de Cáncer

La detección de cáncer es quizás una de las aplicaciones más importantes y de mayor potencial de los anticuerpos monoclonales. Estos pueden ser usados *in Ovo* para la localización de tumores o de sus metástasis cuando se dispone de reactivos específicos para antígenos presentes en la membrana de la célula tumoral (Goldenberg y Schlom, 1993), o *in vitro* utilizándolos en ensayos tipo ELISA para la detección, en muestras de suero u otros fluidos biológicos, de moléculas como la gonadotropina coriónica (Yoshimura et al., 1994), la alfafetoproteína (Sell, 1993) o el antígeno prostático específico (Sell, 1993; Ploch y Brawer, 1994). En el caso de antígenos asociados a membrana, los anticuerpos monoclonales son conjugados a elementos trazadores radioactivos tales como radioisótopos del indio, tecnecio, yodo o bismuto, son administrados en el paciente y luego se procede a tomar gammagrafías permitiendo la localización y además dando una idea de la masa tumoral. El campo de esta aplicación incluye multitud de tumores entre los cuales se destacan: el de la mama, el uterino, el ovárico, el del colon, el del recto, el prostático, el del pulmón, el del hígado, y muchos otros más (Goldenberg y Schlom, 1993).

4.5.6 Refractariedad Plaquetaria

Refractariedad Plaquetaria mediada por acción inmune, Se reporta en un 60% de los receptores que han sido multitransfundidos. La aloinmunización HLA se genera contra antígenos clase I que ha sido provocada por los leucocitos residuales presentes en los hemocomponentes celulares (concentrados plaquetarios, paquetes globulares y/o sangre total). Estudios clínicos han demostrado que niveles de leucocitos de 5×10^6 puede ser la dosis de inmunización. Los receptores con este tipo de aloinmunización y refractariedad a plaquetas deben ser transfundidos con unidades de concentrados plaquetarios obtenidas por aféresis de un donante HLA compatible.

Se produce en receptores con anticuerpos anti-HLA o antiantígenos plaquetarios específicos por transfusiones o embarazos previos. Estos anticuerpos producen la destrucción de las plaquetas que contengan el antígeno correspondiente, manifestándose generalmente en un mínimo incremento del recuento plaquetario inmediatamente después de la transfusión de plaquetas y una pobre respuesta terapéutica. Debe diferenciarse aquellos casos de supervivencia acortada de las plaquetas por razones no inmunológicas (coagulación intravascular diseminada [CID], sepsis, esplenomegalia, etc.).

4.5.7 Otras aplicaciones

En el campo de la industria farmacológica los anticuerpos monoclonales también han sido de gran utilidad. Por ejemplo, empleando procedimientos de cromatografía de afinidad, estos reactivos se usan ampliamente en la purificación de hormonas, citocinas y de otros productos biológicos destacándose el interferon alfa, beta y gamma, los factores VII, VIII, IX y von Willebrandt de la coagulación la uroquinasa, las interleucinas IL-2 e IL-3, la gonadotropina coriónica y algunas beta-glicoproteínas específicas del embarazo. Así mismo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra agentes patógenos tales como bacterias gram-negativo, Hemophilus influenza, virus de la hepatitis A y B, o contra productos bacterianos como el lipopolisacárido de la pared de bacterias gram-negativo y toxinas como la diftérica o tetánica pueden su usados en protocolos de inmunización pasiva (Ziegler et al, 1991; Lang et al., 1993; Gustafsson et al., 1993).

V. DISEÑO METODOLÓGICO

a) Tipo de Estudio

Tipo de investigación documental descriptiva. Fundamentada en la consulta de documentos (libros, revistas, etc.) con el propósito de analizar de forma descriptiva y exploratoria un tópico en particular.

b) Recolección de la Información

La información fue recolectada de fuente secundaria, los investigadores utilizaron libros de Inmunohematología, Revistas científicas, diccionarios, Páginas de internet, artículos y publicaciones donde se aborda El Sistema HLA y todo lo relacionado con la Hematología. Se consideraron dentro de este estudio todos los datos bibliográficos, útiles para cumplir con los objetivos planteados en la investigación, la cual fue realizada de forma ordenada con la finalidad de construir conocimientos. Por lo tanto, se utilizó una estrategia donde se analizó y reflexionó sistemáticamente sobre la realidad usando diferentes documentos. Una vez recopilado y revisado todo el material documentado, la información se ordenó y se elaboró el informe final.

