

## PAPEL DE LA BIOLOGIA MOLECULAR EN LOS PROGRAMAS DE TRASPLANTE DE ORGANOS SOLIDOS

Eduardo Salido. Dept. A.Patológica. Hospital Universitario de Canarias.

La tecnología conocida como de “Biología Molecular” ha penetrado aspectos tan importantes del trasplante de órganos sólidos en las últimas décadas que en la actualidad forma parte de los métodos de uso habitual en áreas clave como es el estudio de histocompatibilidad, la monitorización del injerto y el diagnóstico de complicaciones, particularmente las infecciones virales.

El gran potencial de esta tecnología, capaz de analizar DNA, RNA y proteínas, las macromoléculas de mayor contenido informativo de nuestras células, ha favorecido el que se intente aplicar a todos los aspectos relacionados con el trasplante: desde la selección del órgano donante, hasta la orientación de la inmunosupresión en un área conocida como farmacogenómica, pasando por la importante monitorización del injerto, que incluye el diagnóstico precoz de rechazo y complicaciones infecciosas, y más raramente neoplásicas.

Evidentemente, en muchas de estas áreas los trabajos realizados hasta la fecha son de tipo experimental, con el objetivo de evaluar mecanismos de enfermedad, y son una minoría los que se traducen en resultados incorporables a la práctica médica. Al ritmo que ha evolucionado la tecnología molecular, se hace muy difícil aventurarse a pronosticar qué aplicaciones serán incorporadas al manejo de los pacientes trasplantados. Estamos en una fase expansiva de acopio de información sobre los fenómenos biológicos subyacentes al trasplante de órganos, y es previsible que muchos de estos detalles moleculares acaben siendo relevantes a la práctica médica, una vez que pasen a una fase de simplificación, con integración de datos críticos.

La tecnología molecular la solemos clasificar según la macromolécula estudiada:

- el análisis del DNA, molécula estable y fácilmente asequible, con técnicas no invasivas, ha encontrado una aplicación fundamental en histocompatibilidad. Una vez conocidas las secuencias de los genes codificantes de los antígenos de histocompatibilidad, se ha impuesto el genotipado de donante y receptor con procedimientos basados en la amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, las técnicas moleculares han permitido extender el análisis de la compatibilidad donante-receptor más allá de los antígenos principales, y se ha podido investigar el papel de otras proteínas, como las moléculas de adhesión, por ejemplo, en la respuesta inmune al órgano trasplantado. También el diagnóstico de complicaciones infecciosas en el paciente inmunosuprimido se ha beneficiado muchísimo de la implantación de técnicas moleculares. De hecho, una de las pruebas moleculares más demandada en el paciente trasplantado es el diagnóstico precoz de infecciones por virus conocidos patógenos en este grupo de pacientes, como el CMV y el HCV, y otros de más reciente interés como el EBV, virus BK, y herpesvirus 6 y 8. En su mayoría, se trata de virus DNA, que pueden ser detectados por PCR directamente en suero y orina; algunos, como HCV, son virus RNA que precisan la síntesis de cDNA previa a la amplificación por PCR.

Dado que el genoma humano es bastante variable entre individuos, la riqueza de polimorfismos del DNA ha sido una fuente importante de estudios sobre el trasplante de órganos sólidos, en búsqueda de asociaciones de interés pronóstico. En la última década han prodigado estudios de asociación en los que se ha descubierto algún alelo de riesgo

relevante para la función del injerto. Desgraciadamente, no todos los estudios son reproducibles, y las conclusiones en muchos casos no pueden generalizarse a otras poblaciones ni están cerca de incorporarse en la toma de decisiones en la práctica. A medida que la tecnología ha posibilitado analizar múltiples polimorfismos a la vez, se está empezando a aplicar un rastreo en paralelo de muchas regiones del genoma, en búsqueda de asociaciones de múltiples polimorfismos y haplotipos con la función del injerto.

- el análisis del RNA, molécula representativa de la actividad de los genes, requiere la obtención de muestras con células que expresen dicho gen. Aunque la evaluación de la expresión génica en sangre periférica o células del sedimento urinario puede ser informativa sobre algunos eventos en curso en el injerto, la mayoría de los trabajos de estudio del RNA se centran en el análisis de células del trasplante, bien obtenidas por punción aspiración con aguja fina, o mediante biopsia del injerto.

También en este campo, en un principio se estudiaban genes concretos, de uno en uno, con métodos sensibles adecuados a la escasez del material de partida, generalmente por transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR). Más recientemente, se ha desarrollado el análisis global de la expresión génica, con el uso de micromatrices de DNA (DNA arrays o chips), que facilita una medición del nivel de actividad de cientos, miles o decenas de miles de genes, en búsqueda de perfiles de expresión que se correlacionen con la función del injerto y el pronóstico.

Un desarrollo importante en la cuantificación de la expresión génica ha sido la incorporación de fluorocromos que permiten detectar la abundancia de la señal al mismo tiempo que está ocurriendo la amplificación por PCR, modalidad conocida como PCR en tiempo real. Esta variante de cuantificación del RNA (previamente convertido en cDNA) es mucho más sencilla de implementar que el análisis tipo Northern o ensayo de protección de RNasa, y el procesado informático de la señal hace que se puedan derivar parámetros cinéticos de la amplificación que se correlacionan bien con la cantidad de moléculas de partida.

- el análisis de proteínas, moléculas responsables de ejecutar la función génica, que están sometidas a sofisticados procesos de regulación post-transcripcional. Uno de los resultados sorprendentes de la secuenciación del genoma humano fue constatar que no existen en nuestro genoma tantos genes como se podría predecir basándose en la complejidad de funciones de nuestro organismo. La variabilidad introducida a nivel de splicing del mRNA y modificaciones postraduccionales resulta en múltiples variantes proteicas codificadas por un mismo gen, lo que explica en gran medida que no haya que invocar tantos genes independientes como se había calculado previamente. El western blot y la inmunohistoquímica han aportado muchísimo al trasplante de órganos, tanto en el conocimiento de los fenómenos básicos implicados, como en aplicaciones diagnósticas. Ambas técnicas dependen de la existencia de anticuerpos útiles para el propósito del estudio. Las técnicas moleculares han facilitado enormemente el desarrollo de anticuerpos, ya que no se hace necesario purificar un antígeno que puede ser muy escaso en tejidos, sino que se puede producir la proteína recombinante a partir del conocimiento del DNA que la codifica. Con ello, disponemos en la actualidad de una gran gama de anticuerpos contra proteínas predecibles a partir del conocimiento del genoma.

Recientemente, se ha empezado a explorar el set completo de proteínas de la célula (proteoma), y se espera que la identificación de proteínas concretas por espectrometría de

masas contribuya mucho a desarrollar conocimientos prácticos importantes del trasplante de órgano sólido.