

Nuevas estrategias de tipificación HLA para potenciar los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas en Cuba

New HLA typing strategies to promote the hematopoietic stem cell transplants in Cuba

AL DIRECTOR:

Cuando alrededor de los años 70 del siglo pasado se comenzó a determinar la compatibilidad entre el donante y su receptor mediante la tipificación del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA, del Inglés *human leukocyte antigens*); se utilizaron anticuerpos policlonales como reactivos de detección. Con el desarrollo de la biología molecular se sustituyó paulatinamente la serología por el análisis del ADN.^{1,2}

Los métodos de tipificación HLA por biología molecular que brindan una información equivalente a la de los serológicos se denominan "de baja resolución". Por otra parte, los que ofrecen un mayor nivel de detalles y permiten agrupar los alelos que codifican solo aquellas moléculas HLA con el mismo sitio de unión al antígeno, se conocen como "de alta resolución".³

En el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), único centro en Cuba donde se realiza la tipificación HLA como soporte a la actividad de trasplante, se comenzaron a aplicar rutinariamente las técnicas de biología molecular de baja resolución a partir de enero del 2013 y desde septiembre del 2015 se introdujeron también las de alta resolución.^{4,5}

El primer método de biología molecular que se utilizó en el IHI se conoce como "reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), con cebadores específicos de secuencia (SSP, del inglés *specific sequence primers*)"; y se basa en la amplificación selectiva de los genes HLA, los cuales se verifican en una etapa pos-PCR mediante una electroforesis de ácidos nucleicos.⁶

La PCR-SSP es útil en las tipificaciones HLA de baja resolución de los donantes renales vivos o cadáveres y sus receptores, y en la mayoría de los estudios familiares para el trasplante relacionado de células progenitoras hematopoyéticas (CPH); sin embargo, un resultado en alta resolución para el trasplante no relacionado de CPH puede demorar varios días con esta metodología.⁶

En marzo del 2017 se introdujo en el IHI otro sistema basado en oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO, del Inglés *sequence-specific oligo nucleotides*), los cuales se hibridan de forma complementaria con el ADN humano previamente amplificado por PCR.⁷

Las tipificaciones HLA por PCR-SSO en un citómetro de flujo multiparamétrico tipo Luminex son más rápidas que las que se realizan por PCR-SSP. Cuando los *loci* HLA-A-B-C-DRB1-DQB1/A1 se expresan en baja resolución pueden incluirse hasta 19 pacientes simultáneos en una placa de 96 pozos, a diferencia de la PCR-SSP que requiere de 96 pozos o más para un solo individuo.^{6,8}

La tipificación HLA por PCR-SSO con Luminex tiene como desventaja que es dependiente de un equipamiento costoso y de sistemas de procesamiento informático, además de que frecuentemente arroja resultados ambiguos en alta resolución a nivel alélico, lo que obliga a estimar la mayor probabilidad o a expresar todas las posibilidades, lo que se conoce como "resolución intermedia".^{8,9}

Las tipificaciones mediante la secuenciación del ADN en sistemas tipo Sanger (SBT, del inglés *Sanger based typing*), permiten identificar el orden de las bases nitrogenadas dentro de la región del genoma en que están codificados los antígenos HLA.¹⁰

Esta metodología devuelve los resultados en alta resolución de forma intrínseca y se considera el método de referencia en la tipificación HLA. Aunque la SBT también puede arrojar resultados ambiguos, estos se resuelven con el empleo de cebadores de secuenciación específicos de grupo (GSSPs, del inglés *group specific sequencing primers*).^{9,10}

La SBT es costosa, por lo que muchos bancos de sangre de cordón umbilical o registros de donantes voluntarios de CPH suelen determinar inicialmente los *loci* HLA-A-B por baja resolución y el *locus* HLA-DRB1 por baja o alta. En los casos en que se encuentran individuos compatibles, primero se expanden las tipificaciones aHLA-C-DQB1 y si también hay coincidencias es que se indica la SBT.¹⁰

La verdadera revolución en el campo de la tipificación HLA ha llegado en los últimos años con el avance de los sistemas secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*).