c) Instrumento de Recolección

Se elaboraron fichas bibliográficas, análisis de documentos y de contenidos. De igual forma se elaboró un esquema de trabajo, bosquejo del subtema, esquemas, cuadros sinópticos y registros de datos.

d) Presentación de la Información

Se utilizaron herramientas de informática, para el levantado de texto como el programa de Microsoft Word 2010 y el programa de Microsoft Power Point 2010 para la presentación final.

e) Ética en la confidencialidad de los datos

Para la realización de este estudio únicamente se utilizó información documental guardando los principios éticos en investigación para ser divulgados posteriormente.

VI. CONCLUSIONES

1. El rol que desempeña el Sistema Antígeno Leucocitario Humano en la Hematología está basado con el reconocimiento de antígenos y anticuerpos que pueden producir una reacción adversa en las transfusiones de hemocomponentes.
2. La dinámica de los haplotipos del Sistema HLA consiste en diferenciar lo propio de lo ajeno. En el reconocimiento de aloantígenos, las células del donante reconocerían los antígenos HLA extraños del receptor, que podrían activarse, proliferarse y atacar al huésped.
3. Las pruebas celulares, serológicas y moleculares se utilizan en la tipificación HLA para determinar el grado de compatibilidad que exhibe el receptor donador, detectar en el receptor anticuerpos anti-HLA clínicamente relevantes dirigidos en contra de las especificidades antigénicas de su potencial donador, conocer el grado de aloinmunización humoral del paciente (sensibilización) y conocer la especificidad del anticuerpo anti HLA presente para evaluar el estatus inmunológico del paciente.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB); Manual Técnico 15a Ed. 2007.
2. Bunce M, Welsh K. PCR-SSP typing of HLA class I and class II alleles. En: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, editor. Laboratory manual. Standard and AHG enhancement. Volume II. Fourth edition. USA: ASHI; 2000. p. 1-10.
3. Chávez González, M.A. Células troncales hematopoyéticas en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Rev Hematol. 2010; 11(Supl. 1): 54 – 55.
4. De Jongh B.M., Termijtelen A., Bruining G.J., De Vries R.R.P., Van Rood J.J. Relation of insulindependent diabetes mellitus (IDD) and the HLA-linked SB system. Tissue Antigens. 1984; 23: 87 – 93.
5. Gorodezky C. Manual de procedimientos serológicos y celulares de histocompatibilidad. México: INDRE; 2003 p. 78-80.
6. Hopkins, Catherine A. The basic lymphocyte microcytotoxicity tests. En: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, editor. Laboratory manual. Standard and AHG enhancement, volume I. Fourth edition. USA: ASHI; 2000. p. 1-7.
7. Macías Abraham C, Villaescusa Blanco R, Ustáriz García C, Ballester Santovenia JM. Tres décadas del desarrollo de la inmunología: su significación clínica y experimental. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1996;12(2):145-153.
8. Murphy K., Travers P., Walport, M. Immunobiology Janeway's. Octava edición. Editado por McGraw Hill Interamericana Editores S.A. México DF. México. 2010. 887 pp.
9. Rodey-Glenn E. HLA beyond tears. Second edition. Houston, USA: Durango, CO De Novo; 2000. p. 117- 148.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

1. bvs.sld.cu/revistas/hih/vol13_1_97/hih03197.html
2. HLA Informatics Group. Disponible en: [http:// www.anthonynolan.com/HIG/index.html](http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html)
3. <http://www.eprintsucm.es/tesis/qui/ucm-t25623.pdf>
4. [http://www.iatreia.udea.edu.co/ index.php/iatreia/issue/view/94](http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/issue/view/94)
5. [http://www.med.unne.edu.ar/catedras /bioquímica /hla.htm.](http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquímica/hla.htm)
6. <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>
7. <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>
8. <http://www.who.int/entity/healthinfo/>
9. United Network for Organ Sharing (UNOS). Disponible en: <http://www.unos.org/>

ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Dinámica del Sistema Antígeno Leucocitario Humano:

