

AVENÇOS EN LA DETERMINACIÓ DELS ANTÍGENS HLA: SEROLOGIA I GENOTIPIFICACIÓ

MANEL JUAN, JAVIER CALVO, EVA MARTÍNEZ-CÁCERES, MARIA SIMARRO, JAUME MARTORELL,
ANTONI GAYA I JORDI VIVES

Servei d'Immunologia, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona

RESUM

Els antígens leucocitaris humans (HLA) tenen un paper clau en la resposta immunològica. La determinació de llur variabilitat s'ha demostrat especialment decisiva en l'anàlisi prèvia de la compatibilitat d'òrgans transplantats. Fins ara, l'alta variabilitat al·lèlica dels HLA havia estat únicament determinada fenotípicament (serologia, MLC), però l'arribada de la biologia molecular ha proporcionat noves i millors eines. Entre elles, aquelles proves derivades de la PCR permeten una determinació més acurada i senzilla d'aquest polimorfisme, i en possibilitant l'automatització. En aquest article, revisem i comentem els diferents mètodes que, de manera habitual, hom emprà als laboratoris d'histocompatibilitat.

MOTS CLAU: *HLA, genotipificació, polimorfisme, PCR, RFLP.*

SUMMARY

The human leukocyte antigens (HLA) play a main role in the immune response. In tissue transplantation, the determination of HLA variability is especially important. Their high allelic variability has traditionally been determined phenotypically (serology, MLC), but may often be more accurately investigated by molecular biology techniques. Among them, those assays derived from the PCR, allow a more accurate and easier determination of this important polymorphism and its possible automatization. In this article, we review and comment different methods which are currently used in HLA-typing labs.

KEY WORDS: *HLA, genotyping, polymorphism, PCR, RFLP.*

Amb les sigles HLA (*human leukocyte antigens*) es designen els antígens glicoproteics humans codificats pel complex major d'histocompatibilitat o MHC (*major histocompatibility complex*), la regió gènica que en cada espècie codifica aquestes molècules, també anomenades *antígens (Ag) d'histocompatibilitat*, ja que van ésser descoberts pel seu important paper en l'acceptació o el rebuig d'un empelt. Aquestes glicoproteïnes de membrana extracel·lular, extraordinàriament polimòrfiques (diversitat en la seqüència d'una única molècula segons s'expressi en distints membres de l'espècie), tenen com a funció fisiològica la presentació dels Ag perquè puguin ésser reconeguts pel receptor dels limfòcits T (TcR) de manera específica, conjuntament amb les molècules CD4 o CD8. En aquest reconeixement resulta definitori el polimorfisme dels antígens HLA, ja que el TcR reconeix cada Ag en el context polimòrfic d'una forma concreta d'HLA presentador (en canvi, la interacció amb les molècules CD4 o CD8 es realitza en zones monomòrfiques de la molècula HLA).

La regió gènica de l'MHC humà, que es troba localitzada al braç curt del cromosoma 6 (regió 6p21) al llarg de 3.800 kb (Ezquerria i López de Castro, 1987), presenta més de trenta gens que es classifiquen en tres classes: I, II i III (vegeu la fig. 1). Només els gens de classe I i II codifiquen proteïnes dels antígens d'histocompatibilitat. Així, tres dels loci gènics de classe I són responsables de la codificació dels HLA-A, HLA-B i HLA-C, mentre que els diversos loci de classe II codifiquen els HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP. L'estructura dels antígens de classe I, que es troben en la membrana cel·lular de totes les cèl·lules nucleades de l'organisme, és el resultat de la presentació conjunta del pèptid b_2 -microglobulina i de la cadena polimòrfica HLA-A, HLA-B o HLA-C. Per la seva part, les molècules de classe II, que bàsicament es troben restringides a la superfície de les cèl·lules presentadores d'Ag (macròfags, monòcits, limfòcits B), resulten de la conjunció de dues cadenes (a i b) codificades per gens de l'MHC de classe II.

Totes les molècules HLA són extremament

polimòrfiques, presenten moltes variants alternatives d'un mateix gen (al·lels) i fan del sistema MHC el complex gènec més polimòrfic que es coneix (més de vint al·lels distints al locus HLA-A, més de cinquanta al locus HLA-B...). Algunes d'aquestes variants, que s'hereten en un patró de herència mendeliana codominant, són força característiques de certs grups racials. Aquest alt polimorfisme fa que sigui bastant poc freqüent que dos individus no emparentats siguin HLA idèntics (compatibles). Aquesta peculiarment alta variabilitat i les seves repercussions clíniques (transplantament, relació amb determinades malalties...), antropològiques (definicions racials, fluxos de poblacions...) i legals (investigació de paternitat, identificació de residus humans...) és la raó per la qual, juntament a la importància funcional de les molècules HLA (presentació antigènica, selecció clonal tímica, activació i adhesió interleucocitària...), s'han dedicat i es dediquen tants esforços per a la definició concreta dels determinants antigènics HLA d'un individu (tipificació) (Gallart i Vives, 1988; Gallart i Ercilla, 1993).

Tradicionalment, els mètodes de tipificació (vegeu la taula 1) dels antígens HLA han estat dos: la determinació serològica i el cultiu mixt limfocitari (MLC *mixed lymphocyte culture*). No fa pas gaire, la introducció de tècniques bioquímiques (especialment l'isoelectroenfocament) va semblar que seria una eina útil per incrementar el coneixement d'aquest polimorfisme. Actualment, amb l'incorporació de les tècniques de biologia molecular, especialment les derivades de la reacció en cadena de la polimerasa PCR, s'ha produït una important revolució amb l'aparició d'un seguit de proves (que s'engloben dins del terme *genotipificació*), que, a més de permetre un altíssim grau de definició en el polimorfisme, comporten un augment de la simplicitat, la rapidesa i la reproductibilitat de la tipificació i, presumiblement, en un futur no molt llunyà, en permetran l'automatització. A continuació intentarem presentar de manera resumida com són aquestes tècniques i quina és la principal aportació (o aportacions) que presenten (vegeu la taula 1).

