



Pruebas previas para evitar el rechazo a:

Trasplantes de Órganos en Nicaragua



Tipificación del Antígeno Leucocitario Humano (HLA-A) mediante el empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en estudiantes de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua), 2004.

*Karla Pérez Martínez *Gabriela Pérez Pantoja, *Oscar Salamanca Castilla, *Josefa Morán Tercero, *Rafael Flores Obando. *Gustavo Sequeira

*Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN -Managua), Nicaragua; **Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana, Managua, Nicaragua

Palabras clave: Alelos; Antígeno Leucocitario humano; Primers; Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Aunque en otros países la tipificación de HLA a través de PCR es algo común, no ocurre lo mismo en Nicaragua, razón por lo que este estudio es un esfuerzo pionero en su ramo. Se identificó el Antígeno Leucocitario Humano (HLA-A) clase I en muestras sanguíneas de 24 estudiantes de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Se extrajo el ADN de las muestras y se procesó mediante el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con una secuencia específica de primers (PCR-SSP), encontrando que la variante de alelos de HLA-A más frecuentes en la población estudiada fueron HLA-A*11 y HLA-A*66. Según cálculos del porcentaje de homocigotos y heterocigotos se obtuvo un 50% para cada uno respectivamente; esto podría indicar una posible disminución en la variabilidad genética para estos marcadores en la población estudiada, para lo cual es necesario analizar un mayor número de muestras.

INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) se generó un avance significativo en el trasplante de órganos y tejidos. El HLA brinda información relacionada con la compatibilidad genética entre dos sujetos (donador-receptor) e indica las posibilidades de rechazo de un órgano o tejido a trasplantar.

El HLA es un grupo de genes localizados en el cromosoma 6, se designaron así debido a que

codifican antígenos leucocitarios humanos, los cuales son aloantígenos sobre leucocitos de una persona (donador) que inducen la producción de anticuerpos en el organismo de otra (receptor).

Existen tres clases diferentes de HLA, I, II, III, siendo de especial interés para la donación y trasplantes de órganos la clase I con los subtipos A, B, C y la clase II con el subtipo DR. Pero para cualquier procedimiento que involucre el trasplante de órganos, es necesario la tipificación del HLA utilizando la biotecnología a través de la técnica de PCR.

La primera aplicación de la biotecnología en Nicaragua se realizó en junio de 1991 a través de la utilización de PCR para el diagnóstico de Leishmaniasis.

En 1998, el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana inició la caracterización genética de la población nicaragüense, diagnósticos fitosanitarios y detección de material transgénico en productos alimenticios. Así mismo, otras instituciones como el Ministerio de Salud, Universidad Nacional de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (Managua y León), Universidad Nacional Agraria también han utilizado técnicas de biología molecular tanto para fines diagnósticos como investigativos.

Hasta el momento, Nicaragua no cuenta con un banco de donantes de órganos, ni se han realizado estudios de implementación de técnicas como PCR para la identificación del HLA.

Es por ello que en el presente estudio se realizó la tipificación del Antígeno Leucocitario Humano clase I,



subtipo A (HLA-A) mediante el empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras sanguíneas de 24 estudiantes de la Facultad de Medicina de la UNAN-Managua, como etapa inicial para conocer el perfil del HLA-A de la misma, dando pautas para continuar el estudio dirigido a toda la población y poder crear el primer banco de donantes de órganos en Nicaragua.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

El universo estuvo constituido por 1.075 estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-Managua, durante el período de enero a junio del 2004. La muestra fue de 24 estudiantes de Medicina, seleccionados por conveniencia. Tomando en cuenta los siguientes criterios: que fuesen estudiantes de Medicina cursando desde primero a quinto año, y voluntarios para participar en el estudio.

Se tomaron en cuenta variables sociodemográficas de la población estudiada como el sexo, edad procedencia y religión.

Para la recolección se divulgaron objetivos de la investigación a cada grupo de estudiantes; todos los voluntarios llenaron y firmaron hoja de consentimiento informado. También se tomó ficha de registro con los datos sociodemográficos de cada uno de los participantes.

Extracción de muestra

Se extrajeron 3cc de sangre venosa a cada participante, las muestras fueron tomadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-Managua.

