



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"Frecuencia de Antígenos del Complejo HLA
en una Población Mestiza Mexicana"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmaceutico Biologo
P R E S E N T A :
BEATRIZ SILVA RAMIREZ



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.

I N D I C E
* * * * *

| | Págs. |
|--|-------|
| | 1 |
| <u>Introducción.</u> | |
| I. <u>Complejo Mayor de Histocompatibilidad</u> <u>en el ratón H-2.</u> | 2 |
| 1.1 Introducción. | 3 |
| 1.2 Historia. | 4 |
| 1.3 Mapa Genético. | 6 |
| 1.4 Regiones K y D. | 7 |
| 1.4.1. Nomenclatura. | 8 |
| 1.4.2. Características | 9 |
| 1.5 Región S | 15 |
| 1.6 Región I | 18 |
| 1.7 Genes de la Respuesta Inmunitaria. | 21 |
| 1.8 Relación H-2 y Hormonas. | 28 |
| 1.9 Relación H-2 y oncogénesis viral. | 29 |
| II. <u>Complejo Mayor de Histocompatibilidad</u> <u>en el hombre HLA.</u> | 31 |
| 2.1 Introducción. | 32 |
| 2.2 Historia. | 32 |
| 2.3 Mapa genético. | 38 |
| 2.4 Terminología. | 41 |
| 2.5 Herencia. | 45 |
| 2.6 Antígenos HLA-A, -B, -C. | 47 |

| | Págs. |
|--|-------|
| 2.6.1. Aislamiento. | 47 |
| 2.6.2. Bioquímica. | 52 |
| 2.6.3. Distribución Tisular. | 56 |
| 2.6.4. Serología. | 57 |
| 2.6.5. Obtención y detección de sueros inmunes para tipificación. | 61 |
| 2.6.6. Técnicas de tipificación. | 64 |
| 2.7 Antígenos HLA-D. | 66 |
| 2.7.1. Distribución tisular. | 67 |
| 2.7.2. Tipificación de Antígenos HLA-Dw | 68 |
| 2.7.3. Células mediadoras de linfó- lisis (CML). | 71 |
| 2.8 Antígenos HLA-DR | 73 |
| 2.8.1. Aislamiento. | 73 |
| 2.8.2. Bioquímica. | 74 |
| 2.8.3. Distribución tisular. | 76 |
| 2.8.4. Serología. | 76 |
| 2.8.5. Obtención y Selección de sueros inmunes para tipificación. | 79 |
| 2.8.6. Técnicas de tipificación. | 80 |
| 2.9 Genética de población y desequilibrio génico. | 82 |
| 2.10 Relación HLA y el Sistema de Complemento | 83 |
| 2.11 Relación HLA y Respuesta Inmune. | 86 |
| 2.12 HLA y trasplantes. | 87 |
| 2.13 HLA y enfermedad. | 90 |

| | Págs. | |
|------|--|-----|
| III. | <u>Tipificación de antígenos HLA en mestizos</u> | |
| | <u>mexicanos.</u> | 97 |
| 3.1 | Introducción. | 98 |
| 3.2 | Material y Método. | 100 |
| 3.3 | Cálculos. | 110 |
| 3.4 | Resultados. | 112 |
| 3.5 | Discusión. | 133 |
| 3.6 | Conclusión. | 137 |
| | Apéndice I. | 138 |
| IV. | <u>Bibliografía.</u> | 139 |

INTRODUCCION.

El conocer y lograr entender el funcionamiento del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), tal vez nos lleve a comprender muchos enigmas que aún no podemos descifrar claramente, como la cooperación célula a célula para efectuar una respuesta inmune efectiva y específica, el éxito total en los trasplantes de órganos, la asociación y ligamiento de antígenos del MHC con enfermedad. El gran apoyo que ha significado el estudio del MHC en el hombre (HLA) en antropología, nos podrá llevar algún día al conocimiento de nuestros orígenes.

Esta tesis fue elaborada tratando de dar los conocimientos básicos para comprender el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), en el hombre (HLA) y el ratón (H-2), el cual es el más estudiado, pero principalmente caracterizar a una población mestiza mexicana representativa, tipificándola para antígenos del complejo HLA.

Si esta tesis logra interesar a más investigadores en el estudio del MHC, las muchas horas de trabajo de laboratorio e investigación bibliográfica no habrán sido desprovechadas.

I. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL
RATON (H-2)

1.1. INTRODUCCION

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) ha sido objeto de múltiples estudios en diferentes especies. Especialmente resulta útil el estudio de este sistema en el ratón (H-2), debido a su fácil manipulación genética, -- así como a su notable similitud con el MHC humano, denominado HLA.

Se ha descrito y estudiado MHC en otros mamíferos, además en un ave, y un anfibio Xenopus leavis, este hallazgo implica que existe tal vez un origen común relativo en el proceso evolutivo Figura (1).

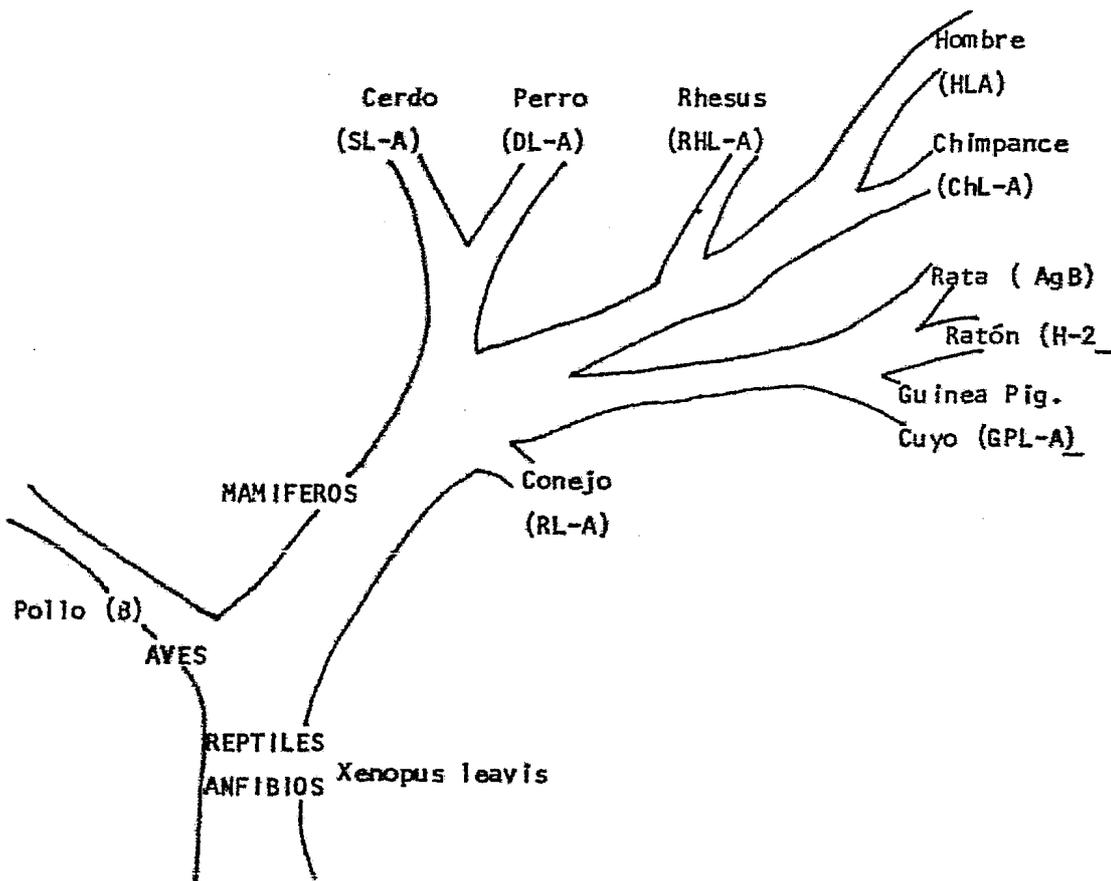


Figura 1. Especies en las cuales se han descrito MHC.

(HLA and Disease 1980, pag. 32 Munksgaard Copenhagen).

1.2 Historia.

El sistema H-2 fué descubierto por Gorer (1) --- cuando trataba de diferenciar los grupos sanguíneos de cepas endogámicas* de ratones. Inmunizó conejos con -- eritrocitos de cepas diferentes de ratones y estudio el antisuero de conejo resultante contra los eritrocitos de cada cepa murina, buscando a'gutininas eritrocita- - rias que detectaran antígenos presenten en los eritro-- citos de cada cepa y la individualizaran. Logró defi-- nir cuatro antígenos eritrocitarios, uno de los cuales, el antígeno 11, le pareció particularmente interesante. Estaba presente en unas cepas y ausente en otras, y al estudiar los descendientes resultantes del cruce de cepas positivas y negativas constató que el carácter se - transmitía en la forma dominante simple de las leyes de Mendel. Después demostró la importancia del antígeno - 11 en sus experimentos con injertos de tumores. Gorer transplantó los tumores de una cepa positiva 11 a la -- descendencia de retrocruzamiento (backcross) de cepas - positivas 11 y cepas negativas 11. Tipificados con an- tisueros anti-11 algunos de los descendientes eran posi- tivos y otros negativos; ulteriormente pudo constatar - que los animales negativos podían rechazar el tumor de la cepa positiva y los animales positivos podían acep- tarlo. Así demostró que el antígeno 11 era un antígeno de histocompatibilidad (2).

El siguiente paso importante en la definición --

* Cepa endogámica. Cepa que prácticamente podría consi- derarse homocigota en todos los loci desarrollada por el apareamiento de hermanos con hermanas.

del sistema H-2 fue dado por Gorer, Lyman y Snell (3). - Ellos probaron que el gen que determinaba la presencia - del antígeno 11 se encontraba en el cromosoma 17.

Cuando snell y sus colaboradores analizaron H-2 - en numerosos cepas endogámicas, constataron que no se -- trataba de un sistema simple de aloantígenos con un alelo positivo y otro negativo (LL^+ y 11^-) como al principio se creyó, sino un sistema complejo con diversos alelos- H-2, que diferenciaron por medio de pequeñas letras sobreescritas ($H-2^a$, $H-2^b$, etc.).

Counce y col. (4) compararon la duración de la su pervivencia de injertos de piel entre cepas diferentes - las cuales solo variaba el locus H-2. Así fué posible - estudiar la influencia de cada uno de los locus de histo compatibilidad. Lo importante de estos resultados fué - que los injertos de piel intercambiados entre cepas -- que discrepaban sólo en el locus H-2 fueron rechazados - más rápidamente que los injertos entre cepas con una di- ferencia en cualquier otro locus de histocompatibilidad- no H-2. En consecuencia el locus H-2 fue denominado - -- fuerte o mayor y los loci de histocompatibilidad restan- tes fueron arbitrariamente designados débiles, menores o no H-2.

Más tarde se logró decifrar la complicada serolo- gía y la genética del sistema H-2 gracias a los esfuer-- zos de Gorer, Amos y Mikulska en Inglaterra y de Snell - y Stimpfling en los Estados Unidos quienes elaboraron mé todos serológicos fidedignos y lo aplicaron al estudio - inmunitario del ratón. Un aporte fundamental fue la uti lización de la prueba de linfocitotoxicidad por Gorer y- O'Gorman (5), para detectar las diferentes especificida- des H-2, basada en la destrucción mediante el complemento de linfocitos sensibilizados por un antisuero anti- inmu nitario. Los análisis serológicos han demostrado que el producto de H-2, es un complejo antigénico compuesto por numerosos genes, definidos serológicamente y denomina-- dos especificidades antigénicas.

En las décadas posteriores nuevos progresos, han sido obtenidos, los cuales se irán enumerando paulatinamente en este mismo capítulo, ya que encierran una importancia fundamental para comprender el sistema H-2.

1.3 Mapa Génético del Complejo H-2.

El complejo H-2 ocupa un segmento del cromosoma 17 de una longitud de 0.5 unidades (cM) del mapa. El complejo H-2 está subdividido en 5 regiones principales K, I, S, G y D fig. (2). Las regiones K, I, S y D fueron designadas por Klein en 1974, la región G se ha adicionado recientemente (6).

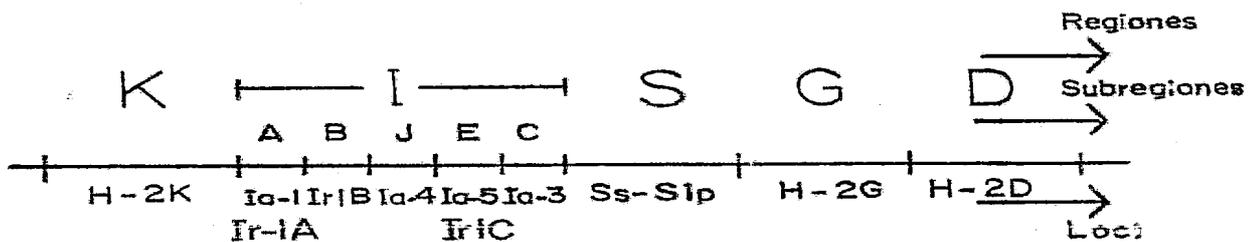


Fig. 2 Regiones y loci de los genes del complejo H-2 HLA y disease 1980, pág. 32-45 - Munksgaard Copenhagen.

Las regiones K y D son responsables de los antígenos de trasplante, la región S determina uno o más componentes de complemento y la región I está relacionada con la respuesta inmunitaria (7). La región I se ha di-

vidido en subregiones (I-A, I-B, I-C, I-E, I-J). El complejo H-2 contiene también numerosos genes específicos de la respuesta inmunitaria (Ir). Estos genes fueron localizados en regiones individuales del mapa; sabemos que algunos de ellos se encuentran en el extremo K del complejo H-2 pero se ignora si están localizados en la región K o en una de las subregiones de I. Es necesario hacer hincapié que el mapa H-2 no está concluido. Los segmentos consideradas como regiones únicas actualmente, podrán ser subdividas en subregiones, si se llega a detectar en nuevas investigaciones. Además al interpretar el mapa genético del complejo H-2, se debe tener en cuenta, que su construcción se basa en numerosas hipótesis que pueden ser ciertas pero que aún no han sido probadas en forma concluyentes.

Todas las regiones del complejo H-2, con excepción de la región S controlan especificidades antigénicas detectables en la membrana celular por medio de métodos serológicos. Estas especificidades se dividen en dos grandes grupos: las especificidades antigénicas H-2 (regiones K, G y D) las especificidades Ia (asociadas a la región I) que serán tratadas sepradamente. La información de la región G es muy escasa.

1.4 Regiones K y D (Especificidades H-2).

La mayoría de las especificidades antigénicas H-2 son expresadas en varios tipos de células: linfocitos, eritrocitos, macrófago, fibroblastos, en las células epiteliales, en las células rosales pulmonares cerebrales y también en otros tejidos.

Se pueden tener altos títulos de anticuerpos específicos anti H-2 con la Mayoría de las combinaciones de cepas H-2 incompatibles, en contraste con la respuesta de los anticuerpos contra la mayoría de los antígenos de los otros loci de histocompatibilidad que es muy débil o nula.

Una gran cantidad de especificidades H-2 pueden ser detectadas por hemaglutinación, y linfocitotoxicidad pero algunas son predominantemente citotóxicas y otras son evidenciadas más fácilmente por hemaglutinación, un estudio completo de especificidades requiere de los dos análisis.

1.4.1. Nomenclatura.

Los haplotipos son expresados con las letras minúsculas del alfabeto sobreescritas al prefijo H-2: H-2^a, H-2^b, H-2^c, etc. La letra w se reserva a los haplotipos identificados en ratones silvestres, se diferencian por medio de números arábigos colocados a continuación de la letra; H-2^{w2}, H-2^{w3}, etc.

Como el número de haplotipos identificados en ratones endogámicos es superior que las letras del alfabeto se utilizan símbolos compuestos por dos o más letras:

1.- Si el nuevo haplotipo es muy similar a un haplotipo conocido, el símbolo se compone de dos letras, la primera es del haplotipo conocido y la segunda es cualquier letra de la primera mitad del alfabeto (a-n), así las variantes del haplotipo H-2^b son: H-2^{ba}, H-2^{be}, H-2^{bf}.

2. Si el nuevo haplotipo no es similar a ningún otro, su símbolo puede estar formado por dos (o tres) letras, pero esta vez la segunda mitad del alfabeto (p-z), por ejemplo: H-2^{ap}, H-2^{aq}, H-2^{ap}, etc.

3. Los haplotipos que comparten las especificidades privadas de las regiones K y D, pero con entrecruzamiento (crossing-over) y recombinación en diferentes partes del complejo H-2, se distinguen por medio de números arábigos consecuentes después de la letra sobreescrita, características del haplotipo H-2^h, H-2^{h2}, H-2^{h4}, H-2^{h5}, etc.

4. Si el nuevo haplotipo representa una variante menor de un haplotipo conocido, su símbolo consiste en la letra símbolo del haplotipo original, más la letra v (variante) y un número secuencial. Así las variantes del haplotipo b serían: H-2^{bw1}, H-2^{bv2}, etc. De la misma manera las formas mutantes de un haplotipo se indican añadiendo al símbolo del haplotipo, la letra m (mutante) y un número secuencial. Las mutantes del haplotipo b serían: H-2^{bm1}, H-2^{bm2}, etc. La letra v (variante) no puede usarse como segunda letra para formar un símbolo para un haplotipo relacionado.

Cada alelo de las regiones K o D determina un grupo de especificidades antigénicas características. Estas contienen una especificidad privada que está determinada solamente por un alelo en particular y ningún otro de esa misma región, siendo adoptado este término por Ams (8).

Las otras especificidades son determinadas por uno o varios de los otros alelos de esa región o de otra región, siendo estas las especificidades públicas. Algunas especificidades públicas están determinadas por un número de alelos y son llamadas: Especificidades Públicas cortas que son determinadas por un número pequeño de alelos.

Otras especificidades públicas pueden ser determinadas por alelos de dos o más regiones. Son las especificidades birregionales (9, 10, 11).

1.4.2 Características de las especificidades H-2.

Los antígenos H-2 son complejos proteínicos que flotan libremente entre las dos capas de fosfolípidos semilíquido que forman la membrana celular (12). Datos más recientes sugieren que los antígenos H-2 pueden ser retirados de la membrana celular con detergentes no iónicos del tipo del NP-40.

Están formados por dos cadenas polipéptidicas, -- una grande y otra pequeña. La cadena pequeña es la misma para todos los antígenos H-2 y no contiene la especificidad aloantigénica. Su peso molecular es de 12 000 y su estructura primaria es idéntica a la de beta-2-microglobulina y es homóloga a la porción constante de las cadenas de inmunoglobulina, Figura (3).

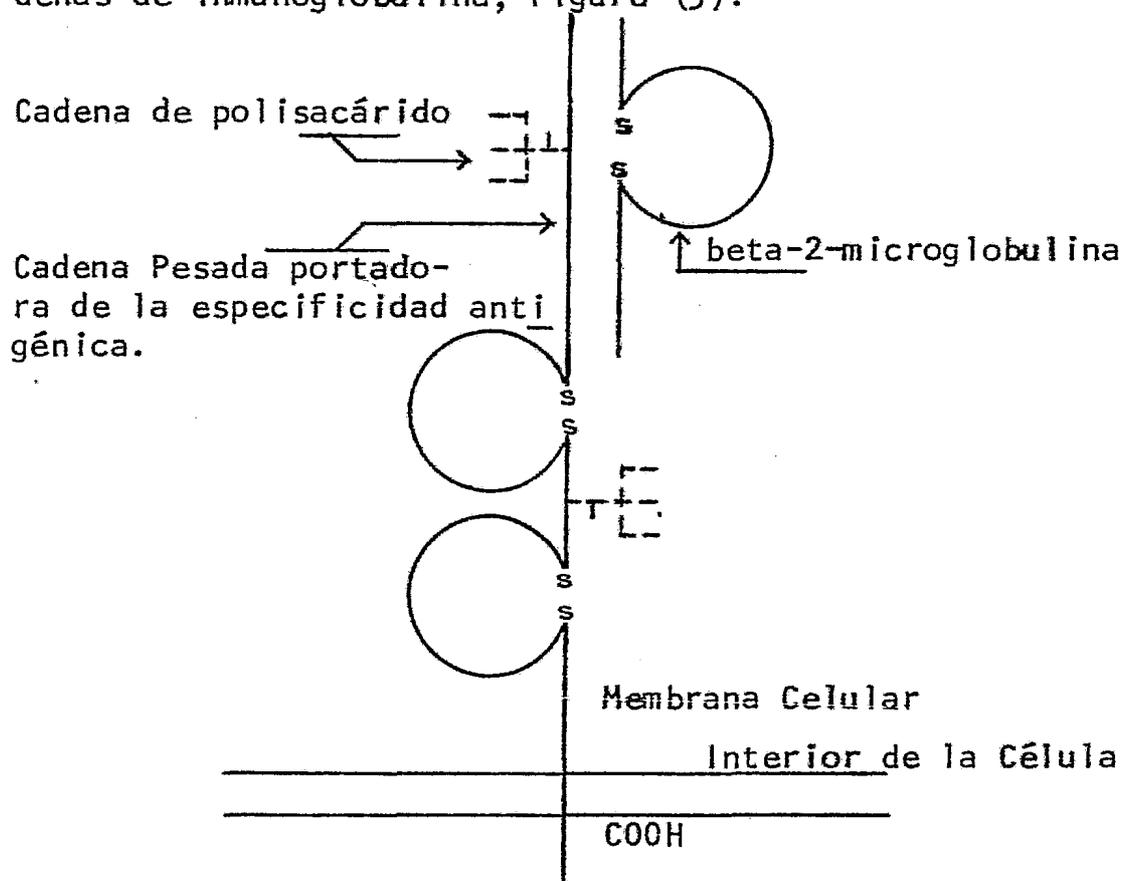


Figura 3. Estructura básica de los antígenos H-2
Science 1979, 203:516.

La cadena pesada (peso molecular de 45,000) porta las especificidades H-2. La porción terminal COOH - de la molécula esta sumergida en la membrana celular, - cada cadena H-2 es fijada a la microglobulina B2 por medio de enlaces no convalentes (13).

Las moléculas portadoras de las especificidades antigénicas están constituidas por 90-95% de proteína y del 5-10% de carbohidratos, sin embargo, las propiedades aloantigénicas están determinadas en gran parte o en su totalidad, por una porción del componente proteico (cadena pesada). Este hecho a sido deducido de:

1- La imposibilidad de alterar la especificidad aloantigénica de los antígenos H-2, modificando o eliminando el componente polisacarido.

2- La destrucción de la especificidad aloantigénica de preparaciones antigénicas H-2 por medio de tratamientos que modifican las propiedades del componente proteico.

Esto es importante en la interpretación fundamental de la relación entre los antígenos H-2 y los genes H-2. Si la aloantigenicidad H-2 se debiera a diferencias entre los componentes polisacaridos, ellos se explicarían por la diferente acción de enzimas (las Glicosil-transferasas) que atacan carbohidratos de la estructura proteica esencial. El polimorfismo del gen H-2 se reflejaría entonces en las enzimas correspondientes y los antígenos H-2 no serían los productos primarios de los genes estructurales H-2. Por otro lado, si el polimorfismo antigénico es debido a diferencias de la estructura primaria de las moléculas H-2, ellas deben reflejar directamente las secuencias de nucleótidos característicos de sus genes. Por lo tanto, los antígenos H-2 son productos primarios de los genes estructurales H-2.

Cullen (14) y Neauport-Sautes (15), trataron de-

demostrar si las especificidades antigénicas son producidas por un solo gen o existe un gen para cada una de ellas. Para distinguir estas diferentes alternativas, se requiere la información sobre la distribución molecular de las especificidades antigénicas y sobre la estructura de la molécula. Los dos métodos que han contribuido más a la solución de este problema son la redistribución inducida por los anticuerpos y la inmunoprecipitación.

Redistribución por anticuerpos. Cuando los anticuerpos están ligados con antígenos de la membrana celular y las células sensibilizadas se incuban con suero antiglobulina que se fija a los anticuerpos, se altera la distribución difusa normal de los antígenos, los que se agregan en grumos, y se desplazan hacia un polo de la célula. Cuando el anticuerpo marcado con fluoresceína es observado al microscopio el agregado polar semeja un casquete brillante sobre el fondo oscuro de la superficie celular y el proceso se denomina "encasquetamiento".

Esta prueba puede ser aplicada al estudio de la distribución molecular de aloantígenos, ya que cuando dos antígenos están situados en moléculas separadas, no ligadas, el "encasquetamiento" de un antígeno no afecta la distribución difusa del otro y viceversa. Pero si las moléculas portadoras de los antígenos están ligadas en cualquier forma o si ambos antígenos se encuentran en la misma molécula, el "encasquetamiento" de uno de ellos induce el "encasquetamiento" del otro antígeno ("encasquetamiento secuencial o mixto").

Inmunoprecipitación. El segundo método, la radioinmunoprecipitación, es más directo. Las preparaciones antigénicas H-2 purificadas y solubilizadas son obtenidos a partir de células cultivadas en un medio que contiene moléculas de carbohidratos o aminoácidos radioactivos (marcados con ^3H o ^{14}C) que son incorporados a

los antígenos H-2. A continuación, la preparación se trata con anticuerpos contra una especificidad antigénica y con un suero anti-inmunoglobulina. La precipitación de moléculas portadoras de la especificidad antigénica particular provocada por este procedimiento puede ser estudiado detectando el radioelemento.

El segundo paso consiste en analizar con antisuero contra otra especificidad antigénicas y suero anti-inmunoglobulina; una vez más se determina la radiactividad en el precipitado.

Si las dos especificidades antigénicas se encuentran en la misma molécula (o en dos moléculas enlazadas), la precipitación de una de ellas implica que la otra desaparezca del sobrenadante, de modo que el segundo análisis no hay especificidad detectable en el precipitado. Pero si las dos especificidades se encuentran en moléculas diferentes. La precipitación de una no afecta la otra, que se precipitaría en el segundo paso del experimento.

Aplicando estos métodos se demostró que las especificidades privadas K y D se encuentran en moléculas diferentes. Por lo tanto un heterocigoto H-2 tiene al menos cuatro tipos de moléculas H-2, una molécula K y una D para cada haplotipo. Más tarde, se demostró que las especificidades antigénicas se encuentran en moléculas diferentes que las que portan especificidades cifradas en las regiones K y D (16).

Cuando se trataron de estudiar las relaciones entre las especificidades públicas y privadas determinadas por una misma región (K o D) se obtuvo una imagen más complicada. Los análisis indican que la mayoría de las especificidades públicas están en la misma molécula portadora de la especificidad privada. Una excepción notable es la especificidad pública H-2. 28 (17) en la cual se investigó su distribución molecular en el producto antigénico del haplotipo H-2^a donde se encuentra-

por el alelo D^d de la región D. La especificidad privada determinada por este alelo es la H-2.4. Las pruebas de redistribución inducida por anticuerpos han demostrado que el "casquete" de la especificidad H-2.28, a menudo provoca un "encasquetamiento mixto" completo de H-2.4, pero cuando se hace el "casquete" de las especificidades H-2.4, la mayoría de las determinantes de las células quedan no redistribuidas y difusas. Estos resultados indican que hay determinantes H-2.28 localizados en la membrana celular independientes de la especificidad privada H-2.4. Ninguna otra especificidad controlada por el mismo alelo D^d , es independiente de H-2.4 (18).

La independencia de la expresión molecular de la especificidad H-2.28 fue demostrado también por inmunoprecipitación.

Como estos resultados muestran que la región D de H-2 determina dos tipos de cadenas de polipéptidos - (una portando la especificidad H-2.4 y la otra portando H-2.28) se dedujo que deben existir al menos dos genes estructurales, uno para H-2.4 y otro para H-2.28 sin H-2.4 ambos genes son extremadamente polimorfos (19).

Como H-2.28 es expresado por moléculas de la región D diferentes de H-2D, un nuevo locus de la región D, llamado H-2L es responsable de su control. Por consiguiente, en la actualidad se conocen 3 loci que controlan especificidades clásicas H-2: H-2 K en la región K, H-2D y H-2L en la región D (20) Las especificidades privadas de la región K y D actualmente conocidas son portadas por las moléculas H-2K y H-2D respectivamente sin embargo no puede excluirse que cada alelo H-21 produce, además de H-2.28 y su alelo H-2.1, su propia especificidad privada.

El polimorfismo de H-2.3/H-2.1 indica que probablemente estas determinantes, que están en una misma -

molécula, estén controladas por genes separados.

1.5 REGION S.

En 1963, Shereffler y Owen descubrieron una nueva proteína sérica codificada por el complejo H-2. Encontraron que reaccionaban con un antisuero de conejo anti-proteínas séricas de ratón, pero que los valores séricos de la proteína variaban mucho de una cepa murina a otra. La denominaron proteína Ss (Ss suero serológico, porque es detectado por métodos serológicos). Las cepas consanguíneas de ratones se clasifican en dos categorías Ss: con un valor alto de la proteína S.s (Ss - high, alta; Ss-H) y con un valor bajo (Ss-low-baja; Ss-1)-

Se demostró que la diferencia entre las cepas -- Ss- alta y Ss-baja esta determinada por un gene autosómico único, con dos alelos, Ss- alto y Ss-bajo heterocigotos tienen un valor sérico de Ss intermedio. En -- otros estudios genéticos usando haplotipos H-2 recombinantes entre cepas con valores altos o bajos de Ss. Shereffler y col. sitúan el locus Ss en el centro del complejo H-2, entre H- 2K y H-2D. La región que que porta el locus Ss es denominada región S.

Passmore y Shereffler (21) investigaron las variantes alotípicas de la proteína Ss inmunizando ciertas cepas de ratones, con proteína Ss de otras cepas. - En alguna de estas combinaciones de cepas, lograron obtener un antisuero reactivo con todos los sueros Ss altas y no reactivos con Ss bajas. El antisuero reaccionó contra una proteína con una característica muy peculiar: estaba presente en adultos machos y totalmente ausente en las hembras.

La proteína descubierta fué denominada proteína limitada (restringida) por el serco (sex limited protein). El análisis genético ha demostrado que la presencia o ausencia de los antígenos S1p también se hereda. Dos alelos controlan el antígeno S1p, S1p^a determina su presen-

sencia, Slp⁰ su ausencia. Se comportan como caracteres mendelianos simples; los animales heterocigotos -- tienen valores intermedios de Slp y cada alelo puede ser transmitido a la descendencia tanto por el progenito macho como por la hembra. El alelo Slp^a se expresa exclusivamente en adultos machos. Las hembras portadoras el alelo Slp^a no tienen cifras séricas detectables del antígeno Slp. El locus que porta los alelos Slp -- fué situado en la región S del complejo H-2.

Algunas de las propiedades generales de las proteínas Ss y Slp fueron analizadas por Shereffler y Pasmore. Encontraron que ambas son euglobulinas, con la movilidad eletroforética de una $\alpha_2\beta$ globulina. Su peso molecular es de 200,000 aproximadamente y la proteína Ss es una molécula compleja consituída por 3 -- cadenas de polipéptidos con peso molecular de 35 000, 70 000 y 23 000 respectivamente. Las proteínas Ss y Slp conservan su actividad serológica a lo largo de importantes fluctuaciones de pH y resisten temperaturas de 70°C y 52°C respectivamente durante 20 minutos.

Sauders y Edidin (22) estudiaron los sitios de biosíntesis en ratones con Ss alta con técnica de inmunofluorescencia y mostraron que la proteína Ss puede ser detectada en el citoplasma de macrófagos y hepatocitos, siendo cultivadas estas en un medio con amino--ácidos readioactivos secretan proteínas Ss radiactiva en el sobrenadante, confirmado así que se sintetiza activamente este componente sérico.

En cepas con Ss-alta, el contenido de proteína Ss del suero de ratones machos es generalmente el doble de las hembras. La proteína Slp está ausente del -- suero de ratones hembras de cepas Slp^a. Desaparece -- del suero de machos Slp^a consecutivamente a la castra--ción y puede ser inducido por un tratamiento con andrógenos en machos castrados y en hembras de cepas Slp^a. -- Es más, el mutante Tfm (testicular feminization- femi-

nización testicular), que bloquea la expresión de caracteres dependientes de los andrógenos, impide la aparición del antígeno SIp en el suero de machos adultos de cepas SIp^a, - por lo tanto la expresión de los productos del locus Ss está regulada por las hormonas masculinas (23).

Démant y col (24) descubrieron que la proteína Ss es un componente del complemento. Más tarde se demostró que su acción es homóloga a la del componente C₄ del complemento humano.

Analizando el control genético del complemento sérico en ratones de cepas endogámicas y de cepas congénicas,[#] encontraron que el genotipo H-2 tiene un efecto significativo sobre la actividad de complemento (25). Además se encontró una sorprendente correlación entre el valor de la proteína Ss y la actividad de complemento. Las cepas de ratones con alelos Ss-alta SIp^a poseía la más alta actividad de complemento mientras que las cepas con alelos Ss-alta SIp^o tenían actividad intermedia y las cepas con alelos Ss-baja-SIp^o mostraron actividad más baja (24).

Se sugiere la posibilidad de que la proteína Ss fuera un componente de complemento, porque la actividad del complemento del suero de ratón era abolida al añadir anticuerpo anti-Ss (26).

Poco tiempo después de descubrirse que Ss, producto de un gen del complejo H-2, es un componente del complemento, fueron reveladas las asociaciones entre el sistema MHC humano (HLA) y ciertos componentes del complemento, los cuales se discutirán más adelante.

Cepa Congénica: Cepa de animales desarrollados a partir de una cepa isogénica por cruzamientos repetidos con animales de otra camada que tienen un gen extraño.

1.6 REGION I.

La región que se encuentra localizada entre Ss y H-2K fué denominada I, los genes localizados en esta región codifican para especificidades antigénicas denominadas Ia (asociadas a la región I) (27) que fueron inicialmente denominadas Ir 1.1, Lna o beta, existen también localizados los genes de la respuesta inmunitaria (Ir) asociados con el complejo H-2 en esta región I.

Hasta ahora, se han descubierto más de 20 especificidades antigénicas Ia, designadas con números arábigos Ia1, Ia.2, Ia.3, etc. No existe relación entre las especificidades Ia1 y H-2.1, Ia.2 y H-2.2 etc. Las especificidades que pertenecen probablemente a la clase Ia pero no están localizados con precisión, se designan con el prefijo W; por ejemplo: Iaw. 16, Iaw. 17, etc.

Los antisueros que llevaron a el descubrimiento de especificidades Ia fueron de pares recombinantes donador-receptor difiriendo en la región I del complejo H-2. La mejor manera de producir un suero anti-Ia consiste en inmunizar con células linfoides cepas portadoras de alelos idénticos en las regiones K o D y diferentes en la región I. El antisuero producido por este tipo de combinaciones, contiene anticuerpos anti-Ia puros, es decir, sin contaminación de anticuerpos anti-H-2K o anti-H-2D. Sin embargo, los anticuerpos anti Ia se producen también cuando el receptor y el donador difieren de la región K o D de H-2 como en la región I. En este caso el antisuero resultante contiene una mezcla de anticuerpos anti H-2 y anti Ia (28).

Los genes de la mayoría de las especificidades Ia están localizados en la región I, sin embargo, algunos de estos genes no han sido localizados con precisión pues se carece de cepas recombinantes de ratón con una variedad suficiente de puntos de entrecruzamiento dentro del complejo H-2 (6).

El estudio de muchos haplotipos recombinantes ha demostrado que también puede ocurrir entrecruzamiento dentro

de la región I. Esto sucede tanto en los genes de especificidades I_r y también I_a.

La primera demostración de recombinantes intrarregión I fué proporcionado por Lieberman (29) quien localizó los genes I_r que controlan la respuesta inmunitaria a los alotipos IgG e IgA.

Los recombinantes disponibles en la actualidad dividen la región I en cinco subregiones: I-A, I-B, I-J, I-E e I-C.- Muchos de los genes de la especificidad I han sido asignados ya a su subregión individual mientras que los demás podrán ser localizados con precisión sólo cuando se descubran nuevos haplotipos recombinantes que aporten la información necesaria. El mapa de la localización de los genes de las especificidades I se encuentran en la Figura 4.

| Subregión | I-A | I-B | I-J | I-E | I-C |
|-----------|---|-----|---------|-----|-----------|
| | 1, 2, 3+, 8, 9, 11, 17, 18, 19, 20+ | | | | 6, 7, 21+ |
| | | | | 22 | |
| | 4, 5, 12, 13+, 15 | | | | |
| | | 16 | | | |
| | | | 10, 14. | | |

+Especificidades dispuestas en el mapa según sus asociaciones moleculares con otras especificidades de la misma región.

Fig. 4. Mapa de los genes de especificidades I_a Adv. Immunol 1979, 20:125.

Aún no se ha resuelto el fascinante e impenetrable -- problema de la distribución de las especificidades antigénicas en los tejidos. Cuando se analiza suspensión de linfocitos de sangre periférica, del bazo o de los ganglios -- con antisueros anti-la en pruebas de citotoxicidad, una porción importante de los linfocitos no es destruida, aún cuando el antisuero utilizado da reacciones positivas en diluciones altas. El porcentaje de células destruidas varía según el antisuero y la técnica, es más elevada en la prueba de microcitotoxicidad que en la de citotoxicidad con liberación de 51 Cr; generalmente se destruyen de 40-60% de los linfocitos esplénicos (30). El contraste es muy grande cuando se compara los resultados obtenidos con sueros contra especificidades antigénicas H-2K o H-2D en los que todos los linfocitos son destruidos. Es evidente que en la prueba -- de linfocitotoxicidad anti-la se destruye sólo una subpoblación de linfocitos.

Las determinantes la son expresadas, sobre linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T (7). se ha demostrado en pruebas funcionales, que células T colaboradoras y -- las células T supresoras, portan antígenos la con diferentes especificidades para unas u otras y son controladas por subregiones diferentes. Las especificidades la en las células T supresoras son cifradas por la región I-J. Estos sucesos demuestran que los antígenos la son marcadores de células T funcionales (31).

Además de su presencia en linfocitos, los antígenos -- la han sido detectados sobre células de hígado fetal, macrófagos, células epidérmicas y espermatozoides. No están presentes sobre células rojas, plaquetas, músculo, cerebro y -- una gran variedad de otros tejidos (32, 33, 34).

Las especificidades la están formadas por dos cadenas de glucoproteínas con peso molecular de 33 000 y 26 000 (16) Las especificidades la producidos por las diferentes subregiones de la región I son también portadas por moléculas diferentes. Al contrario de los antígenos H-2, los antígenos -- la no están asociados con las cadenas de beta-2-microglobulina. Su especificidad antigénica así como la de H-2 parece

ser determinada por la composición de aminoácidos de las -- cadenas y no por la porción de carbohidratos adheridos a -- ellas. Sin embargo McKenzie (35) demostró que algunas de -- las moléculas de los determinantes antigénicos la son car-- bohidratos.

Las especificidades la están controladas por la re-- gión I que verifica también otras importantes y variadas -- funciones. Contiene genes de respuesta inmunitaria (I_r), ge-- neradores productores de las determinantes de la actividad lin-- focítica (Lads) para MLR, los de estimulación de células -- efectoras (ECS) para CML, y antígenos de histocompatibili-- dad. Además, los productos de la región I participan en la-- cooperación de linfocitos T y B durante la respuesta immu-- nitaria, que será discutida a continuación.

1.7 Generas de la respuesta inmunitaria (I_r).

El hallazgo de que los genes de la respuesta inmunita-- ria están situados en el mismo segmento de cromosomas, jun-- to a los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el ratón (H-2), constituyó un gran adelanto y uno de los -- descubrimientos más importantes para la comprensión de la -- biología del MHC y del sistema inmunológico en general.

A partir de 1960 grupos de investigadores se interesa-- ron en el análisis del control genético de la respuesta in-- munitaria. Inmunizando animales de diferentes cepas congéni-- cas de varias especies (ratón, cobayo, rata, conejo) con di-- ferentes antígenos, y evaluando la intensidad de la respues-- ta inmunitaria resultante, fue posible demostrar importan-- tes diferencias de capacidad de respuesta inmunitaria entre las especies (36). En 1938 Gorer y Schultze habían demostra-- do que las diferentes cepas congénicas murinas difieren -- en su capacidad de producir anticuerpos contra polisacári-- dos del neumococo, y que estas diferencias estaban contro-- ladas genéticamente. Más tarde, se practicaron experimentos en los que utilizaron antígenos producidos sintéticamente -- con determinantes antigénicos relativamente simples. Cuan-- do estos antígenos fueron inyectados a animales produjeron un espectro de anticuerpos limitados. Utilizando poli-L-I-

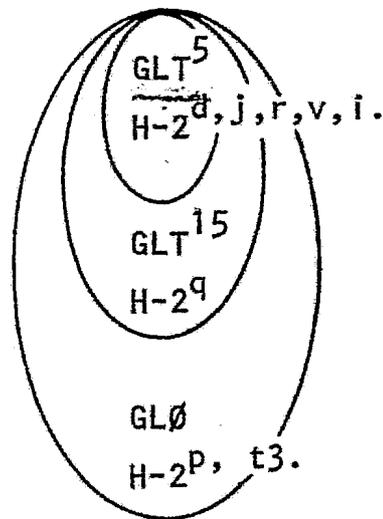
sina (PLL), Benacerraf demostró que unas cepas endogámicas de cobayo produjeron anti-PLL y otras no. Esta diferencia - esta controlada por un gen, denominado gen PLL. Así mismo - en el ratón, al utilizar polipéptidos con ramificaciones -- sintéticas (T,G)-A--L, (Phe,G)-A--L, se detectaron importantes diferencias en la producción de anticuerpos entre las-- diferentes cepas endogámicas (36). Los estudios genéticos - ulteriores demostraron que el control depende de un solo -- gen, que los autores denominaron Ir-1 (respuesta inmune-1). Utilizando cruces entre cepas que respondan de manera fuerte o débil, Mc Devit y Tyan (37) demostraron con generaciones segregadas por retrocruzamiento, que cualquier ratón habiendo recibido por lo menos un haplotipo H-2 de las cepas- de respuesta fuerte, respondían con intensidad, mientras -- que los ratones portadores de haplotipos H-2 de las cepas - de respuesta débil, respondían levemente. Este descubrimiento estableció que el gen Ir-1 debía encontrarse muy cerca o formado parte del complejo H-2, lo cual fue confirmado más- tarde utilizando cepas congénicas H-2. Las cepas murina con el mismo haplotipo H-2 pero con genes no-H-2 diferentes poseen los mismos genes Ir, mientras que las cepas congénicas H-2 que portan los mismos genes no H-2 pero diferentes H-2, tienen diferentes genes Ir. Finalmente en un estudio de - McDevitt (38), utilizando ratones con haplotipos H-2 recombinantes, se localizó la situación del gen Irl dentro del - complejo H-2.

Desde 1968, el control genético de la respuesta a numerosos antígenos ha podido ser localizado en muchos casos - en el complejo H-2. Estos estudios han evidenciado varios - genes Ir dentro de la región I. Muchos genes Ir han sido encontrados en la subregión I-C, incluyendo el que controla - la respuesta inmunitaria a los polipéptidos GAΦ. Se debe -- aclarar, sin embargo que además de los genes Ir enlazados - H-2, existen otros genes Ir independientes de H-2. Algunos- de ellos están ligados a los genes del alotipo de inmunoglobulina de cadena pesada, otros se encuentran en el cromosoma X (39).

Los genes Ir son específicos: por ejemplo, cada haplotipo H-2 contiene genes que determinan respuestas fuertes --

a algunos antígenos, y no existen relaciones obvias entre las formas de respuesta fuerte y débil a antígenos afines.

Sin embargo, cuando se estudiaron antígenos poseedores de estructuras semejantes, se tomó un aparente sistema de inclusión. Ningún haplotipo determina una respuesta fuerte o débil general a todos los antígenos, Figura 5.



H-2^{d, j, r, v, i}

responden sólo a GLT⁵

H-2^q

responde a GLT¹⁵ y GLT⁵

H-2^{p, t3}

responde a GLØ, GLT¹⁵ y GLT⁵

H/2^{a, b, f, k, s, v, i, l, r.}

no responden.

Figura 5. "Sistema de Inclusión de los antígenos" J. exp. med. 1976, 143;889.

Los genes Ir ligados a H-2 que determinan las respuestas fuertes, son dominantes en relación a los que determinan respuesta débil al mismo antígeno. Por lo tanto híbridos F1 entre cepas que responden fuerte y débilmente, responderán fuertemente.

Varios genes Ir ligados al MHC pueden participar en -

el control de la respuesta inmunitaria a un antígeno.

Dorf, Stimpfling y Benacerraf (41) demostraron que la respuesta inmunitaria a los polipéptidos sintéticos GLT y -GLO- es controlada por dos genes, uno en la región I-c y -- otro en la región I-A. Un ratón debe poseer por lo menos un alelo de respuesta fuerte en cada uno de estos loci para -- poder responder fuertemente.

Los genes Ir se expresan en células linfoides, y esto se comprueba transfiriendo suspensiones de células linfói-- des de cepas que responden fuerte o débilmente, a recepto-- res irradiados portadores de uno y otro genotipo (débil o - fuerte); el ratón así restaurado adquiere el mismo fenotipo que la cepa donadora.

Sin embargo, al intentar establecer si los genes Ir - asociados al MHC son expresados en linfocitos T o linfoci-- tos B los resultados son complejos.

Se ha utilizado el método de dilución celular al lími-- te para poder resolver este problema. El sistema se basa en en la inyección de un número excesivo de células de un tipo (timocitos) como origen de células T a animales irradiados, administrando al mismo tiempo cantidades restringidas de -- otro tipo, en este caso médula ósea conteniendo linfocitos- B, utilizando como donadores células de ratones de respues- ta débil o fuerte, se puede determinar en los animales que- responden débilmente, cual es el tipo celular funcionalmen- te deficiente. Se demostró que algunas respuestas débiles - eran debidos a defectos de las células T, pero en otros ca- sos, defectos en células B sin que hubiera transtornos fun- cionales en células T; esto aparentemente se puede explicar sobre bloqueo de la cooperación células T y B.

Las células de animales que responden débilmente no - provocan los efectos inmunológicos dependientes de función- de células T, como es la incapacidad de cambiar la produc-- ción de anticuerpos IgM (T independientes), por anticuerpos IgG (T dependientes), la mayoría de los casos en la cual -- existe respuesta débil producen anticuerpos IgM tan eficaz-

mente como los de respuesta fuerte, pero no producen anticuerpos IgG. Se sabe que este cambio depende de células T colaboradoras.

Los genes Ir no afectan la capacidad intrínseca de las células B de producir anticuerpos contra determinantes antigénicos, pero afectan la función de la molécula antigénica portadora.

El efecto específico en los fenómenos inmunológicos dependientes de las células T en los receptores débiles, refleja simplemente el hecho de que el gen o los genes del MHC que cifran el o los receptores de las células T y por lo tanto la o las clonas correspondientes en estas células también están ausentes.

Kapp (43) usa un antígeno controlado por los genes Ir asociados a H-2 y demuestra que ciertos animales con sensibilidad baja podían producir, previa inmunización, población de células T específicamente activas, sin embargo estas células T actividades tienen una acción supresora (en vez de colaboradora) específicamente sobre la respuesta inmunitaria del antígeno. Los genes responsables son denominados genes Is, por lo que se puede decir que la inmunosupresión esta mapeada dentro de H-2 y cofician por medio de la región I-J unos receptores para linfocitos T que son antígenos la (31).

Katz (44) analiza las limitaciones genéticas de la cooperación entre células T-B, inyectando a ratones normales irradiados, con varias combinaciones de suspensiones de células T y B provenientes de diferentes donadores alogénicos y encontraron que la cooperación óptima entre células T y B en respuestas inmunitarias ocurre sólo cuando las células T y B inyectadas tienen el mismo haplotipo. El fracaso de la cooperación entre células T y B en las combinaciones H-2 incompatibles no se debe a una reacción aloinmunitaria entre células T y B alogénicas, puesto que células de híbrido F1 (heterocigoto H-2) y las células B de la cepa paterna (homocigoto H-2), reaccionan mutuamente y cooperan-

como las células T y B singénicas. Lo mismo sucede con las células T paterna y las células B de híbridos F1 que tienen un haplotipo H-2 de las células T. La porción crítica de -- H-2 de la cual depende la cooperación eficaz de células T y B es la región I compartiendo idénticas sub-regiones I-A y I-B.

Taussing y Munro, aislaron un factor soluble capaz de substituir específicamente las células T aportando células-B productoras de anticuerpos. Este factor sólo puede ser -- inhibido por un antisuero anti-I específico, por lo que indica que el factor soluble de cooperación de las células T es un producto de la región I.

Además de la cooperación de células T y B en la res-- puesta inmune, existe la cooperación fundamental entre las células T y macrófagos.

Analizando la Respuesta Inmune, sabemos que se inicia con la introducción de una molécula extraña, "antígeno" al organismo, la inmunidad celular identifica primero al antígeno como extraño, discriminando estas moléculas extrañas de moléculas de nuestro organismo, subsecuentemente se desarrollan un número de funciones efectoras, que incluyen formación de anticuerpos (Igs), desencadenamiento del sistema de complemento y células mediadoras (macrófagos, linfocitos T y linfocitos B).

Se ha demostrado que la activación de células T depende de la presentación apropiada del antígeno por los macrófagos. Se sabe que los macrófagos y células T deben ser compatibles en sus respectivos haplotipos para H-2, existe la evidencia de que el requisito de compatibilidad concierne a la subregión I-A.

El macrófago posee moléculas la que controlan reconocimiento de antígenos por células T, en el contacto inicial de presentación las células T reconocen al antígeno y las moléculas la, después de este contacto los macrófagos secretan un factor soluble que estimula proliferación y diferenciación de células T.

Para explicar este reconocimiento, se tienen dos hipótesis: la primera asegura que el linfocito T tiene dos receptores de membrana, uno interactúa con la molécula la del macrófago y el otro receptor es para el antígeno. La segunda hipótesis postula que tiene un sólo receptor, para moléculas la del macrófago y ahí mismo se une al antígeno; el resultado de cualquiera de estas dos hipótesis, es que el factor secretado por el macrófago estimula células T.

Los genes Ir operan a nivel macrófago, haciendo posible señalar la clona específica de linfocitos T que estimulara, una vez que las células T han sido estimuladas, se efectúa interacción linfocito T y linfocito B, llevando a la producción de anticuerpos.

Las células B reaccionan con los determinantes hápténicos, las células T cooperadoras, reaccionan con los determinantes antigénicos de las moléculas proteica (portadora) a la cual estan fijados los determinantes hapténicos, la cooperación T-B ocurre únicamente cuando los determinantes hapténicos están fijados a la molécula portadora, nunca con cada uno aislado, es probable que el mecanismo de cooperación T-B consista en que las células T se ligen a la molécula portadora, presentando los determinantes hapténicos a las células B en una forma más aceptable, las células B al contacto con el antígeno, liberan sustancias solubles específicas e inespecíficas que facilitan la activación de linfocitos B resultando en la producción de anticuerpos, esto requiere de dos señales una por parte del antígeno y otra por el linfocito, la cooperación óptima entre células T y B es cuando comparten idénticas subregiones I-A y I-B, que ya ha sido mencionado. Estos pasos conforman la respuesta inmune humoral. (45).

La respuesta inmune celular, también esta relacionada con los antígenos mayores de Histocompatibilidad.

En ratones la expresión de funciones de células T activadas parece estar dictado en alguna forma por genes del complejo H-2.

La lisis específica por células T citotóxicas ocurre eficientemente, si las células blanco infectadas por virus o aún con bacterias (46) comparten haplotipo H-2 compatibles, los genes requeridos mapean en la región K ó D del complejo H-2 (45).

Esta identidad necesaria de las regiones K ó D se ha explicado por dos hipótesis (47,48).

1o. Los virus o sustancias químicas alteran los antígenos H-2 y esto es reconocido por células T citotóxicas.

2o. Reconocimiento Dual que implica un doble reconocimiento, unos receptores reconocen K o D y otros al virus.

La mayor parte del trabajo experimental apunta a la Dual.

Los genes Ir, operan en la producción de patrones antigénicas en células T estimuladoras, las cuales dictan la cantidad de respuesta de células T cooperadoras y células B.

Esta operación de genes Ir la efectúa por medio de una batería de enzimas glicosil-transferasas, las cuales glicosilan al antígeno no modificándolo.

1.8 RELACION H-2 y HORMONAS.

La asociación entre el MHC y las hormonas fué establecida por primera vez en el ratón en los trabajos de Ivanyi (49), quien descubrió que el peso de los testículos, de las vesículas seminales, del timo y de los ganglios, así como de otros órganos varía entre las diferentes cepas murinas y que los genes del complejo H-2 son responsable de algunas de esas variaciones. El hallazgo de que el peso de esos órganos es influenciado por las hormonas andrógenas, justificó la hipótesis de que el sistema H-2 afecta en alguna forma; el metabolismo de esas hormonas, esta teoría fue reforzada por el descubrimiento de que el complejo H-2 contiene genes que influyen la concentración sérica de tes-

tosterona. Se denominó Hom-1 ("Hormone metabolism-1, metabolismo hormonal-1") a el o los factores genéticos responsables y se les situó provisionalmente (y de una manera aproximada) en el centro del mapa del complejo H-2. Otro grupo de investigadores obtuvieron evidencias indirectas en favor de la teoría de la implicación del MHC en el control genético de la actividad hormonal. Demostraron que el tipo H-2 afecta: (1). La cantidad de AMP cíclico (cAMP) en las células hepáticas y (2). La actividad enzimática implica el metabolismo del cAMP. Se sabe que el cAMP es el mediador celular de numerosas hormonas y las variaciones de su metabolismo dependientes de H-2 pueden influir el efecto de esas hormonas en los tejidos. Las hormonas esteroideas afectan el tamaño y la composición del tejido linfático y, como ya fue señalado, Ivanyi demostró que el peso del timo y los ganglios linfáticos así como la proporción de los diferentes tipos de células linfáticas, son influenciados por el H-2.

Es posible que el MHC codifique los receptores hormonales de las células, pero es muy difícil hacer un análisis profundo de estos mecanismos. (23)

1.9 RELACION H-2 y ONCOGENESIS VIRAL.

Se sabe desde hace tiempo que ciertas cepas endogámicas de ratón son más susceptibles a la oncogénesis, inducida por virus que otras. Algunas, pero no todas esas diferencias, se deben a genes ligados a H-2 o incluidos en el complejo H-2. Uno de esos genes (Rgv-1) gobierna la resistencia a la leucemogénesis inducida por el virus de Gross y está localizado en el extremo K de H-2, mientras que la resistencia a la oncogénesis viral de tumor de mama y a la leucemogénesis inducida por el virus de Friend (Rfv-1) parecen ser controladas por genes situados en el extremo D del complejo H-2 (50).

Como otros caracteres el control enlazada a H-2 de la oncogénesis viral puede incluir no sólo uno, sino varios genes del complejo H-2, controlado cada uno de ellos en mecanismos diferentes, por ejemplo el locus Rgv-1 no afecta el paso inicial (susceptibilidad a la infección) sino más --

bien a desarrollos posteriores, la capacidad de rechazar -- las células infectadas y transformadas. Este no es el único mecanismo con que H-2 controla la oncogénesis viral; otro - es la influencia del gen Rfv-1 sobre la infección del virus de Friend determinando la capacidad de las células infectadas de inmunizar al huésped (51).

II. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL
HOMBRE (HLA).

2.1 INTRODUCCION.

En el humano, como en los anfibios, aves y otros mamíferos estudiados, hasta la fecha, existe una región cromosómica que contiene genes de importancia fundamental para las respuestas inmunitarias. Estos genes incluyen, los genes de histocompatibilidad HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) y los genes para algunos de los componentes del sistema de complemento.

En el ratón, esta región contiene también genes Ir -- que controlan la respuesta inmunitaria contra antígenos específicos. Aunque dichos genes no se han demostrado en el humano en forma definitiva su existencia es deducida por la semejanza del MHC en otros mamíferos.

Los genes de esta región, pudieron haber resultado durante la evolución, por un proceso de autoduplicación de un sólo gen de la respuesta inmunitaria, proporcionando la ventaja de la supervivencia distinguiéndose los antígenos extraños de los "autoantígenos", la etapa inicial requerida para la eliminación de las células extrañas o de los microorganismos.

El conocimiento de los genes HLA, ha sido de gran importancia práctica en el trasplante de órganos, en la transfusión de plaquetas y granulocitos, en el diagnóstico de enfermedad y el establecimiento de riesgos relativos para algunos padecimientos, en las investigaciones antropológicas y en las pruebas para la determinación de la paternidad. Todo esto será revisado a continuación en el presente capítulo.

2.2 HISTORIA.

El gran interés que existe por el estudio del Complejo Mayor de histocompatibilidad en el ratón (H-2), es debido a su gran similitud con el del hombre.

Como se mencionó con anterioridad en 1936, Gorer describe el MHC en el ratón y en el hombre se describe varios -

años después.

Los estudios iniciales se realizaron hacia 1952 por J. Dausset, cuando detectó aglutininas en el suero de pacientes con leucopenia; basándose en el hecho de que anemias hemolíticas pueden ser cuasadas por anticuerpos en contra de las células rojas del pacientes; parecía lógico admitir que los anticuerpos en el suero de pacientes leucopénicos eran formados en respuesta a leucocitos extraños debidos a las transfusiones sanguíneas a las que eran sometidos los pacientes.

Tratando de investigar más sobre estos anticuerpos; se tomaron sueros de pacientes leucopénicos y se hicieron reaccionar contra un panel de leucocitos de individuos sanos tomados al azar, casi siempre se encontraba una reacción positiva, entonces se pensó que los anticuerpos eran dirigidos contra un antígeno presente en los leucocitos de un 50% de individuos. Este antígeno se identificó como MAC, ahora denominado HLA-A2 (52).

En 1958 Van Rood y R. Payne definen aglutininas leucocitarias en el suero de mujeres multíparas producidas por estimulación materno-fetal. Van Rood basándose en reacciones de aglutinación y en análisis estadístico computarizado define un sistema de dos alelos, el cual llamó "Grupo 4"; 4a y 4b los cuales hoy se denominan Bw4 y Bw6 (53).

Payne usando métodos estadísticos define en 1964 un sistema alelico independiente el cual llamó LA, L-Leucocito y A para el primer locus, el cual hoy se denomina HLA-A (54).

El desarrollo del sistema HLA ha sido estimulado por la creación de una serie de Talleres Internacionales de Histocompatibilidad (International Histocompatibility Workshops), que tiene bajo su control la coordinación y estandarización de técnicas, la comparación y consolidación de resultados y la definición unificada internacionalmente de los antígenos.

El primer Taller fué organizado en 1964 por D.B. Amos en el cual se trató de intercambiar y estandarizar reactivos y técnicas, analizaron y discutieron resultados obtenidos por los diferentes laboratorios participantes. El segundo y tercer Taller fueron organizados por J.J. van Rood en 1965 y R. Cepellini en 1967. De esta reunión resultó obvio que había cuando menos 2 loci separados para HLA Tabla (1).

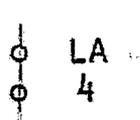
| | Alelos LA | Alelos 4 |
|---|-------------------------|-------------------------|
|  | HL-A1 HL-A2 HL-A3 | HL-A5 HL-A7 HL-A8 |
| | 3 alelos | 3 alelos |
| Total=6 | | |

Tabla (1). Loci del Complejo HLA en 1967.

Estos loci estaban suficientemente cercanos, sobre el mismo cromosoma de manera que los dos antígenos que eran -- productos de un sólo cromosoma eran heredados siempre juntos, pero estos loci, estaban lo suficientemente separados-- como para que ocurriera entrecruzamiento, aproximadamente -- del 1% (55, 56).

El taller organizado en 1970 por P.I. Terasaki (57), -- aumentó el número de antígenos reconocidos de 6 a 20 introdujo la práctica de aplicar el prefijo w (de workshop) a los antígenos que sólo eran aceptados provisionalmente Tabla -- (2).

| | Alelos La | Alelos 4 |
|--------|-----------|----------|
| o LA | HL-A1 | HL-A5 |
| | HL-A2 | HL-A7 |
| | HL-A3 | HL-A8 |
| o 4 | HL-A9 | HL-A12 |
| | HL-A10 | HL-A13 |
| | HL-A11 | W5 |
| Número | W -28 | W10 |
| de | | W14 |
| alelos | | W15 |
| LA 7 | | W17 |
| 4 13 | | W18 |
| 20 | | W22 |
| Total | | W27 |

Tabla (2) Loci del Complejo HLA en 1970.

J. Dausset en 1972 organiza el quinto Taller (58) el-- número de antígenos había aumentado a 41. Algunos antígenos provisionalmente reconocidos fueron subdivididos en subti-- pos y parecía aparente que existía un tercer locus que era-- responsable de MLR (Reacción de Linfocitos en Cultivo Mix-- to), el gen MLR parecía estar alejado del gen 4 y del LA. La frecuencia de entrecruzamiento entre el gen 4 y el gen MLR-- es aproximado de 0.5%.

En el Taller de 1975, el número de los loci del complejo HLA había aumentado a 4, el número de antígenos se había elevado a 51, el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomendó un cambio en la terminología; HLA-A para el antiguo locus LA, HLA-B para el locus 4. Se define el tercer locus HLA-C, el cual se determina serológicamente. El locus MLR fue cambiado a HLA-D, Tabla (3).

| | Locus A | Locus B | Locus C | Locus D |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| | HLA-A1 | HLA-B5 | HLA-Cw1 | HLA-Dw1 |
| | -A2 | -B7 | HLA-Cw2 | -Dw2 |
| HLA-A | -A3 | -B8 | -Cw3 | -Dw3 |
| | -A9 | -B12 | -Cw4 | -Dw4 |
| HLA-C | -A10 | -B13 | -Cw5 | -Dw5 |
| HLA-B | -A11 | -B14 | | -Dw6 |
| | -A28 | -B18 | | |
| HLA-D | -A29 | -B27 | | |
| | -Aw19 | -Bw15 | | |
| Número de | -Aw23 | -Bw16 | | |
| alelos | -Aw24 | -Bw17 | | |
| A 20 | -Aw25 | -Bw21 | | |
| B 20 | -Aw26 | -Bw22 | | |
| C 5 | -Aw30 | -Bw35 | | |
| D 6 | -Aw31 | -Bw37 | | |
| | -Aw32 | -Bw38 | | |
| | -Aw33 | -Bw39 | | |
| Total | -Aw34 | -Bw40 | | |
| | -Aw36 | -Bw41 | | |
| | -Aw43 | -Bw42 | | |

Tabla (3). Loci del Complejo HLA en 1975.

El Taller Internacional de Histocompatibilidad de 1977, aumenta el número de antígenos identificados a 77 y confirmó la existencia de un quinto locus posible con una

serie de alelos importantes -DRw1, DRw2, DRw3, DRw4, DRw5, -DRw6, DRw7 determinados serológicamente.

Los siete antígenos HLA-DR reconocidos oficialmente - parecen productos de un sólo gen dentro de la región HLA, - un gen que puede ser el gen HLA-D o íntimamente ligado a -- él. Esta hipótesis está apoyada por que existe una relación clara entre los productos de los genes HLA-D y DR; la terminología DR significa "relacionado con D". Los números de -- los antígenos DR1 al DR7 corresponden a los determinantes - del gen HLA-D con los cuales están correlacionados. La de-- tección de un determinante HLA-D por la técnica de HTC (células Homocigóticas para Tipificación) casi siempre está -- asociado con el hallazgo del antígeno DR correspondiente -- sobre la tipificación de las células B, mediante linfocito-- toxicidad. Existe evidencia adicional que está proporcionada por el hecho de que los antisueros contra linfocitos B - bloquean la MLR reaccionando con las células estimuladoras y por el hecho de que la célula estimuladora parece ser un linfocito B. Sin embargo hay evidencias que apoyan la hipótesis de que los genes HLA-D no son idénticos a los genes - HLA-DR. Además de algunos ejemplos donde los determinantes D y DR de la misma célula parece que no corresponden (59).

El Taller de 1980, no reconoció nuevos antígenos en - el locus HLA-A. En el locus B los fragmentos B8, B15, B17, - Bw22 y B40 alcanzaron reconocimiento oficial. El Cw7 y Cw8 - fueron agregados a la lista del locus C. Para evitar confusión con la terminología del complemento, el prefijo temporal "w" no será eliminado de la nomenclatura de los antígenos del locus C ya caracterizados. El HLA-Dw12 es nuevo. -- En el locus DR los antígenos DR1, 2, 3, 5, 7, ya no requieren "w". El DRw8 el w9 y el w10 son nuevos y no se correlacionan con los antígenos DW que tienen los mismos números.- Las pruebas crecientes indican que los genes D y DR no son idénticos. En la actualidad, la interrogante de que si los genes D y DR constituyen productos idénticos de un sólo locus genético debe considerarse sin respuesta (60).

2.3 MAPA GENETICO.

El sistema HLA ha sido localizado en el brazo corto - del cromosoma 6, por hibridización celular (61) y estudios familiares (62,53). El Complejo HLA se ilustra en la figura (6), esta compuesta por cinco loci mayores, cada uno codificado para antígenos de superficie celular. Estos loci son designados HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DR (13).

Los genes estructurales que determinan componentes de la vía clásica de Complemento C2 y C4 (65,66) se encuentran mapeados dentro de la región HLA. C2 se encuentra cercano a el locus HLA-D; su ubicación exacta aún no es bien conocida.

El factor C4 se encuentra entre HLA-D y HLA-B, la distancia comprendida entre C4 y el loci HLA-B es de 0.6 cM, mientras que la distancia de C4 a HLA-D es de 1.0 cM (67).

Estudios recientes sugieren que el polimorfismo de C4 es controlada por dos genes ligados a HLA (68,69). Los genes que cifran para los grupos sanguíneos Chido y Rodgers que se encuentran mapeados en esta región son los responsables de el polimorfismo de C4. En estudios realizados por Neill (70), se sabe que el antígeno Chido es un componente de la molécula C4S y que el antígeno Rodgers es el componente de la molécula C4F y son controlados por dos genes distintos y que ambos estan cercanos a el locus HLA-B.

Tilley (71) muestra que los antígenos Chido y Rodgers residen sobre el fragmento C4d de la molécula C4.

El factor B (Bf) de la vía alterna de Complemento está también localizado entre el locus HLA-B y C4 (72, 73). Aunque en reportes recientes, se han encontrado evidencias para suponer que los genes Bf y C2 de complemento están fuera de la región HLA; sugiriendo que el orden de los genes debe ser; pter-HLA-A, HLA-C, HLA-B, HLA-D/DR (Bf, C2)-----PGM₃-----centrómero (74).

Receptores para C3b y C3d, fragmentos de C3 son también ligados a HLA (75). La deficiencia del factor C8 fue ligado a HLA-B por Merritt (76), pero otros estudios de deficiencia de C8 muestran que no existe ligamento (77). Se sabe que C8 esta compuesto de tres cadenas al igual que C4 (78) y puede ser posible que una de las cadenas pueda ser ligada a HLA.

El locus para Hiperplasia Adrenal Congénita (Deficiencia de 21-hidroxilasa) se encuentra cercano al locus HLA-A (79). El locus que determina la enzima Glioxalasa GLO para células rojas esta aproximadamente a 5 centimorgans a la izquierda de HLA-D (80). Fosfoglucomutasa-3 (PGM 3) esta a una distancia de 15 cM de HLA en varones (81).

Los genes localizados en el cromosoma 6 pero no cercanos a HLA incluyen superoxida-dismutasa-2 (SOD-2), enzima málica-1 (ME1) (82), un receptor para células rojas de mono (83), mitocondrial glutamato oxalacetato transaminasa (GOTm) (84). Gen o genes para cadenas pesadas de Inmunoglobulinas y alfa-1-antitripsina (85). Se ha reportado ligamiento de pepsinógeno-S urinario y HLA, pero es dudoso aún (86).

.....

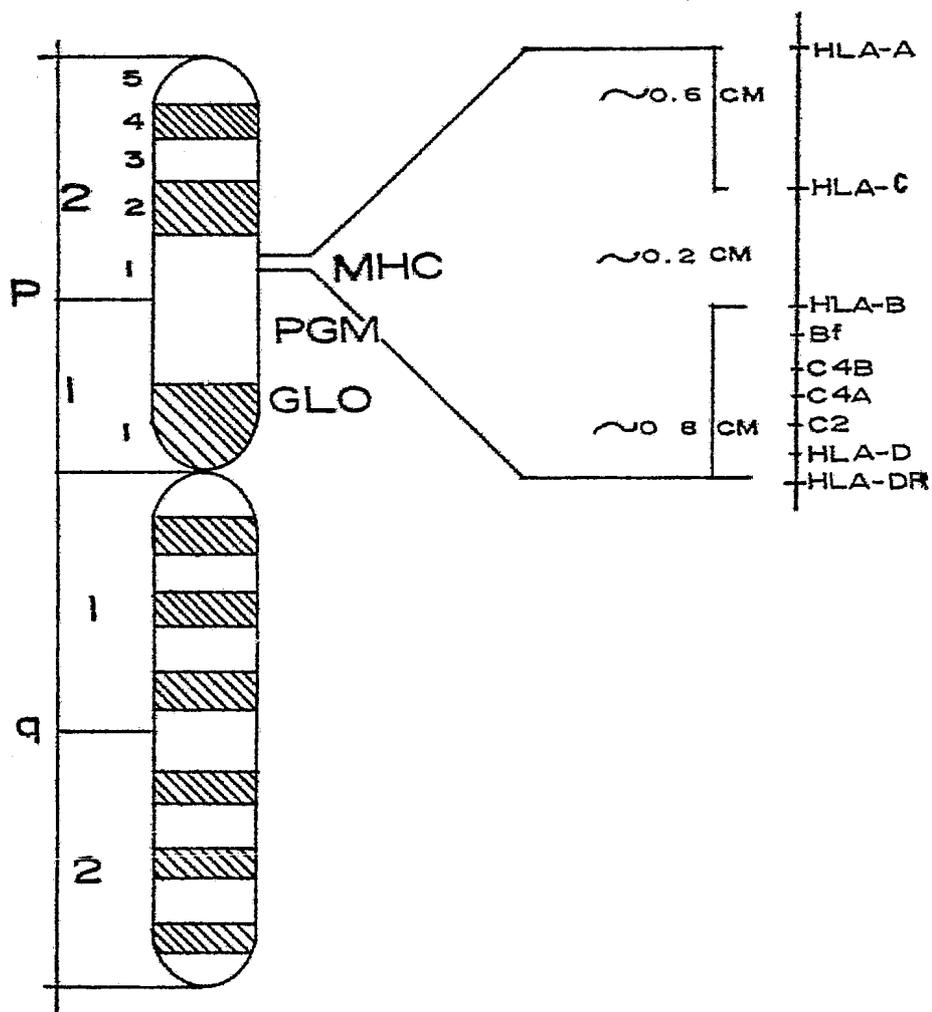


Figura (6). Localización de genes del Complejo HLA en el cromosoma 6. Adv. Hum. - Genet. 10:137 (1980).

2.4 TERMINOLOGIA.

Después de cada Taller de Histocompatibilidad (desde el 3o. en 1967) se reúne un Comité de Nomenclatura compuesto por genetistas, inmunólogos y especialistas en tipificación de tejidos, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (WHO) y para informe de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología, los boletines expedidos por este Comité son incluidos en los volúmenes de Histocompatibility Testing y en publicaciones especializadas como: Tissue Antigens; Transplantation y Human Immunology.

El propósito de este Comité es poner al día la Nomenclatura de las especificidades de los loci HLA-A, -B, -C, -D y DR, además de establecer una nomenclatura para las nuevas especificidades.

El Comité que se reunió de nuevo después del 8o. Taller, estableció una nomenclatura de la región HLA basándose en principios creados en anteriores informes, pero teniendo en cuenta la expansión del conocimiento de la genética del MHC en el humano, HLA es el nombre dado a la región completa, mientras que HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D y HLA-DR, se refiere a los loci individuales dentro de ella. Como antes, los números que siguen se refieren a especificidades correspondientes a cada locus (por ejemplo HLA-A1) y la letra w precediendo a este número indica una especificidad provisionalmente identificada (HLA-Bw35).

Los objetivos principales de este informe son:

1.- Reconocimiento oficial de ciertas especificidades de los loci HLA-A, -B, -c, -D, y -DR.

2.- Designar las nuevas especificidades provisionales de los loci HLA.

ESPECIFICIDADES HLA-A, -B, -C.

Se siguen reconociendo 20 antígenos para la serie HLA -A; no se describen nuevas especificidades para este locus.

Para el locus HLA-B no hubo cambios en la nomenclatura para las especificidades provisionales ya establecidas.- Las nuevas especificidades provisionales otorgadas son enlistadas en la tabla (4).

Las designaciones provisionales de especificidades de los loci HLA-A y HLA-B se enumeran conjuntamente para que no haya superposición de números entre ellas, que cada especificidad retenga su número aunque haya subdivisiones (HLA-A9 subdividida en HLA-Aw23 y HLA-Aw24; HLA-B17 subdividida en HLA-Bw57 y Bw58), y que los números usados una vez no vuelvan a asignarse aunque ya no se usen. Por lo tanto con las nuevas designaciones el locus HLA-B cuenta con 42 especificidades, además de las dos supertípicas: Bw4 y Bw6 (ver más adelante).

| Nuevas designaciones | Equivalente Representativo previo |
|----------------------|-----------------------------------|
| Bw55(w22) | 22.1 |
| Bw56(w22) | 22.2, Te92, Da 30 |
| Bw57(17) | 17.1, 17A, 17 largo |
| Bw58(17) | 17.2, 17B, 17 corto |
| Bw59(8) | HOK-1, 8.2 |
| Bw60(40) | 40.1 |
| Bw61(40) | 40.2 |
| Bw62(15) | 15.1-To53, 15B, Te72 |
| Bw63(15) | 15.2-T052, 15A, Te77 |

Tabla (4). Nuevas designaciones provisionales para especificidades HLA-B.

Las especificidades Cw1, Cw2, Cw3, Cw4, y Cw5 se consideran suficientemente bien definidas para satisfacer las calificaciones necesarias para reconocimiento oficial. Sin embargo, se ha decidido que las especificidades del locus C seguirán siendo nombradas Cw1, etc., para evitar, al menos por ahora, la confusión con los Componentes de Complemento.

Se designan como provisionales las especificidades -- Cw7 (antes CVE, CT0-1) y Cw8 (T8,T9) y el locus HLA-C cuenta con 8 especificidades antigénicas.

ESPECIFICIDADES HLA-D.

Existe un avance significativo en la definición de -- algunas especificidades del locus HLA-D. No obstante, las -- dificultades prácticas de los procedimientos de tipifica- -- ción celular no justifican reconocimiento oficial. La nueva designación para este locus fue Dw12 (antes DB40, DH0).

ESPECIFICIDADES HLA-DR.

Las especificidades HLA-DR que se consideran suficien- temente bien definidas para reconocimiento oficial son los- enlistados en la tabla (5).

| NUEVA | PREVIA |
|---------|--------|
| HLA-DR1 | DRw1 |
| HLA-DR2 | DRw2 |
| HLA-DR3 | DRw3 |
| HLA-DR4 | DRw4 |
| HLA-DR5 | DRw5 |
| HLA-DR7 | DRw7 |

Tabla (5). Nuevas designaciones de especificidades de el loci HLA-DR con reconocimiento oficial.

Se ha tenido muchas dificultades para definir DRw6, -- ya que no se tienen antisueros operacionalmente monoespecí- -- ficos. Son tres las nuevas especificidades provisionales -- otorgadas; DRw8 (antes wIA8), DRw9 (wIA4X7, Dud15) y DRw10 (ST-1, LTM). Otras especificidades discutidas pero no consi- deradas para su reconocimiento oficial son 8w13, YYY o 5/6- (64).

La lista completa de especificidades para HLA recono- cidas por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en 1980 se encuentran en la tabla (6).

| HLA-A | HLA-B | HLA-C | HLA-D |
|----------|-------------|---------------------|--------|
| A1 | B5 ° | Cw1 | Dw1 |
| A2 | B7 * | Cw2 | Dw2 |
| A3 | B8 * | Cw3 | Dw3 |
| A9 | B12* | Cw4 | Dw4 |
| A10 | B13° | Cw5 | Dw5 |
| A11 | B14* | Cw6 | Dw6 |
| Aw19 | B15° | Cw7 | Dw7 |
| Aw23(9) | Bw15* | Cw8 | Dw8 |
| Aw24(9) | B17° | | Dw9 |
| A25 (10) | B18* | | Dw10 |
| A26 (10) | Bw21° | | Dw11 |
| A28 | Bw22* | | Dw12 |
| A29 | B27° | | |
| Aw30 | Bw35* | ° contenidos en Bw4 | |
| Aw31 | B37° | * contenidos en Bw5 | |
| Aw32 | Bw38 (w16)° | | |
| Aw33 | Bw39 (w15)* | | |
| Aw34 | B40* | | |
| Aw35 | Bw41* | | |
| Aw42 | Bw42* | | |
| | Bw44 (12)° | | |
| | Bw45 (12)* | | |
| | Bw46* | | |
| | Bw47° | | |
| | Bw48* | | |
| | Bw49 (w21)° | | |
| | Bw50 (w21)* | | |
| | Bw51 (5)° | | |
| | Bw52 (5)° | | |
| | Bw53° | | |
| | Bw54 (w22)* | | |
| | | | HLA-DR |
| | | | DR1 |
| | | | DR2 |
| | | | DR3 |
| | | | DR4 |
| | | | DR5 |
| | | | DRw6 |
| | | | DR7 |
| | | | DRw8 |
| | | | DRw9 |
| | | | DRw10 |

Tabla (5). Lista completa de especificidades HLA reconocidas por la Organización Mundial de la Salud 1980.

2.5 HERENCIA.

El sistema HLA es un sistema codominante; los dos alelos para cada serie se expresan fenotípicamente. La combinación de alelos HLA sobre un cromosoma (uno para cada locus) se llama haplotipo, y es heredado de uno de los padres como una unidad (87).

El fenotipo HLA de un individuo estará dado por dos antígenos de cada serie; HLA-A1, A2, B5, B7, Cw1, Cw3, Dw2, Dw3, DR2, DR3. Su genotipo consiste, en dos haplotipos, uno de cada progenitor y se manifiesta como sigue: A1, B7, Cw1, Dw3, DR3/A2, B5, Cw3, Dw2, DR3. Debido a que sólo hay dos haplotipos paternos y dos maternos en una familia, los vástagos pueden heredar sólo cuatro combinaciones posibles, Figura (7).

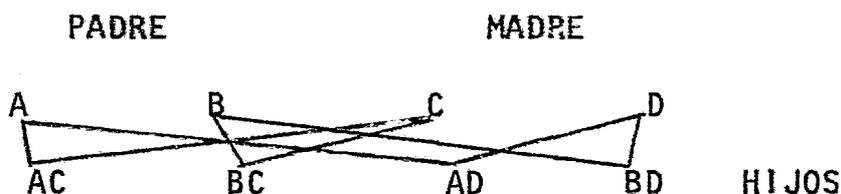


Figura 7. Los haplotipos paternos están representados con las letras A y B, C y D los haplotipos maternos; AC, BC, AD, BD son las combinaciones posibles en los hijos. Adv. Hum. Genet. 1980, 10:137.

Por lo tanto, dos hermanos tienen una posibilidad de 25% de ser idénticos en sus HLA, 50% de compartir sólo un haplotipo y 25% de posibilidades de diferir en ambos haplotipos.

El análisis de haplotipos dentro de una familia puede determinar, homocigocidad para un antígeno dado o detectar la presencia de un antígeno "blanco" que no puede ser identificado aún, denominado antígeno "blanco". La frecuencia de los genes "blanco" en el locus A entre los caucásicos es --

aproximadamente de 2%, en el locus B es de 3%, en los demás locus no ha sido determinado el porcentaje. La frecuencia de los genes "blanco" en otros grupos étnicos es mayor, ya que la mayoría de los antisueros empleados, son de población caucásica (88).

Recombinación (Entre-cruzamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis) ocurre entre los loci HLA. La existencia de recombinantes HLA es esencial en la identificación de los loci componentes del complejo y la separación de sus entidades. La frecuencia de recombinación sirve para calcular la distancia génica entre dos loci.

HLA A/B recombinantes ocurren con una frecuencia de aproximadamente 0.8% (89), con una distancia génica de 8cM. De este modo se esperaría encontrar entre 100 y 2 000 genes existentes entre A y B.

El loci HLA-C se encuentra muy cercano al locus HLA-B pero aún no se conoce su frecuencia de recombinación (90). La distancia génica estimada entre HLA-B y D es del rango de 1 a 2.22 cM (91). No se ha podido encontrar recombinantes entre HLA-B y el gen para el grupo sanguíneo Chido (92).

La frecuencia de recombinación parecería ser influenciada por el sexo, y es variable entre diferentes poblaciones (93).

2.6 ANTIGENOS HLA-A, -B, -C.

Los antígenos HLA-A, -B, -C, son glucoproteínas, localizadas en la membrana celular, están presentes en casi todas las células nucleadas de nuestro organismo. Se cree que estas moléculas fueron originadas de un gen ancestral común que sufrió duplicación, esto es atribuido, por el hecho, de que exhiben una estructura bioquímica homóloga.

Los genes de los loci HLA-A, -B, -C son entidades separadas, esto se ha podido probar por estudios familiares, experimentos de "encasquetamiento" y análisis químico de los productos génicos.

2.6.1 AISLAMIENTO DE ANTIGENOS HLA-A, -B, -C.

Se conoce relativamente poco sobre la estructura molecular de los antígenos de histocompatibilidad. Ello se debe sobre todo a que, al igual que otras proteínas de la superficie celular, presentan problemas experimentales de importancia para el químico: no se pueden obtener fácilmente en gran cantidad, no son solubles en agua, ni en soluciones salinas sencillas y están mezcladas con otras muchas moléculas sobre la superficie celular, a pesar de estas limitaciones, los antígenos HLA resultan más accesibles para la realización de análisis estructurales que otras muchas glucoproteínas de la superficie celular.

Esta insolubilidad nos demuestra la presencia de una región hidrofóbica, la cual se encuentra insertada en la membrana celular; para el problema de insolubilidad se han tomado dos caminos: disrupción de la membrana celular con un detergente; o bien el empleo de enzimas proteolíticas.

La molécula de antígenos HLA-A, -B, -C está constituida por dos cadenas polipeptídicas; una cadena pesada (larga) y una cadena ligera (corta) unida no covalentemente (94). Al extraer la molécula HLA con un detergente, se mantendrá en solución solamente si el detergente se encuentra presente. Se ha encontrado (95,96) bajo estas condiciones --

que la molécula HLA está constituida por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas.

Las dos cadenas pesadas se mantienen unidas a merced de un enlace covalente, por lo menos. Las cadenas ligeras se mantienen unidas a las pesadas por enlaces más débiles, no covalentes.

Cuando la molécula se extrae con papaína, se libera un fragmento hidrosoluble de ella denominado F_S . Un fragmento similar se libera cuando el material detergente solubilizado se trata con papaína. En ambos casos, el fragmento F_S consta de una cadena ligera asociada a un fragmento (F_H) de la cadena pesada. Una porción pequeña de la cadena pesada que se designa F_m permanece probablemente asociada a la membrana celular después de que la cadena pesada se ha roto por acción de la papaína. No se ha podido aislar todavía este fragmento más pequeño pero posiblemente comprenda la región de la cadena pesada que interacciona con la membrana junto con las subunidades aminoácidas que forman los enlaces covalentes entre dos cadenas pesadas cuando se encuentran en una solución de detergente, Figura (8).

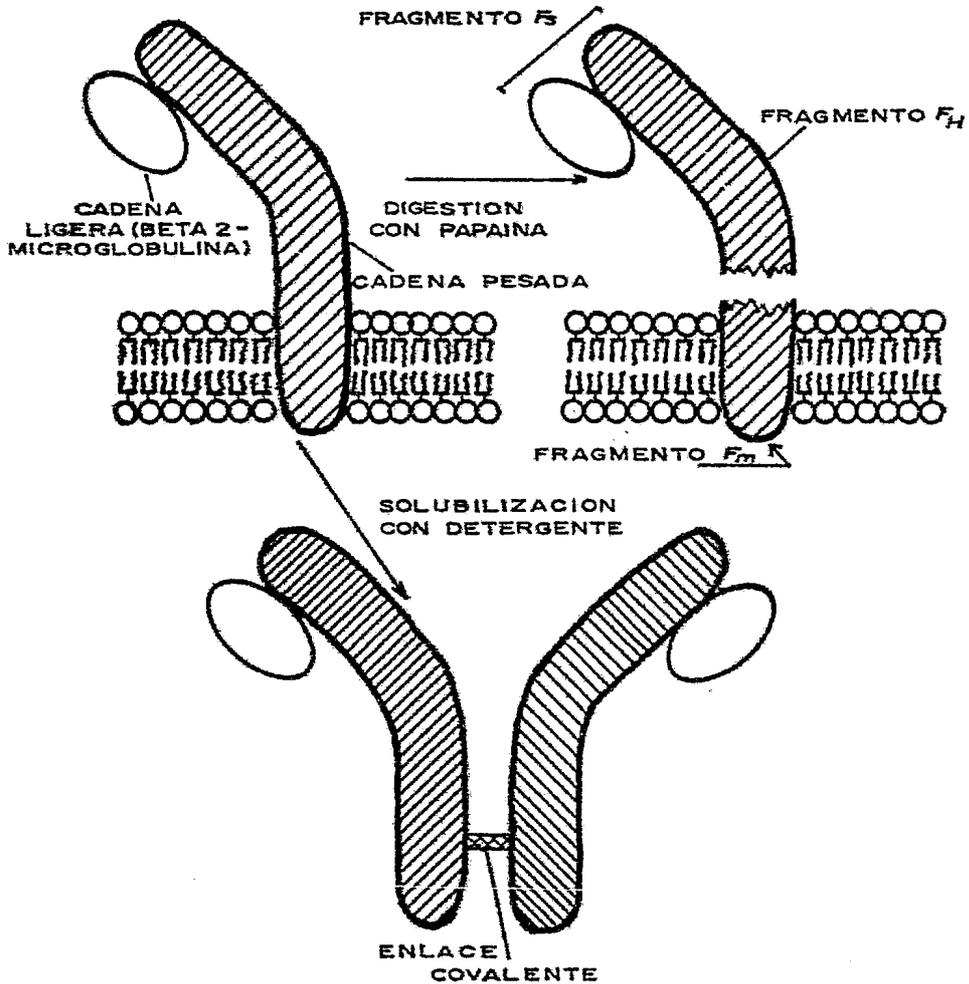


Figura 8. La estructura de los antígenos HLA, difieren en función del modo en que se han extraído - de la membrana celular. *Investigación y Ciencia* 1977, 15:66.

Los detergentes usados para la solubilización de los antígenos son del tipo no-iónicos especialmente se usan: -- Deoxycholate de sodio, Brij 99 y NP-40); la proteólisis enzimática se efectúa principalmente con papaína (97).

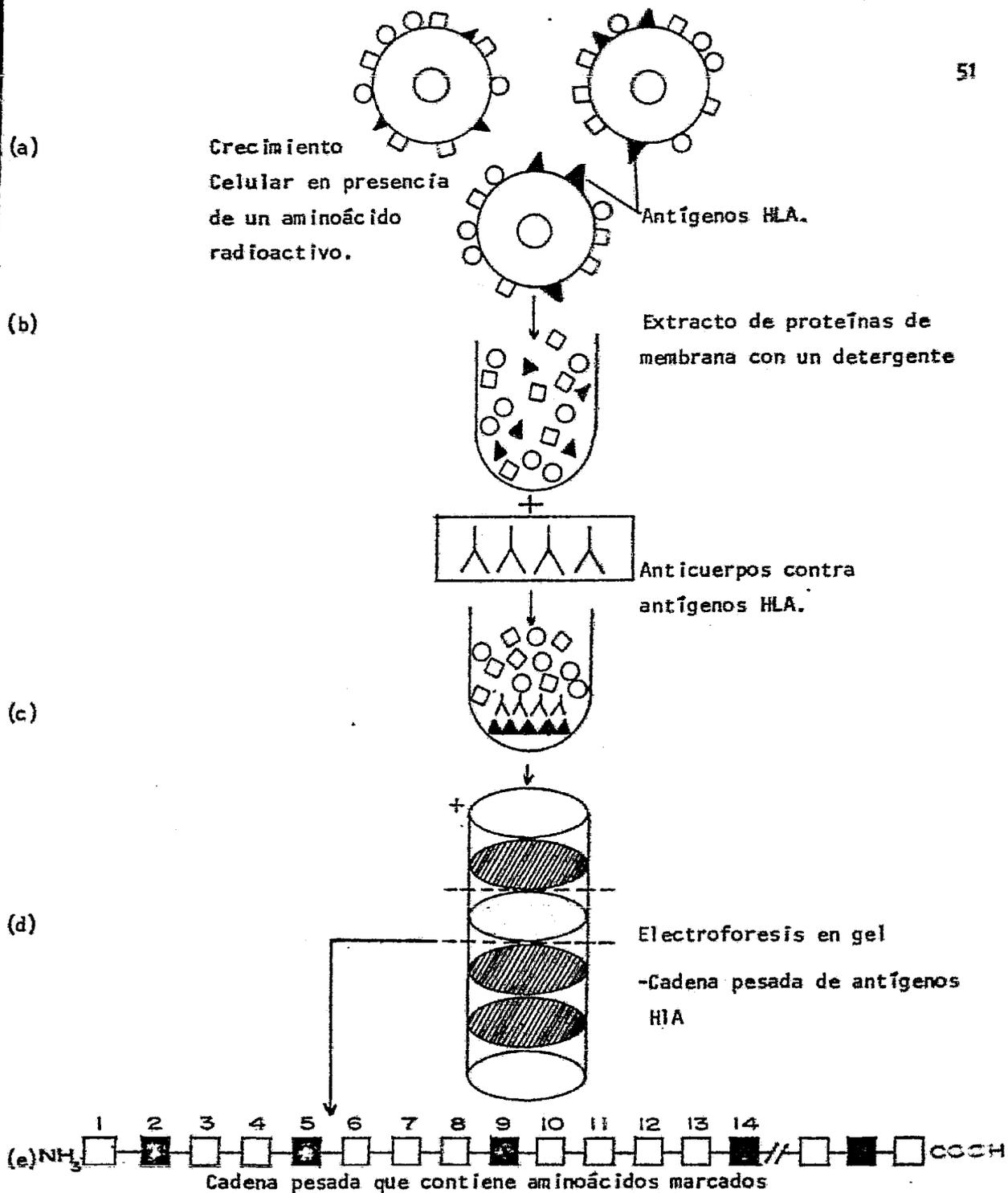
La cadena polipeptídica ligera de los antígenos HLA-A -B, -C, ha sido identificada ampliamente como beta-2-microglobulina, la cual es ya conocida desde 1968 (ver más -- adelante).

La cadena polipeptídica pesada es la que reviste mayor interés, ya que es la portadora de la especificidad antigénica.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada resulta bastante difícil, debe extraerse con el -- detergente, y mantenerse en dicha solución, un esquema de -- secuenciación de cadena pesada está representada en la Fi-- gura (9).

El primer paso de la secuenciación es cultivar linfocitos humanos, en presencia de un aminoácido radioactivo -- que se incorpore en todas las proteínas nuevamente sintetizadas, incluyendo los antígenos HLA (a).

Las proteínas de membrana marcadas y no marcadas se -- extraen con el detergente (b) y se aíslan los antígenos HLA por precipitación con anticuerpos específicos (c), luego, -- las moléculas de antígenos se redisuelven en sus componen-- tes (cadenas ligeras y pesadas) por electrofóresis con gel de poliacrilamida (d). Las cadenas pesadas se eluyen del -- gel y se determina en que posición aparece el aminoácido radioactivo a lo largo de la cadena eliminando un aminoácido -- cada vez de la proteína con la ayuda de una máquina llamada "secuenciador" (e). Finalmente se mide la radioactividad de los aminoácidos eliminados secuencialmente (98).



Removiendo un aminoácido cada vez en el secuenciador (Cuentas para detectar el marcaje radiactivo).

Figura 9. Secuenciación de las cadenas pesadas de antígenos HLA
Investigación y Ciencia 1977, 15:66.

2.6.2. BIOQUIMICA.

Las moléculas HLA-A, -B, -C, están compuestas por cadenas polipéptidicas unidas no covalentemente. Una de estas cadenas es codificada por gen(es) dentro de la región HLA, y tiene un peso molecular de 44 000 daltons (gp 44), y es denominada cadena pesada. La otra cadena se denomina ligera y tiene un peso molecular de 11 600 daltons, la cual ha sido reconocida como beta-2-microglobulina y es determinada por un gen dentro del cromosoma 15 (82). Esta microglobulina ya era conocida por los bioquímicos, y se sabe que no parece poseer ninguno de los determinantes antigénicos que son característicos de un definido tipo HLA. Por lo tanto -- las especificidades antigénicas deben correr a cargo de las cadenas pesadas (99).

La beta-2-microglobulina humana fué descubierta, en la orina de pacientes con disfunción renal. Desde entonces, se ha estudiado detalladamente esta proteína y se ha observado que se sintetiza en casi todas las células del organismo, también se encuentra presente en otras especies, así -- como: en el ratón, el perro, conejo, cobayo, y la rata. En contraste con la variabilidad de las cadenas pesadas de los antígenos de histocompatibilidad, no se han detectado variantes de la beta-2-microglobulina dentro de una especie y sólo existen pequeñas variaciones en diversas especies.

La cadena polipéptidica de la beta-2-microglobulina -- esta constituido por unos 100 aminoácidos y su secuencia es homóloga al dominio de la porción constante de las cadenas de Igs (c3H).

El análisis bioquímico y estructural de la cadena pesada sugieren que es la responsable de la antigenicidad, -- que está dada por la secuencia de aminoácidos, no ha sido -- posible localizar una región variable dentro de esta cadena que sea responsable de la antigenicidad como en el caso de las Igs. Por la secuencia de aminoácidos de diferentes especificidades HLA se sabe que la antigenicidad puede estar da

da en términos de un simple cambio de la posición de un - - aminoácido dentro de la cadena(100). Sin embargo pueden existir múltiples cambios (101, 102).

Además la cadena pesada porta una molécula depolisa-- cárido con un peso molecular de 3 000 daltones que no mues-- tra propiedades antigénicas o heterogeneidad (103) y esta - unidad a una asparagina que aproximadamente es el residuo - número 100 N-terminal de la cadena pesada.

El conocimiento de la secuencia completa de aminoáci-- dos de la molécula de HLA-B7 (104), ha servido para descri-- bir la molécula de los antígenos HLA-A, -B, -C, los cuales-- poseen un dominio alfa-1 (una porción amino-terminal apro-- ximadamente 110 aa). Los dominios alfa-2 y alfa-3 que están-- unidos por dos puentes disulfuros y constituidos por 63 y - 36 aminoácidos respectivamente, una secuencia corta de ami-- noácidos responsables de la inserción en membrana celular - de aproximadamente 30 aminoácidos y un carboxilo terminal - en el citoplasma, Figura (10).

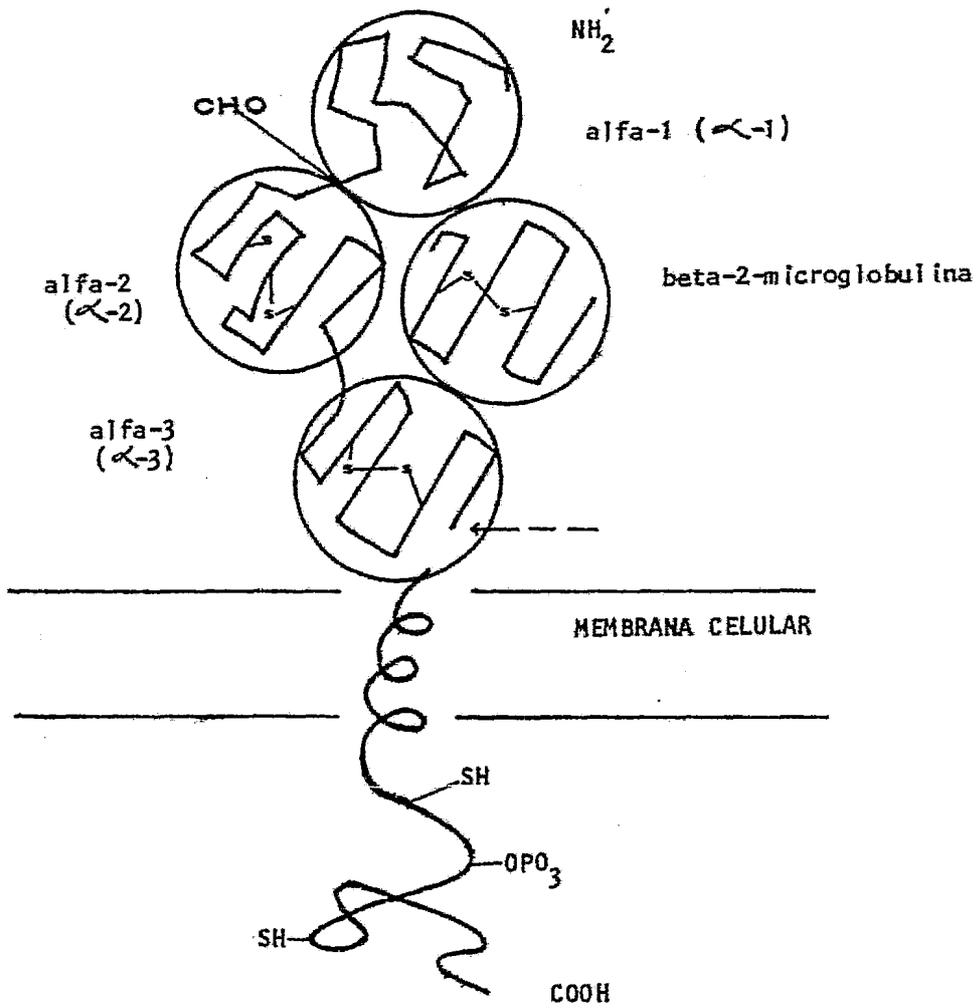


Figura 10. Dibujo esquemático de la molécula HLA-A, -B y -C
 Immunol. Today 1980, 1:17.

El aislamiento y purificación de antígenos HLA-C ha presentado algunas dificultades, la molécula es poco estable, la cadena de polisacáridos es más heterogénea que la de antígenos HLA-A y -B, siendo no antigénicas (105).

La marcada homología que existe entre los loci HLA-A y -E confirma la suposición de que genes HLA-A y -B proceden de un gen ancestral común que se duplicó.

Para entender la biosíntesis y regulación de los productos del complejo HLA se ha tratado de caracterizar mRNA para cadenas HLA-A, -E y -C y para beta-2-microglobulina en cultivo celular.

Se ha podido estimar la cantidad de nucleótidos que contiene el mRNA para HLA-A, -B y -C que son 1 700, 1 300 y 900 nucleótidos para HLA-DR y beta-2-microglobulina respectivamente.

El mRNA ha sido aislado fundamentalmente de la membrana celular, sin embargo la beta-2-microglobulina es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y como la proteína es relativamente pequeña, el mRNA está libre de los polirribosomas durante el proceso de aislamiento.

Se puede concluir que el mRNA para antígenos del Complejo HLA y beta-2-microglobulina; siguen el mismo modelo de síntesis e inserción que las proteínas de la superficie celular en eucariotes (106).

Se ha observado en experimentos llevados a cabo en la línea celular Daudi la cual tiene una mutación a nivel del gen de beta-2-microglobulina y por lo cual no es capaz de sintetizarla, pero esta línea expresa cadenas HLA-A, -E, -C libres, las cuales no pueden ser determinados serológicamente.

Esto podría implicar que la beta-2-microglobulina controla la expresión antigénica de los HLA-A, -B, -C en la superficie celular (107,108).

2.6.3. DISTRIBUCION TISULAR.

Los antígenos HLA-A, -B, y -C; se encuentran expresados codominantemente sobre casi todas las células nucleadas del organismo linfocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos neutrófilos, basófilos, eosinófilos, fibroblastos, células del bazo, corazón, pulmón, intestino, riñón (109, 110), células epiteliales (111, 112). Estos antígenos están también presentes en la placenta pero no sobre el trofoblasto (113).

Los eritrocitos parecen tener algunos antígenos HLA, pero sólo pueden ser detectados con autoanalizador, ya que se encuentran en muy bajas cantidades (114).

Mortón (115) demostró que tres antígenos eritrocitarios, Bennell-Goodspeed (Bg) se correlacionan ampliamente con antígenos HLA; Bg^a con HLA-B7, Bg^b con HLA-B17 y Bg^c con HLA-A28, pero su identidad química no ha sido establecida.

Las células que han sido más estudiadas son: los linfocitos T que tienen $10^3 - 10^4$ moléculas de antígenos HLA, por especificidad por célula, y en los linfocitos B no ha podido precisarse (116).

HLA-A, -B, -C se han detectado en forma soluble en saliva, suero y plasma (110, 117), orina (118), líquido seminal (119) en el calostro de la leche (120).

No se sabe aún con exactitud cuando aparecen los antígenos HLA durante el desarrollo embrionario pero se cree que es a partir de la sexta semana (121). La placenta es rica en antígenos HLA (122), pero no en el trofoblasto (116).

Existen algunas anomalías reportadas en la expresión de antígenos de Histocompatibilidad. Schuurman y van Rood (123), describen dos infantes turcos con severa hipogamma-

globulinemia, y una pérdida en la expresión de antígenos HLA sobre linfocitos, plaquetas y fibroblastos.

Un hallazgo similar fué descrito por Betuel (124), en un niño inmunodeficiente, sus linfocitos circulantes tenían pérdidas de antígenos HLA-A, -B, y -C. Ceppellini describe individuos químera, quienes expresan ambos haplotipos HLA de ambos padres (125). Mayr (126), comunicó a una madre con aparente mosaïcismo gonadal y anomalía en la expresión de antígenos HLA. Los haplotipos HLA-A, -B, y -C, que pasó a sus hijos no estaban expresados sobre sus linfocitos, pero estaban presentes en su madre. Pearson (127), comunicó a una niña con expresión trisómica de antígenos HLA, quien heredó un haplotipo materno y los dos paternos debido a una inversión pericéntrica del cromosoma 6. Aster (128), estudió individuos normales que tienen pérdida en la expresión de antígenos HLA sobre sus plaquetas. Halim (129) comunicó expresión haploide de antígenos HLA en espermatozoides. Svejgaard estudió a una mujer aparentemente sana, quien perdía los antígenos HLA en sus linfocitos durante la menstruación y estos reaparecían durante el período de ovulación (130).

2.6.4. SEROLOGIA.

Las reacciones serológicas son exquisitamente específicas en la identificación de un antígeno (Landsteiner).

En el sistema HLA, las reacciones serológicas se dan en grupos o familias, lo cual indica que los antígenos que definen cada grupo o familia presentan similaridad química, dando origen a reacciones cruzadas. Algunos ejemplos de estos grupos son: A1-A11-A3, A2-A28, B5-Bw35, Bw51-B5-Bw52.

Los términos "subtípico", "privado", y "corto" se refieren a antígenos que no pueden subdividirse más y los términos "supertípico", "público" o "amplio" se aplican a antígenos definidos por sueros que reaccionan con más de una especificidad "corta". El antígeno B5 es supertípico -

ya que define a dos antígenos cortos Bw51 y Bw52.

Los primeros antígenos descritos por van Rood 4a, 4b- y más tarde el 6a, 6b, 7b, 7d, 8a y el antígeno descrito por Payne son antígenos supertípicos, ya que incluyen una serie de antígenos subtípicos. Por ejemplo, el antígeno designado 7c "incluye" B7, B27 y Bw22, mientras que 4c "incluye" - - B% (Bw51 y Bw52), Bw53, B18 y Bw35.

Los antígenos 4a y 4b, hoy conocidos como Bw⁴ y Bw⁶ - respectivamente se consideran supertípicos, o bien que sus determinantes forman una "espiná dorsal" a la que están unidas las especificidades HLA-, esto ha sido demostrado por experimentos de "encasquetamiento"; en los cuales se observan que las moléculas HLA-B aparentemente llevan dos antígenos, Bw⁴ o Bw⁶ y un antígeno subtípico (131). Se esperaría encontrar el mismo antígeno del locus B asociado siempre, o con Bw⁴ o bien Bw⁶, en la tabla 6, se encuentran los antígenos que están incluidos en Bw⁴ o Bw⁶. La utilización de estos antisueros supertípicos, puede ser de una gran ayuda en la determinación de una especificidad subtípica. Por ejemplo, si tenemos un individuo B12 positivo, y sabemos -- que el B12 define dos especificidades subtípicas, Bw⁴⁴ y -- Bw⁴⁵; además que Bw⁴⁴ está incluido en Bw⁴, mientras que -- Bw⁴⁵ en Bw⁶ y si sólo tuviéramos un suero subtípico Bw⁴⁴ -- y los dos supertípicos (Bw⁴, Bw⁶) y encontramos reactividad positiva para B12 y el Bw⁶ seguramente el individuo tendrá la variante Bw⁴⁵ y no la Bw⁴⁴.

De este modo la reactividad cruzada puede ser acortada a través del uso de sueros subtípicos. Ya que la reactividad cruzada complica la obtención de sueros monoespecíficos.

Los grupos o familias de reactividad cruzada de antígenos HLA (CREGs), hasta ahora conocidos se encuentran en la Figura 11.

Las reacciones cruzadas debidas a similaridad en la es-

estructura química podrían explicarse por un origen común, -- Ivanyi (132), sostiene que el sistema HLA se deriva de un gen ancestral que por multiplicaciones y duplicaciones a través de los siglos ha llegado al polimorfismo casi individual existente hoy.

La mayoría de las reacciones cruzadas ocurren entre especificidades del mismo locus, pero recientemente se ha descubierto la existencia de reactividad cruzada entre antígenos de diferentes loci (133), lo cual concuerda con la hipótesis de Ivanyi.

L O C U S A

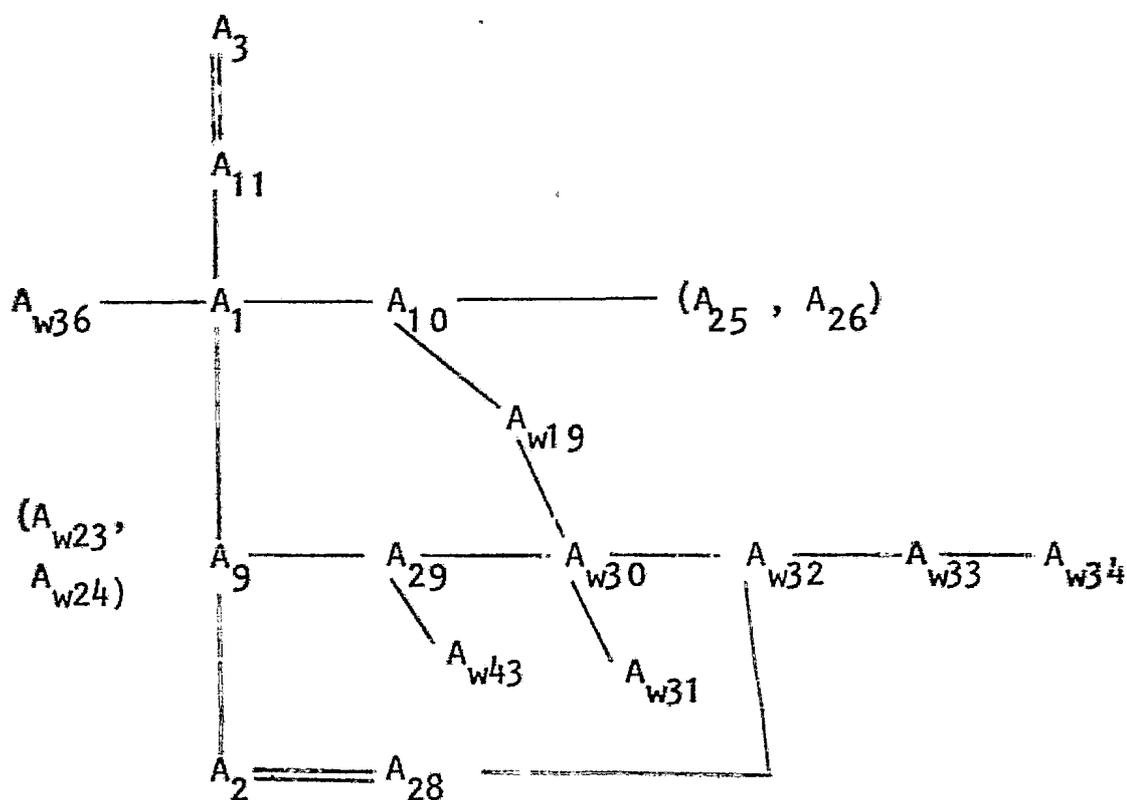


Figura 11. Reacciones Cruzadas para los locus HLA-A y -E.
Pr. Med. Bull. 1978, 34:217.