TAULA I

Tècniques de tipificació

A) TÈCNiques SEROLÒGIQUES:	Serotipificació per microlimfotoxicitat per mitjà de complement
B) CULTIU MIXT LIMFOCITARI:	— Primari (Dw) — Secundari (DP)
C) TÈCNiques BIOQUÍMIQUES:	Isoelectroenfocament
D) GENOTIPIFICACIÓ:	1) Sense amplificació: R. F. L. P. (generalment amb TaqI i HindIII).
	2) Amb amplificació (PCR):
	2a) PCR simple :
	— PCR-SSP o PCR-específica.
	— PCR-SSCP
	— PCR-heterodúplex.
	— DNA- <i>crossmatching</i>
	2b) PCR + hibridació amb SSO:
	— PCR-SSO ó PCR-ASO
	— PCR-inversa
	— PCR-HPA
	2c) PCR + digestió enzimàtica:
	— PCR-RFLP ó AFLP
	2d) PCR + seqüenciació:
	— PCR-SBT

Abreviacions:

AFLP	Polimorfisme en la longitud dels fragments amplificats
ASO	Oligonucleòtids específics d'al·lels
HPA	Assaig de protecció per hibridació
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció
SBT	Tipificació basada en la seqüenciació
SSCP	Polimorfisme en la conformació de la cadena senzilla
SSO	Oligonucleòtids de seqüència específiques
SSP	Encebadors de seqüència específics

Serotipificació

La tipificació serològica, ja emprada de fa temps en molts laboratoris, es realitza bàsicament mitjançant l'avaluació de la microlimfotoxicitat per mitja de complement. Basant-se en la reactivitat específica d'un ventall de sèrums, amb especificitats conegudes, de dones embarassades (que desenvolupen anticossos, *al-loanticossos*, contra les parts polimòrfiques de les molècules HLA paternes dels fetus) o de persones transfoses (que desenvolupen els *al-loanticossos* contra els limfòcits de la sang rebuda) davant dels limfòcits de l'individu que hom pretén tipificar, els limfòcits T permeten determinar els antígens de classe I, els limfòcits B, els de classe II (Degos, 1990; Dyer i Middelton, 1993). Als darrers anys, l'obtenció d'anticossos monoclonals (Acmos) específics d'antígens HLA específics ha congregat molts esforços, i amb l'excepció d'alguns Acmos que fins i tot defineixen alguns subtipus HLA, no ha estat fins ara que s'estan obtenint Acmos contra totes les especificitats HLA, amb opció per a substituir els sèrums convencionals (Dyer i Middelton, 1993). La serotipificació ha permès identificar la majoria de les variants dels antígens HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR i HLA-DQ. Les dificultats de disponibilitat de sèrums amb reactivitat perfectament definida (els tallers, *workshops*, nacionals i internacionals de cooperació entre laboratoris han demostrat ser eines molt útils per a aquesta definició de reactivitats sèriques) i la complexitat d'interpretació del polimorfisme dels HLA de classe II són els principals inconvenients de la serotipificació. Malgrat tot, la simplicitat tècnica i els anys d'experiència en ella fan que, fins al moment, sigui la metodologia més emprada per a la tipificació, i possiblement, si hom l'arriba a substituir per la genotipificació, ho serà parcialment, mantenint en el futur la seva validesa en la determinació dels HLA de classe I (de fet, totes les tècniques de genotipificació que posteriorment analitzarem es dirigeixen a determinar la variabilitat dels gens de classe II).

Cultiu mixt limfocitari

Aprofitant la capacitat estimuladòria proliferativa del contacte entre cèl·lules de diferents individus amb HLA de classe II incompatibles, en l'anomenat *reacció* o *cultiu mixt limfocitari* (MLC), va ser com es varen definir els antígens de classe II (HLA-D). Així, a partir de la mescla dels limfòcits de l'individu a tipificar amb cèl·lules homozigotes de referència (amb els seus HLA-D d'especificitat definida), es podia detectar la resposta proliferativa mitjançant la incorporació de timidina- H^3 , i s'identificava, d'aquesta manera, les diferències d'antigenicitat i l'especificitat HLA-D (Degos, 1990; Dyer i Middelton, 1993). Ara sabem que aquesta especificitat és el resultat de la capacitat al·loreactiva en conjunt de tots els antígens HLA de classe II. Aquesta relativa imprecisió, junt amb la dificultat que hi ha de disposar de les cèl·lules homozigotes de referència i al tedi que provoca aquesta determinació, va fer que quedés substituïda pels mètodes serològics que determinen els HLA-DR i HLA-DQ. Malgrat tot, l'MLC, especialment per la seva sensibilitat en la detecció de l'antigenicitat global de les molècules d'histocompatibilitat, i l'única prova veritablement funcional per a conèixer l'histocompatibilitat, s'empra com a darrera anàlisi per a comprovar la identitat de les molècules de classe II entre donant i receptor en un transplantament de moll d'os (on és una prova preceptiva). A més a més, fins a l'arribada de les tècniques de genotipificació ha estat, en la variant d'MLC secundari (PLT = *primed lymphocyte test*) on les cèl·lules responedores han estat preestimulades (Dyer i Middelton, 1993), l'única forma disponible per a determinar la variabilitat dels HLA-DP.

Tècniques bioquímiques

Basant-se en la diferents característiques bioquímiques (diferents patrons de digestió

específics, canvis en la càrrega global...) que presenten les molècules HLA com a conseqüència de la seva diferent seqüència proteica, diverses van ser les tècniques bioquímiques que es varen fer servir per a intentar definir el polimorfisme de les molècules HLA. D'entre elles, l'isoelectroenfocament unidimensional (Yang, 1989) semblava capaç d'identificar de manera molt precisa aquesta variabilitat. Però la revolta que va significar l'anàlisi genòmica directa del polimorfisme dels gens de l'MHC va deixar de banda aquest intent de tipificació bioquímica, que per la seva dificultat tècnica mai no ha arribat a ser emprada sistemàticament.

D) Genotipificació

Als darrers anys, la possibilitat de reconèixer el polimorfisme dels HLA a nivell de seqüència gènica dels loci de l'MHC ha constituït una veritable revolució en la determinació de la variabilitat de les molècules HLA, especialment de classe II. Moltes són les tècniques de genètica molecular introduïdes, especialment després de la descripció de la PCR (Erlich, 1989), cosa que fa d'aquest un camp en permanent evolució. A continuació intentarem analitzar en què consisteixen les diverses tècniques que fins al moment s'engloben dins del terme *genotipificació*.