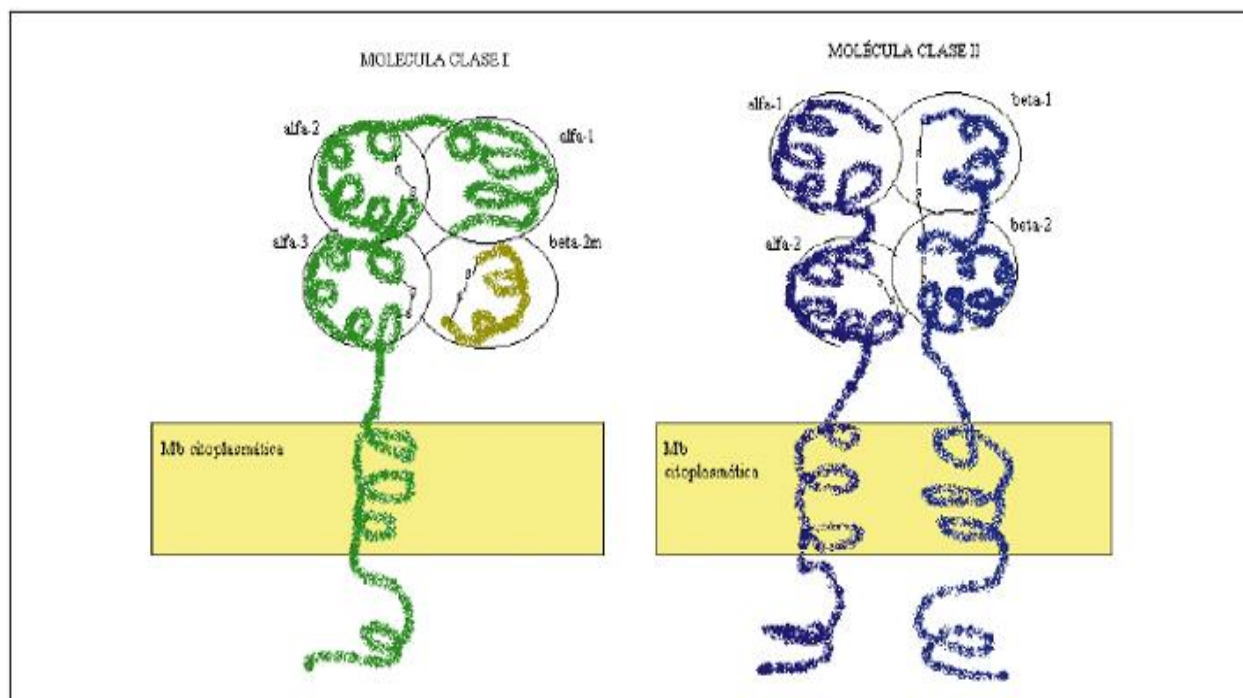


Figura 1. Estructura de las moléculas de clase I y II.

Figura 2.

Cuadro 1. Especificidades antigénicas y alelos presentes en los principales genes del sistema HLA		
Locus	Especificidades antigénicas	Alelos
HLA-A	28	767
HLA-B	62	1178
HLA-C	10	439
HLA-DRB1	21	618
Total	121	3002

Fuente: The IMGT/HLA Sequence Database (23/06/2009)

Figura 3.

