

# El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México

Rodrigo Barquera Lozano\*

Laboratorio de Genética Molecular, Escuela Nacional de Antropología e Historia, México; Área de Histocompatibilidad, Laboratorio de Biología Molecular, Laboratorios Diagnómicos, México; Asesoría Científica, Unidad de Investigación, Laboratorios Zurita & Zurita, Quito, Ecuador

## Resumen

El presente trabajo abarca seis aspectos trascendentes de la inmunología del trasplante en México: en un primer término, se abordan algunos aspectos de interés a nivel inmunológico que ponen en riesgo el éxito del trasplante; después, se señalan algunas características de la variabilidad que exhiben las poblaciones de México en torno a su historia adaptativa y sociopolítica, para dar paso a la discusión sobre la diversidad génica dentro del complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex [MHC]) y la importancia de elegir adecuadamente el tipo de resolución en la tipificación del genotipo en el sistema de antígenos leucocitarios humanos (human leukocyte antigen [HLA]), y otros relacionados, que la genética de poblaciones exige para determinar la compatibilidad en un trasplante. Posteriormente, se revisan algunos puntos críticos en la interpretación de la reactividad serológica de anticuerpos anti-HLA en función de la frecuencia, entendida como la probabilidad de encontrar un alelo en una población finita. Por último, se expone evidencia desde otros sistemas génicos cuya variabilidad presenta repercusión en la relación organismo receptor-injerto.

**PALABRAS CLAVE:** Trasplantes. Genética poblacional. Inmunogenética. Histocompatibilidad.

## Abstract

This review focuses on six transcendental aspects that affect transplant immunology in Mexico: in first place, several immune factors which may lead to graft loss are highlighted; then, some features of the biological variability present in Mexican populations are pointed out in the context of their adaptive and sociopolitical history, leading to the discussion on the genetic diversity within the major histocompatibility complex (MHC) and the importance of resolution in genotypic characterization of the human leukocyte antigen (HLA) and related systems on the basis of human intra-population variability. Critical points on the interpretation of serological reactivity of anti-HLA antibodies are discussed in function of allelic frequency as a probability of finding a variant in a finite population. Finally, evidence of influence of other genetic systems on the recipient-graft relationship is emphasized.

**KEY WORDS:** Transplants. Population genetics. Immunogenetics. Histocompatibility.

## Introducción

Desde sus comienzos en la primera mitad del siglo XX, el trasplante (del latín *trāns*: «más allá de», y *plantāre*: «hundir en tierra con la planta del pie»; *transplantāre*:

«cambiar una planta de lugar», con uso referente a procedimientos médicos por primera vez en 1951) ha representado una opción –no siempre viable– en el manejo de ciertas afecciones y condiciones clínicas en las cuales la única manera de recuperar una función perdida es el cambio físico de la unidad funcional anatomofisiológica. Se entiende por trasplante la implantación de células, como las células troncales hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells* [HSC]), tejidos (es el caso de la piel) u órganos (riñón, páncreas,

### Correspondencia:

\*Rodrigo Barquera Lozano  
Laboratorio de Genética Molecular  
Escuela Nacional de Antropología e Historia  
Periférico Sur y Zapote, s/n  
Col. Isidro Fabela, C.P. 14030, D.F., México  
E-mail: jrockdrigo@hotmail.com

Fecha de recepción: 18-02-2011

Fecha de aceptación: 7-10-2011

hígado, pulmón, corazón) de un individuo a otro genéticamente iguales (trasplante singénico) o diferentes en cierto grado (trasplante alogénico), o de un individuo a sí mismo, previo cultivo o colección de los mismos (autotrasplante). Además, existe la práctica poco común del xenotrasplante, en el que las células, tejidos u órganos pertenecen a un individuo de distinta especie.

En México, la historia de los trasplantes comienza en 1963 con la realización de los primeros tres trasplantes renales a partir de donador vivo relacionado<sup>1</sup>. En el año 2000 se crea el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), en respuesta a la demanda de profesionales especializados en el área de trasplantes, con la finalidad de desarrollar un sistema que facilite la donación y trasplante de órganos y tejidos en el país, y queda a cargo del Registro Nacional de Trasplantes<sup>2</sup>.

En lo tocante al trasplante de HSC, es a partir de 1995 cuando esta actividad deja de ser anecdótica y comienza a tener un papel importante en la terapéutica en los programas de salud en México, y alcanza uno de sus puntos más altos cuando se genera un esquema terapéutico con acondicionamiento no mieloablativo producto de la investigación de grupos mexicanos<sup>3</sup>. El Registro de Donadores No Relacionados de Médula Ósea (DONORMO) nace en 1998 producto de la necesidad de generar un banco de células para los más de 8,000 pacientes anuales que requieren de un trasplante de médula ósea o HSC en nuestro país<sup>4</sup>. La Dra. Gorodezky, titular de este programa, afirmó que el registro contaba con más de 13.000 donadores en noviembre de 2009<sup>5</sup>. Tanto DONORMO como el Banco Altruista de Células Progenitoras de Cordón Umbilical (BACECU) cuentan con el apoyo de la Fundación Comparte Vida, A.C. para sus actividades, enlazados a una red mundial de búsqueda de parejas donador/receptor compatibles para el trasplante de HSC<sup>6</sup>. En el año 2005 existían 406 programas activos de trasplantes de órganos y tejidos en México, tanto en instituciones públicas como en el sector privado<sup>2</sup>.

Sin embargo, dada la elevada demanda de tejidos y órganos prevalente, las listas en nuestro país contemplan 18,000 donadores en espera y una tendencia de donación *post mortem* de órganos de cerca de 10 personas por cada millón de habitantes<sup>7</sup>, es decir, tan sólo unos 1,000 donadores teóricos en la nación, lo que nos ubica como uno de los países con menor participación de la sociedad en la problemática de la donación de órganos, con un promedio de espera de cinco a diez años por paciente; no obstante, estos datos podrían ser más crudos aún. A pesar de ser catalogada como la mejor opción terapéutica (un paciente trasplantado

gana de 2.1 a 16.1 años de vida dependiendo del órgano trasplantado<sup>8</sup>), social y económica (se afirma que la donación representa un ahorro económico del 40% con respecto a otras alternativas terapéuticas y es hasta cinco veces más económica que la práctica de la hemodiálisis en comparación con el trasplante renal), la falta de personal capacitado\*, la carencia de una cultura de la donación de órganos, producto principalmente de la ignorancia y los temores infundados<sup>6</sup>, y la ausencia del marco legal adecuado (aun cuando existe voluntad expresa por parte del donante) dificultan enormemente el panorama<sup>9</sup>.

La falta de órganos cada vez más crítica ha llevado a buscar otras alternativas, algunas de ellas hasta hace poco impensables, como el trasplante de órganos de donadores marginales<sup>10</sup>, también llamados de criterio extenso, grupo que incluye individuos de edad avanzada o con padecimientos como diabetes *mellitus*, hipertensión, insuficiencia renal o incluso enfermedades infecciosas en casos especiales, tales como parejas donador/receptor VIH+<sup>11</sup>. Otro ejemplo de lo que la política de salud pública puede llevar a cabo para despejar el panorama en este rubro se tiene en Reino Unido, donde se ha realizado un programa de asignación de riñones de donadores con corazón latiente, lo que ha permitido solucionar inequidades en el acceso a un trasplante oportuno en base a una puntuación que incluye variables como el tiempo que lleva el individuo en lista de espera, la compatibilidad en el sistema HLA y la edad del paciente<sup>12</sup>.

Aunado a lo anterior, un trasplante representa la entrada de antígenos no propios en un contexto inmunológico distinto al de procedencia, lo que puede ocasionar la activación de la respuesta inmune, con la concomitante destrucción del tejido no reconocido. En el caso de trasplante de médula ósea y HSC, lo que se introduce es un nuevo repertorio de células de respuesta inmune, con especificidades reconocidas como propias o no propias, y, por tanto, con el potencial de atacar todo epítipo ajeno a su acervo de moléculas toleradas, con la aparición de la llamada enfermedad de injerto contra hospedero (*graft-versus-host disease* [GVHD]). Con el objetivo de discutir el papel de la genética de poblaciones en la biología del trasplante y con el entendimiento de su importancia en la mejora de la sobrevida del órgano trasplantado y su receptor, se presenta el siguiente trabajo, que aborda

\*Cabe señalar que no sólo se trata de cirujanos especializados en el área, sino también de analistas, responsables de área y directores de laboratorio.