1) RFLP

(polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció)

La primera aproximació àmpliament acceptada i aplicada a la tipificació dels gens dels antígens HLA de classe II va ser l'anomenat RFLP (Bidwell, 1988; Bidwell *et al.*, 1988; Dyer i Middelton, 1993). L'RFLP permet l'estudi del polimorfisme HLA per mitjà de la digestió del DNA genòmic per endonucleases de restricció i

la posterior hibridació dels filtres transferits mitjançant la tècnica de Southern-Blot. S'obtenen així un conjunt de bandes d'hibridació, el patró de les quals és més o menys característic de cada variant al·lèlica. Molts van ésser en un principi els enzims de restricció assajats (Dupont, 1989), fins que es va determinar que, per a l'anàlisi sistemàtica del polimorfisme dels gens DQ α i DQ β , és especialment útil la digestió amb l'enzim TaqI, mentre que per a reconèixer els al·lèls del locus DR β , a més a més de l'enzim TaqI, era necessària la digestió amb HindIII (Bidwell, 1988). La seva altíssima reproductibilitat i fiabilitat fa que actualment l'RFLP sigui considerat la tècnica de genotipificació de referència (i és emprada com a tal, des de fa ja uns quants anys, al nostre laboratori). Malgrat això, la laboriositat d'aquesta tècnica (el seu principal inconvenient), que necessita al voltant d'una setmana per a assolir la tipificació d'una mostra, està fent que s'esmercin molts esforços a intentar reemplaçar-la per una tècnica més senzilla i curta. Aquest és el motiu que explica la irrupció de tot el seguit de tècniques que, basant-se en l'amplificació selectiva dels gens de classe II mitjançant PCR, intenten substituir l'RFLP com a tècnica de genotipificació de rutina.

2) PCR-SSO

(PCR-ASO, PCR-oligohibridació o Dot-hibridació)

Amb aquests quatre noms es coneix la tècnica de genotipificació que es realitza bàsicament en tres parts: 1) amplificació per PCR de la zona polimòrfica del DNA (ex 2 en els gens de DRB, DQ i DP) de les mostres que es desitgen tipificar. 2) fixació subsegüent en membranes de niló del DNA amplificat, i 3) hibridació posterior amb oligonucleòtids de seqüència específica (SSO) per a tots els al·lèls que es volen estudiar (vegeu la fig. 1) (Dyer i Middelton, 1993). Cal esmentar que la PCR-SSO és la primera tècnica basada en

PCR que es va generalitzar, i sembla que té una gran acceptació entre tots els laboratoris que l'han incorporada com a tècnica habitual. Entre els seus avantatges, cal assenyalar la seva altíssima concordança amb la serologia (> 90 %), a la qual arriba a superar quan la serologia es demostra imprecisa o insuficient, juntament amb el seu altíssim grau de reproductibilitat entre els laboratoris, ja que estudis internacionals en col·laboració demostren que la tècnica presenta un grau de consens superior al 80 %. Les dificultats que presentava aquesta genotipificació en la seva forma inicial han anat trobant solucions concretes. Així, des de l'elaboració d'extrapolacions informàtiques (Juan *et al.*, 1992) que per-

meten seleccionar teòricament les millors sondes o analitzar la utilitat quotidiana d'una determinada proposta de genotipificació, passant per la substitució del marcatge radioactiu per altres tècniques amb menys riscos (Mytilineos *et al.*, 1992), però tant sensibles o més, fins a arribar a la planificació tecnològica amb vista a l'automatització (Caillat-Zucman *et al.*, 1992), són moltes i molt diverses les propostes concretes que fan, de la PCR-SSO, la tècnica de genotipificació més emprada arreu del món, amb voluntat de substituir l'RFLP com a tècnica de referència. Malgrat tot, el seu temps d'elaboració (superior a les 24 h), fa que altres tècniques més curtes i senzilles intentin fer-s'hi lloc i reemplaçar-la.

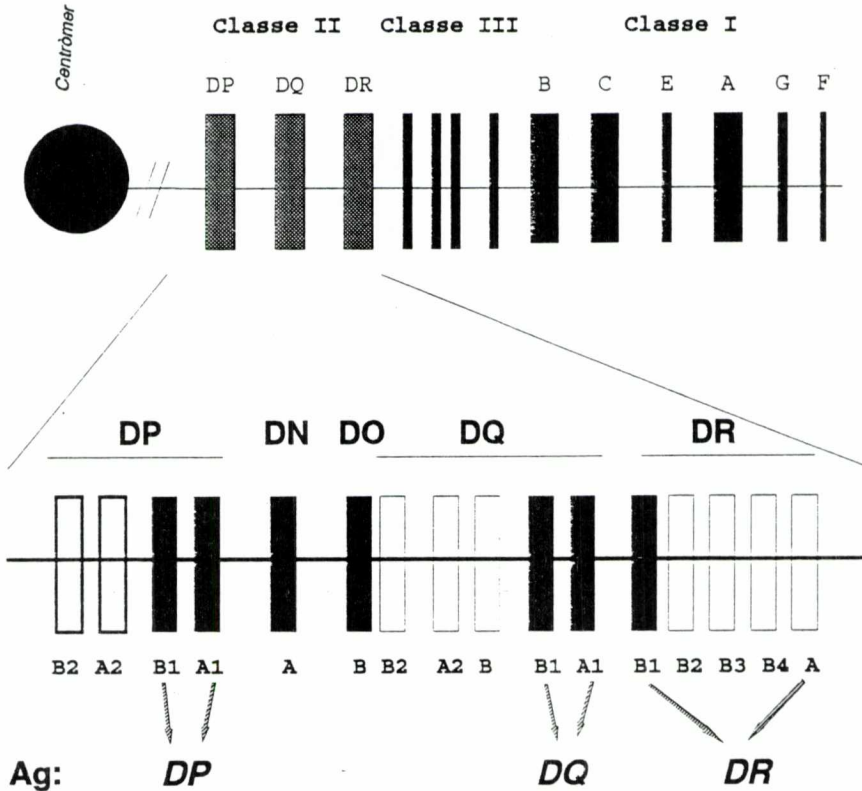


FIGURA 1. Representació esquemàtica del mapa genètic de la regió MHC humana al braç curt del cromosoma 6

Cadascuna de les barres representa els diferents *loci* genètics de l'MHC. La part inferior mostra una ampliació a la regió dels gens de classe II. Les barres en negre indiquen els gens que s'expressen. Les barres blanques representen pseudogens o gens no codificadors.