Extracción de ADN nuclear de la muestra de sangre

Se mezcló 300 ul de sangre con solución lisadora de células e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, se repitieron dos veces los pasos anteriores. Posteriormente se agregó solución lisadora de núcleo e incubó a 37° por una hora. Se adicionó solución precipitadora de proteínas centrifugándose al 1400 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un tubo que contenía 300 ul de isopropanol. Luego se centrifugó por un minuto y al sedimento se le agregó etanol al 70%, para su posterior centrifugación. Al sedimento se le agregó solución rehidratante y se dejó 4C° toda la noche.

Preparación de la reacción de PCR

La mezcla de la reacción para cada muestra consistió en 208 ul de agua estéril, 26 ul de ADN de la muestra 26 ul de rojo cresol y 2.6 ul la enzima taq polimerasa. El control negativo contenía todos los componentes anteriores, exceptuando el ADN.

Cada muestra se amplió 24 veces en el termociclador Perkin-Elmer, através del programa computarizado GeneAmp PCR System 2400.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa. El gel contenía 2% de agarosa, buffer TBE y 3 ul de bromuro de esthidium. Una vez puesto el gel en condiciones adecuadas y dentro de la cámara, se colocaron los marcadores de ADN de 100 pares de bases en los extremos y se colocó 10 ul de la solución de PCR de cada una de las muestras en su pozo correspondiente.

Lectura e interpretación de resultados

Terminado el proceso de electroforesis se retiró el gel de la cámara y se observó en cuarto oscuro en contraposición a una superficie de luz ultravioleta, se procedió a fotografiar el gel para registrar las secuencias específicas donde se obtuvieron productos de ampliación del ADN, utilizándose la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa como control interno. Los resultados fueron interpretados por medio de una tabla de lectura de bandas (Fastype HLA-A* Low Resolution Specificity Table) suministrada por BIO-SYNTHESIS (Abril 2004).

Análisis estadístico

La información sociodemográfica se procesó mediante la aplicación del paquete estadístico SPSS versión 11.01 y se utilizó el programa Power Stats de Promega Corp. para realizar los cálculos de las frecuencias alélicas y porcentajes de homocigotos y heterocigotos del HLA-A

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Datos sociodemográficos:

De los 24 sujetos del estudio, el 62.5% (15) se encuentran entre las edades de 18-19 años, seguido del 16.7% (4) entre las edades de 20-21 años, coincidiendo estos rangos con el nivel de educación superior, el estudio se enfocó a nivel universitario.



El 83.3% (20) son del sexo femenino y el 16.7% (4) del sexo masculino; estos datos coinciden con la información reflejada en el registro de matrícula de los estudiantes de la Facultad de Medicina de la UNAN-Managua, el cual indica que la mayor presencia estudiantil es del sexo femenino.

El 58% (14) proceden del municipio de Managua, el 12.5% (3) son de Carazo y 16.6% (4) se encuentran distribuidos en forma equitativa en los municipios de Granada y Masaya.

En cuanto a la religión el 79.2% (19) son católicos, y el 16.7% (4) son evangélicos, siendo esta información importante para decidir sobre trasplante de órganos y tejidos, ya que existen religiones que vetan esta práctica. Por ejemplo, lo revelado por un estudio entre budistas sobre el nivel de conocimiento, creencias, actitudes y prácticas de la población mayor de 20 años del departamento de Managua con respecto a la donación y trasplante de órganos y tejidos realizados en el periodo junio-octubre 2004.

Tabla 1 Información sociodemográfica de los participantes en el estudio.

Tipificación del HLA-A:

Código	Edad	Sexo	Procedencia	Religión
01	40	F	Managua	Católica
02	19	F	Managua	Católica
03	19	F	Managua	Católica
04	19	F	Managua	Católica
05	23	F	Granada	Católica
06	19	F	Managua	Católica
07	19	F	Granada	Católica
08	20	F	Masaya	Católica
09	24	M	Carazo	Evangélica
10	20	F	León	Católica
11	20	F	Managua	Católica
12	19	F	Managua	Católica
13	23	M	Managua	Evangélica
14	19	M	Masaya	Católica
15	19	F	Managua	Católica
16	19	F	León	Católica
17	18	M	Managua	Católica
18	19	F	Carazo	Católica
19	21	F	Managua	Católica
20	19	F	Managua	Católica
21	25	F	Matagalpa	Evangélica
22	19	F	Managua	Católica
23	19	F	Managua	Ninguna
24	19	F	Carazo	Evangélica

De las 24 muestras de ADN analizadas, solamente 17 fueron amplificadas por medio de la técnica de PCR-SSP para determinar los alelos del HLA-A de cada individuo. Estos resultados se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 2 Subtipos de alelos de HLA-A de los participantes.