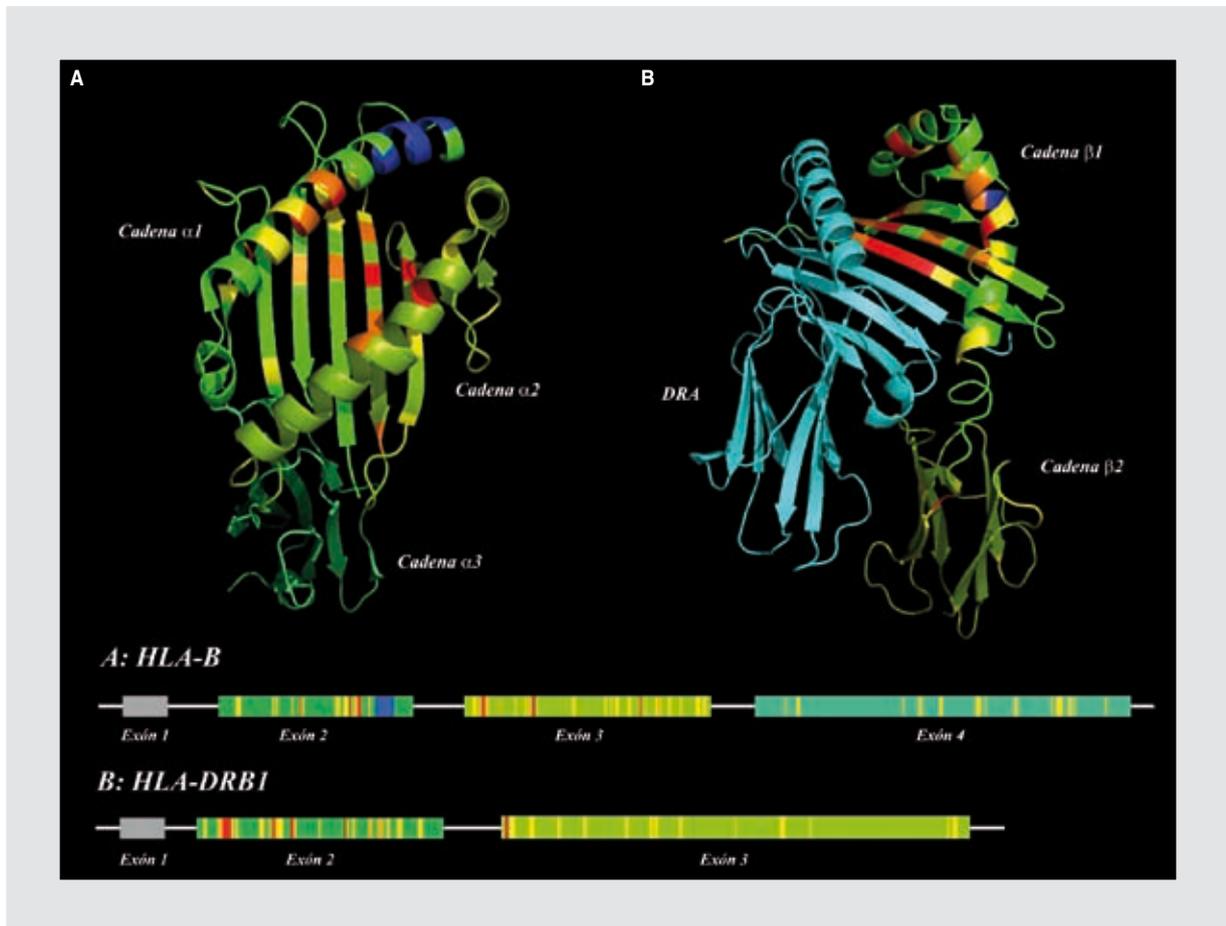
cuestiones como: ¿cuál es el papel de la genética de poblaciones en la supervivencia de un trasplante?, ¿por qué es necesario el estudio de la variabilidad biológica humana para mejorar el pronóstico clínico de un paciente trasplantado?, ¿cómo se relaciona la frecuencia alélica con la probabilidad de éxito en un trasplante entre donadores no relacionados?, ¿cómo impacta el conocimiento de la inmunología molecular en la elaboración de programas de búsqueda de parejas donador/receptor adecuadas?, ¿qué resolución representa la mejor opción en función del tipo de trasplante que se va a realizar?

### La principal barrera para un trasplante sin rechazo es la respuesta inmune

Además del sistema ABO y del llamado factor Rh, existen dos grandes grupos de moléculas cuya variabilidad biológica es la responsable del rechazo de un órgano trasplantado: los antígenos del MHC y los denominados antígenos menores de histocompatibilidad (*minor histocompatibility antigens* [mHA]). Dentro del MHC, los genes del sistema de HLA se encuentran localizados en Chr 6p21.3 dentro de una región génica densamente ocupada (cerca de 200 genes) y son los que exhiben mayor polimorfismo y, por tanto, son responsables de las mayores diferencias inmunogenéticas entre individuos de una población y entre poblaciones; de hecho, el polimorfismo es tan grande que el número teórico de fenotipos posibles que resultan de todas las combinaciones de alelos HLA es más grande que la población humana en la Tierra<sup>13</sup>. Cada uno de estos polimorfismos se conoce como alelo y se heredan en haplotipos. Un haplotipo es un segmento cromosómico que involucra a varios alelos y que se hereda en bloque en un gran porcentaje de las ocasiones. Estos bloques se conservan, por lo general, de generación en generación de manera bastante constante, hasta que en una meiosis determinada los alelos de un haplotipo pueden intercambiarse por los del cromosoma homólogo. A la fuerza con que se mantienen juntos estos alelos en un bloque se la conoce como desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium* [LD]) y a la distancia cromosómica dentro de la cual la probabilidad de que un alelo en un *locus* se separe de otro por entrecruzamiento meiótico (se rompe el LD) es igual a 0.01 se la conoce como centiMorgan (cM). El sistema HLA se extiende a lo largo de cuatro millones de bases dentro del cromosoma 6 con una probabilidad de recombinación dentro de la región de 0.04, es decir, posee una medida de recombinación de 4 cM.

Los productos de expresión génica de este sistema son glicoproteínas de superficie cuya función consiste en presentar antígenos endógenos (clase I, con las moléculas A, B, C, E, G, codificadas por los genes con el mismo nombre; en esta región genómica también se localizan los pseudogenes -H, -J, -K y -L) o exógenos (clase II, representada por los antígenos heterodímeros DM, DP, DQ y DR, y codificada por los genes *DMA*, *DMB*, *DPA1*, *DPB1*, *DQA1*, *DQB1*, *DRA*, *DRB1* a *DRB9*). Las variantes en la secuencia genómica, a nivel de ADN, y su repercusión en la secuencia de aminoácidos en cada uno de estos genes se denotan en la nomenclatura del sistema. En resumen, las primeras letras designan al sistema genético; después del guión se encuentran la letra o letras y números que nombran al gen; delante del asterisco se encuentran los dígitos que indican el grupo serológico al que pertenece el alelo, seguido por dos puntos, tras los cuales se colocan los dígitos que señalan la especificidad dentro del grupo, generalmente distinguida de otras por variaciones en al menos un aminoácido de la secuencia; tras otros dos puntos se ubican los dígitos que indican la presencia de variaciones sinónimas en la secuencia de ADN de la región codificante del alelo y, después de los últimos dos puntos, los dígitos que identifican variaciones en los intrones o en las regiones 3' y 5' no traducidas que flanquean los intrones o exones del alelo<sup>14</sup>. Así, tenemos que la secuencia del alelo HLA-A\*02:01:01:03 corresponde a la tercera variante en la región no codificante de la primera variante sinónima del alelo 01 de la determinante serológica 02 del gen A del sistema HLA. Cuando al final de la designación se añade una letra N (*null*), se refiere a que el alelo contiene un cambio en la secuencia que impide la expresión de la molécula (generalmente un codón de paro), por lo que el alelo no contribuye al fenotipo de la célula. Si se trata de una L (*low*), significa que contiene cambios que disminuyen la expresión de la variante en la superficie de la célula. Y una S (*secreted*) implica que la molécula se secreta y no se encuentra en la superficie celular.

Cualquier designación que involucre los primeros cuartos dígitos después de la letra o letras que indican el nombre del gen se considera como tipificación de alta resolución, mientras que la detección de los dos primeros dígitos sin ambigüedades se denomina baja resolución o equivalente alélico. Cuando la metodología analítica lo permite, es posible contemplar un par de alelos de alta resolución como posibles antígenos, lo cual se indica colocando los primeros dos dígitos (la determinante serológica) y después, en



**Figura 1.** Representación de los sitios polimórficos en las moléculas HLA y su correspondiente organización genómica (sólo se muestran los exones). **A:** representación de una molécula HLA-B (a partir del archivo PDB 2RFX para el alelo HLA-B\*57:01). **B:** representación de una molécula HLA-DR (a partir del archivo PDB 1AQD para el alelo HLA-DRB1\*01:01). Guía de colores: en distintos tonos de verde se señalan las posiciones conservadas (un solo residuo de aminoácido); ■ exón correspondiente al péptido señal (no presente en la molécula presentadora madura); ■ posición con dos posibles aminoácidos; ■ posición con tres posibles aminoácidos; ■ posición con cuatro o más posibles aminoácidos. **A:** ■ señala la región que distingue a los grupos Bw4/Bw6, ■ señala la cadena  $\alpha 1$ , ■ señala la cadena  $\alpha 2$  y ■ señala la cadena  $\alpha 3$ . **B:** ■ señala el residuo 72, parte del denominado epítipo reumatoide, ■ señala la cadena  $\beta 1$ , ■ señala la cadena  $\beta 2$ , ■ cadena DR4 (no polimórfica). Se analizaron las secuencias de aminoácidos de 50 alelos de HLA-B (HLA-B\*07:02, -B\*08:01, -B\*13:01, -B\*14:01, -B\*14:02, -B\*15:01, -B\*15:02, -B\*15:03, -B\*15:04, -B\*18:01, -B\*27:01, -B\*27:05, -B\*35:01, -B\*35:02, -B\*37:01, -B\*38:01, -B\*39:01, -B\*39:02, -B\*39:06, -B\*40:01, -B\*40:02, -B\*40:05, -B\*07:02, -B\*41:01, -B\*42:01, -B\*44:02, -B\*45:01, -B\*46:01, -B\*47:01, -B\*48:01, -B\*49:01, -B\*50:01, -B\*51:01, -B\*51:02, -B\*52:01, -B\*52:02, -B\*53:01, -B\*54:01, -B\*55:01, -B\*56:01, -B\*57:01, -B\*57:05, -B\*58:01, -B\*59:01, -B\*67:01, -B\*73:01, -B\*78:01, -B\*81:01, -B\*82:01, -B\*83:01) y 22 alelos de HLA-DRB1 (HLA-DRB1\*01:01, -DRB1\*03:01, -DRB1\*03:02, -DRB1\*04:01, -DRB1\*04:05, -DRB1\*04:07, -DRB1\*07:01, -DRB1\*08:01, -DRB1\*08:02, -DRB1\*09:01, -DRB1\*10:01, -DRB1\*11:01, -DRB1\*11:02, -DRB1\*12:01, -DRB1\*13:01, -DRB1\*13:02, -DRB1\*14:01, -DRB1\*14:02, -DRB1\*14:06, -DRB1\*15:01, -DRB1\*16:01, -DRB1\*16:02)<sup>49</sup>. Las moléculas fueron editadas con el programa PyMOL<sup>15</sup>. Los sitios genómicos no están representados a escala.

orden ascendente, los números de los alelos posibles separados por una diagonal. Esta interpretación se conoce como resolución intermedia.

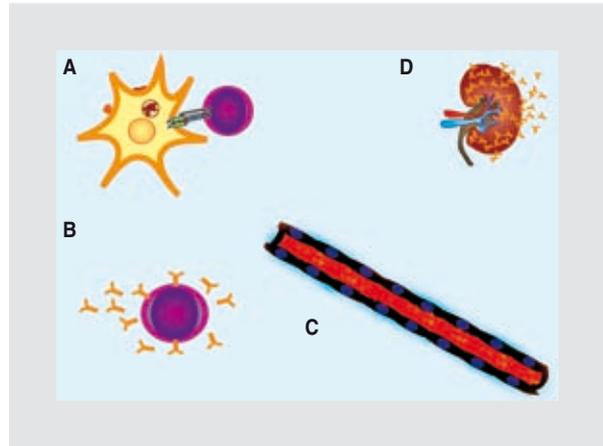
La molécula presentadora de clase I se compone de tres dominios codificados por cada uno de los genes de HLA de clase I y de una molécula adicional: la  $\beta_2$ -microglobulina (B2M, Chr 15q21-22). En cambio, las moléculas presentadoras de clase II son heterodímeros formados por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ ; la primera de ellas prácticamente no presenta polimorfismo dentro de la especie, mientras que la segunda

concentra gran parte de sus variaciones en la región de unión al péptido (Fig. 1). En ambos casos, las dos moléculas requieren ensamblarse (entre ellas y con su péptido a presentar cargado en la hendidura de presentación) dentro del retículo endoplásmico (razón por la que el exón 1 codifica para un péptido señal altamente conservado) antes de expresarse en la superficie; de lo contrario, no pueden mantener su estructura tridimensional estable.