3) PCR-inversa (PCR-reversa o oligohibridació inversa)

Aquesta tècnica, com l'anterior, permet la genotipificació d'una mostra amplificada de DNA aprofitant la seva capacitat d'hibridar-se a diferents SSO específics; tanmateix, a diferència de la PCR-SSO, la PCR-inversa té prèviament immobilitzats als filtres d'hibridació els oligonucleòtids específics i és la mostra amplificada la que es marca per a detectar la hibridació (vegeu la fig. 2) (Saiki *et al.*, 1989). El principal avantatge d'aquesta tècnica, en front de l'anterior, és troba en la possibilitat d'analitzar una sola mostra amb totes les especificitats que s'han d'estudiar, d'una manera equiparable a la serotipificació convencional que utilitza una placa en què cada pouet conté un sèrum amb una especificitat determinada. D'aquesta manera no cal tenir diverses mostres amplificades per a poder fixar-les a diferents filtres i poder tipificar-les després de la hibridació; un únic filtre amb les distintes sondes prèviament fixades és suficient per a hibridar una mostra. Quant a l'altra diferència de la PCR-inversa respecte a la PCR-SSO, el marcatge del producte de la PCR (Abe *et al.* 1992), hi ha dues propostes: la utilització dels encebadors («primer») de l'amplificació marcats (amb P³² o biotina), o l'ús de nucleòtids marcats (radioactius o biotinats) que marquen el DNA amplificat quan s'incorporen a l'extensió. Entre els desavantatges de la PCR-inversa, cal fer esment de la dificultat de fixació en els filtres d'hibridació de les petites sondes que s'empren. Això pot ésser superat afegint una llarga cua de politimidina (100-200 T) (Rudert i Trucco, 1992) a l'oligonucleòtid específic, o bé formant-hi polímers entre els SSO (Kawai *et al.*, 1992), però a costa d'encarir considerablement la tècnica i assumint el risc d'errors que la contaminació amb sondes mal fixades en punts dels filtres on es troben altres especificitats. A més a més, es troba la limitació en l'especificitat i la variabilitat que significa haver d'emprar una única temperatura

d'hibridació per a tots els SSO. Tot això fa que actualment aquesta tècnica no hagi aconseguit l'abast que feia suposar la seva simplicitat tècnica teòrica.

4) PCR-SSCP (polimorfisme en la conformació de la cadena senzilla)

Aquesta senzilla i ràpida tècnica de genotipificació es basa en la diversa mobilitat electroforètica de les cadenes senzilles de DNA, separades per desnaturalització de la doble cadena amplificada per PCR, segons la seqüència característica de les esmentades cadenes (Hoshino *et al.*, 1992). La tècnica defineix patrons de bandes específics per a distintes cadenes senzilles. Els patrons són encara més diferents en heterozigots, per efecte de les interaccions entre les cadenes desnaturalitzades. Aquesta tècnica permet analitzar el polimorfisme en els gens de DQA, DQB, DPA i DPB, i es mostra molt útil per la seva senzillesa per a detectar diferències entre parelles donant-receptor. La principal objecció a aquesta aproximació és la dificultat en la interpretació i reproductibilitat dels patrons específics.

5) PCR-heterodúplex

Aquesta tècnica, també ràpida i senzilla, es basa en la diferent mobilitat electroforètica de les cadenes de DNA d'individus heterozigots que es formen en desnaturalitzar i renaturalitzar el DNA amplificat (exó 2) (Sorrentino *et al.*, 1992). Concretament, les desigualtats en les seqüències de les cadenes dels dos al·lells provoquen «heterodúplex», en els quals les diferències en la migració electroforètica es correlacionen amb el nombre, la posició i el tipus de desigualtats. De nou són els patrons de bandes els que determinen les distintes parelles d'al·lells, i la dificultat d'interpretació d'aquests patrons torna a ser la principal objecció a aquesta tècnica.

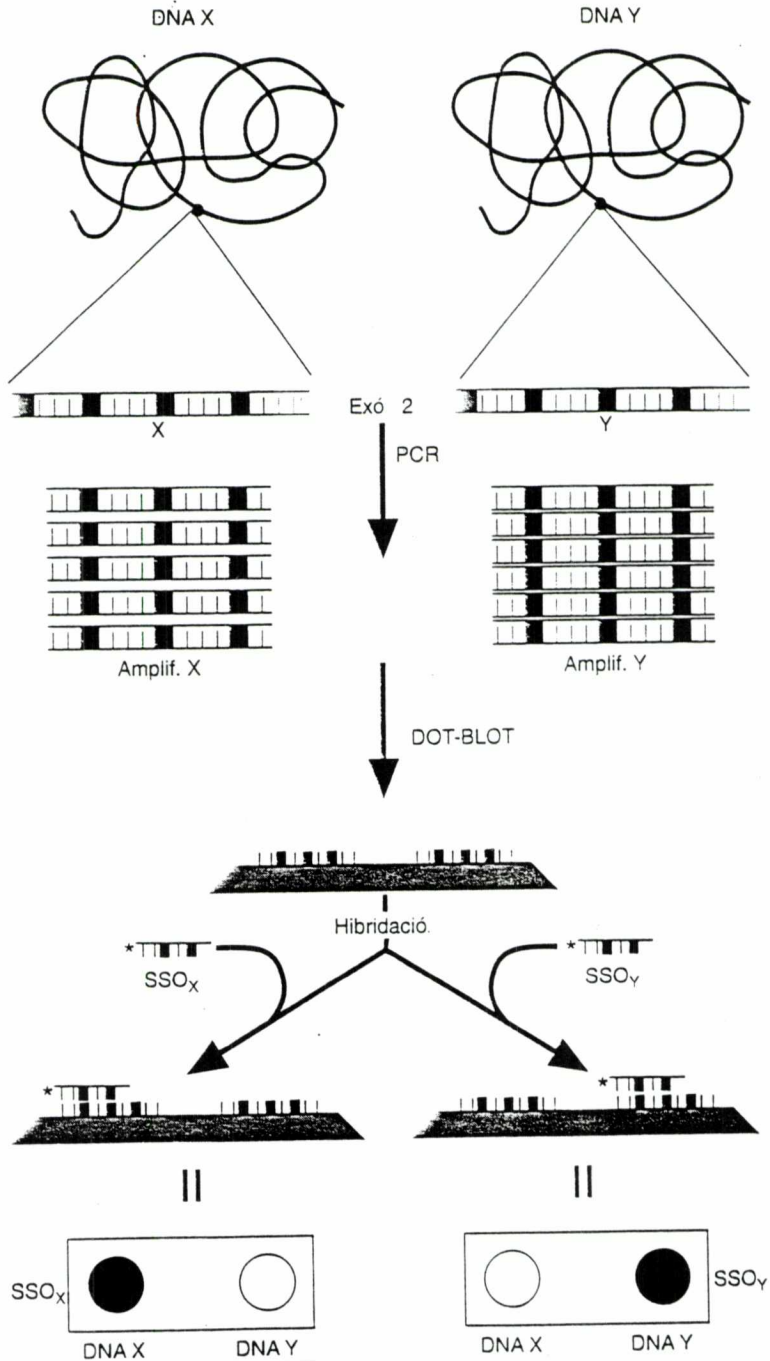


FIGURA 2. Esquema de la tècnica de PCR-SSO

L'esquema representa els diferents passos seguits en la tècnica de PCR-SSO: PCR exònica, fixació en la membrana del producte amplificat per a hibridació amb oligonucleòtids específics de seqüència (SSO) marcats (*).

6) DNA-crossmatching (prova creuada amb DNA)

Aquest assaig, útil per a seleccionar parelles idèntiques de donant-receptor, es basa en la possibilitat de poder distingir patrons de migració electroforètica diferents, entre els productes d'amplificació dels segons exons dels gens de DRB, especialment en mesclar DNA de dos individus no idèntics (vegeu la fig. 3) (Clay *et al.*, 1991). Aquesta tècnica no es planteja com una tècnica de genotipificació en sentit estricte, sinó com una prova creuada entre els DNA de dos individus presumiblement idèntics (els DNA-*fingerprints* [Bidwell i Hui, 1990], que són els patrons característics de cada parella d'al·lells, segons la tècnica inicialment descrita i sobre la qual es va idear el DNA-*crossmatch*, sí que es van concebre per a genotipificar). La senzillesa i rapidesa de la tècnica són dos dels avantatges que permeten intuir una probable utilitat del DNA-*crossmatch* en la ràpida selecció de donants no emparentats de moll de l'os amb DR presumiblement idèntic. Així només aquells individus amb un genotip absolutament idèntic al del receptor donaran el mateix patró de bandes en realitzar la prova creuada amb el receptor.

7) PCR-HPA (assaig de protecció per hibridació)

Aquesta tècnica es basa en la protecció a la hidròlisi en un tampó alcalí dels SSO que s'hibriden amb els productes de l'amplificació (Matsuoka *et al.*, 1992). La hidròlisi és selectiva, ja que només les sondes que no hibriden s'hidrolitzen. Aquelles que reconeixen la seqüència específica romanen intactes. Mercès al marcatge d'aquestes sondes amb esters d'acridina (sondes-AE), una substància quimioluminiscent, és possible detectar la presència d'hibridació. Aquesta prova, a més d'ésser ràpida (uns trenta minuts), és fàcil de realitzar, pel fet que es pot fer en tub d'assaig sense marcatge radioactiu.

8) PCR-SSP («primers» específics de seqüència) o PCR-específica

L'amplificació específica dels distints al·lells és, sens dubte, la tècnica més clara conceptualment, ja que en un únic pas (una PCR) és possible determinar quins al·lells presenta la mostra a estudi (Olerup i Zetterquist, 1992). N'hi ha prou de comprovar, en un simple gel d'electroforesi, l'existència o no de productes d'amplificació per a poder assignar la tipificació que defineix els «primers» («encebadors») específics. Només s'amplificaran els exons d'aquelles mostres en què els encebadors reconeixin l'al·lel per al qual són específics. A la inversa, si els encebadors no són complementaris amb la seqüència dels al·lells de la mostra que volem tipificar, no s'apreciarà banda pel fet de no haver-hi amplificació. Utilitzant parelles d'encebadors específics per a tots els al·lells que podem genotipificar, els productes d'amplificació ens permeten determinar en un gel d'agarosa els dos al·lells de la mostra. El principal avantatge d'aquesta tècnica és la seva rapidesa, ja que amb l'ús de termocicladors de segona generació, que redueixen el temps dels cicles d'amplificació, es calcula en 2 hores i 20 minuts el temps necessari per al desenvolupament de la tipificació (Olerup i Zetterquist, 1992). D'altra banda, les principals objeccions a aquesta tècnica són l'elevat nombre d'amplificacions que s'han de realitzar per a cada mostra (de 18 a 41 segons el grau de concreció que es desitja en el moment de genotipificar), la qual cosa redueix la utilitat de la tècnica a l'estudi de petits grups de mostres (potser la tipificació pretransplantament d'un donant), i la dificultat de dissenyar controls negatius i positius de les amplificacions. Malgrat tot, sembla una de les tècniques amb un esdevenidor més prometedor, ja que està essent aplicada en molts laboratoris, entre ells el nostre, a punt de ser incorporada com a tècnica de rutina.