No. de muestra	Grupo de Subtipos de HLA-A
1	A11/A23
2	A11/A11
3	A11/A68
4	A11/A66
5	A66/A66
6	A34/A66
7	A23/A66
8	No amplificó
9	A23/A66
10	No amplificó
11	A11/A11
12	No amplificó
13	No amplificó
14	A11/A11
15	No amplificó
16	A66/A68
17	A11/A11
18	No amplificó
19	A23/A23
20	No amplificó
21	A11/A24
22	A74/A74
23	A23/A68
24	A80/A80

Los alelos más frecuentes del HLA-A de las muestras estudiadas son los subtipos A*11 y A*66, predominan en la posición 4 y 19 con un tamaño del producto de 200 pares de bases, según interpretación en la tabla de lecturas de bandas (Fastype HLA-A* Low Resolution Specificity Tabla) de BIO-SYNTHESIS incorporated (Abril 2004).

F: Femenino

M: Masculino



Frecuencias alélicas de HLA-A de los participantes

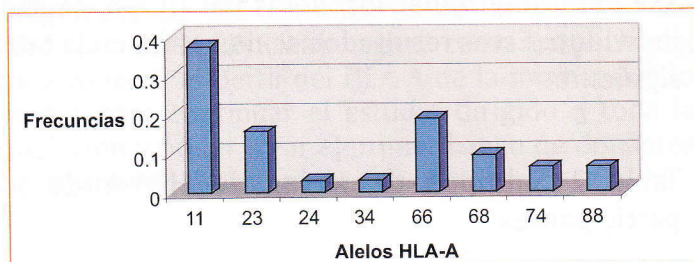


Gráfico 1

Se realizó el cálculo de homocigotos y heterocigotos y se obtuvo un 50 % para cada uno respectivamente. Esto podría indicar una posible disminución en la variabilidad genética para estos marcadores en la población de estudiantes que participaron, para lo cual es necesario ampliar el estudio a un mayor número de muestras.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



M13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24M



Gráfico 2

Se observa en la fotografía del gel de agarosa los subtipos de alelos A*11 y A*66, en la posición 4 y 19 con un tamaño del producto de 200 pares de bases, según interpretación en la tabla de lectura de bandas (Fastyp HLA-A Low Resolution Specificity Tabla) de BIO-SYNTHESIS incorporated (ABRIL 2004).

Factores que intervinieron en la aplicación de la técnica:

Concentración óptima de ADN:

Se obtuvieron concentraciones diferentes de ADN desde 30 ng/ul hasta 700 ng/ul, resultando la concentración ideal para trabajar la de 50 ng/ul, porque con una concentración inferior no se obtuvo amplificación de los pares de bases y con una superior se inhibieron los productos de las muestras, debido a la competencia de dos pares de cebadores por el mismo ADN.

La temperatura de los reactivos:

En el proceso es muy importante mantener los reactivos

reactivos en hielo, por ejemplo la taq polimerasa a pesar de ser termoestable produjo un artefacto llamado "primer dimer" que consiste en la superposición de los cebadores sobre sí mismo, dando lugar a una amplificación inespecífica de una banda de uno 50 pares de bases o menos, siendo ésta una amplificación específica débil.

Esterilización del material:

Aunque no hubo evidencia de contaminación en las muestras procesadas, se consideró determinante la esterilización del material de laboratorio y el manejo adecuado de las muestras.



Bibliografía

1. Buckley, Rebeca H. Durham, NC (2003). Organ and Bone Marrow, Transplantation and Immunology No. 27. University Medical Center, Department of Pediatrics, Allergy/Immunology.
2. Jawetz, Melnick y Aldelberg (2002). Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Inmunología Sección II. 17 Edición. Manual Moderno.
3. Roitt, Ivan M. Y Delves, Peter J. (2003). Inmunología Fundamentos. 10ª Edición Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina.
4. Harris, Eva (1998). A Low-Cost Approach to PCR. Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. Oxford University Press. New York.
5. Universidad Centroamericana UCA (2004) Centro de Biología Molecular. Memorias del Segundo Congreso de Biotecnología. Managua, Nicaragua.
6. Pérez, Karla E. y Pérez Gabriela A. (2003). Nivel de conocimientos, actitudes, creencias y prácticas de la población mayor de 20 años del departamento de Managua, Nicaragua respecto a la donación y trasplante de órganos y tejidos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua).