



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO DE LAS FRECUENCIAS DE LOS
ANTIGENOS HLA EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA
Y SU APLICACION EN TRASPLANTE RENAL Y EN
TRABAJOS DE ASOCIACION HLA-ENFERMEDAD"

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmacéutico Biologo

PRESENTA:

María de los Angeles Mendoza Martínez

MEXICÓ, D.F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION	1
I GENERALIDADES	
A) Antecedentes históricos	2
B) Panorama actual del HLA	6
C) Aplicaciones del sistema HLA en Medicina	
a) Trasplante	11
b) Asociación HLA-Enfermedad	13
II PROPOSITOS	16
III MATERIAL Y METODOS	
A) Poblaciones en estudio	19
B) Tipificación de linfocitos	
a) Purificación de linfocitos	21
b) Separación de linfocitos T _H y B	23
c) Microcitotoxicidad	26
C) Procedencia de aloantisueros tipifi- cadores	30
D) Manejo estadístico	31
IV RESULTADOS	33
V DISCUSION	41
VI RESUMEN	50
VII CONCLUSIONES	52
VIII BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUCCION

En la presente tesis, se abordará el estudio de la frecuencia de algunos marcadores del sistema HLA en 138 sujetos mestizos mexicanos, aplicándose a determinar:

- a) la probabilidad de que se compartan algunos de estos antígenos de histocompatibilidad entre sujetos no emparentados, explorando la posibilidad de encontrar buenas compatibilidades en el trasplante de órganos provenientes de cadáveres, y
- b) el número de individuos control y enfermos necesario en los trabajos que tratan de establecer asociaciones de estos marcadores con algunas enfermedades.

I GENERALIDADES.

A) Antecedentes históricos.

Aunque desde hacía mucho tiempo se había intentado el trasplante de órganos o tejidos como medida terapéutica, no se conocía la causa que provocaba que tales intentos terminasen en fracasos. Karl Landsteiner en 1910 (26), al descubrir los grupos sanguíneos e introducir la prueba cruzada para determinar anticuerpos preexistentes, hizo posible efectuar transfusiones sin peligro, esto lo podemos considerar como el primer trasplante de un tejido líquido. Peter Gorer en 1936 (13), al tratar de diferenciar grupos sanguíneos de cepas murinas endogámicas, observó un antígeno, llamado II, que se transmitía en forma dominante y que además tenía una gran relación con la sobrevida de trasplante de piel, es decir, el antígeno II del ratón era un antígeno de histocompatibilidad.

Peter Medawar en 1944 (23), realizando injertos de piel en ratones, llegó a concluir que el rechazo de injerto es una reacción inmunológica por presentar:

- a) especificidad
- b) estar caracterizada en una aparición más temprana y el corto lapso en que se lleva el rechazo en una segunda exposición del injerto.
- c) estar mediada por linfocitos
- d) formar anticuerpos específicos.

A estos hechos se unieron los exámenes histológicos del sitio del trasplante, en los que se pudo apreciar el infiltrado leucocitario. En la figura 1, se esquematizan sus experimentos y las características inmunes.

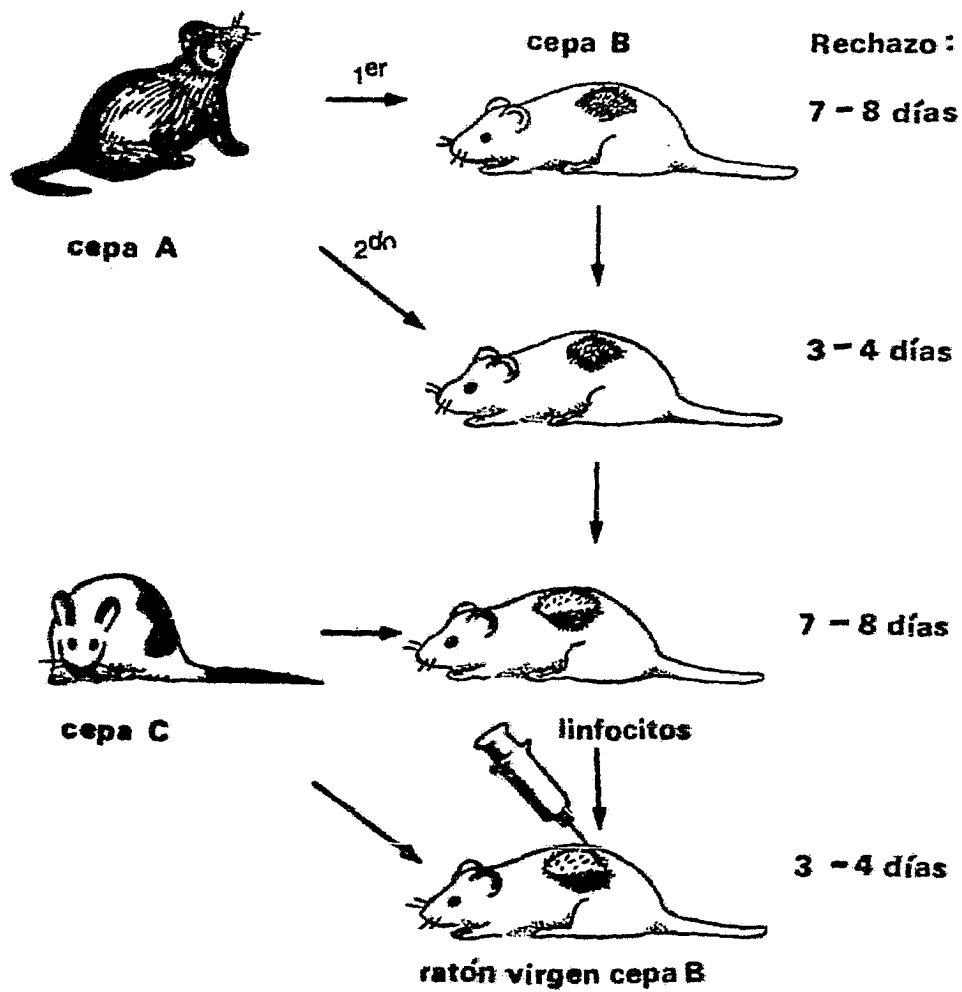


Fig. 1 Peter Medawar

Gorer, Lyman y Snell en 1948 (11), probaron que el gen que determina la presencia del antígeno II se encuentra en el cromosoma 17, que también porta el gen de la braquiuria (T) que provoca anomalías de la cola. Allen en 1955 detectó recombinaciones entre marcadores del sistema de histocompatibilidad 2 (H-2), lo que permitió su poner que este sistema estaba codificado en más de un gen. Gorer, A nos y Mikutsko en Inglaterra y Snell y Stimpfling en E.E.U.U., lo-- gran esclarecer por métodos serológicos la genética de estos marcadores en el ratón.

Gorer y O'Gorman en 1956 (11), introducen la linfocitotoxicidad para detectar las diferentes especificidades del sistema H-2, método basado en la destrucción de la célula blanco por acción del complemento hemolítico y su posterior valoración mediante el empleo de colorantes vitales; más tarde Terasaki (39) introduce la miniaturización de esta técnica en 1964, la que con diversas modificaciones menores, es la que se utiliza en casi todos los centros de tipificación del H-2 y del HLA.

Dausset en 1958 (8), describe el primer antígeno de histocompatibilidad en el humano, sistema posteriormente denominado HLA - (Human Leucocyte Antigens).

Hasta aquí, el estudio del H-2 en el ratón, así como el -- del HLA en el humano, no hubieran pasado de un marcador útil en el -- trasplante y en genética de poblaciones si no es por el hallazgo for tuito hecho por Lilly en 1964 (19), que consistió en una gran correlación con los antígenos H-2 del ratón y su susceptibilidad al virus de la leucemia de Gross; más tarde, McDavitt y Benacerraf en 1969(21),

establecen el control genético de la respuesta inmune en el ratón -- por el locus Ir (Immune response). Estos últimos datos incrementaron el interés de estos antígenos acerca de su papel biológico. Una vez orientados los estudios a esta nueva faceta, se inició la búsqueda de asociaciones del HLA con algunas enfermedades y así Russell en 1972 (11), establece una clara relación entre el HLA y la psoriasis y Falchuk con la enfermedad celiaca; Briverteen y Scholsstein en -- 1973, describen la asociación más contundente de las conocidas hasta ahora, que es entre el HLA-B27 y la espondilitis anquilosante.

Con el reciente desarrollo de técnicas serológicas para tipificar los antígenos D/DR, que antes sólo era posible mediante el -- cultivo mixto de linfocitos, han resultado nuevas especificidades.

Otro descubrimiento importante por Demant y col. en 1973- (17) fue el mapeo de los genes de los componentes C4, C2 y factor B del complemento, que se encuentran incrustados entre los genes del HLA en el cromosoma seis humano.

El sistema principal de histocompatibilidad del ratón, -- quizá sea el mejor conocido hasta la fecha, dadas las facilidades -- de contar con cepas puras congénicas que han permitido el estudio -- de uno por uno de los locus involucrados; en el humano eso no po--- dría realizarse no sólo por limitaciones éticas, sino también por -- el tiempo que tardaríamos en tener las generaciones suficientes. -- Por esta razón, el modelo de ratón se ha convertido en la gufa de -- la investigación en humanos.

B) Panorama actual del HLA.

Aunque se ha intentado el trasplante de tejidos entre indi-
viduos de diferentes especies, las diferencias antigénicas son tan -
abundantes, que se puede considerar por el momento como irrealizable.
Entre individuos de una misma especie (alotrasplante), también exis-
ten numerosas diferencias conocidas como "polimorfismos", de éstos, -
no todos son importantes en la génesis de un rechazo, los que sí par-
ticipan se han denominado "antígenos de histocompatibilidad"; ahora
bien, estos a su vez se clasifican en dos grandes grupos: unos que -
siempre se encontraran involucrados en rechazos, y que se han agru-
pado como el complejo principal de histocompatibilidad, y los otros
que eventualmente participan y que se les denomina complejo secunda-
rio de histocompatibilidad.

En el complejo principal de histocompatibilidad humano, no
sólo se codifican los genes del sistema HLA, sino también algunos --
componentes del ~~complemento~~, enzimas y grupos sanguíneos, dichos ge-
nes se localizan en el brazo corto del cromosoma seis humano, y ha -
sido determinado mediante (5,18):

- a) estudios familiares (entrecruzamientos)
- b) análisis genético con células híbridas
- c) estudios de enfermedades con genes conocidos codificados en dicho
cromosoma.

Cuatro locus son los constitutivos para los antígenos HLA:
HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-D. Su nomenclatura establecida por la Orga-
nización Mundial de la Salud, se muestra en la tabla 1 (40), a cada
locus de este sistema se le reconocen varios alelos, los cuales se -

designan mediante números arábigos. En algunos la letra w es puesta cuando se necesita confirmar que se trata de una entidad pura. Hay especificidades que son subdivisiones de antígenos definidos previamente (splits), un ejemplo de esto es el Bw22 que está constituido por el Bw54, Bw55 y Bw56. Con los sueros específicos, se detectan antígenos que poseen porciones comunes, lo cual se traduce en reacciones cruzadas, las que se encuentran perfectamente establecidas y son útiles en la interpretación de resultados (15)

Los aloantisueros para la tipificación de linfocitos, se obtienen de las siguientes fuentes (37 y 12):

- a) multiparas que se han sensibilizado contra los antígenos paternos del producto.
- b) individuos politransfundidos
- c) sujetos trasplantados
- d) a través de inmunizaciones deliberadas.

Las principales características fisicoquímicas de los antígenos de histocompatibilidad, así como algunos aspectos de su papel biológico se resumen en la tabla 2 (22, 9,3,33).

Los antígenos HLA son codominantes y se heredan generalmente en bloque, es decir el contenido de un cromosoma 6, lo que se denomina haplotipo (haploide y genotipo), eventualmente ocurren entre cruzamientos que han servido para localizar el orden y distancias que guardan entre sí los genes en el brazo corto del cromosoma. Lo anterior se esquematiza en la figura 2, donde podemos apreciar que la probabilidad de que dos hermanos sean idénticos en el HLA es del 25%, el que compartan un haplotipo un 50% y de que sean totalmente diferentes un 25%.

NOMENCLATURA DE LOS ANTIGENOS HLA

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR
HLA-A1	HLA-B5	HLA-Cw1	HLA-Dw1	HLA-DR1
HLA-A2	HLA-B7	HLA-Cw2	HLA-Dw2	HLA-DR2
HLA-A3	HLA-B8	HLA-Cw3	HLA-Dw3	HLA-DR3
HLA-A9	HLA-B12	HLA-Cw4	HLA-Dw4	HLA-DR4
HLA-A10	HLA-B13	HLA-Cw5	HLA-Dw5	HLA-DR5
HLA-A11	HLA-B14	HLA-Cw6	HLA-Dw6	HLA-DRw6
HLA-Aw19	HLA-B15	HLA-Cw7	HLA-Dw7	HLA-DR7
HLA-Aw23(9)	HLA-Bw16	HLA-Cw8	HLA-Dw8	HLA-DRw8
HLA-Aw24(9)	HLA-B17		HLA-Dw9	HLA-DRw9
HLA-A25(10)	HLA-B18		HLA-Dw10	HLA-DRw10
HLA-A26(10)	HLA-Bw21		HLA-Dw11	
HLA-A28	HLA-Bw22		HLA-Dw12	
HLA-A29	HLA-B27			
HLA-Aw30	HLA-Bw35			
HLA-Aw31	HLA-B37			
HLA-Aw32	HLA-Bw38(w16)			
HLA-Aw33	HLA-Bw39(w16)			
HLA-Aw34	HLA-B40			
HLA-Aw36	HLA-Bw41			
HLA-Aw43	HLA-Bw42			
	HLA-Bw44(12)			
	HLA-Bw45(12)			
	HLA-Bw46			
	HLA-Bw47			
	HLA-Bw48			
	HLA-Bw49(w21)			
	HLA-Bw50(w21)			
	HLA-Bw51(5)			
	HLA-Bw52(5)			
	HLA-Bw53			
	HLA-Bw54(w22)			
	HLA-Bw55(w22)			
	HLA-Bw56(w22)			
	HLA-Bw57(17)			
	HLA-Bw58(17)			
	HLA-Bw59			
	HLA-Bw60(40)			
	HLA-Bw61(40)			
	HLA-Bw62(15)			
	HLA-Bw63(15)			

Table 1.

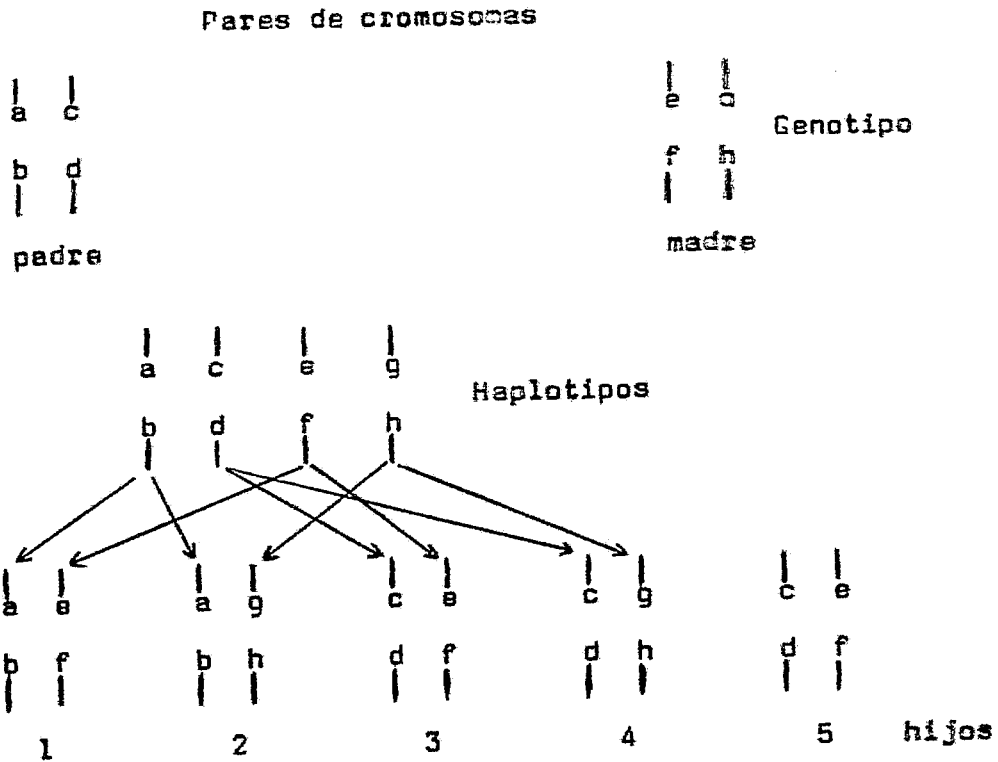


Fig. 2 Herencia del HLA.

Debido al gran polimorfismo que presenta cada locus de este sistema, la probabilidad de que exista un parecido entre sujetos no emparentados es remoto, lo cual es de gran utilidad en estudios antropológicos y en medicina legal. La frecuencia de cada uno de los marcadores es una característica étnica de una población, por ejemplo el HLA-Bw54 se encuentra en el 7.3% en los japoneses, siendo casi inexistente en los caucásicos, negros e indios americanos (14). Por tanto, el conocimiento de las frecuencias de una raza establece su perfil étnico, que puede ser utilizado para determinar que distancia genética guardan dos poblaciones, así como si ha existido cierta mezcla genética.

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y PAPEL BIOLÓGICO
DE LOS ANTIGENOS DEL SISTEMA HLA.

Locus	Productos	Función	Localización	Metodología
A, B y C	Constituidos por dos cadenas, una glicoproteína de 44 000 daltons, aloantigénica, unida no covalentemente a la beta-2-microglobulina de 11 500 daltonas.	Reconocimiento no inmune, reconocimiento inmune, regulación de células T citotóxicas.	Se manifiestan en todos los tejidos excepto en eritrocitos maduros y trofoblastos placentarios.	Serológicamente definibles por microcitotoxicidad.
D/DR	Dos glicoproteínas, la alfa de 34 000 daltons, fosforilada, posiblemente aloantigénica. Y la beta, de 29 000 daltons, unidas no covalentemente.	Reconocimiento entre las células inmunocompetentes. Interacción entre células T y macrófago. Regulación de células T facilitadoras y supresoras.	En linfocitos B, algunos subtipos de células T, células endoteliales, epidermis, islotes de Langerhans y espermatozoides.	Se utiliza la D a estos antígenos cuando se detectan por cultivo mixto de linfocitos, y DR cuando se hace serológica sobre linfocitos B.

Tabla 2.

C) Aplicaciones del sistema HLA en Medicina.

En la actualidad el estudio del sistema HLA se aplica como valoración pronóstica para trasplantes; en el estudio de estados de susceptibilidad o resistencia a diversos padecimientos, así como la genética de los mismos y en algunos casos reclasificación de síndromes, todo en algo que se conoce como HLA-Enfermedad, así mismo en medicina legal y estudios antropológicos (5,14,37). En esta tesis se concretizará el discutir los dos primeros objetivos, es decir, la aplicación en trasplantes y en HLA-Enfermedad.

a) Trasplante.

Aunque su aplicación cabe en toda clase de trasplantes, sólo se plantea aquí la aplicación que actualmente se está llevando a cabo en el laboratorio de Histocompatibilidad del C.H. "20 de Noviembre", es decir, al trasplante renal.

En los pacientes con insuficiencia renal terminal, el trasplante es la alternativa terapéutica de elección, tanto por la calidad de rehabilitación, supervivencia en promedio y costo (de 7:1), - comparados con los métodos de diálisis (16,30 y 31). Desafortunadamente no siempre es posible encontrar un donador dentro de la familia del paciente, en la tabla 3 se señalan las principales causas de esto (38), no quedando otro camino que la búsqueda de donadores cadavéricos; afortunadamente en México se cuenta con una excelente legislación al respecto (28).

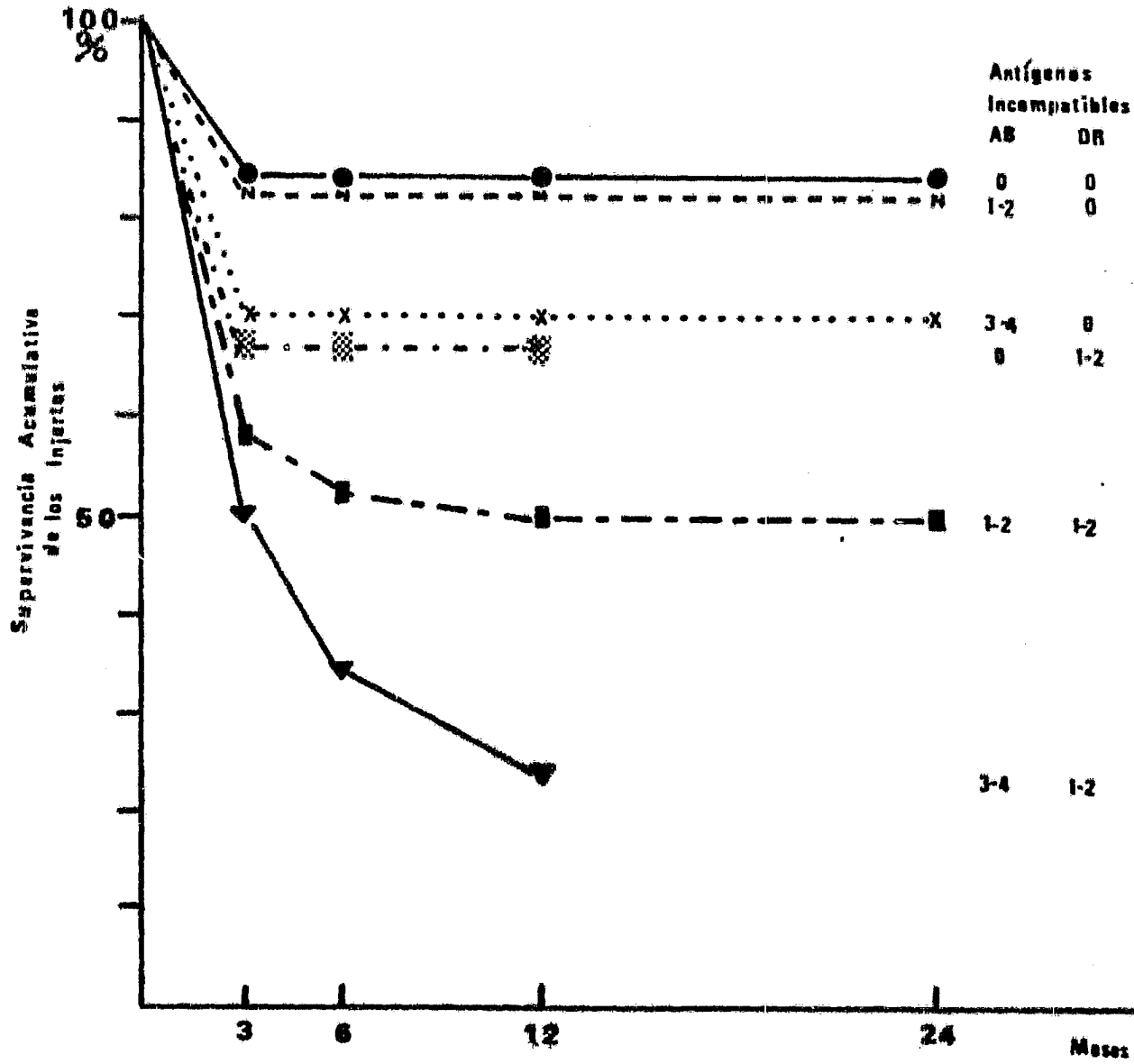
LEGALES	Menores de edad Deficientes mentales.
FAMILIARES	No tienen No acceden Esten enfermos Edad avanzada.
HISTOINCOMPATIBILIDAD	Grupo sanguíneo ABO Sistema HLA Cultivo mixto de linfocitos.
PRESENSIBILIZACION	Prueba cruzada positiva.

Tabla 3. Causas que impiden la donación de órganos de parientes.