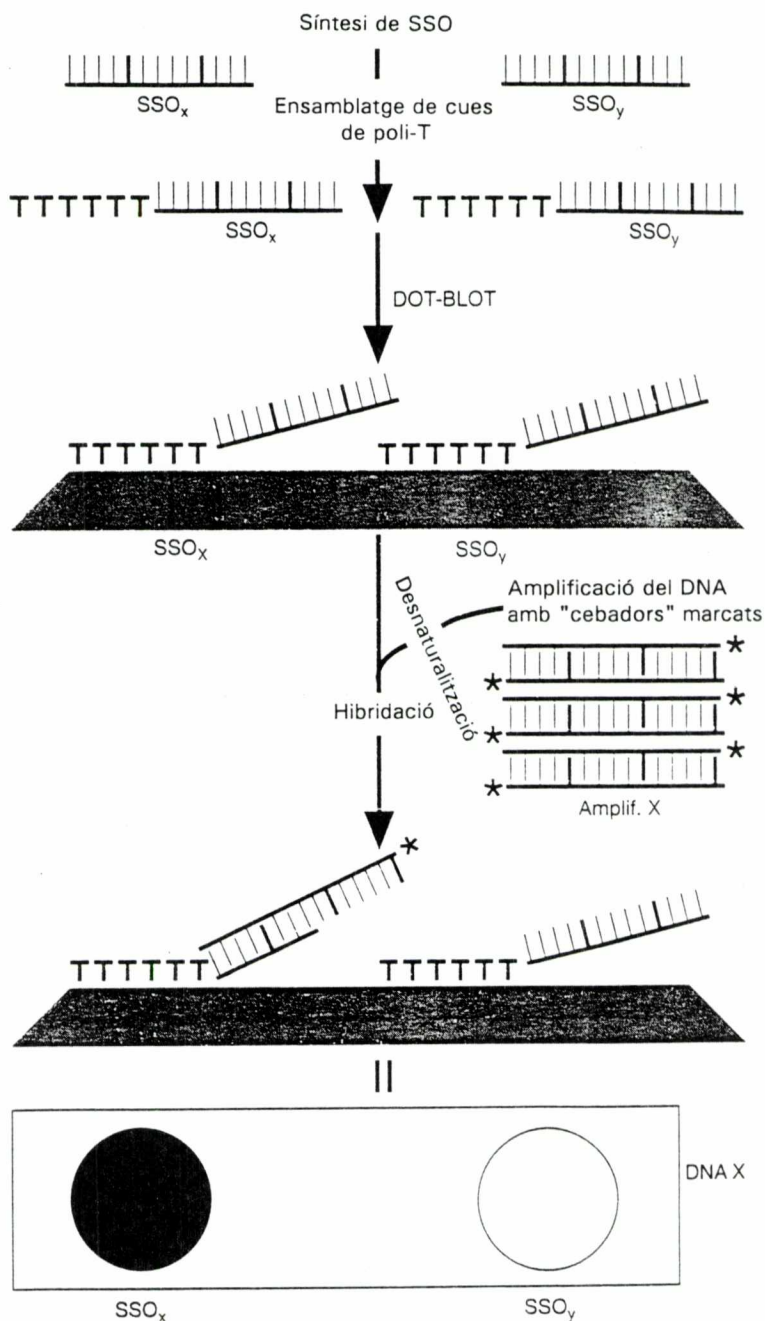


FIGURA 3. Esquema de la tècnica de PCR-inversa

L'esquema representa els diferents passos seguits en la tècnica de PCR-inversa, que, a diferència de la PCR-SSO, fixa els oligonucleòtids específics de seqüència (SSO) mitjançant una cua de politimidines (TTTTTT) a la membrana per a hibridació amb la mostra amplificada marcada (*).

**9) PCR-RFLP, AFLP
(polimorfisme en la longitud dels
fragments amplificats)
o PRFP (contracció de PCR + RFLP)**

Aquesta tècnica, anomenada de tres maneres diferents, es basa en la digestió amb diversos enzims de restricció dels productes d'amplificació obtinguts per PCR amb els encebadors que reconeixen genèricament l'exó polimòrfic del gen que es vol tipificar (Uryu *et al.*, 1990; Yunis *et al.*, 1991). Les endonucleases de restricció se seleccionen per llur capacitat de definir el polimorfisme per mitjà dels fragments de restricció dels productes de la PCR. Sens dubte, la PCR-RFLP es considera també una de les tècniques de genotipificació més prometedores (vegeu la fig. 4), ja que, de manera ràpida i a través de la visualització directa en un gel d'electroforesi dels patrons de bandes que es generen en digerir l'amplificació mitjançant enzims de restricció, és possible genotipificar una mostra. Els patrons de bandes descrits, si bé no defineixen un polimorfisme tan extens com el presentat per la PCR-SSO, sí que descriuen, i en certs casos acreixen, el polimorfisme serològic. Si bé les primeres aproximacions descrites es mostraren incompletes i inútils per a determinar els al·lels d'heterozigots (Juan *et al.*, 1992), actualment s'han elaborat variants (certes amplifícacions específiques, noves endonucleases de restricció més informatives) que permeten una utilització real d'aquesta senzilla tècnica.

**10) PCR-SBT
(tipificació basada en la seqüenciació)**

Aquesta proposta de genotipificació es basa en la seqüenciació directa dels fragments amplificats de DNA. L'automatització del procés permet suggerir la utilitat pràctica d'aquesta tècnica que, en només 16-24 hores, determina la seqüència concreta dels al·lels i detecta qualsevol nova variant (Santamaria *et al.*, 1992). Alhora, s'ha proposat l'ús de gels d'electroforesi en

gradient tèrmic (TGGE) per a separar els diferents al·lels prèviament a la seqüenciació. Malgrat que aquesta proposta és molt atractiva, la PCR-SBT és una tecnologia encara massa cara per a poder ser considerada una alternativa generalitzable a la majoria dels laboratoris.

De tot el que hem exposat es desprèn un encara complex escenari, amb multitud de propostes de genotipificació que intenten assolir una major precisió en la determinació del polimorfisme dels antígens HLA, i on les clàssiques tècniques de serotipificació i el cultiu mixt limfocitari tenen unes indicacions encara no substituïbles. Malgrat tot, la superior capacitat informativa de les tècniques de genotipificació, molt més discriminatòries que la serologia i els cultius cel·lulars, fa suposar que possiblement alguna o algunes d'aquestes tècniques aviat substituiran les tècniques clàssiques, si més no per a certs propòsits. Ja actualment, els RFLP primer, i la PCR-SSO últimament, tenen un paper real en la determinació rutinària de tipificacions dels loci dels gens de classe II. Probablement en un futur no molt llunyà, veurem que algunes de les noves propostes de genotipificació, més senzilles, ràpides i presumiblement automatitzables, pendran el lloc que ja ocupen els RFLP, la PCR-SSO i, fins i tot, la serotipificació. Apostar en aquest moment per alguna d'elles resulta difícil ja que totes comporten avantatges i inconvenients, encara que l'ampli ventall de propostes útils per a la correcta genotipificació permet l'acomodament d'alguna d'elles a les necessitats dels diferents laboratoris: l'ús de la PCR-SSO està trobant ja la seva millor aplicació en els laboratoris amb experiència en aquesta tècnica i, mercès a l'automatització, en aquells laboratoris amb grans volums (entre 50 i 100 tipificacions simultànies) de mostres en estudi. En canvi, potser tant la PCR-inversa com la PCR-SSP seran una bona opció per a la genotipificació en els laboratoris amb menor volum de mostres, d'aquestes la primera és la millor candidata per a aquells laboratoris amb bons recursos econòmics i amb interès en la determinació de subtipus només definibles mitjançant SSO, i la segona és una