Dentro del espectro de péptidos que se pueden presentar a través de la clase I se encuentran péptidos

virales y fragmentos de proteínas que son generadas dentro de las células, mientras que los previamente fagocitados y procesados son exhibidos por la clase II. La función de ambas clases se pone de manifiesto en la distribución de sus moléculas: la clase I es ubicua, mientras que la distribución de las pertenecientes a la clase II se encuentra restringida a aquellas células especializadas en fagocitar y presentar antígenos en su superficie: células dendríticas (*dendritic cell* [DC]), macrófagos y linfocitos B. Ambas clases son reconocidas por los linfocitos T: los complejos HLA de clase I/péptido, por los linfocitos T CD8+ circulantes y los complejos HLA de clase II/péptido, por los linfocitos T CD4+ en los ganglios linfáticos preferentemente. Dentro de la clase I, dos grandes familias se distinguen de cada uno de sus dos genes principales: los alelos del gen *HLA-B* pertenecen a una de dos familias denominadas Bw4 o Bw6, de acuerdo con la secuencia de residuos de aminoácidos entre las posiciones 77 y 83 de estas proteínas (Fig. 1), y los grupos C1 y C2, en los que se clasifican los alelos del gen *HLA-C*, en base a dos posiciones específicas: el residuo 77 (S o N) y el residuo 80 (N o K).

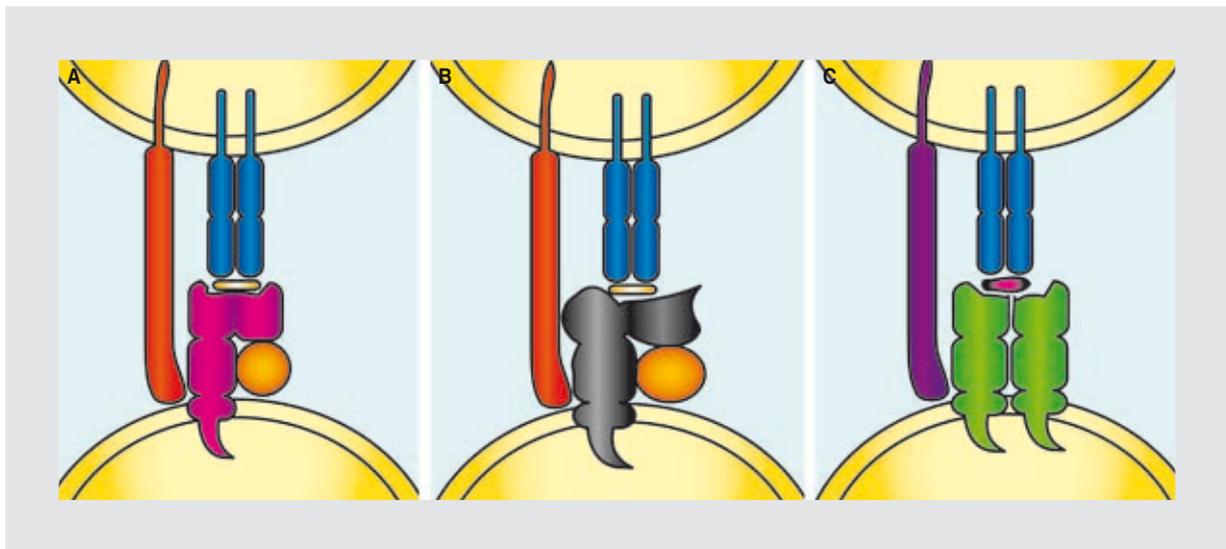
El mecanismo de rechazo puede llevarse a cabo de cuatro formas distintas: rechazo hiperagudo (mediado por anticuerpos, Fig. 2), rechazo agudo directo o indirecto (relacionado con las moléculas de histocompatibilidad, Fig. 3), rechazo crónico y vasculopatía crónica



**Figura 2.** Rechazo mediado por anticuerpos. **A:** un aloantígeno (cuyo origen puede ser a partir de muy diversas fuentes) es fagocitado y procesado para su presentación por HLA de clase II, reconocido por un linfocito T CD4+. **B:** del reconocimiento por el linfocito T cooperador puede desencadenarse el estímulo de un linfocito B específico para el péptido presentado con la concomitante producción de anticuerpos. **C:** al momento de la reperusión del órgano trasplantado, los anticuerpos viajan al interior del injerto. **D:** comienzan a unirse a los mHA o a los alelos de HLA que porten epítopes con la secuencia de aminoácidos contra la cual está sensibilizado el paciente, provocando daño contra el injerto, que puede desembocar en la pérdida del órgano trasplantado.

del injerto (primera causa de muerte tardía en pacientes con trasplante cardíaco<sup>16</sup>).

Dentro de los mHA se encuentran ciertos aloantígenos tales como los antígenos HY (*KDM5D*, *UTY* y *USP9Y*



**Figura 3.** Rechazo agudo relacionado con incompatibilidad en moléculas HLA. **A:** presentación clásica de un antígeno por una molécula de HLA de clase I al TCR de un linfocito T CD8+. Si no es reconocido como no propio, el antígeno no generará una respuesta inmune; en caso contrario, el linfocito T CD8+ desencadenará una respuesta citolítica. **B:** presentación de un antígeno por una molécula de HLA de clase I de una célula del donador al TCR de un linfocito T CD8+ del receptor. Aun cuando el antígeno sea reconocido como propio, el TCR no reconoce a la molécula presentadora como propia y puede atacar a la célula. **C:** presentación clásica de un aloantígeno (del donador) por una molécula de HLA de clase II de una célula presentadora de antígenos del receptor al TCR de un linfocito T CD4+ del receptor. En este momento el antígeno presentado se convierte en un detonante de respuesta inmune contra su secuencia de aminoácidos.

en Chr Yq11), responsables de la supervivencia reducida de injertos provenientes de un individuo masculino en receptores femeninos<sup>17</sup>, HA-1 (*HMHA1*, Chr 19p13.3), HA-2 (*MYO1G*, Chr 7p13-12), HA-3 (*AKAP13*, Chr 15q24-25), HA-4, HA-6, HA-7, HA-8, los genes *A* y *B* parecidos a cadenas de MHC de clase I (*MICA* y *MICB*, Chr 6p21.3) y moléculas específicas de tejido como el colágeno V (*COL5A1*, *COL5A2* y *COL5A3*; Chr 9q34.2-34.3, Chr 2q31 y Chr 19p13.2, respectivamente), receptores vasculares (receptor de tipo 1 de angiotensina II [AGTR1, Chr 3q21-25]), moléculas de adhesión (agrina [AGRN, Chr 1pter-p32]) y filamentos intermedios (vimentina [VIM, Chr 10p13], miosina cardíaca [al menos 10 genes en varios cromosomas])<sup>18-21</sup>. A ellos se atribuye el rechazo a largo plazo de órganos sólidos y la aparición de GVHD y el efecto de injerto contra leucemia (*graft-versus-leukemia effect* [GVLE]) en individuos receptores de HSC con donador HLA-identico<sup>22,23</sup>. HA-1 y HA-2 sólo se presentan en células derivadas de tejido hematopoyético, incluyendo las células leucémicas<sup>24</sup>, mientras que el resto aparecen también en otros tejidos<sup>25</sup>. La presencia de HA-1, así como de HA-2, ha demostrado ser de alta importancia en el trasplante de médula ósea, pues existen dos variantes de esta molécula: HA-1(H) (con la secuencia de aminoácidos VLHDDLLEA) y HA-1(R) (cuya secuencia es VLRDDLLEA y se considera un alelo nulo). Dada la antigenicidad del nonapéptido, basta su presencia para disparar una respuesta de injerto contra hospederero cuando el fenotipo del donador de las HSC es HA-1(R/R) y el receptor presenta el fenotipo HA-1(H/R) o HA-1(H/H)<sup>20</sup>. Estudios sobre la presentación de estos antígenos muestran restricción a determinados alelos de HLA de clase I: HLA-A\*01 (HA-3), HLA-A\*02 (HA-1, HA-2, HA-4, HA-5, HY) y HLA-B\*07 (HA-6, HA-7, HY), y se observa correlación entre la presencia de los mHA y alelos de HLA: de los individuos que expresan HLA-A\*02, el 69% presentan el antígeno HA-1; el 95%, el antígeno HA-2; el 16%, el antígeno HA-4, y el 7%, el antígeno HA-5, mientras que el 88% de los individuos HLA-A\*01 portan el antígeno HA-3<sup>25,26</sup>. Recientemente, se han identificado otros mHA por su presentación restringida a moléculas de HLA de clase II<sup>27</sup>.

Una de las contrapartes fisiológicas del sistema HLA se encuentra expresada en las células *natural killer* (NK) y se conoce como receptor tipo inmunoglobulina de células NK (*killer immunoglobulin-like receptors* [KIR], Chr 19q13.4); la evidencia apunta a que parte de la diversidad exhibida en este sistema correlaciona con la selección alélica y haplotípica sufrida por el HLA y, por tanto, esta relación HLA/KIR influye en el curso

de diferentes condiciones clínicas<sup>28</sup>. El sistema HLA funciona como regulador de activación o inhibición de la actividad citotóxica de las células NK mediante la variación en la expresión de proteínas HLA de clase I en la superficie celular, particularmente en células infectadas, tumorales y alogénicas<sup>29</sup>.

El estudio de esta relación dentro del sistema inmune ha adquirido relevancia al observarse mayor incidencia de GVHD en individuos receptores de trasplante de médula ósea de donadores HLA-identicos de los que difieren en el genotipo KIR, en particular entre los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1*. La combinación *KIR3DL1/Bw4* se ha asociado a menor mortalidad y la presencia de *KIR2DS3* es factor de protección en el desarrollo de GVHD. Por otro lado, cuando *KIR2DS5* se encuentra en el receptor o en ambos integrantes de la pareja, existe mayor riesgo de recaída. Es evidente que un mayor conocimiento en la genética y biología de este sistema aportará mayores beneficios al paciente, pues se arrojará luz sobre el papel de las células NK en la biología del trasplante, así como posibles usos terapéuticos de la alorreactividad controlada, en el trasplante de HSC y en el entendimiento de los procesos de tolerancia en el embarazo<sup>28-30</sup>.

## Un breve panorama de la diversidad genética de las poblaciones mexicanas

Aunque se mantiene la convicción –errónea– de que la colección de variantes genéticas de los grupos humanos que habitan nuestro país resulta de la unión de unas decenas de grupos indígenas con españoles<sup>31</sup>, la mezcla génica que exhiben las poblaciones mexicanas es por demás compleja, al igual que su historia demográfica, como demuestran, por ejemplo, estudios en el ADN mitocondrial (mtADN)<sup>32</sup>. A principios del siglo XVI, cerca de 20 millones de pobladores formaban parte de cientos de pueblos pertenecientes a distintos troncos lingüísticos<sup>33</sup>. Al parecer, estos pobladores descendían de una migración desde Beringia hace 15,000-18,000 años, y poblaban extensas regiones del actual territorio mexicano<sup>34</sup>, al momento en que se encontraron con conquistadores, primero, y con colonizadores, después, venidos de varias regiones del Viejo Mundo: Andalucía, León, Extremadura y las Castillas fueron las regiones de donde más del 70% del ejército de Cortés provenía, así como Portugal y Génova<sup>35</sup>. Aproximadamente 130,000 esclavos africanos, procedentes de Cabo Verde, Guinea, Angola, Congo y otras regiones aledañas a la costa atlántica centroafricana, llegaron a la Nueva España entre el

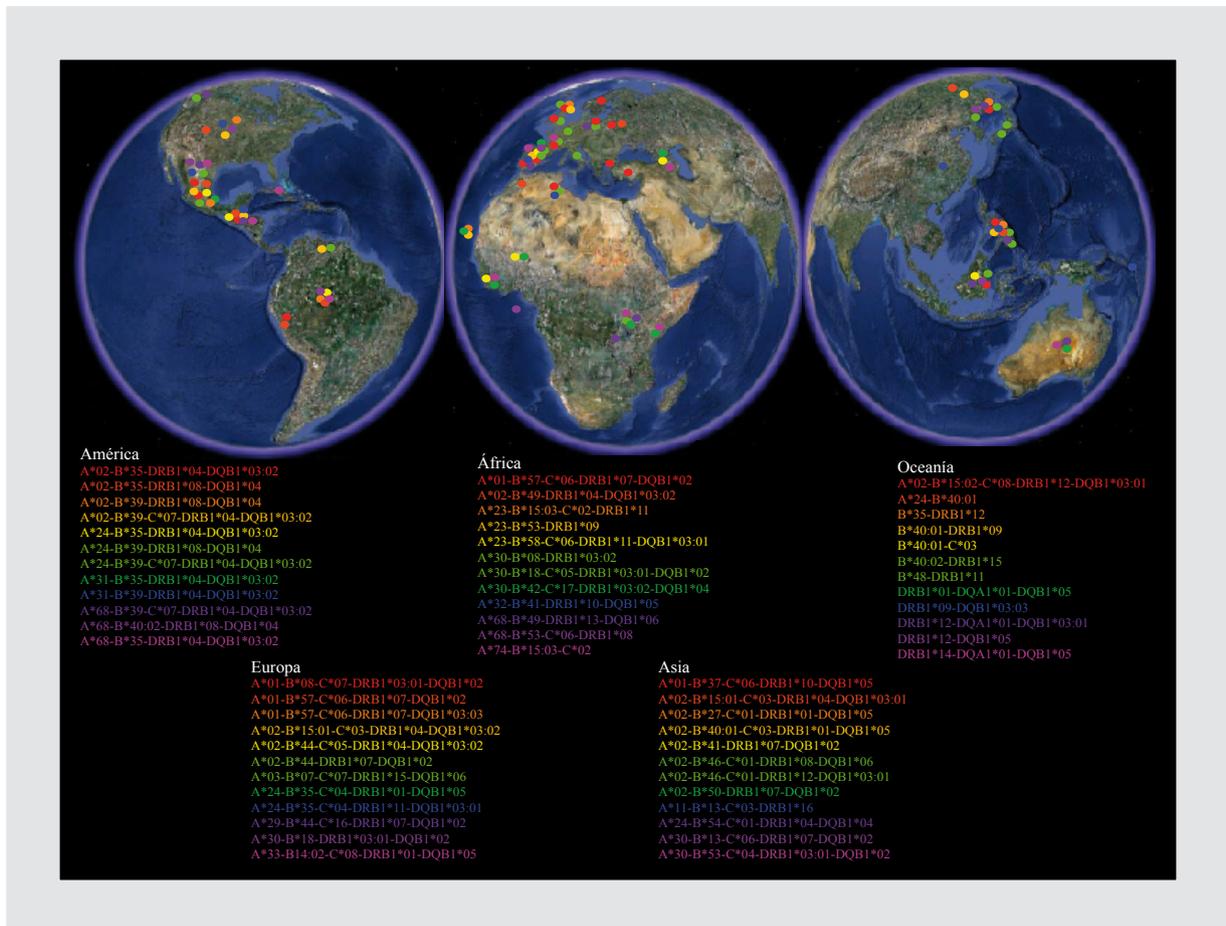
comienzo de la época colonial de América y 1817, año en que las coronas inglesa y española abolieron el tráfico de esclavos desde África<sup>36</sup>. Tras este encuentro, las guerras de conquista y las enfermedades, como la denominada *Huey cocoliztli* (del náhuatl «gran enfermedad, epidemia»), presuntamente una epidemia ocasionada por fiebre hemorrágica viral, entre otros factores, acabaron con el 90% de la población originaria, que fue sustituida por europeos y criollos<sup>37</sup>, o africanos, mulatos y otros grupos humanos descendientes de aquellos primeros esclavos procedentes de África<sup>36</sup>. El reflejo de este mestizaje queda patente en el genoma de los habitantes descendientes de los actores de tales eventos: diversas estimaciones de mestizaje arrojan contribuciones desiguales por todo el territorio nacional, con una tendencia a presentar mayor componente africano hacia las costas del sureste y algunas regiones del centro del país, y una proporción más elevada de alelos de ancestría europea hacia el norte del territorio, con gradientes de contribución nativa americana desde el centro hacia las regiones antes citadas, lo que arroja porcentajes de contribución estimados en rangos que van del 25.6 al 94.5% (nativa americana), del 4.2 al 70.8% (europea) y del 0.9 al 40.5% (africana)<sup>38-42</sup>.

El monto poblacional, las actividades económicas, la transición de los modos de producción originarios a los impuestos, la introducción de nuevos cultivos, la creación de ciudades, el abandono del campo, la destrucción de los ecosistemas y el acceso desigual a los servicios básicos, entre otras razones, han provocado la migración del campo a la ciudad, del campo a otros campos y del campo y las ciudades al extranjero: actualmente un tercio de la población indígena de los países latinoamericanos vive en áreas urbanas<sup>43-46</sup>. Estos fenómenos sociales también han impactado en la composición genética de las poblaciones mediante la introducción (el 2.8% de la población inmigrante por entidad en el país es de origen no mexicano<sup>43</sup>) y pérdida de alelos en una población «finita», lo que modifica el equilibrio de Hardy-Weinberg en algunos de sus preceptos y, por consecuencia, nos indica que la frecuencia de un alelo en particular (o un conjunto de ellos) variará de una generación a otra; esto hace del acervo genético de la población mexicana un mosaico dinámico, un vídeo, más que una fotografía. Si bien no existen esquemas generales que resuman de manera consistente la historia poblacional y demográfica de México, el estudio de los eventos demográficos y epidemiológicos del pasado y su repercusión en la genética de poblaciones actualmente presentada en

nuestro país debe comenzar a desplegar todo su protagonismo no sólo en el ámbito académico, sino también como parte del diseño de nuevas políticas de salud que respondan al panorama biosociocultural de nuestras poblaciones.

### Variabilidad inmunogenética en las poblaciones mexicanas

En México, la heterogeneidad del acervo genético poblacional, como ya hemos visto, es un asunto bastante complejo. No sólo se debe tomar en cuenta la contribución de al menos tres fuentes principales de alelos (América, Europa y África), sino también el factor único del mestizaje, que, además de modificar las frecuencias alélicas de generación en generación, puede generar nuevos haplotipos y modificar las asociaciones entre alelos de HLA. Dentro de este peculiar acervo genético, se han encontrado representantes de prácticamente todos los grupos de alelos principales de este sistema<sup>42</sup>. Se debe entender que entre los alelos presentes en nuestra población, hay algunos que son específicos de determinados grupos humanos (nativos americanos, africanos, norafricanos, europeos, asiáticos de Oriente Medio y Lejano Oriente o habitantes nativos de Australia e islas del Océano Pacífico) y otros que son prácticamente ubicuos, es decir, que han conservado su presencia en muchas de las poblaciones humanas desde su dispersión a partir de los primeros grupos que salieron de África hace unos 50,000 o 60,000 años<sup>47</sup>, descendientes de poblaciones de *Homo sapiens* anatómicamente modernos que vivieron en África hace cerca de 100,000-150,000 años<sup>32,34,48</sup>; dentro del sistema HLA<sup>49</sup>, destacan los alelos HLA-A\*02, -A\*24, -A\*68 y -B\*35 como ejemplo de variantes que han viajado con la humanidad desde que dejó su cuna geográfica en el Este de África. Otros se encuentran presentes en los grupos humanos nativos que habitaban grandes extensiones geográficas desde antes de las expansiones coloniales de los siglos XVI a XIX: el alelo HLA-DRB1\*04 se encuentra en grupos europeos, asiáticos y nativos americanos; el alelo -B\*39, en asiáticos y nativos americanos; alelos del grupo -B\*14, distribuidos por el llamado Viejo Mundo, y las variantes del alelo -DRB1\*03, en grupos africanos subsaharianos o norafricanos, europeos y mediorientales. Pero también hay algunos alelos restringidos a determinadas poblaciones o grupos humanos, como el HLA-B\*47 encontrado en grupos judíos, el alelo -B\*46 de los grupos del Este Asiático (japoneses, chinos, etc.) o el subtipo DRB1\*14:02 encontrado en grupos



**Figura 4.** Presencia de algunas asociaciones y haplotipos característicos del sistema HLA en distintas poblaciones humanas. Los colores indican la ubicación<sup>50</sup> de las poblaciones nativas en las que se han reportado estos haplotipos<sup>51,52</sup>.

nativos de América, en particular en América del Norte. Además, no debemos olvidar que el sistema continuamente arroja nuevos alelos, ya sea por mutaciones puntuales, recombinación o conversión génica, lo que hace más complicado el panorama genético poblacional. Al trabajar con HLA, es indispensable recordar estas características del sistema génico.