Esta metodología se basa en una secuenciación masiva y paralela del ADN y en programas bioinformáticos especializados que determinan el resultado final por comparación con las bases de datos de alelos preestablecidas.¹¹

Aunque los equipos de NGS tienen un precio elevado, el costo por cada determinación es mínimo. Este sistema también supone un ahorro financiero y de tiempo, porque devuelve de forma inicial los resultados en alta resolución y hace innecesario emplear primero otro método.^{11,12}

Algunos estuches para NGS permiten tipificar en el mismo pozo de reacción el HLA de 96 pacientes^{11,12} e incluso otros alcanzan las 300 muestras simultáneas, más la determinación del sexo y de genes como CCR5, KIR, ABO y RhD, que son de interés por su impacto en el resultado de los trasplantes de CPH.¹³

La NGS sería actualmente el sistema de elección para desarrollar en Cuba el trasplante alogénico no relacionado de CPH, porque permitiría crear en poco tiempo un registro cubano de donantes y brindaría la capacidad de tipificación que necesita un banco de sangre de cordón umbilical.^{2,12}

La introducción de un secuenciador de tipo NGS también potenciaría el estudio de las inmunodeficiencias primarias (IDP), de los trastornos de la coagulación y de las hemopatías malignas. Con esta tecnología se podrían secuenciar miles de genes por paciente y luego analizarlos en el contexto clínico para llegar a un diagnóstico más preciso.^{11,14}

Los grandes avances tecnológicos en el campo de la biología molecular ya no ocurren en décadas, sino en meses; incluso, cuando se publique esta carta, pudieran estar disponibles otros métodos revolucionarios aplicables también a la tipificación HLA, como el sistema basado en nanoporos MinION.^{15,16}

MinION es un dispositivo portable que pesa solo 90 g y se conecta a una computadora por un puerto USB 3.0. Puede secuenciar en tiempo real segmentos de ácidos nucleicos de gran longitud sin necesidad de amplificación previa de la molécula. Su atractivo radica en la portabilidad, en el bajo costo por base nitrogenada secuenciada y en la rapidez con que se obtiene el resultado.^{15,16}

Las estrategias de tipificación HLA para potenciar el trasplante de CPH en Cuba deberán basarse en la experiencia acumulada en este campo a nivel mundial, incorporando directamente las tecnologías más modernas y eficientes, lo que permitiría a corto plazo alcanzar la meta deseada: salvar la vida de los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mittal KK. Standardization of the HLA typing method and reagents. Report of a workshop held on November 11, 1976, by the Bureau of Biologics, Food and Drug Administration, United States Department of Health, Education and Welfare. *Vox Sang.* 1978;34(1):58-63.
2. Erlich H. HLA DNA typing: past, present and future. *Tissue Antigens.* 2012;80(1):1-11.
3. Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, et al. Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group. *Hum Immunol.* 2011;72(12):1214-6.
4. Bencomo Hernández A. A propósito del primer año del Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2014;30(3):192-5. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892014000300001&lng=es&nrm=iso
5. Macías Abraham C. Histocompatibilidad: pasado, presente y futuro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2015;31(1):53-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892015000100006&lng=es&nrm=iso.
6. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol.* 2012;882:9-25.
7. Trajanoski D, Fidler SJ. HLA typing using bead-based methods. *Methods Mol Biol.* 2012;882:47-65.
8. Testi M, Andreani M. Luminex-Based Methods in High-Resolution HLA Typing. *Methods Mol Biol.* 2015;1310:231-45.

9. Paunic V, Gragert L, Madbouly A, Freeman J, Maiers M. Measuring ambiguity in HLA typing methods. *PLoS One*. 2012;7(8):e43585.
10. Perng CL, Chang LF, Chien WC, Lee TD, Chang JB. Effectiveness and limitations of resolving HLA class I and class II by heterozygous ambiguity resolving primers (HARPs)--a modified technique of sequence-based typing (SBT). *Clin Biochem*. 2012;45(16-17):1471-8.
11. Carapito R, Radosavljevic M, Bahram S. Next-Generation Sequencing of the HLA locus: Methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. *Hum Immunol*. 2016;77(11):1016-23.
12. Zhou M, Gao D, Chai X, Liu J, Lan Z, Liu Q, et al. Application of high-throughput, high-resolution and cost-effective next generation sequencing-based large-scale HLA typing in donor registry. *Tissue Antigens*. 2015;85(1):20-8.
13. Schofl G, Lang K, Quenzel P, Bohme I, Sauter J, Hofmann JA, et al. 2.7 million samples genotyped for HLA by next generation sequencing: lessons learned. *BMC genomics*. 2017;18(1):161.
14. Fang M, Abolhassani H, Lim CK, Zhang J, Hammarstrom L. Next Generation Sequencing Data Analysis in Primary Immunodeficiency Disorders - Future Directions. *J Clin Immunol*. 2016;36 Suppl 1:68-75.
15. Walter MC, Zwirgmaier K, Vette P, Holowachuk SA, Stoecker K, Genzel GH, et al. MinION as part of a biomedical rapidly deployable laboratory. *J Biotechnol*. 2017;250:16-22.
16. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*. 2016;17(1):239.

Recibido: 9 de enero de 2017.

Aprobado: 9 de agosto de 2017.

Dr. Arturo Chang Monteagudo. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268.
Correo electrónico: rchematologia@infomed.sld.cu