Existen numerosos trabajos retrospectivos que analizan la correlación entre el número y locus de antígenos compatibles, con la sobrevida del injerto, en la gráfica 1 se presentan los resultados del grupo noruego de trasplantes encabezados por Thorsby (24), donde se puede apreciar:

- i) que el orden de importancia de los diferentes locus es el siguiente: DR, B y A.
- ii) que la compatibilidad al 50% de los antígenos, es decir uno de cada locus tiene una probabilidad de sobrevida del injerto del 50% a dos años, la cual puede considerarse aceptable cuando por hemodiálisis los sujetos tienen una sobrevida similar.

HISTOCOMPATIBILIDAD Y SOBREVIVIDA*



Gráfica 1.

b) Asociación HLA-Enfermedad.

Desde la primera asociación del sistema de histocompatibilidad-enfermedad y la vinculación entre el sistema HLA y la respuesta inmune, se ha despertado gran interés hacia investigar su papel biológico y cómo participa en la etiología de diversos padecimientos.

A continuación se exponen las teorías que intentan explicar los mecanismos de la asociación HLA-enfermedad.

1.- Similitud entre antígenos HLA y determinantes antigénicos de agentes infecciosos. Ebrenger en 1976 (10) encontró que *Klebsiella* está presente en pacientes con espondilitis anquilosante (AS); posteriormente Seager en Australia (32) demostró, que anticuerpos contra algunas cepas de *Klebsiella* reaccionaron con los linfocitos sólo de los pacientes que tuvieron HLA-B27 y espondilitis, con lo que se demuestra la existencia de determinantes antigénicos comunes entre el HLA-B27 y algunas cepas de *Klebsiella*, esta semejanza antigénica seguramente provoca una modificación en la respuesta contra este agente infeccioso, que conduce finalmente a la enfermedad.

2.- Antígenos HLA como receptores. Los antígenos HLA podrían servir como receptores a algunos agentes infecciosos o a sus productos antigénicos, estableciéndose una asociación entre el antígeno en particular y el padecimiento que ocasione dicho agente (22).

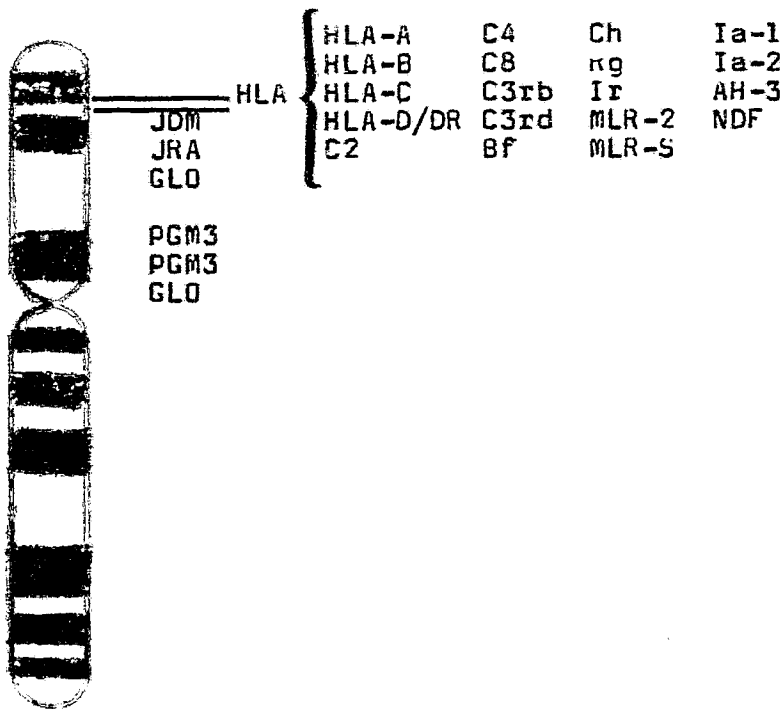
3.- Deficiencia en la regulación inmune (cooperación). Los genes D/DR involucrados en forma importante en la cooperación celular existente en la respuesta inmune, y por tanto en la regulación de la misma, pudiera conducir a la asociación de un antígeno de histocompatibilidad, bien sea para predisposición o para protección de algún padecimiento.

cimiento (34).

4.- Los genes D/DR controlan la magnitud de la respuesta contra algunos agentes bacterianos. E.J.Yunis en 1977 (11), estudiando la respuesta de sujetos infectados con estreptococo, observó que existen los que producen títulos sumamente elevados de antiestreptolisinas y que tienen relación estadística con los antígenos D/DR, en comparación con sujetos que responden con títulos menores.

5.- El HLA y la estructura química de los antígenos. Los genes del sistema HLA probablemente controlan la capacidad de reaccionar eficientemente contra los determinantes de un agente patogénico. De encontrarse alterada esta capacidad, conducirá al desarrollo de una enfermedad (22). Se han realizado estudios con antígenos sintéticos y no contamos aún con un ejemplo de esta teoría.

6.- La codificación de genes de componentes de complemento entre el locus B y D/DR. Figura 3 (29). El sistema HLA controla a C2, C4 y factor B del complemento, que pudieran participar en la etiología del padecimiento directamente, o bien, que sean genes vecinos a ellos con los que han caído en "desequilibrio de unión", este término describe el fenómeno de encontrar dos genes en particular asociados más allá de la probabilidad, tomando en cuenta sus frecuencias individuales, esto pudiera ser el resultado de una distancia - muy pequeña entre ellos en el cromosoma, o bien, a una falta de recombinación atribuible a mecanismos que regulan la misma (18 y 41). Como ejemplo se tiene que la deficiencia de C2 por sí, no conduce a padecimiento alguno, pero en ocasiones acompaña al lupus eritematoso sistémico (LES), el que se ha encontrado asociado al HLA-D/DR3 -



Nombre de los símbolos genéticos.

Símbolo genético	Estatus	Nombre del gen
LA-A	Confirmado	Comp. A del complejo principal de histocomp.
LA-B	"	" B " " " "
LA-C	"	" C " " " "
LA-D/DR	"	" D/DR " " " "
2	"	" 2 " Complemento
4	"	" 4 " "
8	"	" 8 " "
3rb	"	" C3b receptor del complemento
3rd	Provisional	" C3d " " "
f	Confirmado	Factor B del complemento
h	"	Grupo sanguíneo Chido
g	"	" " Rodger
r	Tentativo	Locus de la respuesta inmune
LR-2	Provisional	Reacción débil de linfocitos en mezcla
LR-S	Confirmado	" de linfocitos en mezcla
a-1	"	Asociado a la respuesta inmune
a-2	"	" " " " "
H-3	-	Hiperplasia adrenal III (21-OH)
JDM	Provisional	Diabetes mellitus juvenil
PE	Confirmado	Factor neutrófilo de diferenciación Glicoxalasa

Figura 3. Cromosoma 6 humano.

(34), de ahí que el gen responsable de esta enfermedad esté codificado por el sistema de histocompatibilidad.

7.- Presencia de genes estructurales vecinos al HLA. Otros genes estructurales (predisponentes) están codificados en la vecindad del HLA. Tal es el caso de la 21-hidroxilasa y la asociación con el HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita y la hemocromatosis idiopática en el HLA-A3. Los genes no involucrados en la respuesta inmune se encuentran incluidos o vecinos a los genes de los diferentes locus HLA, cayendo en desequilibrio con ellos y de esta forma manifestarse una asociación (34).

En la tabla 4 aparecen las enfermedades que se encuentran asociadas al HLA, como también la frecuencia en que el marcador aparece en poblaciones de enfermos y controles. El riesgo relativo se refiere al número de veces que una persona positiva a un determinado antígeno, probablemente desarrolle el padecimiento.

ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HLA.

Padecimiento	HLA	FRECUENCIA (%)		Riesgo Relativo
		Pacientes	Controles	
Enfermedad de Hodgkin	A1	40	32.0	1.4
Hemocromatosis idiopática	A3	76	28.2	8.2
Enfermedad de Behcet	B5	41	10.1	6.3
Hiperplasia adrenal congénita	B47	9	0.6	15.4
Espondilitis anquilosante	B27	90	9.4	87.4
Enfermedad de Reiter	B27	79	9.4	37.0
Uveítis anterior aguda	B27	52	9.4	10.4
Tiroiditis subaguda	B35	70	14.6	13.7
Psoriasis vulgaris	Cw6	87	33.1	13.3
Dermatitis herpetiforme	D/DR3	85	26.3	15.4
Enfermedad celíaca	D/DR3	79	26.3	10.8
	D/DR7	También aumentado		
Síndrome de Sicca	D/DR3	78	26.3	9.7
Enfermedad de Addison idiopática	D/DR3	69	26.3	6.3
Enfermedad de Grave	D/DR3	57	26.3	3.7
Diabetes insulino-dependiente	D/DR3	56	28.2	3.3
	D/DR4	75	32.2	6.4
	D/DR2	10	30.5	0.2
Myasthenia gravis	D/DR3	50	28.2	5.8
	B8	47	24.6	2.7
S.L.E.	D/DR3	70	28.2	5.8
Nefropatía membranosa idiopática	D/DR3	75	20.0	12.0
Esclerosis múltiple	D/DR2	59	25.8	4.1
Neuritis óptica	D/DR2	46	25.8	2.4
Deficiencia de C2	D/DR2			
	B18			
Síndrome de Goodpasture	D/DR2	88	32.0	15.9
Artritis reumatoidea	D/DR4	50	19.4	4.2
Pénfigo (Jews)	D/DR4	87	32.1	14.4
Nefropatía por IgA	D/DR4	49	19.5	4.0
SLE inducido por hidralazina	D/DR4	73	32.5	5.6
Tiroiditis de Hashimoto	D/DR5	19	6.9	3.2
Anemia perniciosa	D/DR5	25	5.8	5.4
Artritis Reumatoide juvenil	D/DRw8	23	7.5	3.6

A. Svejgaard, N. Morling, P. Platz, L. P. Ryder y M. Thomsen.
HLA and Disease
Immunology 80 Acad. Press 1980.

Tabla 4. Enfermedades asociadas al HLA.

II PROPOSITOS

Tanto para el trasplante como para trabajos de HLA-enfermedad y otros, es necesario conocer el perfil local de frecuencias. La población estudio y mayoritaria en el Distrito Federal es el resultado de un mestizaje entre europeos y autóctonos; sin embargo, no ha alcanzado su equilibrio. Si consideramos que hace 500 años ocurrió la Conquista, pero el mestizaje fue a partir de la Independencia, es decir hace 150 años, lapso en el que caben aproximadamente 6 generaciones, no es extraño encontrar diferencias estadísticas dependiendo de la edad. Por otro lado, la estratificación étnica está fuertemente relacionada a la condición socioeconómica predominantemente indígena en clases bajas y un predominio caucásico en clases altas; finalmente hay que tomar en cuenta las diferencias regionales, por ejemplo la carga negra en Veracruz y Guerrero es muy diferente a la existente en los estados del noroeste del país.

Así, el conocimiento de las frecuencias fenotípicas, genotípicas y haplotípicas es fundamental para contestarnos algunas preguntas a priori como son, en el trasplante: ¿qué posibilidades hay de encontrar buena compatibilidad entre individuos no familiares de nuestra población?, y en HLA-enfermedad: ¿de qué tamaño tendrán que ser las muestras testigos y enfermos para satisfacer efectivamente este requisito estadístico?.

La presente tesis contesta estas dos preguntas a partir de la determinación de las frecuencias antes mencionadas.

III MATERIAL Y METODOS

A) Poblaciones en estudio.

Se tipificaron 100 sujetos testigos de la población general y 38 candidatos a trasplante renal cadavérico. La selección de ambas poblaciones se realizó en base a las siguientes consideraciones:

a) Homogeneidad de la población. Es importante por ser los antígenos HLA una característica étnica; las pocas generaciones de mestizos que habemos y la estratificación étnica en base a la condición socioeconómica existente, podrían dar resultados erróneos.

La población consistió de mestizos mexicanos, cuyas dos generaciones anteriores también lo eran; su edad promedio fué de 30 años; de condición socioeconómica media.