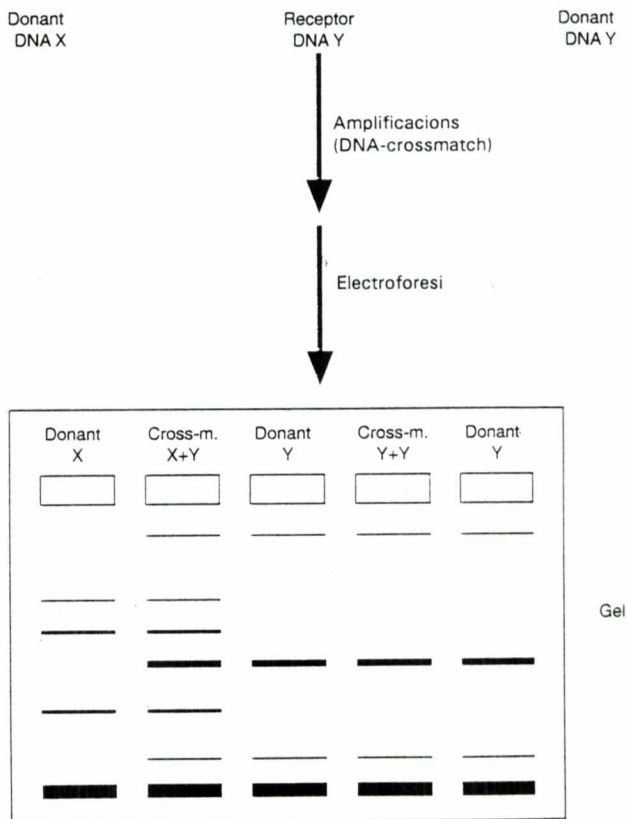


FIGURA 4. Esquema de la tècnica de DNA-crossmatch

L'esquema representa els diferents passos seguits a la tècnica de DNA-crossmatch que consisteix en la definició per electroforesi en gel de poliacrilamida de la similitud o diferència del patró de bandes característic del producte d'amplificació dels DNA de dos individus (donant i receptor), i també de llur mescla.

bona opció tècnica per a aquells centres que desitgin una genotipificació no molt àmplia (entre 15-20 al·lels), però sí senzilla, ràpida i no gaire costosa econòmicament. De fet, i com ja hem comentat prèviament, al nostre laboratori s'està genotipificant, des de fa ja diversos anys, mercès als RFLP i estem ja emprant la PCR-SSP com a complement i possible futur substitut. La resta de mètodes poden resultar puntualment útils, en la selecció de la millor parella donant-receptor, com ara amb el DNA-crossmatch. Utilitzar la PCR-SBT quedaria de moment per als laboratoris amb més recursos econòmics, mentre esperen les millores tecnològiques que, sens dubte, apareixeran, però potser en un futur

encara llunyà. Seleccionar entre tot aquest panorama la millor proposta és la difícil responsabilitat de cada laboratori, en un moment en què la genotipificació és ja una eina gairebé imprescindible per a la determinació del polimorfisme dels antígens HLA.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, A., F. OBATA, S. MIYAKOSHI, M. KITAGAWA, H. DANBARA i N. KASHIWAGI. (1992). *HLA* 1991. Rapid DNA typing utilizing immobilized oligonucleotide probes and non-radioactive detection system: application to HLA-DR typing of the Japanese population. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 347-350.

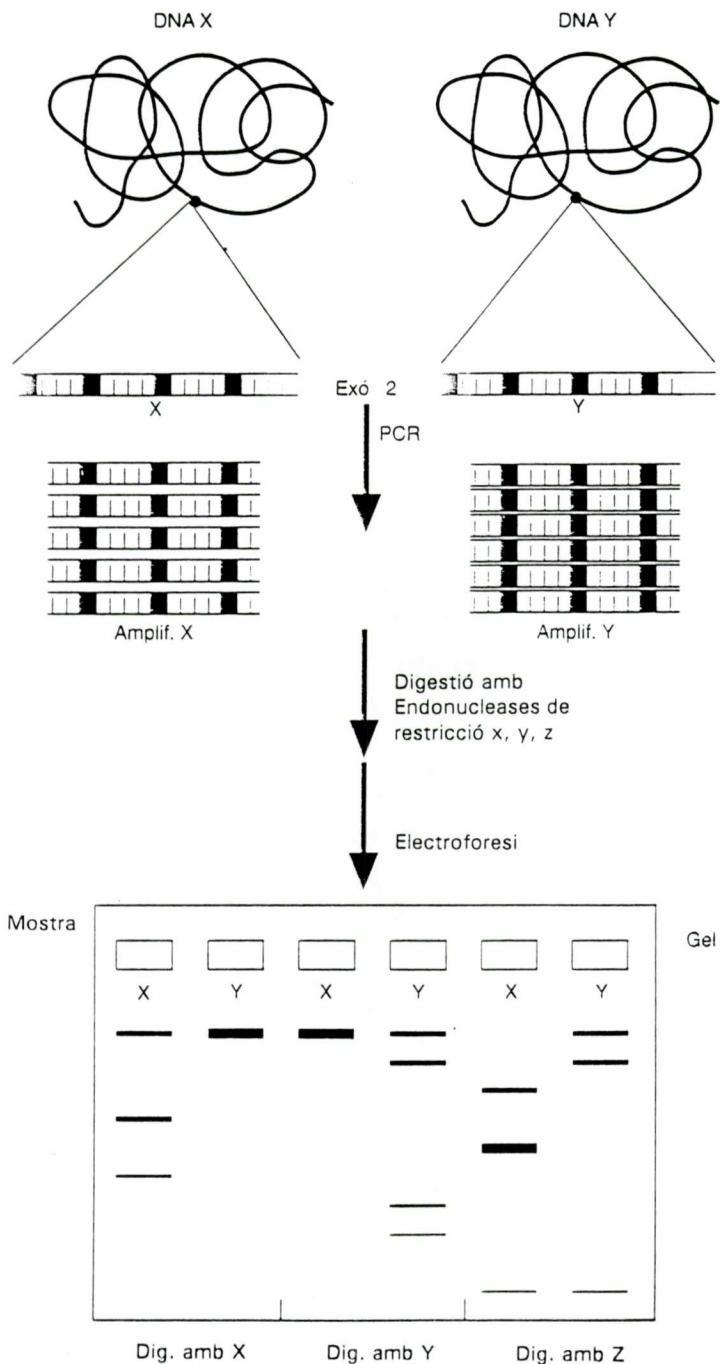


FIGURA 5. Esquema de la tècnica de PCR-RFLP

L'esquema representa els diferents passos seguits en la tècnica de PCR-RFLP, que combina la PCR amb la digestió amb endonucleases de restricció dels productes amplificats, la qual permet la definició al·lèlica segons llur patró de migració electroforètica.