ORGANIZACIÓN GENÉTICA DEL CMH HUMANO

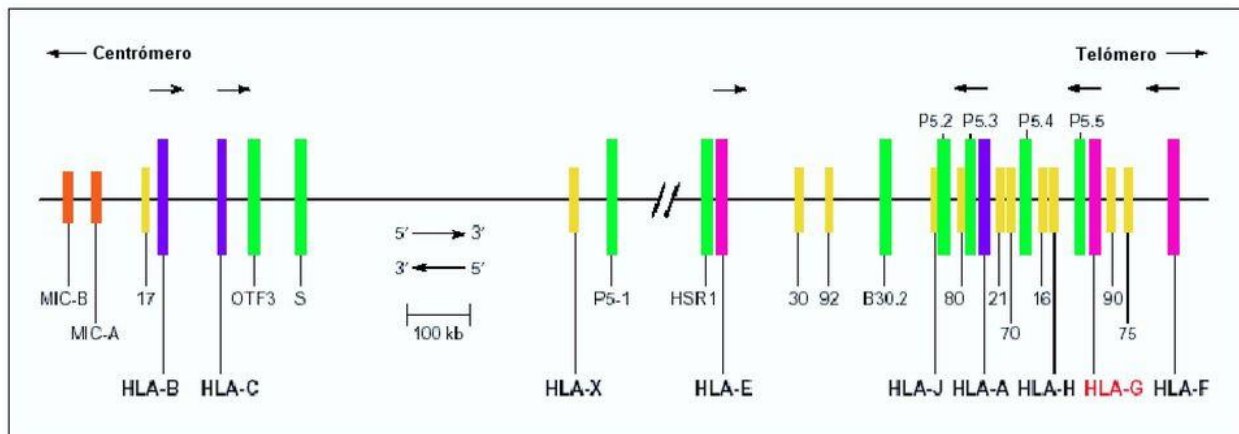
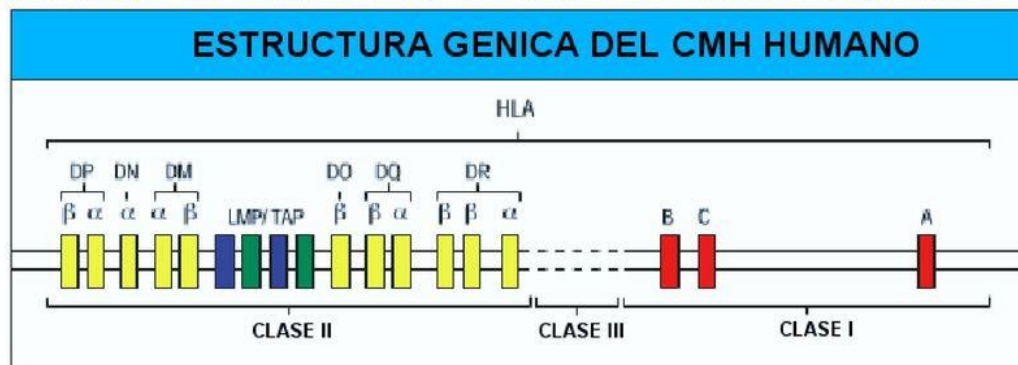


Figura 4.