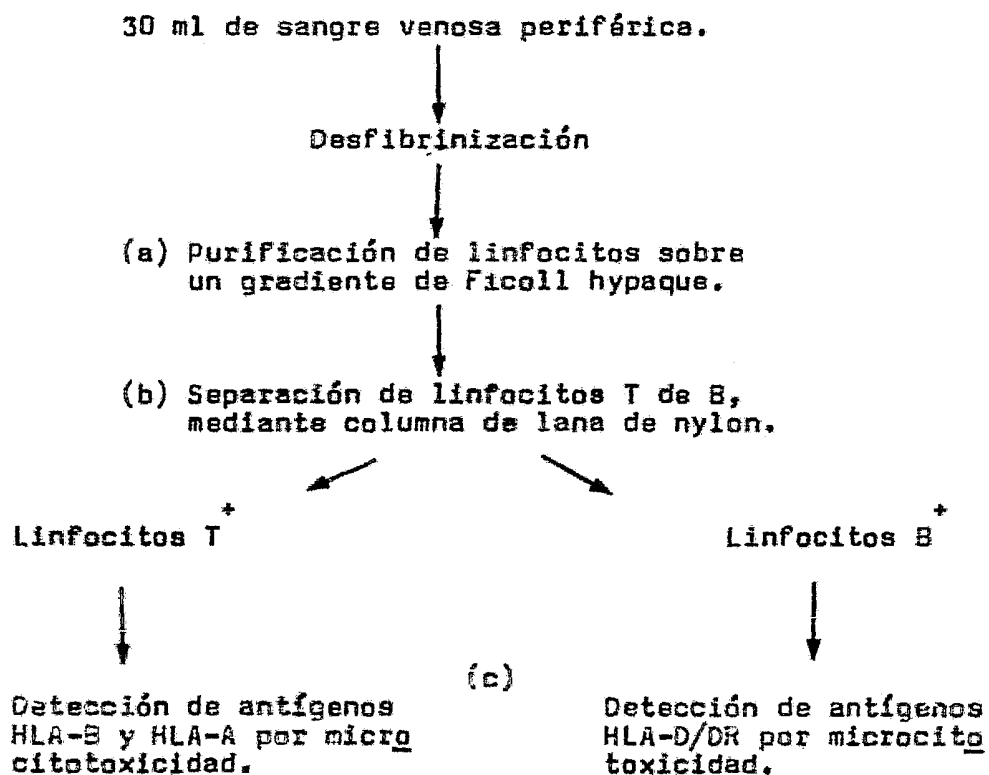
b) Parentesco. Se evitó incluir parientes dentro de este estudio, que fué con población abierta, era igualmente importante si hubiese sido una población pequeña, pues la frecuencia de un antígeno poco común - puede erróneamente aumentarse, dado el patrón hereditario del sistema HLA.

c) Homogeneidad del padecimiento en estudio. Los 38 pacientes con insuficiencia renal terminal, se catalogaron como tales tanto por la clínica, como por el laboratorio.

B) Tipificación de linfocitos.

La purificación de linfocitos periféricos a partir de sangre defibrinada, se efectuó por centrifugación sobre gradiente de densidad de Ficoll hypaque (25,42), la separación de linfocitos T de los B, fué por medio de columnas de nylon (1,7,37), y la tipificación por la técnica de microcitotoxicidad (25,37,39). A continuación se exponen detalladamente.

Las metodologías que fueron empleadas en este trabajo se esquematan a continuación, ampliándolas en seguida.



+ Se verificó la pureza de ambas poblaciones de linfocitos, en base a su capacidad de formar rosetas.(20).

(a) Purificación de linfocitos.

Fundamento: La purificación de linfocitos se logra aprovechando las diferentes densidades de las células sanguíneas, así, centrifugándolas sobre una mezcla de Ficoll hypaque (isotónica y no citotóxica), cuya densidad es de 1.076 a 1.078 muy cercana a la promedio de los linfocitos, al ser centrifugadas las células más densas se depositarán en el fondo (eritrocitos), ensiguída poblaciones de leucocitos como polimorfonucleares, que por su número pudiera ser un contaminante importante; finalmente, los linfocitos quedan muy cercanos a la interfase, quedando como sobrenadante el suero. La colección de linfocitos se realiza por aspiración con una pipeta Pasteur, posteriormente son lavados con solución de Hank para eliminar tanto el ficoll hypaque como el suero.

Material:

Jeringas desechables de 20 ml.

Agujas desechables del no. 20.

Tubos con tapón de rosca de 18 X 145 mm.

Perlas de vidrio de 4 mm de diámetro.

Pipetas serológicas de 10 ml 1/10

" " " 5 ml.

" " " 1 ml 1/10.

" " " 1 ml 1/100.

" Pasteur de 9 pulgadas.

Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.

" " " " 15 X 100 mm.

Propipetas de 10 ml.

Solución de Hank.

Ficoll 400 (PFS), Pharmacia F. Chem. no. P4375.

Hypaque 50%. Wintrop Products Inc.

Centrífuga clínica. HNS. DAMDN/IEC, División Internacional. Needham Heights, U.S.A.

Densímetro.

Preparación de reactivos:

-Solución separadora de Ficoll hypaque.- se logra con 10 partes de hypaque al 33.9% y 24 partes de Ficoll al 9%, la densidad debe ser corroborada de entre 1.076 a 1.078. Se conserva a temperatura ambiente (22 a 24 °C). Es recomendable esterilizarlo (10 lb por 15 min).

Técnica:

- 1.- Extraer por punción venosa 30 ml de sangre, desfibrinaria mecánicamente utilizando perlas de vidrio.
- 2.- Diluir la sangre con solución de Hank en relación 2:1.
- 3.- Pasar la sangre diluída a tubos de ensaya, en alícuotas de 5 ml.
- 4.- Mediante una pipeta Pasteur, se estratifica a cada alícuota anterior, 3 ml de solución separadora de Ficoll hypaque
- 5.- Centrifugar a 1 500 rpm por 40 min.
- 6.- Separar la capa de linfocitos de la interfase y ponerlos en tubos de ensayo de 13 X 100 mm, a un tercio de su capacidad.
- 7.- Adicionar a los linfocitos solución de Hank hasta completar la capacidad de volumen del tubo.
- 8.- Centrifugar a 1 500 rpm por 10 min.
- 9.- Lavar el paquete de linfocitos 3 veces con solución de Hank, centrifugando a 1 500 rpm por 10 min.

(b) Separación de linfocitos T y B.

Fundamento: La separación de las dos grandes poblaciones de linfocitos T y B, se basa en la capacidad de estos últimos de adherirse al nylon. Los linfocitos T se recuperan en el eluido de la columna; en tanto que los B son desprendidos del nylon, estrujando vigorosamente la columna.

Material:

Además del descrito en la parte anterior,

Tubos capilares.

Cámara de Neubauer.

Popotes de plástico comerciales para bebidas de 5 mm de diámetro y - de 12 a 14 cm de largo.

Fibra de lana de nylon.

Cajas de Petri.

Medio de cultivo Mc Coy 5a modif. Lab. Microlab, México.

2-Yodoacetamida, J.T. Baker Chem. Co.

Suero de varios donadores.

Estufa de incubación, Hoffman Pinther and Bosworth, S.A.Méx.

Microscopio óptico, Carl Zeiss, Germany.

Potenciómetro.

Sellador de plásticos.

Preparación de reactivos:

- a) Suero humano de complementado. Se incuban los sueros de los donadores, durante 30 min a 56°C y se conserva a -20°C.
- b) El medio de cultivo Mc Coy 5a modif., se emplea con 5% de suero hu

mano de complementado.

- c) 2-Yodoacetamida, se emplea al 0.01% en solución de Hank.
- d) Fibra de lana de nylon. Se lava con NaOH 0.1N, agua corriente, - HCl 0.1N, nuevamente agua y finalmente agua destilada; se seca a 37°C y se pesan porciones de 0.1 g.
- e) Preparación de columnas empacadas con fibra de lana de nylon:
 - los popotes se sellan por un extremo, formando ángulo de 45°
 - la fibra se remoja en aproximadamente 13 ml de solución de Hank durante 10 min.
 - empacar la columna con la fibra remojada, la longitud del relleno debe ser de aproximadamente 6 cm, y se deben evitar burbujas de aire en él.
 - con la punta de una aguja hipodérmica, hacer un orificio (2 mm a proximadamente) al extremo inferior sellado de la columna, a fin de lograr un goteo medio.
 - adicionarle a la columna 3 ml de medio de cultivo.
 - colocarla en posición horizontal e incubarla (37°C por 30 min) - antes de poner la suspensión de linfocitos purificados.

Técnica:

- 1.- Suspender en 0.5 ml de medio de cultivo los linfocitos purificados, y pasarlos verticalmente con una pipeta Pasteur a la columna preincubada.
- 2.- Una vez que la suspensión ha recorrido la fibra, colocarla horizontalmente y adicionarle 0.2 ml de medio de cultivo.
- 3.- En la misma posición, por el lado no sellado, formarle un tapón

con el mismo medio. Esto con el fin de evitar que se alcalinice la suspensión de linfocitos.

- 4.- Incubar la columna a 37°C por 30 min.
- 5.- Colocar verticalmente la columna y eluirla con 28 ml de medio de cultivo. Este eluido contiene los linfocitos T.
- 6.- Adicionar 5 ml de medio, pero ahora estrujando vigorosamente la columna, a fin de desprender los linfocitos B.
- 7.- Centrifugar la suspensión de ambas poblaciones celulares a 1 500 rpm durante 10 min.
- 8.- Decantar y resuspender los linfocitos T en 1.0 ml de medio de cultivo.
- 9.- Decantar y resuspender los linfocitos B en 0.5 ml de la solución de yodoacetamida e incubarlos en ella 30 min a temperatura ambiente, con el objeto de evitar que los monocitos den falsos positivos en la tipificación.
- 10.- Ajustar la concentración de ambas poblaciones para tener aproximadamente 4×10^6 linfocitos por ml.

(c) Microcitotoxicidad.

Fundamento: Mediante la microcitotoxicidad se determinan los antígenos de histocompatibilidad, utilizando anticuerpos específicos contra cada uno de los alelos ya descritos en la tabla 1. Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos: en el primero, se ponen los linfocitos en presencia de los anticuerpos, si éstos reconocen la especificidad contra la que están dirigidos, formarán un complejo antígeno-anticuerpo, en caso contrario no ocurrirá nada. En el segundo paso se añade complemento de conejo, que solamente en presencia del complejo inmune se activará, matando a la célula blanca, como no produce lisis, es necesario recurrir a colorantes vitales para poner de manifiesto si hubo reacción o no, los colorantes vitales como el azul tripán, no son citotóxicos, ni tiñen a células vivas y solamente penetran en aquellas que fueron dañadas por el complemento y donde existen cambios importantes en la permeabilidad de su membrana.

Material:

Además del anterior,

Placas Tarasaki. Cooke, Histocompatibility plate. Dynatech Lab. Inc. Virginia, U.S.A.

Jeringa Hamilton de 50 μ l. Microliteter # 710, Hamilton Co., Reno, Nevada, U.S.A.

Jeringa Hamilton Múltiple de 250 μ l. Castight # 1735, Hamilton Co., Reno, Nevada, U.S.A.

Despachador de repetición Hamilton. Hamilton Co., Nevada, U.S.A.

Despachador de repetición múltiple Hamilton. Hamilton Co., Nevada, U.S.A.

Agitador Vortex, Lab. Lim Instruments, Inc. U.S.A.

Complemento de conejo liofilizado. URAX D6/D7, Behring Inst.

Solución concentrada de amortiguador de fosfatos. (FTA) COPMI 44/45, Behring Inst.

Petrolato líquido U.S.F., viscosidad 255° 350 centistokes. Sigma de México, S.A.

Colorante azul tripán. Sigma de México, S.A.

Etilendinitrilotetracetato disódico. J.T. Baker Chem. Co.

Preparación de reactivos:

a) Solución diluyente de complemento

MgCl₂ 0.0008%

CaCl₂ 0.0008%

Rojo de fenol como indicador de pH.

Se prepara en solución salina de fosfatos y se conserva a 4°C

b) Complemento de conejo. Se reconstituye el liofilizado, para su uso se adiciona por cada ml del reconstituido, 0.5 ml de la solución diluyente de complemento. El pH debe ser entre 7.0 y 7.2 . - Una vez diluido, se mantiene a 4°C y por un máximo de 24 h.

c) EDTA al 2%. El EDTA disódico, se disuelve en solución salina amortiguada de fosfatos. El pH se ajusta entre 7.0 y 7.4 con NaOH 0.1 N. Se conserva a 4°C.

d) Colorante azul tripán 0.3%. 1 g de colorante se disuelve en 100ml de agua destilada (sol stock al 1%). Para uso diario se diluyen - 3 ml del stock, con 7 ml de EDTA al 2%, quedando la concentración final del colorante al 0.3%. Se conserva a 4°C.

e) En microcitotoxicidad, los tiempos de incubación para detectar an

tígenos HLA-A y HLA-B (en linfocitos T), y HLA-DR (en linfocitos B) son diferentes, razón por la que los aloantisueros deberán prepararse en las placas Terasaki, en forma independiente para una y otra población celular.

Preparación de placas Terasaki: en cada pozo de la placa, se deposita 1 μ l de cada una de las especificidades de los sueros antilinfocitos humanos tipificadores, además de los controles positivo y negativo; en seguida se pone una gota de petrolato líquido, con el fin de evitar la evaporación y cambio de pH de los aloantisueros. Se conservan las placas sembradas a -20°C .

Técnica:

- 1.- Una vez ajustada la concentración de cada una de las poblaciones de linfocitos a 4×10^6 cél/ml, sembrar 1 μ l en cada pozo de la placa correspondiente.
- 2.- Mezclar el contenido de los pozos utilizando el agitador Vortex.
- 3.- Incubar por 30 min a temperatura ambiente los linfocitos T, para los B su tiempo es 60 min, en las mismas condiciones.
- 4.- Poner una gota de solución de Hank en cada pozo de las placas.
- 5.- Dejar que las células sedimenten durante 10 min a temperatura ambiente.
- 6.- Sacudir las placas con movimiento firme, esto con el fin de eliminar el aceite que antes sirvió para proteger a los sueros.
- 7.- Adicionar 5 μ l de complemento de conejo diluido en cada pozo.
- 8.- Mezclar nuevamente, empleando el agitador Vortex.
- 9.- Incubar la placa que contiene a los linfocitos T, durante 30 min a 37°C ; en tanto, que la de linfocitos B, es durante 60 min a -

temperatura ambiente.

- 10.- Colocar en cada pozo colorante azul tripán a la concentración de 0.3%.
- 11.- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 12.- Sacudir la placa con movimiento firme, a fin de eliminar el exceso de colorante.
- 13.- Adicionar una gota de solución de Hank a cada pozo.
- 14.- Esperar que sedimenten las células durante 10 min a temperatura ambiente.
- 15.- Observar al microscopio óptico. Las células vivas se observan refringentes, redondas o ligeramente ovales; en tanto que las muertas se tiñen de azul oscuro, y el tamaño es mayor que el de las vivas.
La calificación que se le da a cada pozo, es en base al criterio siguiente:

Calificación	% de células muertas
1	0-10
2	11-20
4	21-30
6	31-80
8	81-100

Interpretación:

1 y 2	resultados negativos
4	dudoso
6 y 8	positivos.

C) Procedencia de los aloantisueros tipificadores.

Los aloantisueros utilizados provinieron de tres fuentes:

-) Sydney Faber Cancer Institute, Boston Mass., E.U.A., proporcionados generosamente por el Dr. E.J.Yunis.
-) Instituto Nacional de Salud de los E.U.A. (N.I.H.) Bethesda, Maryland; gracias al intercambio que tiene este laboratorio con dicho banco de sueros tipificadores de linfocitos .
-) Los obtenidos en este laboratorio, mediante el programa permanente de búsqueda de tales reactivos, auspiciado en parte por el -- Conacyt.

Los distintos sueros específicos con que se contaron son:

- locus A: A1, A2, A3, A9(Aw23 y Aw24), A11, A25(A10), A26(A10), - A28, A29, Aw30, Aw31, Aw32 y Aw33.
- locus B: B5(Bw51 y Bw52), B7, B8, B13, B14, B15(Bw62 y Bw63), - Bw16(Bw38 y Bw39), B17(Bw57 y Bw58), B18, Bw21(Bw49y Bw50) Bw22(Bw54, Bw55 y Bw56), B27, Bw35, B37, B40(Bw60 y Bw61), Bw42 y Bw44(B12).
- locus DR: DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 y DR7.

Este lote fué el utilizado para la tipificación de las - poblaciones de testigos y enfermos.

D) Manejo estadístico.

Los estadísticos que se emplearon en este trabajo (4,11,18, 35) fueron los siguientes:

- 1.- Frecuencia antigénica o fenotípica (F.f.): número de positivos a un antígeno, entre el número de sujetos estudiados.
- 2.- Frecuencia genotípica (F.g.): $F.g. = 1 - \sqrt{1 - F.f.}$
- 3.- Desequilibrio de enlace o unión (Δ, D): nos indica la diferencia entre la frecuencia haplotípica esperada y la observada, y cuya fórmula matemática es:

$$D = \sqrt{\frac{d}{N}} - \sqrt{\frac{(b+d)(c+d)}{N^2}}$$

en donde:

N = no. de muestra

a = no. de individuos con ambos antígenos del haplotipo en cuestión.

b = no. de individuos con uno sólo de los antígenos del haplotipo en cuestión.

c = no. de individuos con sólo el otro antígeno del haplotipo en cuestión.

d = no. de individuos que no poseen los antígenos que constituyen a ese haplotipo.

4.- χ^2 , Chi cuadrada (Yates): mide la probabilidad de que los valores observados difieran de los esperados, y su fórmula es:

$$\chi^2 = \frac{[(ad-bc) - N/2]^2}{N(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Se expresa en términos de p (probabilidad)

Los criterios considerados son los siguientes:

$0.05 < p < 0.01$ significativos

$0.01 < p < 0.001$ muy significativos

$p < 0.0001$ altamente significativos.

5.- Frecuencia haplotípica (F.H.): número de veces que coinciden 2 marcadores de diferentes locus; esta frecuencia normalmente es proporcional a las frecuencias que tengan estos 2 marcadores in dependientemente, en algunas ocasiones esto no sucede y pueden presentarse más frecuentes combinados, que es lo que se denomina desequilibrio de enlace.

El cálculo de las frecuencias fenotípicas, genotípicas y haplotípicas, se llevó a cabo con una computadora, contando con la gentil colaboración de los ingenieros Luis E. Mancilla y Joaquín Alarcón G. Profesores del Instituto de Estudios Físico - Matemáticos del I.P.N. en la elaboración de este programa.

IV RESULTADOS.

Se presentan los resultados obtenidos de la población tes
tigo estudiada.

En la tabla 5, se presentan las frecuencias fenotípicas y genotípicas de los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-D/DR.

En las tablas 6 y 7, aparecen las frecuencias haplotípi--
cas existentes entre los locus A y B. Y en las tablas 8 y 9 apare-
cen las correspondientes a los locus B y D/DR.

Los resultados fueron graficados tridimensionalmente, to-
mando en cuenta tanto las frecuencias de los antígenos individual--
mente (frecuencias fenotípicas) como las resultantes de combinación
(Frecuencias haplotípicas), así en la gráfica 2 y 3 se presentan los
locus A/B y B/DR respectivamente. Los frentes de las barras corres-
ponden a las frecuencias fenotípicas y las alturas de ellas a las --
frecuencias haplotípicas. Los desequilibrios de enlace o unión en--
tre cada pareja, están señalados con los techos sombreados cuando =
éstos existen.

FRECUENCIAS FENOTIPICAS Y GENOTIPICAS EN 100 MESTIZOS MEXICANOS.

Locus A	F.f.	F.g.
A1	0.09	0.046
A2	0.57	0.344
A3	0.13	0.067
A9 (Aw23 y Aw24)	0.35	0.194
A11	0.11	0.057
A25 (A10)	0.07	0.036
A26 (A10)	0.03	0.015
A28	0.05	0.025
A29	0.03	0.015
Aw30	0.00	0.000
Aw31	0.00	0.000
Aw32	0.02	0.010
Aw33	0.00	0.000
Ax	0.55	0.329
Locus B		
B5 (Bw51 y Bw52)	0.22	0.117
B7	0.13	0.067
B8	0.07	0.036
B13	0.07	0.036
B14	0.08	0.041
B15 (Bw62 y Bw63)	0.10	0.051
Bw16 (Bw38 y Bw39)	0.02	0.010
B17 (Bw57 y Bw58)	0.05	0.025
B18	0.03	0.015
Bw21 (Bw49 y Bw50)	0.12	0.062
Bw22 (Bw54, Bw55 y Bw56)	0.03	0.015
B27	0.07	0.036
Bw35	0.36	0.200
B37	0.02	0.010
B40 (Bw60 y Bw61)	0.18	0.094
Bw42	0.00	0.000
Bw44 (B12)	0.07	0.036
Bw45 (B12)	0.04	0.020
Bx	0.46	0.265
Locus DR		
DR 1	0.22	0.117
DR 2	0.10	0.051
DR 3	0.17	0.089
DR 4	0.56	0.337
DR 5	0.17	0.089
DR 7	0.15	0.078
DR x	0.63	0.391

TABLA 5.

FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS LOCUS HLA-A/HLA-B
EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA.

	B5	B7	B8	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B21
A1	- 0.45	2.14	9.05	3.65	14.20*	2.91	- 0.49	- 1.25	4.57	- 3.20
A2	61.00	36.01	- 3.66	20.20	1.53	20.07	2.38	9.80	15.10	13.40
A3	8.70	12.00	13.90*	8.43	2.53	- 3.92	- 0.70	3.62	- 1.10	0.96
A9	- 11.16*	22.60	- 9.01*	- 2.47	- 3.81	- 6.57	3.82	- 6.30	2.61	17.20
A11	4.08	1.36	3.28	- 2.22	- 2.56	13.40*	- 0.661	3.87	- 0.92	1.69
A25	12.60	2.89	- 1.36	- 1.36	- 1.57	3.46	- 0.37	- 0.96	- 0.57	8.59
A26	3.71	- 1.11	4.68	- 0.40	- 0.65	- 0.83	- 0.15	- 0.40	- 0.23	4.39
A28	13.90*	- 1.87	- 0.96	- 0.96	4.23	- 1.40	- 0.26	4.58	- 0.40	3.75
A29	3.71	- 1.10	- 0.57	- 0.57	- 0.65	4.51	- 0.15	- 0.40	- 0.23	- 1.01
Aw30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aw31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aw32	- 1.34	- 0.73	- 0.37	- 0.37	- 0.43	- 0.55	- 0.10	4.90*	0.00	- 0.67
Aw33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ax	22.27	- 5.20	20.60	11.67	27.99	19.97	6.70	7.70	- 3.73	16.80
Totales	117.00	67.00	35.60	40.80	51.00	10.10	25.30	25.30	15.10	61.90

* Haplotipos en desequilibrio

Tabla 6

FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS LOCUS HLA-A/HLA-B
EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA.

	B22	B27	B35	B37	B40	B42	B44	B45	Bx	Totales
A1	- 0.74	- 1.78	- 5.60	- 0.49	3.88	0.00	- 1.78	- 1.00	20.48	46.10
A2	- 0.32	12.34	118.70*	- 5.38	- 0.78	0.00	4.39	12.00	27.44	344.30
A3	4.33	- 2.67	28.80	- 0.73	3.26	0.00	2.89	- 1.49	-13.69*	67.30
A9	- 3.71	16.80	72.00	- 2.44	11.60	0.00	10.40	1.38	80.86*	193.80
A11	4.45	3.28	4.93	- 0.61	- 1.89	0.00	3.28	4.16	17.63	56.60
A25	- 0.57	- 1.36	10.20	4.85*	- 1.16	0.00	- 1.36	- 0.76	4.41	35.60
A26	- 0.23	- 0.57	2.51	4.96*	- 0.48	0.00	4.68	- 0.32	- 4.45	15.10
A28	- 0.40	4.53	- 0.80	- 0.26	4.46	0.00	- 0.96	- 0.54	- 1.16	25.30
A29	- 0.23	- 0.57	2.51	- 0.15	- 0.48	0.00	9.91*	- 0.32	0.90	15.10
A30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aw31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aw32	- 0.10	- 0.37	3.77	- 0.10	- 0.32	0.00	- 0.37	4.93*	2.35	10.10
Aw33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ax	12.60	6.10	-37.00*	10.46	12.40	0.00	4.50	1.95	56.50	193.70
Totales	15.10	35.60	200.00	10.10	30.50	0.00	35.60	20.00	190.70	1 000.00

* Haplotipos en desequilibrio
Tabla 7.

FRECUENCIAS HAPLOTIPICAS DE LOS LOCUS HLA-B/HLA-DR
EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA.

	B5	B7	B8	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B21
DR1	21.04	2.62	12.64	- 4.93	17.89*	4.80	- 1.34	- 3.40	3.71	15.40
DR2	- 1.19	7.39	- 2.00	3.46	8.66	13.67*	- 0.55	- 1.40	4.51	- 3.59
DR3	- 0.49	22.24	2.08	2.08	1.57	- 5.32	- 0.99	3.09	- 1.50	- 0.60
DR4	10.20	20.37	28.05	- 3.19	9.96	28.30	10.05	2.30	7.53	6.86
DR5	- 0.49	10.61	- 3.63	13.41	1.57	- 5.32	10.50*	- 2.54	- 1.50	11.10
DR7	37.40*	- 0.29	2.49	8.10	- 3.62	6.85	- 0.86	8.90	- 1.30	11.70
DRx	50.54	4.07	- 4.04	16.66	4.77	8.02	- 6.70	18.35	3.65	21.03
Totales	117.00	67.00	35.60	35.60	40.80	51.00	10.10	25.30	15.10	61.90

*Haplotipos en desequilibrio

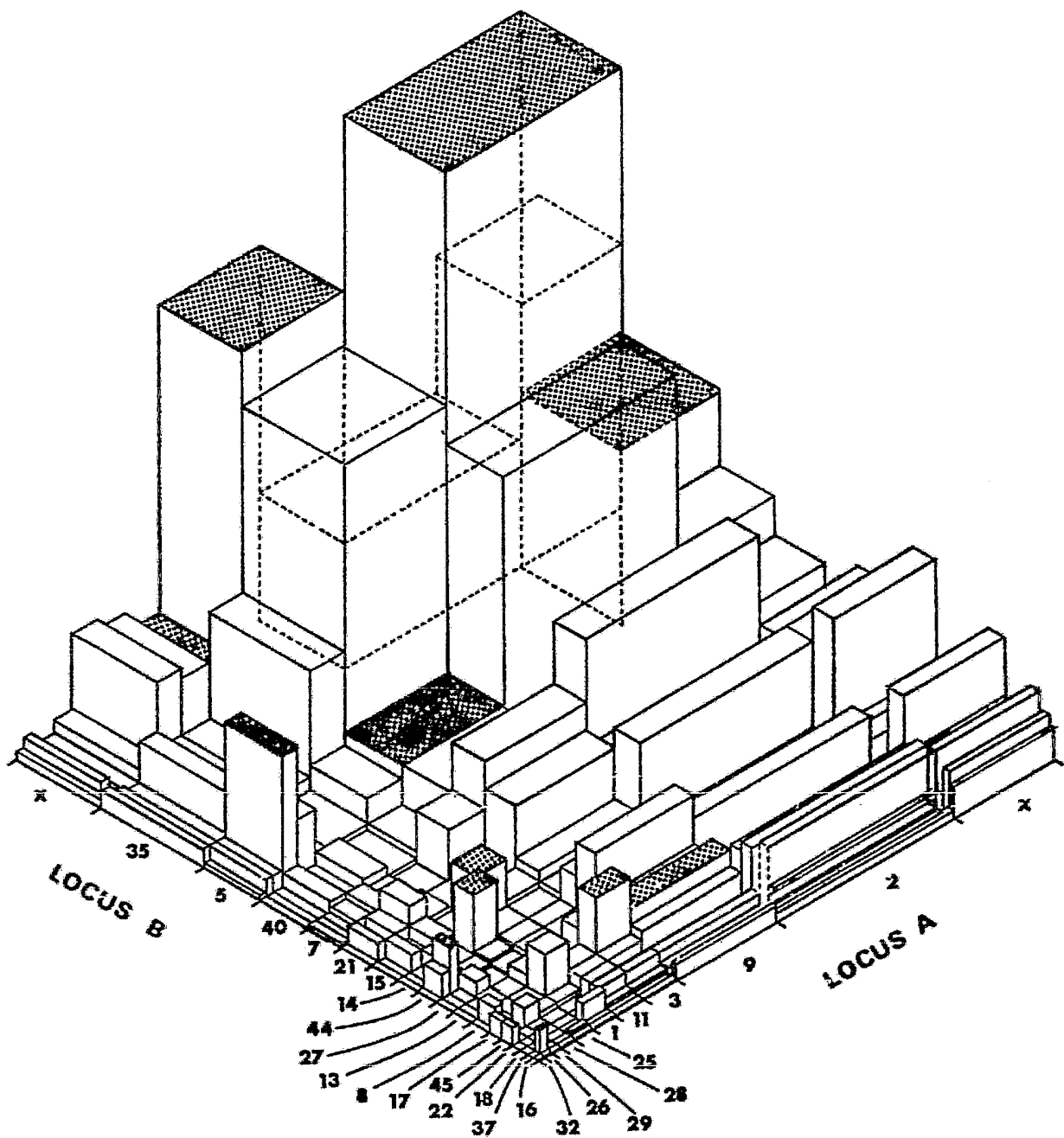
Tabla 8.

FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS LOCUS HLA-B/HLA-DR
EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA.

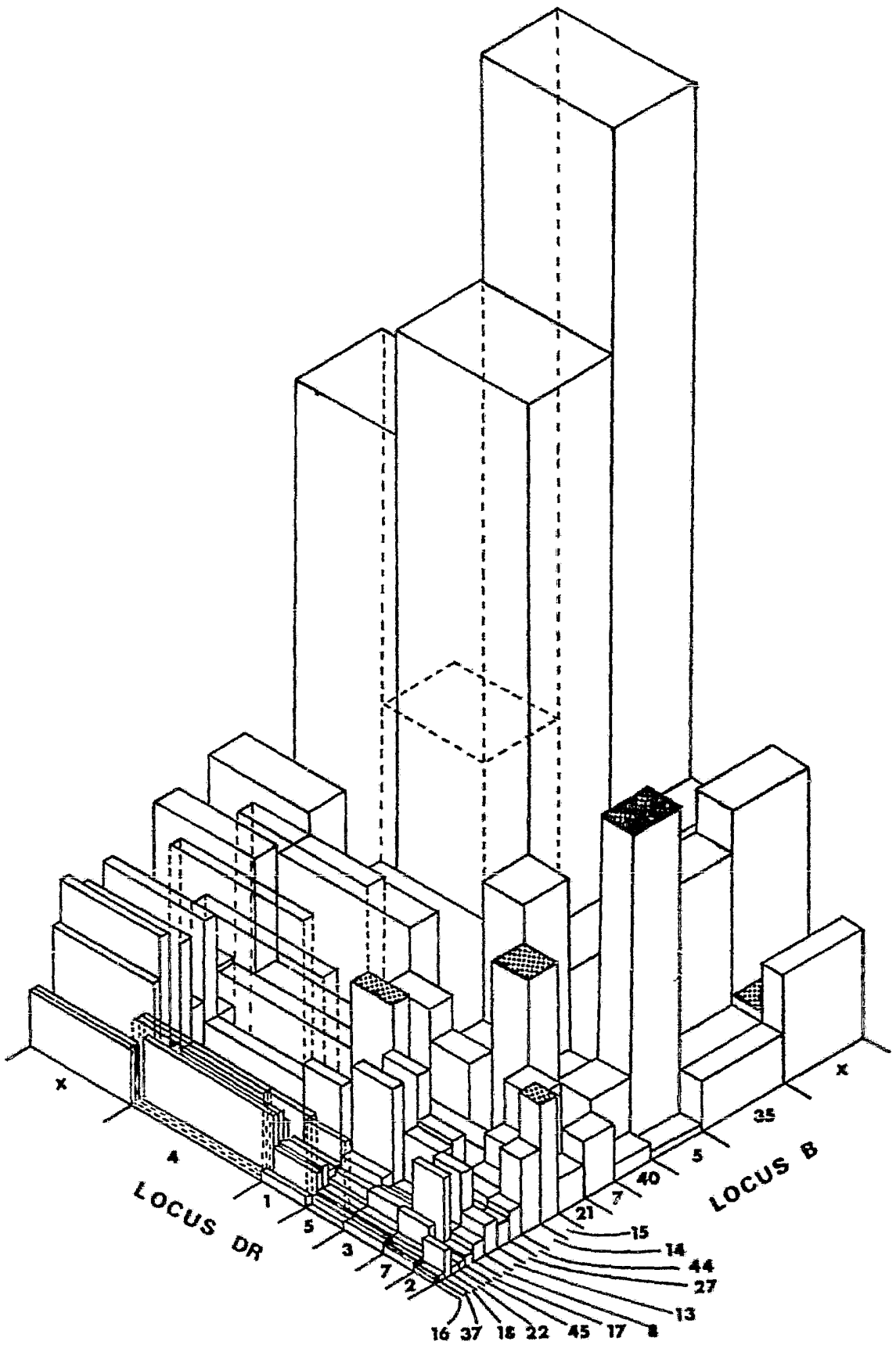
	B22	B27	B35	B37	B40	B42	B44	B45	Bx	Totales
DR1	3.70	6.85	9.60	10.05*	1.69	0.00	- 4.92	3.05	18.55	117.00
DR2	- 0.83	3.46	6.30	- 0.54	- 1.70	0.00	3.46	- 1.11	12.99	51.00
DR3	- 1.50	7.76	23.80	- 0.99	- 3.08	0.00	7.76	3.58	29.52	89.00
DR4	7.53	20.30	75.10	10.05	- 0.40	0.00	- 3.19	4.95	102.15	337.00
DR5	- 1.50	7.76	16.96	- 0.99	2.59	0.00	13.40	- 2.01	19.10	89.00
DR7	4.20	- 3.14	6.05	- 0.86	8.50	0.00	2.49	- 1.75	- 6.86*	78.00
DRx	3.50	- 7.39	62.00	- 6.60	22.90	0.00	16.60	13.29	18.25	239.00
Totales	15.10	35.60	200.00	10.10	30.50	0.00	35.60	20.00	193.70	1 000.00

* Haplotipos en desequilibrio.

Tabla 9.



Gráfica 2.



Gráfica 3.

V DISCUSION.

Dado que los antígenos HLA son una de las tantas características particulares de cada población, constituyendo una raza; resulta obvio que es inadecuado aplicar perfiles étnicos locales entre poblaciones diferentes. Como ejemplo, en la tabla 10 se muestran nuestras frecuencias de los antígenos del locus HLA-DK, en comparación con las de otras poblaciones. Los locus HLA-A y HLA-B han sido analizados en un trabajo previo (14)

Los antígenos más frecuentes en nuestra población fueron:

HLA-A: A2, A9, A3, A11, A1.

HLA-B: Bw35, B5, B40, B7, Bw21, B15.

HLA-DR: DR4, DR1, DR3, DR5, DR7, DR2.

Los catalogados como Ax, Bx y DRx son los antígenos indefinidos o blancos, éstos encierran en sus frecuencias a especificidades desconocidas o bien, que se trate de células homocigotas, lo que no resulta extraño sobre todo con aquellos antígenos cuya frecuencia es muy elevada.

Si analizamos la distribución de los indefinidos en relación a cada uno de los antígenos identificados del mismo locus, encontramos que la frecuencia de blancos está en relación directa a la frecuencia fenotípica del antígeno identificado con el que se acompaña; es decir, en el locus A el mayor número de blancos lo encontramos acompañado del A2 como el identificado, lo cual pudiera traducirse en la probabilidad de que más que indeterminados sean homocigotos (ver tabla 11), de cada 100 haplotipos A2/Ax, probablemente 42 de esos indeterminados sean ho-

FRECUENCIA DE HLA-DR EN MESTIZOS MEXICANOS
COMPARADA CONTRA OTRAS POBLACIONES.

LOCUS D/DR	MESTIZOS MEXICANOS	INDIOS AMERICANOS	CAUCASICOS EUROPEOS	CAUCASICOS N. AMERICA	JAPONESES
HLA-DR1	22.00	3.00	13.30	20.00	12.20
HLA-DR2	10.00	46.30	25.10	25.30	36.00
HLA-DR3	17.00	6.00	20.40	22.20	3.20
HLA-DR4	56.00	47.80	18.30	27.30	41.40
HLA-DR5	17.00	3.00	19.50	19.40	4.30
HLA-DR7	15.00	4.50	23.40	23.60	1.00

FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS HLA-D/DR EN DISTINTAS POBLACIONES.

Tabla 10.

DISTRIBUCION DE ANTIGENOS NO IDENTIFICADOS.

Antigenos	F.f. (%)		% del total de blancos.
HLA-A			
A1	9.00	A1/Ax	6
A2	57.00	A2/Ax	42
A3	13.00	A3/Ax	6
A9	35.00	A9/Ax	18
A11	11.00	A11/Ax	6
A25	7.00	A25/Ax	2
A26	3.00	A26/Ax	2
A28	5.00	A28/Ax	6
A29	3.00	A29/Ax	0
Aw30	0.00	Aw30/Ax	0
Aw31	0.00	Aw31/Ax	0
Aw32	2.00	Aw32/Ax	0
Aw33	0.00	Aw33/Ax	0
Ax	55.00	Ax/Ax	14
HLA-B			
B5	22.00	B5/Bx	2
B7	13.00	B7/Bx	13
B8	7.00	B8/Bx	4
B13	7.00	B13/Bx	11
B14	8.00	B14/Bx	4
B15	10.00	B15/Bx	11
B16	2.00	B16/Bx	2
B17	5.00	B17/Bx	0
B18	3.00	B18/Bx	0
Bw21	12.00	Bw21/Bx	4
Bw22	3.00	Bw22/Bx	0
B27	7.00	B27/Bx	2
Bw35	36.00	Bw35/Bx	24
B37	2.00	B37/Bx	0
B40	18.00	B40/Bx	13
Bw42	0.00	Bw42/Bx	0
Bw44	7.00	Bw44/Bx	4
Bw45	4.00	Bw45/Bx	4
Bx	46.00	Bx/Bx	17
HLA-DR			
DR1	22.00	DR1/DRx	6
DR2	10.00	DR2/DRx	3
DR3	17.00	DR3/DRx	8
DR4	56.00	DR4/DRx	19
DR5	17.00	DR5/DRx	6
DR7	15.00	DR7/DRx	6
DRx	63.00	DRx/DRx	50

Tabla 11.

homocigotos en nuestra población (probabilidad del 42%). Merecen otra interpretación cuando ninguno de los antígenos del mismo locus está identificado, o sea que corresponden a especificidades no detectables por nuestro panel de sueros.

En los antígenos DR, la cantidad de indeterminados dobles (del mismo locus) es elevado, lo que plantea que aquí faltan muchas especificidades por determinar.

Estas observaciones nos llevan a la conclusión de que la frecuencia de antígenos blancos es menor a la expresada, pero la forma de asegurarse del porcentaje de blancos que corresponden a homocigotos es sólo posible mediante estudios familiares o con el cultivo celular (43). Además, se necesita continuar con la búsqueda de nuevas especificidades de sueros anti HLA y así ir abatiendo la frecuencia de blancos.

Para dar respuesta a la primera pregunta planteada en los propósitos, acerca de conocer las posibilidades de encontrar adecuadas compatibilidades entre individuos no familiares, se ha hecho un análisis probabilístico utilizando las frecuencias anteriormente descritas.

Observamos que de las frecuencias fenotípicas, sobresalen en el locus HLA-A, el A2 con 0.57 y el A9 con 0.35, representando ambos el 46% en la población normal; de la misma manera, en el locus HLA-B, el B5 con 0.22 y el Bw35 con 0.36 suman el 29%. Combinadas las frecuencias haplotípicas de estos dos locus, tenemos en orden de frecuencia: -- A2/Bw35 con 118.7, el A9/Bx con 80.86, A9/Bw35 con 72.0, A2/B5 con -- 61.0 y el A2/Bx con 27.44, así sumando sus frecuencias, éstas hacen --

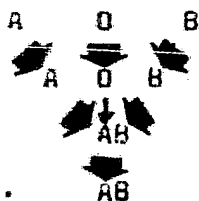
el 36.6 % de los haplotipos encontrados en los mismos 100 sujetos normales.

En el locus HLA-D/DR, el DR4 con 0.56 y el DR1 con 0.22 representan el 39% del total de estos antígenos en la población. Las combinaciones de este locus con el HLA-B nos da lo siguiente: sólo tres haplotipos son muy frecuentes: Bx/DR4 con 102.15, el Bw35/DR4 -- con 75.19 y el Bw35/DRx con 62.0, que hacen en conjunto el 23.9% del total de los haplotipos.

Como se aprecia, aunque existen numerosos alelos (especificidades) distintos en cada locus, en nuestra población sólo unos cuantos son los que predominan en forma importante, no sólo por separado, sino en las combinaciones (haplotipos) que en conjunto representan cuando menos la cuarta parte de la población (1 en 4), lo que para el propósito de trasplante de cadáver es muy favorable, ya que si los pacientes también tienen de estos marcadores, la probabilidad de encontrar semejanzas es muy alto.

Un requisito además de la compatibilidad en antígenos HLA - en trasplante de órganos, es el grupo sanguíneo ABO, en la figura 4 aparecen las reglas de compatibilidad para grupos sanguíneo ABO y además las frecuencias en la población mestiza mexicana testigo (6).

**COMPATIBILIDAD NECESARIA EN EL GRUPO ABO
PARA DONACION DE TRASPLANTE**



**FRECUENCIAS DEL GRUPO ABO
EN MESTIZOS MEXICANOS.**

O	51.2%
A	27.4%
B	8.8%
AB	1.7%

Fig. 4 Reglas de compatibilidad para grupo sanguíneo y sus frecuencias .

De la tabla anterior se observa que el grupo sanguíneo "O" es el más abundante en la población, pero sólo puede recibir de su mismo grupo, en cambio el grupo "A" recibe de "O" y "A", y el "B" de "O" y "B", finalmente el grupo "AB" el menos frecuente de todos, recibe de cualquier grupo, por lo que sumando sus frecuencias se establece la Frecuencia de Compatibilidad como sigue: para el "AB" el 100 % (todos) que en probabilística es igual a 1.0, para el "A" el 0.89, para el "B" de 0.71 y para el "O" de 0.62.

Tomando en cuenta los datos de los 100 sujetos sanos como representativos de nuestra población, se han ordenado por frecuencias fenotípicas (tomando en cuenta los de mayor del 10%) a los antígenos HLA locus DR, B y A, así como las frecuencias de compatibilidad del grupos ABO (tabla 12).

FRECUENCIAS FENOTÍPICAS DE LOS LOCUS DR, B y A Y FRECUENCIAS DE COMPATIBILIDAD DEL GRUPO SANGUINEO ABO.

Locus DR	F.f.	Locus B	F.f.	Locus A	F.f.	Grupo sanguíneo ABO
4	0.56	35	0.36	2	0.57	AB 1.00
1	0.22	5	0.22	9	0.35	A 0.89
3	0.17	40	0.18	3	0.13	B 0.71
5	0.17	7	0.13	11	0.11	O 0.62
7	0.15	21	0.12	1	0.09	
2	0.10	15	0.10			

Tabla 12. Frecuencias fenotípicas y frecuencias de compatibilidad ABO.

Con estos datos, si se multiplican las frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA del receptor (tomando el alelo más frecuente de cada uno de los locus), por su frecuencia de compatibilidad ABO aplicando la siguiente fórmula:

$F.f.locus A \times F.f.locus B \times F.f.locus DR \times F. \text{ compatibilidad ABO}$

se obtiene la probabilidad de encontrarle un donador no emparentado, que comparta la mitad de los antígenos de histocompatibilidad

Aplicando este cálculo de frecuencias a los 38 pacientes en espera de trasplante de riñón de cadáver y ordenándolos en base a la frecuencia de sus antígenos de mayor a menor tenemos que los 10 primeros se pueden igualar al 50% (de parecido en antígenos HLA) con una probabilidad de 1/8, los 20 primeros (incluyendo los 10 anteriores) dan una probabilidad de 1/26, los 30 siguientes 1/36 y todos 1/43. Como podemos observar, los requerimientos de cadáveres son pequeños para satisfacer un programa de trasplante de riñón de cadáver en forma adecuada.

En cuanto a la otra interrogante planteada en los propósitos respecto al tamaño de la muestra en trabajos de HLA-Enfermedad, se tiene que en éstos, además de satisfacer la condición de emplear poblaciones homogéneas, el tamaño adecuado de la muestra testigo y enfermos es de vital importancia para que los resultados tengan valor estadístico. En 1979, Svejgaard (36) propuso unas tablas de tamaños de muestra, esta condición depende de dos factores:

- a) la frecuencia del marcador en la población testigo.
- b) la magnitud de la diferencia en frecuencia del antígeno HLA en particular, entre enfermos y controles.

De acuerdo con la tabla de tamaño de muestra de Svejgaard, se han ordenado los marcadores de los locus HLA-A, HLA-B y HLA-D/DR, en base a las frecuencias obtenidas del estudio en la población testigo (tablas 13,14 y 15)

MINIMO DE PACIENTES NECESARIOS PARA OBTENER UNA SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE $p=0.01$ DE ACUERDO A LA FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS HLA EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA.

Frec. del marcador en testigos	Locus A	Locus B	Locus DR	Núm de controles	Núm. mínimo de pacientes
1 - 5 %	A26 (A10)	Bw16 (Bw38 y 39)		100	370
	A28	B17 (Bw57 y 58)		500	180
	A29	B18		1 000	170
	Aw30	Bw22 (Bw54, 55 y 56)			
	Aw31	B37			
	Aw32	Bw42			
	Aw33	Bw45 (B12)			
6 - 10%	A1	B8	DR2	100	120
	A25 (A10)	B13		500	80
		B14 (Bw62 y 63)		1 000	80
		B15			
		B27 Bw44 (B12)			
11- 25 %	A3	B5 (Bw51 y 52)	DR1	100	35
	A11	B7	DR3	500	30
		Bw21 (Bw49 y 50)	DR5	1 000	30
		B40 (Bw60 y 61)	DR7		
25 - 50%	A2	Bw35	DR4	100	15
	A9 (Aw23 y 24)				

MAGNITUD DE LA DIFERENCIA: DISMINUCION (AUSENCIA)
DEL MARCADOR EN LOS ENFERMOS.

Tabla 13

MINIMO DE PACIENTES NECESARIOS PARA OBTENER UNA SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE $p=0.01$ DE ACUERDO A LA FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS HLA EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA.

Frec. del marcador en testigos	Locus A	Locus B	Locus DR	Núm. de controles	Núm mínimo de pacientes.
1 - 5 %	A26 (A10)	Bw16 (Bw38 y 39)		100	Imposible
	A28	B17 (Bw57 y 58)		500	1 000
	A29	B18		1 000	500
	Aw30	Bw22 (Bw54, 55 y 56)			
	Aw31	B37			
	Aw32	Bw42			
	Aw33	Bw45 (B12)			
6 - 10 %	A1	B8	DR2	100	Imposible
	A25 (A10)	B13		500	1 000
		B14 (Bw62 y 63)		1 000	500
		B15			
		B27 Bw44 (B12)			
11 - 25 %	A3	B5 (Bw51 y 52)	DR1	100	180
	A11	B7	DR3	500	70
		Bw21 (Bw49 y 50)	DR5	1 000	70
		B40 (Bw60 y 61)	DR7		
25 - 50%	A2	Bw35	DR4	100	15
	A9 (Aw23 y 24)				

MAGNITUD DE LA DIFERENCIA: INCREMENTO (DOBLE DE LO NORMAL)
DEL MARCADOR EN LOS ENFERMOS.

Tabla 14

MINIMO DE PACIENTES NECESARIOS PARA OBTENER UNA SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE
 $p=0.01$ DE ACUERDO A LA FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS HLA EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA

Frec. del marcador en testigos	Locus A	Locus B	Locus DR	Núm. de controles	Núm mínimo de Pacientes.
1-5 %	A26 (A10)	Bw16 (Bw38 y 39)		100	Imposible
	A28	B17 (Bw57 y 59)		500	1 000
	A29	B18		1 000	1 000
	Aw30	Bw22 (Bw54,55 y 56)			
	Aw31	B37			
	Aw32	Bw42			
	Aw33	Bw45 (B12)			
6-10 %	A1	B8	DR2	100	Imposible
	A25 (A10)	B13		500	900
		B14 (Bw62 y 62)		1 000	600
		B15			
		B27 Bw44 (B12)			
11- 25%	A3	B5 (Bw51 y 52)	DR1	100	1 000
	A11	B7	DR3	500	160
		Bw21 (Bw49 y 50)	DR5	1 000	150
		B40 (Bw60 y 61)	DR7		
25- 50%	A2	Bw35	DR4	1 000	50
	A9 (Aw23 y 24)			500	60
				100	90

MAGNITUD DE LA DIFERENCIA: DISMINUCION (MITAD DE LO NORMAL)
DEL MARCADOR EN LOS ENFERMOS.

Tabla 15

VI RESUMEN.

Se han dado a conocer las frecuencias de los antígenos HLA, los que en parte constituyen nuestro perfil étnico. Una vez establecido, se abordaron sus principales aplicaciones que son, en trasplante y en estudios de búsqueda de asociaciones de estos marcadores con enfermedades.

Se estudiaron 100 sujetos testigos y 38 candidatos a trasplante de riñón de cadáver en programa de hemodiálisis; se obtuvieron las frecuencias de grupo sanguíneo ABO y fenotípicas y haplotípicas del sistema HLA, cuyos productos permiten el calcular la probabilidad de encontrar un donador que comparte la mitad de los antígenos de histocompatibilidad, entre sujetos no emparentados. El cálculo simple de probabilidad aquí propuesto, en comparación con algunos de la literatura (2,27), que por lo complejo resultan imprácticos, también puede aplicarse a casos en donde se cuente con donador vivo, ya que si se trata de un genotipo común en nuestra población, pudiera decidirse el intento de búsqueda de un donador cadavérico en vez de tomar el riñón de un familiar sano. En el grupo de 38 pacientes en espera de riñón de cadáver, se encuentran genotipos comunes y raros, los primeros tienen una probabilidad de 1/8 de encontrar donadores adecuados y en suma de 1/43. Concluyéndose que los requerimientos de cadáveres son pequeños para satisfacer un programa de trasplante con buenos resultados.

Los trabajos de HLA-Enfermedad pueden contribuir en el esclarecimiento del papel biológico del HLA, etiologías de padecimientos, genética de los mismos, diagnóstico y pronóstico. El tamaño de

las muestras requerido para estos trabajos, en algunos casos puede - ser sorprendentemente altos, trayendo consigo la dificultad de apli-- carlos en patologías poco frecuentes, además del elevado costo que - representaría, por lo que se recomienda contar con una gran población de testigos estudiados para disminuir el número de enfermos requeri-- dos, así como el llevar a cabo trabajos interinstitucionales.

VII CONCLUSIONES.

- 1.- Se determinaron las frecuencias de los antígenos de histocompatibilidad en una muestra representativa de nuestra población mestiza mexicana.
- 2.- A partir de estas frecuencias se puede calcular la probabilidad de coincidencias en algunos de estos antígenos entre sujetos no emparentados, aplicando este estudio al trasplante de donador cadavérico, siendo notorio, que la probabilidad de compartir algunos antígenos, es elevada en nuestra población.
- 3.- En vista de los numerosos trabajos que se realizan tratando de establecer la relación entre estos marcadores y susceptibilidades genéticas a determinados padecimientos, es importante recalcar que para obtener resultados reales, es muy importante el número de individuos control y enfermos. El número de sujetos depende de dos factores: a) la magnitud de la diferencia de la frecuencia entre las dos poblaciones y b) de la frecuencia normal de este antígeno, en base a esto último es posible anticipar los tamaños adecuados de las muestras.

VIII BIBLIOGRAFIA

- 1.- American Red Cross Blood Services, Northeast Region, HLA Laboratory.
- 2.- Barnes B.B., Misttinen D.S. The search for an HLA-A and ABO - compatible cadaver organ for transplantation. *Transplantation* 13 592-8, 1972.
- 3.- Barnstable C.J., Jones E.A., Crompton M.J. Isolation, structure and genetics of HLA-A,B,C and DRw (Ia) antigens. *Brit.M. Bull.* 34 241-6, 1978.
- 4.- Baur M.P., Danilovs J.A. Population analysis of HLA-A,-B,-C,-DR and other genetic markers. Terasaki P.I. (ed.). Histocompatibility Testing 1980. California, E.U.A. 955-93, 1980.
- 5.- Breanndan M.S. HLA, subject Review. *Mayo Clin. Proc.* 54 385-93, 1979.
- 6.- Buen Abad G. Frecuencias de grupos ABO y Rh en población mestiza del D.F. Tesis en realización en el Lab. de Histocomp. C.H. "20 de Noviembre" México, D.F. 1982.
- 7.- Danilovs J.A., Ayoub G., Terasaki P.I. B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. Terasaki P.I. (ed.) Histocompatibility Testing. Cal., E.U.A. 287-8, 1980.
- 8.- Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 20 156-8, 1958.
- 9.- David C.S. Regulation of Immune Response By MHC-Linked Genes. -- *Transpl. Procc.* 12 8-11, 1980.
- 10.- Ebringer A., Cowling P., Nogwa S.N., James D.C. HLA and Disease. Dausset J., Svejgaard A. INSERM. Paris 1976.
- 11.- Festenstein H., Demant P. Inmunogenética fundamental, Biología y aplicaciones clínicas del HLA y H-2. Ed. El manual moderno. México D.F. 1981.
- 12.- Gazit E., Eftor T., Mizrahi Y., Mashiach I., Mashiach S., Serr. Acquisition of typing serum from post partum blood clots. *Tissue Antigens.* 2 359-73, 1977.
- 13.- Gorer P.A. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employed of immune sera. *Brit. J. Exp. Path.* 17, 42-5, 1936.

- 14.- Gorodesky C., Teran Ortíz L.A., Escobar Gutiérrez A. HLA Frequen-
cies in Mexican mestizo population. Tissue Antigens. 14 347-52,
1979.
- 15.- Joyse, V.C., Wolf E. HLA-A,-Band -C antigens, their serology and
Cross-reactions. Br. Med. Bull 34 217-22, 1978.
- 16.- Kaplan De-Nour A., Shanan J., Quality of life of Dialysis and -
transplanted patients. Nephron. 25 117-20, 1980.
- 17.- Lachman Sc. D. Hobart M.J. Complement genetics in relation to -
HLA. Brit. M. Bull. 34 247-52, 1978.
- 18.- Lamm L.U., Degos L. Introduction to HLA genetics. Heather M., --
Kissmeyer-Nielsen (ed.). Histocompatibility Techniques. Biomed-
ical Press. Holanda. 131-61, 1979.
- 19.- Lilly F., Boyse E.A., Old L.J. Genetics basis of susceptibility
to viral leukaemogenesis. The Lancet 2 1207-9, 1964.
- 20.- Madsen M., Johnsen H.E. A methodological study of E-rosette for-
mation using AET-treated sheep red blood cells. J. Imm. Method.
27 61-74, 1979.
- 21.- Mc Devirr H.O. The role of H-2 I region gene in regulation of -
the immune response. Forugereau A and Dausset J. (ed.). Fourth
International Congress of Immunology. Immunology 80. Academic
press, Paris. 503-12, 1980.
- 22.- Mc Devitt H.O. Regulation of the Immune Response by the Major -
Histocompatibility System. N. Engl. J. Med. 303 1514-7, 1980.
- 23.- Medawar P.B. Croonian Lecture: The homograft reaction. Proc. -
Roy. Soc. "B". 148 145-55, 1958.
- 24.- Moen T., Albrechtsen D., Flatmark A., Jakobsen A., Jeruell J., -
Halvorsen S., Solheim B., Thorsby E. Importance of HLA-DR match-
ing in cadaveric renal Transplantation. N. Engl. J. Med. 303
850-4, 1980.
- 25.- Palutke M. Transplantation Immunology. Sonnenwirth A.C., Jarett
L. (ed.) Clinical Laboratory methods and diagnosis. 8a. ed. The
C.U. Mosby Co. 1980.
- 26.- Petrov R.V. Una conversación sobre la nueva inmunología. Ed. Mir
Mosú U.R.S.S. 1978.
- 27.- Pliskin J.S. On the probability of finding an HLA and ABO-compati-

- ble cadaver organ for transplantation. *Transplantation* 20 181-5, 1975.
- 28.- Reglamento Federal para la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos. Edición oficial. Secretaría de Salubridad y Asistencia. México, D.F. 1976.
- 29.- Ruddle F.H. Transferencia de genes y organización del genoma .- Gandarza R., Robert M., Bolivar F. (ed.) . Trasplante y movilización de genes. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México D.F.1981.
- 30.- Salvatierra D.Jr., Feduska N.J., Vicenti F., Duca R., Potter D., Nolan J., Cochrum K.C., Amed W.J.C. Análisis de los costes y resultados de los trasplantes renales en un solo centro. *Deducciones J. Am. Med. Assoc. en México.* 4 396-401, 1979.
- 31.- Schippers H.M.A., Kalff M.W. Cost Comparison haemodialysis and -- renal transplantation. *Tissue Antigens* 7 86-90, 1976.
- 32.- Seager K., Bashir H.V., Gecsy A.F., Edmonda J., Vere-Tyndall A. - Evidence for a specific B27-associated cell surface marker on lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis. *Nature* . 277 - 68-70, 1979.
- 33.- Strominger J.L. Structure of products of the Major Histocompatibility Complex in man and mouse. Fourgereau M. and Dausset J. (ed.) Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. Ac. Press, Paris. 540-54, 1980.
- 34.- Svejgaard A., Morling N., Platz P., Ryder L.p., Thomsen M. HLA -- and Disease. Fourgereau M. and Dausset J. (ed.) Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. Academic Press, Paris. 538-40, 1980.
- 35.- Svejgaard A. HLA and Disease. Rose N.R. y Friedman H. (ed.), Manual of Clinical Immunology. Am. Soc. Microb. E.U.A. 1976 , 841-50.
- 36.- Svejgaard A., Ryder L.P. Disease Associations. Heather, Kissmeyer-Nielsen F. (ed.) Histocompatibility Techniques. Amsterdam, Holland. 125-205, 1979.
- 37.- Terán Ortiz L.A. Aplicación clínica de las pruebas de histocompatibilidad. (En prensa).
- 38.- Terán Ortiz L.A. Jefe lab. Histocompatibilidad C.H."20 de Noviembre" ISSSTE, México, D.F. 1976.

- 39.- Terasaki P.I., Bernoco D., Park S.M., Ozturk G., Iwaki Y. Micro-droplet testing for HLA-A,B,C and D antigens. Am. J. Clin. Path. 69 103-9, 1978.
- 40.- Nomenclature for factors of the HLA system 1980. Terasaki P.I. - (ed.) Histocompatibility testing 1980. UCLA Tissue Typing Lab., California E.U.A. 18-20, 1980.
- 41.- Thomsen M., Morling N., Platz P., Ryder L. P. Svejgaard A. HLA and Disease. Trans. Procc. 11 633-7, 1979.
- 42.- Thorsby E., Bratlie A. A rapid method for the production of pure lymphocyte suspensions. Terasaki P.I. (ed.) Histocompatibility Testing. Munksgaard, Copenhagen. 655-6, 1970.
- 43.- Yuris E.J. Base genética y función del Complejo Principal de Histocompatibilidad. (En Prensa).