Ahora bien, no es un mapa de presencia/ausencia lo que se revela al colocar la distribución de los alelos geográficamente. También la frecuencia de los alelos juega un papel importante en la interpretación de los datos. Si bien el mestizaje es un evento de gran magnitud característico de nuestra población, no es privativo de los grupos humanos latinoamericanos y otros afectados por la política colonial de la Europa de los siglos XVI a XIX, pues siempre ha habido una cierta cantidad de contacto entre poblaciones, y esta es, de manera general, inversamente proporcional a la distancia que las separa. La simple presencia de un alelo en una región geográfica no nos dice mucho

sobre su origen y dispersión; sin embargo, la frecuencia de un alelo nos puede decir un poco más sobre la trayectoria que ha seguido e incluso algunas cuestiones sobre selección de esa variante en particular, si está en una región codificante.

Así, el hecho de encontrar alelos en todo el mundo, pero con mayor frecuencia en ciertas regiones, nos remonta a un posible grupo humano que portaba la variante original y cómo se dispersa alrededor de su sitio de origen. Pero trazar la historia que cuenta la genética a partir de alelos y frecuencias es arriesgado. Las asociaciones entre alelos, características del sistema HLA, son una manera más precisa de estimar el grado de mestizaje en una población y dibujar los movimientos poblacionales a través de la geografía del planeta (Fig. 4). Gracias al conocimiento del LD entre los alelos y a los estudios realizados en distintas poblaciones alrededor del mundo<sup>52</sup>, podemos decir con mayor seguridad que el haplotipo HLA-A\*33/B\*14/DRB1\*01/DQB1\*05 tiene un origen mediterráneo con

Tabla 1. Principales haplotipos del sistema HLA encontrados en México

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

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

Adaptado de Barquera, et al.<sup>42</sup>, Middleton, et al.<sup>52</sup>, Arnaiz-Villena, et al.<sup>54</sup>, Gómez-Casado, et al.<sup>55</sup>, Vargas-Alarcón<sup>56,57</sup> y de datos no publicados.

fundamentos en su distribución reportada (España, Túnez, Portugal, Marruecos) y las frecuencias en los lugares donde se encuentran (0.01-0.04), en vez de adscribir un origen filogeográfico a un alelo. Un resumen de algunos de los haplotipos más frecuentemente encontrados en poblaciones de México se presenta en la tabla 1, y se puede observar cómo correlaciona con algunos de los datos de la historia social, demográfica y política de nuestro país, discutidos previamente.

En los haplotipos del sistema KIR reportados en poblaciones mexicanas al momento se puede encontrar un efecto adverso de su genética en la inmunología del trasplante: El alelo KIR3DL1 se encuentra en prácticamente todos los haplotipos frecuentes en estas poblaciones; sin embargo, la presencia de alelos HLA-B del grupo Bw4 (con el cual muestra un efecto benéfico, como ya se revisó) es prácticamente nula en individuos indígenas y generalmente poco representada en integrantes de grupos mestizos. KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DS1 tienen presencia diferencial en las poblaciones mexicanas, lo que implica diferencias en la respuesta inmune tanto en el caso de trasplantes como de enfermedades infecciosas virales y cáncer, donde la relación HLA-KIR es fundamental para

la fisiopatogenia de dichas entidades clínicas<sup>28,52</sup>. El hecho de que algunos haplotipos presenten mayor incidencia de rechazo en el sistema HLA es un indicativo de que estas relaciones son de importancia en la inmunogenética<sup>53</sup>. La presencia de distintos haplotipos de estos sistemas puede devenir en respuestas a la terapéutica del trasplante de manera positiva o negativa en función de la etnicidad de las asociaciones; sin embargo, la falta de estudios al respecto en esta población (ideal como laboratorio de mestizaje único en el mundo) deja la interrogante acerca de cómo las variantes provenientes de distintas partes del mundo y, por tanto, de distintas historias adaptativas se relacionarán en un contexto mestizo y, más drásticamente, en un mismo ambiente fisiológico.

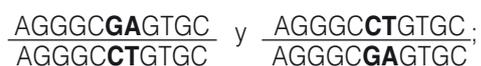
Al analizar conjuntamente la frecuencia de los haplotipos o asociaciones y el LD entre ellas, y estimaciones de mestizaje basadas en estos dos puntos, es posible emplear la genética de poblaciones como herramienta clínica para buscar un potencial donador dentro o fuera del país. Queda clara la importancia de generar mayor conocimiento en torno a las frecuencias de los alelos y haplotipos de los sistemas HLA y KIR en distintos grupos humanos, sean mexicanos o no.

## Relevancia de la resolución en la genotipificación en el trasplante

El único trasplante que teóricamente no presentaría reactividad del receptor contra el injerto, ni viceversa, es el autotrasplante. Fuera de algunos casos de autotrasplantes de HSC, y hasta que la ingeniería de órganos no sea una realidad<sup>8</sup>, existe la necesidad de órganos alógenos, sean de individuos genéticamente relacionados o no. Y esta necesidad conlleva la obligación de conocer el grado de compatibilidad entre individuos a nivel fenotípico. Ahora bien, aunque el fenotipo se puede determinar directamente mediante reacciones antígeno-anticuerpo, esta no es la mejor aproximación para abordar el problema: por lo general, se infiere el fenotipo a partir del análisis del genotipo, pues la diversidad que se puede detectar a nivel de ADN es mayor y más informativa que la que permiten detectar las aproximaciones serológicas y celulares.

Existen diversas estrategias metodológicas para llevar esto a cabo que difieren en la cantidad de alelos que pueden detectar –resolución–, el número de muestras procesables por unidad de tiempo, el costo y el tipo de trasplante del que se trate<sup>13</sup>. La resolución más baja corresponde a la serología, desarrollada como una opción viable en su momento por Paul Terasaki a finales de la década de 1960 y que actualmente no es recomendable, pues su resolución no es suficiente, el tiempo de análisis es elevado, depende en gran medida de la viabilidad celular y frecuentemente se obtienen resultados ambiguos o inconclusos; sin embargo, constituye una opción muy poco costosa.

La introducción en la década de 1980 de las estrategias basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]) permitió incrementar la resolución y disminuir los errores asociados a reactividad cruzada, aunque generó ambigüedades en la tipificación por la presencia de polimorfismos cis-trans, que consiste en que estas metodologías por lo general no pueden discernir la posición de las variaciones en la secuencia: considere el lector los siguientes dos pares de secuencias:



que pertenecen a dos pares de alelos distintos: -B\*07:02/-B\*07:24 y -B\*35:03/-B\*35:33; es imposible distinguir si la combinación de variantes pertenece al primer par de alelos o al segundo<sup>58</sup>. Sea cual sea la

estrategia empleada, a menos que se empleen técnicas complementarias, la biología molecular debe lidiar con estas ambigüedades, que resultan estar presentes en una gran proporción de alelos frecuentemente encontrados en varias poblaciones del mundo.

El análisis por PCR-*primer* específico de secuencia (PCR-*sequence specific primer* [PCR-SSP]) permite generar amplicones a partir de *primers* que se unen de manera específica a las regiones polimórficas de las regiones variables por medio de su extremo 3', lo que permite identificar uno-dos nucleótidos por par de *primers*<sup>59,60</sup>. La resolución que se puede alcanzar con esta metodología puede ser de intermedia a alta, en función del número de pozos que se analicen por paciente y de los pares de *primers* empleados. El algoritmo de interpretación tras la electroforesis en gel de agarosa –el revelado más empleado para esta metodología– se basa en la ubicación de estos pares de *primers* en la placa y en el peso molecular del amplicón generado. Otra metodología empleada a nivel de ADN es la hibridación de los productos de PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-*sequence specific oligonucleotide probe* [PCR-SSOP]) en condiciones de astringencia. Los amplicones se generan por medio de una PCR cuyos *primers* se ubican flanqueando la posición o posiciones polimórficas que se alinean con secuencias conservadas dentro de la región de análisis. El ensayo puede llevarse a cabo con los amplicones o las sondas de hibridación inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa; sea cual sea el caso, las sondas o los amplicones deben estar marcados para su revelado, ya sea por medio de técnicas colorimétricas o de ensayos basados en enzimas (complejos biotina-estreptavidina-peroxidasa-tetrametilbenzidina). Las condiciones de astringencia impiden los alineamientos inespecíficos y, por tanto, disminuyen la probabilidad de tipificar erróneamente un alelo. El número de sondas a emplear depende del número de alelos que se quiera detectar y, por tanto, está implicado en la resolución del análisis.

A pesar de que ambas estrategias pueden llegar a tipificar un buen número de especificidades en alta resolución, la técnica frontera sigue siendo la secuenciación. Con un juego de *primers* que permita flanquear las regiones polimórficas, esta aproximación puede detectar todas las variantes reportadas y aquellas recién descubiertas. La secuenciación depende de dos PCR: una primera para generar un número importante de copias para el análisis, tras la cual procede una purificación enzimática que degrada tanto

los *primers* iniciales (una exonucleasa) como los trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP) (fosfatasa alcalina) presentes en la mezcla; la segunda PCR se lleva a cabo en dos tubos: uno contiene el *primer* del extremo 3' y el otro, la reacción con el *primer* 5', lo que permite al final empalmar ambas secuencias para el análisis. En esta segunda reacción, la posición de los nucleótidos se marca por medio de fluorocromos específicos para cada base nitrogenada que sirve de marcador. Estos nucleótidos marcados además carecen del grupo -OH en la posición 3', por lo que impide que la reacción de polimerización catalizada por la ADN polimerasa empleada siga, restringiendo el fragmento a un tamaño específico. Tras las reacciones, se inyectan los amplicones en un polímero que hace las veces de matriz semisólida para una electroforesis capilar que separa los amplicones por tamaño, y los fluorocromos terminales de cada amplicón son detectados por una cámara especializada en captar luz de determinadas longitudes de onda tras la excitación del fluorocromo con un láser; esto permite asignar una posición a cada señal -y, por ende, a cada nucleótido- por medio de un *software*.