TIPIFICACION DE HLA MOLECULAR

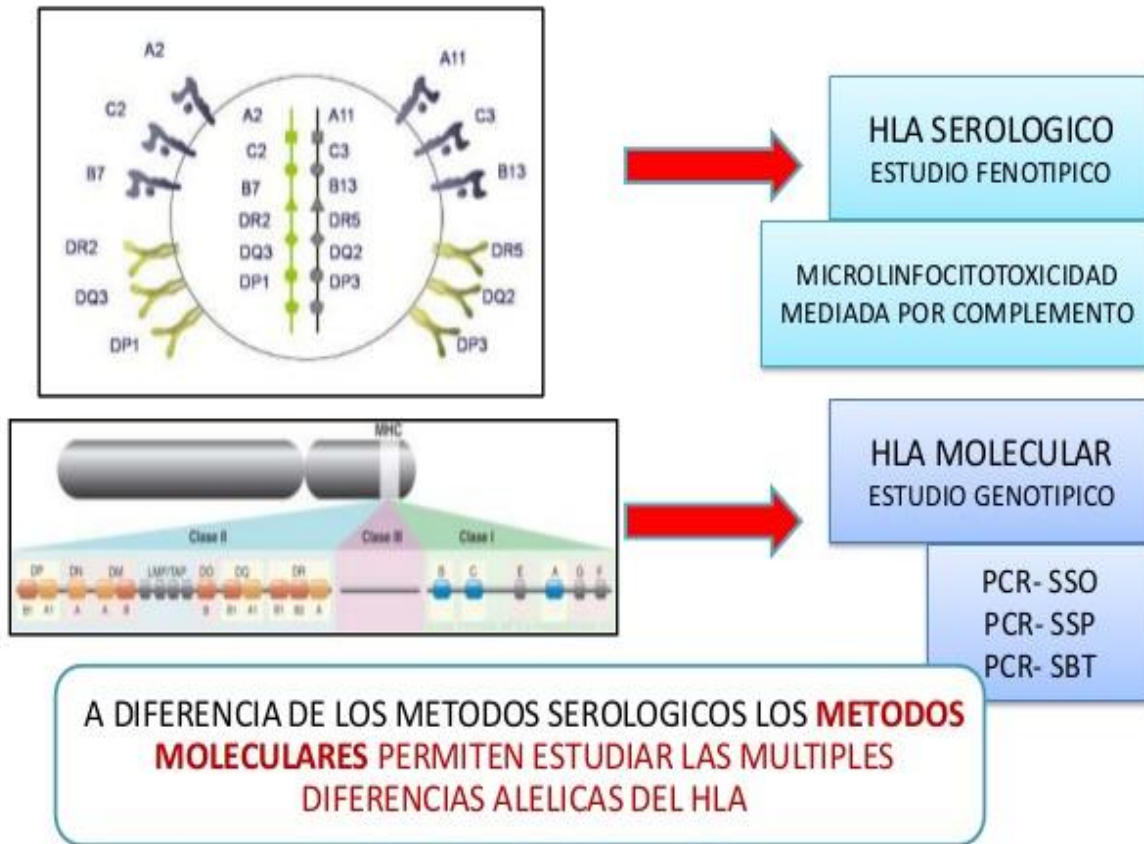


Figura 5. PCR-SSOP

Luminex Multiplex technology

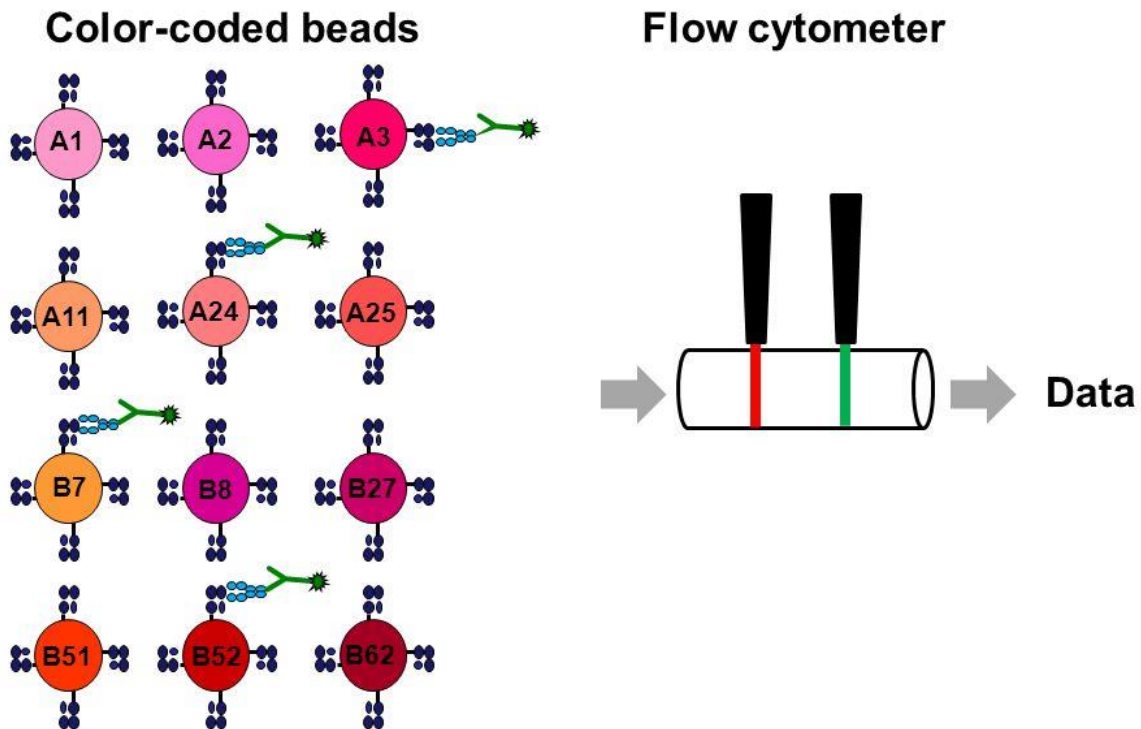


Figura 6.

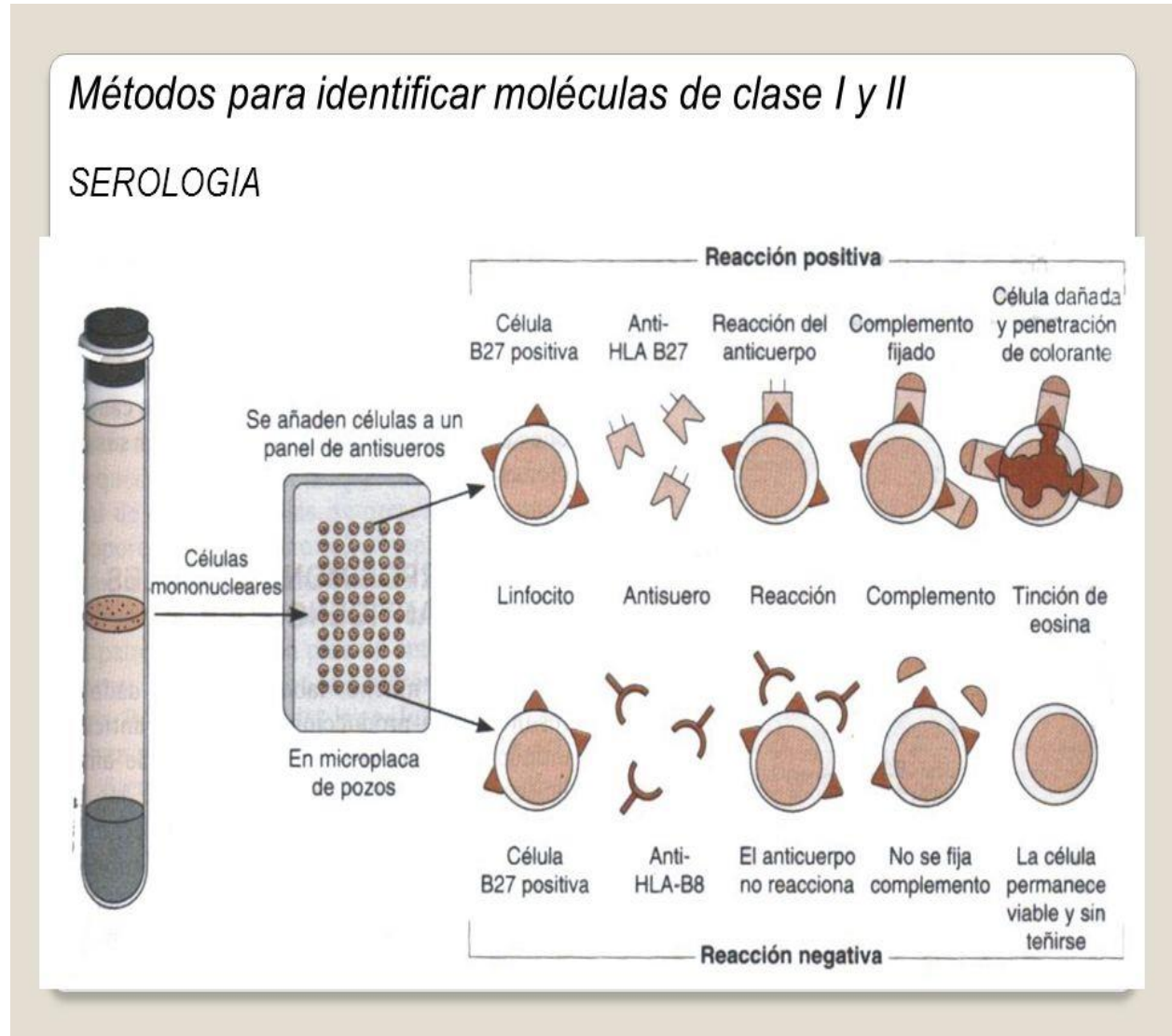
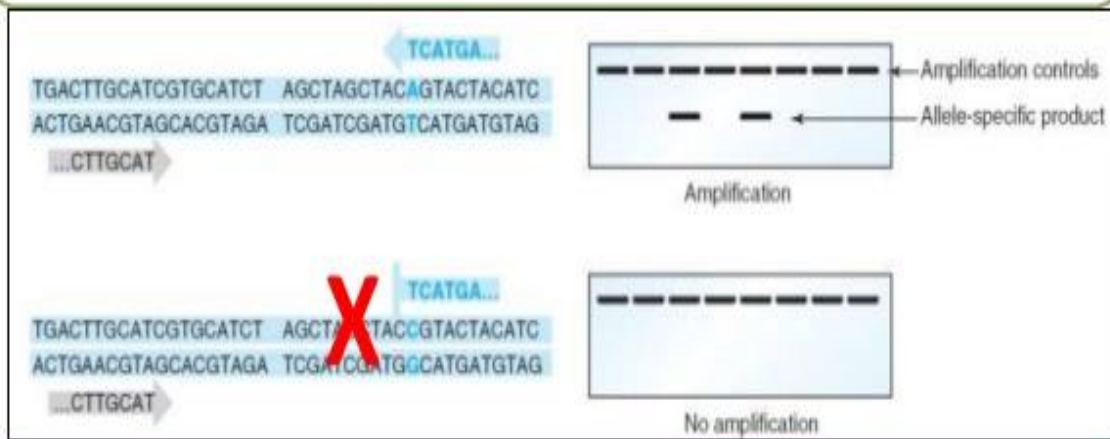