- BIDWELL, J. (1988). DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. **Immunol. Today** 9 (1): 18-24.
- BIDWELL, J. L., E. A. BIDWELL, D. A. SAVAGE, D. MIDDLETON, P. T. KLOUDA i B. A. BRADLEY (1988). A DNA-RFLP typing system that positively identifies serologically well-defined and ill-defined HLA-DR and DQ alleles, including DRw10. **Transplantation** 45: 640.
- BIDWELL, J. i T. HUI (1990). Human HLA/DR-Dw allotype matching by analysis of HLA-DRB gene PCR product polymorphism (PCR «Fingerprints»). **Technique** 2: 93-100.
- CAILLAT-ZUCMAN, S., H-J. GARCHON i J-F. BACH (1992). **HLA 1991**. Automation of large-scale HLA class II oligotyping using a robotic work station. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 346-347.
- CLAY, T. M., J. BIDWELL, M. R. HOWARD i B. A. BRADLEY (1991). PCR-fringerprinting for selection of matched unrelated marrow donors. **Lancet** 337: 1049-1052.
- DEGÓS, L. (1990). **ABC del HLA**. Masson, Paris.
- DUPONT, B. (1989). **Immunobiology of HLA**. Springer-Verlag, Nova York. 1: 553-959.
- DYER, P. i D. MIDDLETON (1993). **Histocompatibility Testing**. Oxford University Press, Oxford.
- ERLICH, H. A. (1989). **PCR Technology**. Stockton Press, Nova York.
- EZQUERRA, A. i A. LÓPEZ DE CASTRO (1987). **Inmunología**. Estructura molecular y organización genética del Sistema Principal de Histocompatibilidad. (Ed. V. Larraga, M. Fresno, L. Enjuanes). CSIC, Madrid. p. 35-58.
- GALLART, T. i G. ERCILLA (1993). **El Manual de Medicina**. Sistema HLA o Complejo principal de Histocompatibilidad Humano. (Ed. J. Rodés, J. Guardia) Masson-Salvat Medicina, Barcelona. p. 2454-2461.
- GALLART, T. i J. VIVES (1988). **Medicina Interna**. Sistema HLA. (Ed. C. Rozman) Doyma, Barcelona. p. 2804-2810.
- HOSHINO, S., A. KIMURA, Y. FUKUDA, K. DOHI i T. SASAKUZI (1992). **HLA 1991**. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple and rapid method to test histocompatibility. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 335-338.
- JUAN, M., J. COLL, E. MARTÍNEZ-CÁCERES, M. A. DE LA FUENTE, J. MARTORELL, J. VIVES, J. YAGÜE i A. GAYÀ (1992). **HLA 1991**. A computer program for analyzing HLA genotyping assays. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 299-300.
- KAWAI, S., A. YAMANE, K. TOKUNAGA, S. KUWATA, i T. JUJI (1992) **HLA 1991**. DNA typing for HLA-DRB using microplate hybridization. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 350-352.
- MATSUOKA, Y., K. MATSUBARA, A. KOYABAYASI, Y. KOIDE, i T. O. YOSHIDA (1992). **HLA 1991**. HLA class II DNA typing with PCR-HPA technology. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, i T. Sasazuki). Oxford University Press. 1: 501-502.
- MYTILINEOS, J., Z. GUO, S. SCHEREER, K. BADENHOOP, i G. OPELZ (1992). **HLA 1991**. Enhanced chemiluminescence: a new non-radioactive labelling technique for PCR-SSO probe class II typing. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 306-308.
- OLERUP, O. i H. ZETTERQUIST (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. **Tissue Antigens** 39: 225-235.
- OLERUP, O. i H. ZETTERQUIST (1992). **HLA 1991**. HLA-DRB1 typing by polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers: post-amplification processing in less than 20 minutes. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 315-317.
- RUDERT, W. A. i M. TRUCCO (1992). **HLA 1991**. A novel approach to rapid HLA class II molecular typing. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 352-356.
- SAIKI, R. K., P. S. WALSH, C. H. LEVENSON i H. A. ERLICH (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. **Proc. nat. Acad. Sci., USA** 86: 6230.
- SANTAMARIA, P., M. T. BOYCE-JACINO, A. L. LINDSTROM, S. H. MYSTER, J. J. BARBOSA, S. S. RICH, F. H. BACH, i A. J. FARAS (1992). **HLA 1991**. Sequence-based HLA «typing»: direct sequencing of class I i class II genes. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 342-346.
- SORRENTINO, R., I. POTOLICCHIO, M. D'AMATO, D. GUERRITORE i R. TOSI (1992). **HLA 1991**. DNA heteroduplex analysis of HLA class II polymorphism. (Ed. K. Tsuji, M. Aizawa, T. Sasazuki). Oxford University Press. 2: 338-341.
- URYU, N., M. MAEDA, M. OTA, K. TSUJI i H. A. INOKO (1990). A simple and rapid method for HLA-DRb and DQB typing by digestion of PCR-Amplified DNA with Allele-Specific Restriction endonucleases. **Tissue Antigens** 35 (1): 20-31.
- YANG, S.Y. (1989). **Immunobiology of HLA**. A Standardized method for detection of HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional Isoelectric Focusing (IEF) Gel Electrophoresis. (Ed. B. Dupont). Springer-Verlag, New York. 1: 332-336.
- YUNIS, I., M. SALAZAR i E. J. YUNIS (1991). **Tissue Antigens** HLA-DR generic typing by AFLP. 38: 78-85.