Actualmente, plataformas analíticas novedosas como los sistemas de pirosecuenciación ofrecen la posibilidad de arrojar resultados de genotipificación de HLA sin ambigüedades alélicas que por otras metodologías analíticas requerirían resecuenciación, secuenciación de ADN aislado y clonado o PCR-SSP para resolver polimorfismos *cis-trans*<sup>61</sup>. Otra opción es recurrir a técnicas conformacionales, como el estudio de polimorfismos de conformación de una sola cadena (*single-strand conformation polymorphisms* [SSCP]) y el análisis de conformación mediado por secuencia de referencia (*reference-strand mediated conformation analysis* [RSCA]), que se basan en la formación de conformeros dependientes de la información de cada una de las cadenas por separado, lo que permite alcanzar alta resolución sin ambigüedades *cis-trans*<sup>62</sup>. La resolución de ambigüedades de resultados también puede llevarse a cabo por resecuenciación o PCR-SSP con *primers* específicos de alelo.

¿Cuántos genes tipificar? Aunque existen autores que consideran una compatibilidad de 6/6 alelos con los genes *HLA-A*, *-B* y *-DRB1*, incluir los genes *-C*, *-DPB1* y *-DQB1* podría incrementar la supervivencia del injerto a largo plazo en trasplantes de órgano sólido. Estudios recientes declaran que el nuevo estándar de oro para la compatibilidad entre una pareja donador/receptor de médula ósea y HSC es 8/8, cuando se toman en cuenta los genes *HLA-A/-B/-C/-DRB1*<sup>62</sup>.

## El análisis de anticuerpos *antihuman leukocyte antigen* reactivos a panel

La incompatibilidad en el sistema HLA no sólo es importante en los mecanismos ya revisados de rechazo agudo directo e indirecto, sino que presenta un reto adicional: la presencia de anticuerpos específicos anti-HLA desarrollados por distintos eventos de inmunización, a saber, embarazos, transfusiones, trasplantes previos y, posiblemente, aloinmunización por presencia de antígenos provenientes de microorganismos (*microorganism-associated molecular patterns* [MAMP]). Se ha encontrado una relación entre la presencia de anticuerpos del isotipo inmunoglobulina G (IgG) específicos contra las mencionadas moléculas, ya sea preformados o generados postrasplante, y la falla e incluso pérdida del órgano trasplantado<sup>63</sup>, y también se ha demostrado que la presencia de anticuerpos anti-HLA está relacionada con la falla en el injerto de HSC<sup>64</sup>. Todo esto ha motivado el desarrollo de plataformas para detectar estos anticuerpos mediante el uso de paneles de antígenos, denominadas genéricamente plataformas de análisis de anticuerpos anti-HLA reactivos a panel (*HLA-panel reactive antibodies* [HLA-PRA]). En el panel, se emplean perlas cubiertas con una selección de distintas especificidades de moléculas HLA a analizar o microarreglos proteicos que incluyen las especificidades y se basan en un método de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de los anticuerpos anti-HLA. En un principio se usaba un «panel vivo», es decir, ensayos de microlinfocitotoxicidad con células previamente tipificadas, pero, conforme los avances tecnológicos se fueron adaptando al campo biomédico, aumentaron la especificidad y la sensibilidad de las pruebas, pasando primero por la citometría de flujo y ahora por los microarreglos proteicos basados en ELISA. Si bien existen estudios que declaran la similitud de los resultados para varias plataformas analíticas<sup>65</sup>, el ensayo que ha demostrado ser más sensible es el basado en ELISA<sup>66</sup> y por su reducido tamaño es capaz de albergar un panel prácticamente universal de especificidades, en vez de una selección de ellas. Estas características lo posicionan como una herramienta útil en la predicción de la supervivencia a largo plazo del injerto y en la determinación de valor predictivo negativo para prueba cruzada antes del trasplante<sup>63</sup>, así como en la identificación de anticuerpos específicos contra las especificidades de HLA del donador en ensayos practicados postrasplante; si se encuentran aloanticuerpos anti-HLA en el suero del receptor

dirigidos contra variantes presentes en el donador –por lo general aquellas presentes en el segundo pero no en el primero–, es probable que el paciente se encuentre en un proceso de rechazo mediado por anticuerpos.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el valor de HLA-PRA debe ser entendido como el porcentaje de las especificidades del panel contra las cuales el individuo analizado presenta anticuerpos reactivos, y no como un valor con significado clínico, pues este diferirá entre paneles en función de la cantidad de especificidades empleadas, el arreglo utilizado y el algoritmo para determinar la reactividad contra un antígeno específico. Un valor más útil sería la denominada prueba cruzada virtual (*virtual PRA* [vPRA]), que es un porcentaje ponderado que no sólo considera el valor de PRA contra el arreglo proteico, sino que lo correlaciona con las frecuencias de los alelos ante los cuales muestra reactividad en la población a la cual pertenece el individuo. Así, un valor de PRA puede ser elevado (> 50%) en el ensayo, pero poco relevante poblacionalmente si la frecuencia de los alelos contra los cuales el paciente posee anticuerpos es relativamente baja –o incluso están ausentes– en la población a la que pertenece. De esta manera, cuando un cadáver o donador no relacionado perteneciente a una población se presente como posibilidad de donación de órganos, los pacientes con valores de vPRA menores serán los mejores candidatos a recibir dicho trasplante, pues la probabilidad de rechazo será menor que en aquellos individuos sensibilizados contra una gama de antígenos HLA mayor. Este hecho hace necesario el conocimiento de la frecuencia de cada alelo en las poblaciones a las que pertenecen los pacientes y donadores de un programa de donación de órganos, así como la tipificación de HLA del donador y las especificidades que reconocen los anticuerpos del receptor, así como algoritmos matemáticos que permitan elegir de manera eficiente las parejas receptor/donador más adecuadas<sup>67</sup>. Aún queda mucho por realizar para mejorar el aprovechamiento del potencial de esta prueba, como algoritmos que permitan hacer algo más que buscar especificidades y calcular vPRA a partir de frecuencias de alelos en poblaciones particulares: ponderar el resultado en función de parámetros poblacionales tales como índice de homocigocidad (también llamado coeficiente de endogamia), la heterocigocidad esperada (ambos valores son relevantes para el análisis de equilibrio de Hardy-Weimberg) y el LD de los alelos de manera específica para cada grupo humano estudiado. Estos valores permitirán

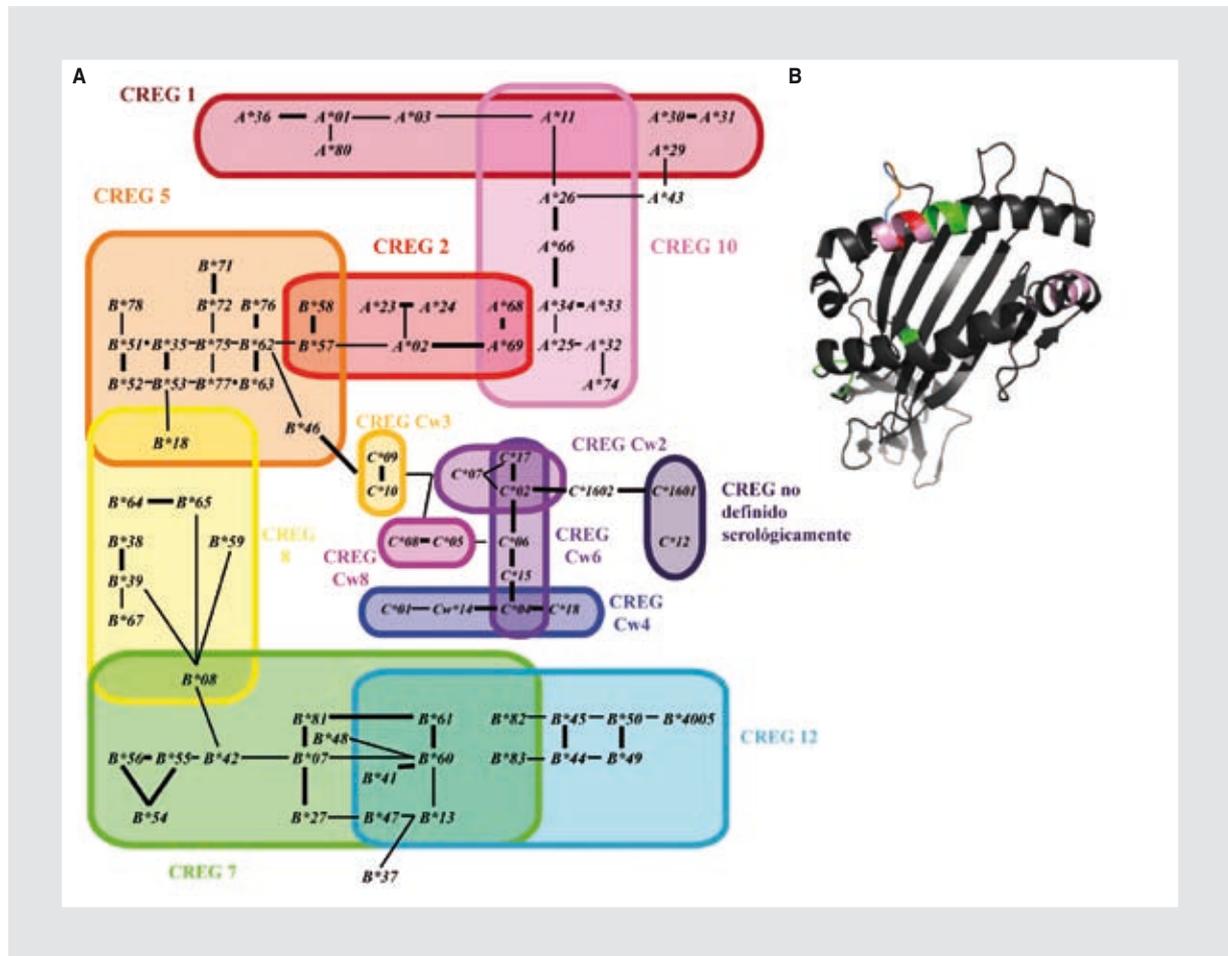
ajustar el cálculo de la probabilidad de un evento de rechazo dada la presencia de un anticuerpo contra un alelo en función de su presencia en forma homocigótica o heterocigótica o incluso, por su LD, si este alelo tendrá repercusión clínica dado un haplotipo conocido en el individuo donante, aun cuando este no se tipifique completamente.