Figura 7. PCR-SSP:

FUNDAMENTO

LA AMPLIFICACION OCURRIRA SOLO SI EL EXTREMO 3' DEL PRIMER COINCIDA PERFECTAMENTE AL ALELO POLIMORFICO



EL PRIMER DE SECUENCIA ESPECIFICA (SSP) QUE TERMINA EN **AGTACT** AMPLIFICARA SOLO AL MOLDE QUE PRESENTA LA SECUENCIA COMPLEMENTARIA

LOS RESULTADOS SON DETERMINADOS DIRECTAMENTE POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

GLOSARIO

Alelo: es cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Primers: es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde

Heterodímero: molécula formada por dos componentes diferentes, pero estrechamente relacionados, como una proteína compuesta por la unión de dos cadenas separadas

Codominancia: es la situación en la que dos alelos diferentes están presentes en un genotipo y ambos son expresados. Se dice también que es un estado en el que un gen expresa su característica en el heterocigoto de modo equivalente a su par.

CPH (células progenitoras hematopoyéticas): conocidas como células madre, son células cuya función es la de producir las células de la sangre es decir glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

Epítipo: determinante antigénico, corresponde a la parte específica del antígeno que es reconocida por el parátipo. El parátipo designa la zona del anticuerpo cuya función es reconocer el antígeno. Cada antígeno viene determinado por sus epítipos.

Linfocitos (las células) T CD4: ayudan a coordinar la respuesta inmunitaria al estimular a otros inmunocitos, como los macrófagos, los linfocitos B y los linfocitos T CD8 para combatir la infección.

Linfocitos (las células) T CD8: es antígeno de los linfocitos T citotóxicos (categoría de linfocitos T, glóbulos blancos de la sangre que destruyen los agentes patógenos). En otras palabras, uniéndose a los receptores membranosos de los linfocitos T citotóxicos, los **CD8** desencadenan su acción inmunitaria.

Exón: es la región de un gen que no es separada durante el proceso de corte y empalme y, por tanto, se mantienen en el ARN mensajero maduro. En los genes que codifican una proteína, son los **exones** los que contienen la información para producir la proteína codificada en el gen.

HLA: Antígeno leucocitario humano.

Anti-HLA: Anticuerpos anti leucocitarios humanos.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

Antígeno MAC: Las moléculas de adhesión celular (MAC) constituyen un grupo de glicoproteínas y moléculas de hidratos de carbono que se expresa, en la superficie de cada cuerpo celular.

Haplotipos: es un conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos. Haplotipo se puede referir a una combinación de alelos o a un conjunto de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) que se encuentran en el mismo cromosoma.

Aloreactividad: es un fenómeno inmunológico complejo que conduce al rechazo de un injerto en el marco de un trasplante de un órgano o tejido. Si no se instaura un tratamiento inmunosupresor eficaz la aloreactividad provocará la pérdida definitiva del trasplante.

Locus: es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador (marcador genético).

DNA: Sigla internacional del ADN (ácido desoxirribonucleico), ácido nucleico que se encuentra en el núcleo de las células y es el principal constituyente del material genético de los seres vivos.

Células NK: Una célula asesina natural, o célula NK (Natural Killer) es un tipo de leucocito o glóbulo blanco de la sangre que actúa en el sistema inmunológico como primera línea de defensa contra los invasores extranjeros, como tumores, bacterias y virus.

Interferón: son unas proteínas producidas naturalmente por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales como respuesta a agentes patógenos, tales como virus y células cancerígenas.