La presencia de ciertos anticuerpos de reactividad cruzada puede complicar el panorama. Estos anticuerpos se generan contra péptidos cuya secuencia se comparte entre varias especificidades de HLA y pueden ser reactivos contra una gran cantidad de alelos. A los alelos contra los cuales un solo anticuerpo presenta reactividad se les llama grupo de reactividad cruzada (*cross reactivity group* [CREG]), y la razón por la cual comparten epítopes, independientemente de su reactividad, se puede entender como una reminiscencia filogenética que nos habla del origen evolutivo de dichos alelos (Fig. 5). En estos casos, la presencia de un solo anticuerpo puede comprometer una gran cantidad de órganos potenciales cuyas células alberguen dichas especificidades. En caso de existir anticuerpos contra un alelo con reactividad cruzada fuerte con otros, se debe evitar trasplantar tanto a partir de individuos positivos para el alelo como con los que presente reactividad.

El tratamiento con rituximab u otros anticuerpos anti-CD20 (molécula encontrada en los precursores linfoides de células B y células B maduras, pero no en células plasmáticas), así como la plasmaféresis terapéutica y la inmunoadsorción, pueden ayudar a disminuir los niveles circulantes de anticuerpos alorreactivos, y de esta manera ayudar a prevenir rechazo mediado por anticuerpos en individuos con elevados títulos de anticuerpos anti-HLA y en parejas donador/receptor incompatibles en el sistema ABO<sup>69,70</sup>, así como aquellos individuos sensibilizados contra uno o varios CREG.

### **Evidencia de influencia de otros factores en la relación receptor-injerto: la biología del trasplante**

El órgano, para ser considerado como potencial injerto en otro organismo, ya ha sufrido diversas situaciones en el cuerpo de su donador o fuera de él que influirán en su fisiología futura una vez trasplantado: ha entrado en contacto con factores proinflamatorios como reactantes de fase aguda, interleucinas y catecolaminas; ha estado expuesto a la «tormenta de citoquinas» que ocurre durante la muerte cerebral, así



**Figura 5. A:** grupos de alelos de HLA de clase I de reactividad cruzada. Las líneas delgadas muestran los alelos que presentan reactividad cruzada, mientras que las líneas gruesas indican reactividad cruzada fuerte. Los grupos de reactividad cruzada se muestran cada uno con un color distinto e indican las especificidades contra las cuales un anticuerpo o un grupo de anticuerpos puede reaccionar de manera inespecífica cuando uno de ellos se dirige contra alguna región o secuencia de aminoácidos compartida por los alelos del grupo. **B:** se muestran algunas de las regiones de las moléculas de clase I identificadas como blancos para anticuerpos de reactividad cruzada, identificadas con el color del CREG al que pertenecen (adaptado de Invitrogen Corporation<sup>68</sup>).

como al procedimiento quirúrgico de extracción, conservación y traslado, con las concomitantes isquemia y variaciones de temperatura que provocan inflamación; tras la conexión a la vascularización, se debe enfrentar al ambiente sanguíneo del receptor, cargado de fármacos y mediadores inflamatorios presentes en el nuevo organismo que pueden ocasionar daño por reperfusión. Además de este panorama, el órgano debe hacer frente a la respuesta inmune del receptor, mediada principalmente –pero no de manera exclusiva– por células T CD4+ y CD8+, así como NK. Las células del linaje T CD8+ atacan las células endoteliales y las células del endotelio vascular del órgano vía liberación de granzimas (principalmente A y B) y perforina, mientras que las células NK contribuyen por su habilidad para responder a la ausencia de lo propio,

es decir, la ausencia de señales inhibitorias provenientes de moléculas MHC de clase I con esta propiedad en la superficie celular<sup>71-73</sup>. Una característica importante a notar es que, entre las primeras células infiltradas en el órgano trasplantado responsables de mediar los mecanismos de rechazo, se encuentran las células T CD8+ de memoria<sup>74</sup>.

Ciertos patógenos oportunistas pueden generar infecciones activas en el receptor, producto de los esquemas de inmunosupresión y el estrés celular ocasionado por el evento quirúrgico, ya sea por una activación tardía de una infección latente, por la transmisión del patógeno en el órgano o por su presencia en células de respuesta inmune trasplantadas. Entre ellos destacan agentes virales como el citomegalovirus (CMV) y el virus de la hepatitis C, bacterias como

*Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de micobacterias. El CMV está reconocido como uno de los principales patógenos en receptores de trasplantes, ya sea directamente como causa de infección y desarrollo de cuadro clínico relacionado, o indirectamente afectando la supervivencia del paciente y el injerto mediante la inmunosupresión sistémica, el incremento en el riesgo de malignidad –en particular, en enfermedad linfoproliferativa de células B relacionada con el virus de Epstein-Barr– y su contribución al daño del injerto<sup>75,76</sup>, así como la disminución de la expresión de moléculas de HLA en la superficie, lo que detona la respuesta de «propio-ausente».

Variaciones de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* [SNP]) en ciertos genes que codifican para proteínas de diversos sistemas –no sólo el inmune– se han relacionado con el pronóstico y respuesta a terapéutica en el área de trasplantes. Tal es el caso de *NOD2/CARD15* (Chr 16q12), cuyas variantes se han asociado con alorreactividad y aumento en recaída y consecuentemente en la muerte del receptor<sup>77</sup>. También los polimorfismos en los genes que codifican para las citocinas son un factor útil para el entendimiento de la biología del trasplante<sup>62</sup>, y, si bien no son actualmente tan populares en este ámbito médico, pueden llegar a jugar un papel importante en la elaboración de nuevos algoritmos no sólo de selección de parejas idóneas receptor/donador, sino también en la terapéutica pre y postrasplante. Algunos estudios<sup>78</sup> demuestran que cambios como G/C en la posición -174 (región promotora) del gen de la interleucina 6 (Chr 7p21) están asociados a desarrollo de diabetes postrasplante en pacientes con sobrepeso. La recomendación en estos casos sería evitar o limitar la administración de fármacos inductores de diabetes postrasplante a individuos con el genotipo G/G, dado que se conozca el mismo en el paciente en cuestión.

## Conclusiones

Como se puede observar, el análisis genético poblacional es una parte fundamental del estudio de la biología del trasplante y es específico para cada población. De los alelos y sus frecuencias en los distintos grupos humanos se puede calcular la probabilidad de rechazo de un donador potencial y se pueden generar bases de datos y bancos de células que puedan ayudar a encontrar órganos, tejido o células necesarios en caso de un alotrasplante. El entender cómo los mecanismos evolutivos y adaptativos han diversificado este sistema abre la posibilidad de llevar

el conocimiento biomédico a un nuevo nivel con un punto de vista biológico que permita comprender cabalmente no sólo la presencia diferencial de alelos dispersos por el mundo, sino también por qué están ahí y qué relevancia tendrán en la inmunología del trasplante. A través de plataformas que involucren el análisis de *pruebas cruzadas virtuales* se puede estimar la probabilidad de rechazo de un individuo receptor cuando un órgano al azar es introducido, en función de los anticuerpos presentes en el suero del paciente. Conocer la estructura y función de las moléculas involucradas en el rechazo ayuda a establecer las necesidades en cuanto a resolución y número de alelos a tipificar, dependiendo del tipo de trasplante. Por último, se debe extender el conocimiento de estas herramientas para optimizar los presupuestos destinados no sólo a la investigación biomédica tradicional, sino también a los análisis en genética poblacional que realmente aporten resultados útiles para mejorar la terapéutica a nivel nacional, con un enfoque local; se debe mejorar el nivel de los algoritmos matemáticos que permitan elegir adecuadamente las parejas receptor/donador y convendría analizar nuevos sistemas que prometen explicar de mejor manera el rechazo de manera adicional al HLA, tales como los genes *KIR*, los *mHA* y los polimorfismos de citocinas, entre otros, que tienen poca o nula representatividad entre los tópicos de trabajos publicados en la genética de poblaciones de México. Sin embargo, se debe tener en mente que la mejor manera de atacar un problema de salud pública no consiste en encontrar la mejor terapéutica, sino en armar los mejores programas de prevención; es decir, se debe buscar la causa raíz de la necesidad de tantos órganos para trasplantes –menester que no es sencillo– y atacarla para disminuir dicha demanda.

## Agradecimientos

Deseo expresar mi gratitud al Lic. Iván Pedroza, al Maestro en Antropología Física (M en AF). Víctor Acuña Alonzo, a la Química (Q). Mónica Rodríguez Estrada, a la Química Farmacobióloga (QFB). Raquel Hernández Díaz y a la estudiante de Antropología Física (est. AF). Anaí Balbuena Jaime, por leer cuidadosamente el manuscrito y emitir sus valiosas opiniones, críticas y correcciones; al Dr. Danilo Franceschi, por sus comentarios y discusiones compartidos que han quedado plasmados en partes de este artículo, y al QFB. Adrián García, por todo su apoyo para la realización de este trabajo. Finalmente, un agradecimiento especial al

Dr. Julio Granados por sus enseñanzas a lo largo de todos estos años, sin las cuales este trabajo hubiera sido imposible de realizar.

## Bibliografía

- Registro Nacional de Trasplantes del Centro Nacional de Trasplantes. [Internet] [http://www.cenatra.gob.mx/cnt/Grafica\\_nal.php](http://www.cenatra.gob.mx/cnt/Grafica_nal.php). Consultado el 18 de noviembre de 2010.
- Dib-Kuri A, Aburto-Morales S, Espinoza-Álvarez A, Sánchez-Ramírez O. Trasplantes de órganos y tejidos en México. *Rev Invest Clin*. 2005;57:163-9.
- Ruiz-Argüelles GJ. Historia del trasplante de médula ósea en México. *Rev Biomed*. 2005;16:207-13.
- Nolasco A. Es tiempo de donar médula ósea. *Salud y medicinas.com.mx*. [Internet] <http://www.saludymedicinas.com.mx/nota.asp?id=2864>. Consultado el 18 de noviembre de 2010.
- Gorodezky C. La Antropología Molecular en Poblaciones Abiertas y en Grupos Endogámicos. Simposio Genética de Poblaciones. XXXIV Congreso Nacional de Genética Humana. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 14 de noviembre de 2009.
- Morfín-Maciel BM. Donación de órganos: Un regalo de vida. *Siempre Unidos*. 2010;6:28-30.
- Álvarez-Hernández I. Por falta de un trasplante 18 mil «condenados a muerte». Uno más Uno, 23 de agosto de 2010. [Internet] Versión electrónica disponible en: [http://www.unomasuno.com.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4663:por-falta-de-un-transplante-18-mil-condenados-a-muerte&catid=1:nacionales&Itemid=541](http://www.unomasuno.com.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=4663:por-falta-de-un-transplante-18-mil-condenados-a-muerte&catid=1:nacionales&Itemid=541), con acceso el 18 de noviembre de 2010.
- Paz y Miño C. Construcción de órganos. *Opinión & Debate. El Telégrafo*: año 126, n.o 45863, p. 08. Quito, Ecuador, 14 de noviembre de 2010.
- Cruz-Martínez A. Trasplantes de riñón amplían la vida a pacientes y dejan ahorro a instituciones. *Sociedad y Justicia. La Jornada*: año 27, n.o 9388, p. 34. México, D.F., 2 de octubre de 2010.
- Bang K, Lee HK, Huh W, et al. Assessment of deceased donor kidneys using a donor scoring system. *Yonsei Med J*. 2010;51:870-6.
- Muller E, Kahn D, Mendelson M. Renal transplantation between HIV-positive donors and recipients. *N Engl J Med*. 2010;362:2336-7.
- Johnson RJ, Fuggle SV, Mumford L, et al. A new UK 2006 National Kidney Allocation Scheme for deceased heart-beating donor kidneys. *Transplantation*. 2010;89:387-94.
- Williams TM. Human Leukocyte Antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn*. 2001;3:98-104.
- Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:846-8.
- The PyMOL Molecular Graphics System, versión 1.2r3pre, Schrödinger, LLC [software].
- Magaña-Serrano JA, Argüero-Sánchez R. Complicaciones crónicas del trasplante cardíaco. Implicaciones clínicas y estrategias futuras. *Rev Inv Clin*. 2005;57:338-43.
- Dieselhuus M, Goulmy E. The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14:419-25.
- Dragun D, Hegner B. Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. *Contrib Nephrol*. 2009;162:129-39.
- Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:682-8.
- Den Haan JMM, Meadows LM, Wang W, et al. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science*. 1998;279:1054-7.
- Spierings E, Brickner AG, Caldwell JA, et al. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis (Lbc) oncoprotein. *Blood*. 2003;102:621-9.
- Simpson E. Minor Histocompatibility Antigens. *Immunol Lett*. 1991;29:9-14.
- Sondel PM, Hank JA, Wendel T, Flynn B, Bozdech MJ. HLA identical leukemia cells and T cell growth factor activate cytotoxic T cell recognition of minor locus histocompatibility antigens in vitro. *J Clin Invest*. 1983;71:1779-86.
- Van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg JHF, et al. Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones. *Blood*. 1994;83:1060-6.
- De Bueger M, Bakker A, Van Rood JJ, Van der Woude F, Goulmy E. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens: ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J Immunol*. 1992;149:1788-94.
- Schreuder GM, Pool J, Blokland E, et al. A genetic analysis of human minor histocompatibility antigens demonstrate Mendelian segregation independent of HLA. *Immunogenetics*. 1993;38:98-105.
- Milosevic S, Bachnick B, Karim K, et al. Identification of MHC II-restricted minor histocompatibility antigens after HLA-identical stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2010;90:1030-5.
- Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2008;21:57-65.
- Vansan-Maragon A, Soares-Guelsin GA, Chagas-Rudnick CC, Alessio-Franceschi DS, Laguila-Visentainer JE, Sell AM. Receptores KIR de células Natural Killer. *Cienc Cuid Saude*. 2008;7(Supl. 1):153-60.
- Skellekens J, Rozemuller EH, Petersen EJ, Van der Tweel JG, Verdonck LF, Tilanus MG. Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. *Mol Immunol*. 2008;45:2255-61.
- Jiménez-Sánchez G. Developing a platform for genomic medicine in Mexico. *Science*. 2003;300:295-6.
- López-Ramírez C, Gorostiza A, González-Martín A. El DNA mitocondrial como herramienta en antropología molecular. En: González-Martín A, coord. *Historia biológica del hombre en América. Aproximaciones desde la Antropología Física*. Pachuca: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.
- Marr JS, Kiracofe JB. Was the huey cocoliztli a haemorrhagic fever? *Med Hist*. 2000;44:341-62.
- Crawford MH. Genética antropológica: Métodos, teorías y aplicación. En: Barquera R, Acuña-Alonzo V, Camacho-Cruz A, Castañeda-Mexzáda R. *Biología Molecular: Métodos y Fundamentos*. Ciudad de México: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
- Grunberg B. El universo de los conquistadores: resultado de una investigación prosopográfica. *Signos Históricos*. 2004;12:94-118.
- Aguirre-Beltrán G. La población negra de México. Estudio etnohistórico. 2.ª ed. México: Fondo de Cultura Económica; 1972.
- Wang S, Ray N, Rojas W, et al. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet*. 2008:e1000037.
- Martínez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, et al. Admixture in Mexico City: Implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet*. 2007;120:807-19.
- Bonilla C, Gutiérrez G, Parra EJ, Kline C, Shriver MD. Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico. *Am J Phys Anthropol*. 2005;128:861-9.
- Rubi-Castellanos R, Martínez-Cortés G, Muñoz-Valle JF, et al. Pre-Hispanic Mesoamerican demography approximates the present-day ancestry of Mestizos throughout the territory of Mexico. *Am J Phys Anthropol*. 2009;139:284-94.
- Juárez-Cedillo T, Zúñiga J, Acuña-Alonzo V, et al. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2008;2:e37-9.
- Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol*. 2008;45:1171-8.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). *La migración en Puebla. XII Censo General de Población y Vivienda 2000*. 2005. Aguascalientes.
- Alderete E. Los pueblos indígenas en el contexto global. En: Alderete E, compiladora. *Conocimiento indígena y globalización*. 1.ª ed. Quito: Ediciones Abya-Yala; 2005.
- Martínez MA, García JE, Fernández P. Indígenas en zonas metropolitanas. *La situación demográfica en México: publica Consejo Nacional de Población (CONAPO) 2003*;155-64.
- United Nations Human Settlements Programme (UN-HABITAT), Office of the High Commissioner for Human Rights (OHCHR). *Urban indigenous peoples and migration: a review of policies, programmes and practices*. 2010. United Nations Rights Programme. Report n.º 8. Nairobi.
- Cavalli-Sforza LL. *Genes, pueblos y lenguas*. 1.ª ed. Barcelona: Editorial Crítica; 2000.
- Goldstein DB, Ruiz-Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:6723-7.
- Robinson J, Waller MJ, Parham P, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:311-4.
- Google Inc. *Google Earth 2010* (versión 5.2.1.1588) [software].
- Yunis EJ, Zúñiga J, Larsen CE, et al. Single Nucleotide Polymorphism blocks and haplotypes: Human MHC block diversity. En: Meyers RA, ed. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Vol. 13, 2.ª ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; 2005.
- Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database. [Internet] <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens*. 2003;61:403-7.
- Torres-Machorro A, Camorlinga-Tagle N, Rodríguez-Ortiz C, et al. Role of major histocompatibility complex and ethnicity in acute renal graft rejection. *Transplant Proc*. 2010;42:2372-5.

54. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, et al. HLA alleles in Mexican Mazatecos, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens*. 2000;56:405-16.
55. Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Moscoso J, et al. Origin of Mayans according to HLA genes and the uniqueness of the Amerindians. *Tissue Antigens*. 2003;61:425-36.
56. Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Moscoso J, et al. HLA genes in Mexican Teeneks: HLA genetic relationship with other worldwide populations. *Mol Immunol*. 2006;43:790-9.
57. Vargas-Alarcón G, Moscoso J, Martínez-Laso J, et al. Origin of Mexican Nahuas (Aztec) according to HLA genes and their relationship with worldwide populations. *Mol Immunol*. 2007;44:747-55.
58. Adams SD, Barracchini KC, Chen D, et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *J Transl Med*. 2004;2:30.
59. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;39:225-35.
60. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*. 1995;46:355-67.
61. Ringquist S, Styche A, Rudert WA, Trucco M. Pyrosequencing-based strategies for improved allele typing of human leukocyte antigen loci. *Methods Mol Biol*. 2007;373:115-34.
62. Shaw BE, Argüello R, García-Sepúlveda CA, Madrigal JA. The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2010;150:251-8.
63. Lee PC, Ozawa M. Reappraisal of HLA antibody analysis and cross-matching in kidney transplantation. *Clin Transpl*. 2007; 219-26.
64. Torres M, Oliveira DCM, Pereira NF, et al. Seleção de doador não aparentado. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(supl. 1):6-7.
65. Quillen K, Medrano C, Adams S, et al. Screening plateletpheresis donors for HLA antibodies on two high-throughput platforms and correlation with recipient outcome. *Transfusion*. 2011; 51(3):504-10.
66. Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, et al. Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:990-5.
67. Ferrari P, Fidler S, Wright J, et al. Virtual Crossmatch approach to maximize matching in paired kidney donation. *Am J Transplant*. 2011;11(2):272-8.
68. Rodey G. CREG charts - Serological cross-reactivity - HLA-A, -B, -Cw locus-. Invitrogen Corporation. 2007.
69. Salama AD, Pusey CD. Drug insight: rituximab in renal disease and transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2:221-30.
70. Vo AA, Peng A, Toyoda M, et al. Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly human leukocyte antigen-sensitized patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation*. 2010;89:1095-102.
71. Choy JC. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ*. 2010;17:567-76.
72. Miltenburg AM, Meijer-Paape ME, Daha MR, et al. Donor-specific lysis of human kidney proximal tubular epithelial cells by renal allograft-infiltrating lymphocytes. *Transplantation*. 1989;48:296-302.
73. Choy JC, Wang Y, Tellides G, Pober JS. Induction of inducible NO synthase in bystander human T cells increases allogeneic responses in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:1313-8.
74. Schenk AD, Nozaki T, Rabant M, Valujskikh A, Fairchild RL. Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h post-transplant in naïve recipients. *Am J Transplant*. 2008;8:1652-61.
75. Reasonable RR. Strategies for managing cytomegalovirus in transplant patients. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11:1983-97.
76. Baron C, Forconi C, Lebranchu Y. Revisiting the effects of CMV on long-term transplant outcome. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:492-8.
77. Madrigal A, Shaw BE. Immunogenetic factors in donors and patients that affect the outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40:40-3.
78. Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, et al. IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2333-40.