LOCUS B

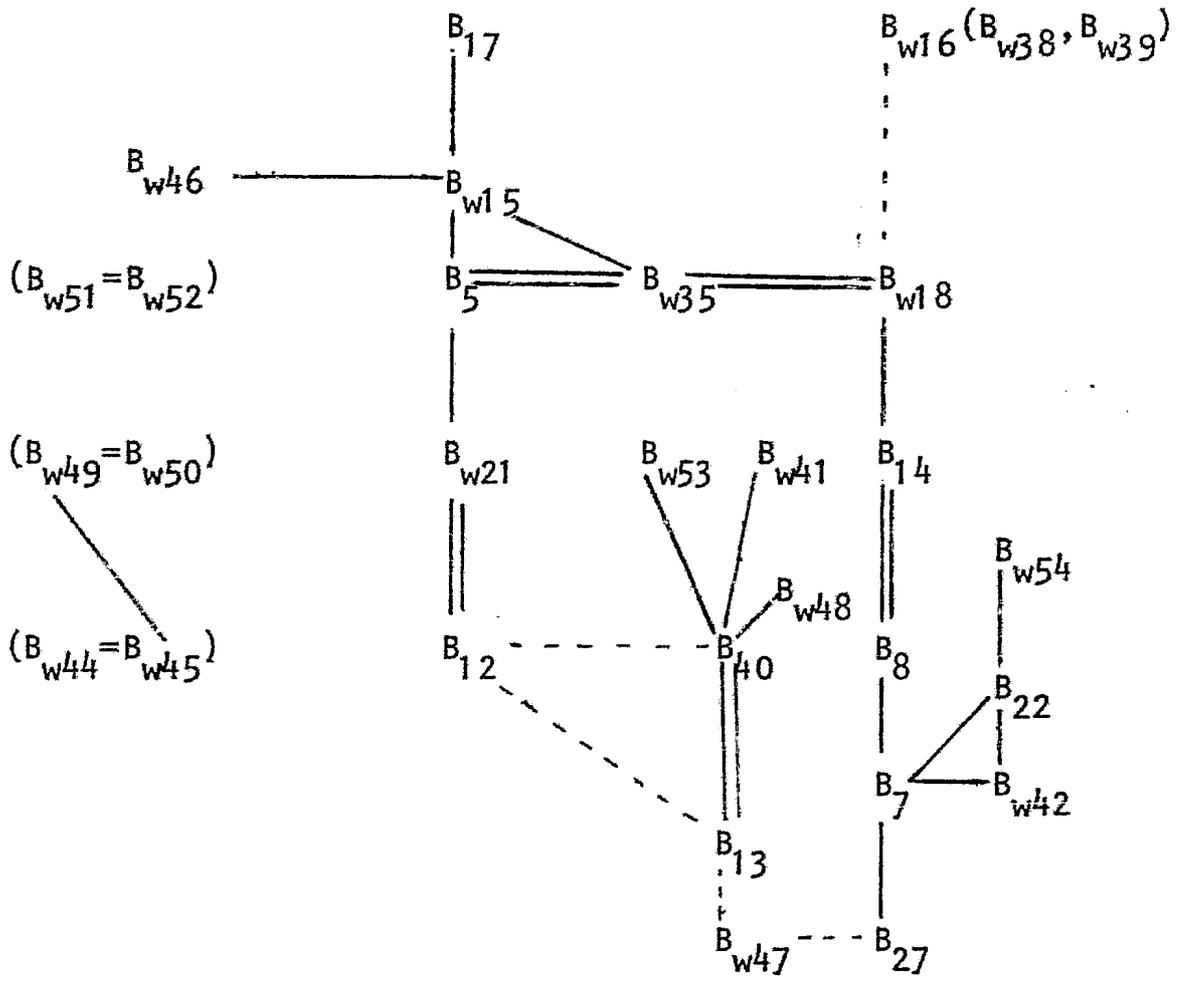


Figura 11. Reacciones Cruzadas para los locus HLA-A y -B. Br. Med. Bull. 1978, 34:217.

2.6.5. OBTENCION Y SELECCION DE SUEROS INMUNES PARA TIPIFICACION.

Las pruebas serológicas para el estudio de especificidades HLA, son variados, pero cualquiera que sea el método para su tipificación las fuentes de origen de los sueros -- son siempre las mismas.

Los anticuerpos HLA sólo se encuentran después de una sensibilización previa. La sensibilización puede ser seguida a un injerto de piel (134), transfusiones sanguíneas, -- terapéuticas o experimentales (135) o por inmunizaciones experimentales con linfocitos, transplatación de órganos y -- más frecuentemente a través del embarazo (136). La ruta -- de administración, el tipo de inmunización tiene influencia en el desarrollo de antígenos citotóxicos.

Los sueros usados para tipificación de antígenos HLA -- son en su gran mayoría seleccionados de mujeres multíparas, pacientes trasplantados y sujetos inmunizados experimentalmente. Los anticuerpos son generalmente de la clase IgG, -- son líticos en presencia de complemento, existiendo también anticuerpos aglutinantes, no fijadores de complemento -- y que son usados de rutina. La mayoría de los anticuerpos -- HLA son activos, sin diluir o en muy pequeñas diluciones.

Las principales fuentes de obtención de sueros para -- tipificación son:

Mujeres multíparas. Los anticuerpos anti HLA-A, -B, -C y -DR se encuentran comúnmente en el suero de mujeres -- que han tenido varios embarazos. Se piensa que la inmunización ocurre durante el embarazo cuando antígenos HLA del feto, de origen paterno, inmunizan a la madre. Como es probable que en embarazos posteriores los fetos tengan antígenos HLA diferentes, es normal que las mujeres multíparas tengan sueros múltiples específicos que reaccionan con varios antígenos HLA. Ocasionalmente uno de los antígenos induce mejor la formación de anticuerpos que los otros. en cuyo caso se-

obtiene un suero "operacionalmente" monoespecíficos.

Los receptores de muchas transfusiones sanguíneas. Al hacer una transfusión no se tiene en cuenta la compatibilidad o la incompatibilidad para HLA entre donador y receptor, la mayoría de los pacientes transfundidos por razones terapéuticas reciben sangre incompatible y por lo tanto, pueden formar anticuerpos. En ocasiones se hacen transfusiones sanguíneas repetidas, a voluntarios, que tengan un determinado antígeno HLA para conseguir anticuerpos capaces de detectar ese antígeno. Las inmunizaciones continuas pueden conducir a la pérdida del antígeno (137).

RECEPTORES VOLUNTARIOS DE INMUNIZACIONES. Las inmunizaciones se llevan a cabo mediante inyección intradérmica o subcutánea de linfocitos HLA-incompatibles o bien por injertos de piel incompatibles para HLA. Para inducir la formación de un anticuerpo monoespecífico HLA. Se debe inmunizar las menos veces posibles, aunque esto tiene la limitación de que algunos antígenos débiles pueden ser incapaces de provocar una respuesta de anticuerpos, por lo que a menudo, la calidad de los anticuerpos es serológicamente pobre y tiene amplia reactividad cruzada.

INMUNIZACION A PRIMATES. Puesto que el MHC de los primates es parecido al HLA, se pueden escoger receptores adecuados para inmunizaciones planeadas.

Los títulos de los sueros son altos, pero las reacciones son amplias y generalmente no se usan para tipificación.

Para el MHC del ratón, ha sido posible elaborar anticuerpos monoclonales en células híbridas, estos anticuerpos monoclonales HLA (138,139,140) pueden solucionar el problema de obtención de sueros monoespecíficos e incrementar el conocimiento de este complejo.

Para establecer la especificidad HLA de un suero inmune, se hace reaccionar con linfocitos o plaquetas con es-

pecificidad conocida o ambas células de un panel donadores-voluntarios para determinar su reactividad y la frecuencia de reacciones positivas en la población. Las reacciones de los sueros se pueden analizar estadísticamente para estudiar sus patrones de asociación lo que generalmente se hace por medio de computadoras. Ultimamente el uso de sueros de referencia para el estudio de las especificidades conocidas de HLA, ha simplificado el proceso.

El problema de multiespecificidad de un anti-suero HLA puede ser solucionado por absorción o dilución.

La absorción consiste en la adición del antígeno al suero multiespecífico, generalmente en la forma de plaquetas o linfocitos en proporciones convenientes; seguido de un paso de elución que consiste en lavar las células (para retirar los anticuerpos libres) y después deshacer la unión antígeno-anticuerpo, lo cual casi siempre se logra con cambios de pH (141, 142). La absorción es el procedimiento más simple cuando se tiene un suero multiespecífico, el cual contiene anticuerpos para antígenos de diferentes locus, ejemplo: Se tiene un suero con anticuerpos A3 y B5, realizamos la absorción con células A3, quedándonos en el sobrenadante sólo anti-B5. El anticuerpo A3 puede ser recuperado lavando las células para quitar la contaminación, seguido de elución ácida y neutralización.

El proceso de absorción es más común para retirar anticuerpos anti-HLA-A, -B, -C de un suero que además contenga anticuerpos HLA-DR (143).

La absorción puede ser usada también para limitar la reactividad cruzada de un anticuerpo. Por ejemplo: un anti-suero HLA-A3, el cual reacciona con un título de 1:8 con células HLA-A3, puede también reaccionar con células HLA-A11 pero a un título mucho menor, por lo cual por diluciones se puede obtener un suero específico. Alternativamente, si realizamos absorción de el antisuero A3 con células A11, se reduce la reactividad con A11, pero desafortunadamente la actividad anti-A3 disminuye.

El problema de los sueros multiespecíficos indudablemente se resolverá por el uso de anticuerpos monoclonales, sin embargo el problema de reactividad cruzada, no se resolverá por lo cual queda aún mucho por analizar al respecto.

2.6.6. TECNICAS DE TIPIFICACION.

Los antígenos HLA-A ' -B, -C y -DR se determinan serológicamente. La primera metodología de estudio para antígenos HLA fué la leucoaglutinación, pero presentaba muchos problemas técnicos, era pobremente reproducible, por lo cual era poco confiable. Los antisueros para tipificación no eran del todo específicos, lo cual acrecentaba el problema de la tipificación, el desarrollo de antisueros operativamente monoespecíficos y el conocimiento de las reacciones cruzadas trajo consigo el desarrollo de nuevas técnicas de tipificación más confiables y reproducibles.

El desarrollo de la técnica de linfocitotoxicidad, llevó a un rápido progreso en el estudio de especificidades HLA. En esta técnica se emplea el efecto citotóxico de anticuerpos leucocitarios, en presencia de complemento, dañando la membrana y causando la muerte celular. El método es más confiable y reproducible que leucoaglutinación. El efecto citotóxico de anticuerpos anti-leucocitarios fué observado por Doan en 1926, y fué aplicado hasta 1956 por Gorer y O'Gorman en el estudio de H-2 en el ratón, siendo más tarde introducida en el estudio serológico de linfocitos humanos para la detección de antígenos HLA. El desarrollo y miniaturización de la técnica se llevó a cabo por Terasaki (144), en esta prueba se usan pequeños volúmenes de antisuero y suspensión celular.

La prueba de linfocitotoxicidad requiere de suero de conejo como fuente de complemento. El uso de sueros de otras especies tradicionales en serología (cuyo) no ha sido satisfactoria (145).

La introducción de linfocitotoxicidad permitió la detección de nuevos antígenos, como los antígenos HLA-DR.

El uso de otras técnicas serológicas, derivadas de -- métodos existentes en microbiología, han sido también explo-- radas. Los principios básicos de el método de Fijación de -- Complemento para bacterias, fué desarrollado y aplicado al estudio de antígenos HLA. Usando plaquetas como fuente de -- antígenos, siendo esta técnica menos sensitiva que microlin-- focitotoxicidad, la ventaja que presenta esta técnica es -- que pueden usarse plaquetas que han estado almacenadas a -- 4°C por un período largo de tiempo. Microlinfocitotoxicidad requiere células frescas o congeladas con técnicas especia-- les para evitar daño celular, en contraste con plaquetas.

En la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas-- más sensibles pero más complicadas y costosas para definir-- antígenos HLA, como Fluorocromasia y Liberación de Cromo -- 51. Aunque estas técnicas sean más sensibles que microlinfo-- citotoxicidad, ésta sigue siendo la más usada y selecciona-- da en los trabajos de investigación y transplantes debido-- al menor costo que tiene ésta.

LINFOCITOTOXICIDAD.

Principio del método: Cuando se incuban anticuerpos - citotóxicos con linfocitos vivos que poseen el antígeno co-- rrespondiente en presencia de complemento, el anticuerpo se fija al antígeno sobre la superficie de el linfocito activa-- do al complemento, causando citotoxicidad, manifestada en -- daño en la integridad de la membrana celular, esta citotoxi-- cidad es revelada por varios métodos.

Para linfocitotoxicidad se usan preparaciones puras - de linfocitos, separados de sangre periférica con un gra-- diente de Ficoll Hypaque, lavados y resuspendidos en medio de cultivo (McCoys) a una concentración de 3 a 4 X 10⁶ célu-- las/ml. Por medio de una microjeringa Hamilton se ponen can-- tidades de 1 μ l de la suspensión celular en los pocitos de placas especiales (Falcon tipo Terasaki), las cuales contie-- nen 1 μ l del antisuero, se incuban a temperatura ambiente-- 30 min., se lavan las células y se añade 4 μ l de complemen-- to (suero de conejo liofilizado) o suero de conejo fresco, -- incubados por espacio de 30 min. El número de células vivas

se estima visualmente en un microscopio de contraste de fases o bien mediante la tinción con eosina o azul tripán o algunas tinciones fluorescentes, la metodología de esta prueba será ampliamente tratada en el siguiente capítulo.

Liberación de cromo 51.

En este tipo de ensayos se requiere un equipo especial de trabajo. La primera parte de esta técnica es aislar la población total de linfocitos, como aislados para linfocitotoxicidad, se lavan y se ajusta su concentración, se incuban con medio de cultivo en el cual se adiciona Cr^{51} ($50 \mu Ci Na_2Cr^{51}$). Las células incorporan el Cr radioactivo del medio de cultivo, inmediatamente después las células son sembradas en las placas conteniendo los antisueros, se incuban a temperatura ambiente 30 min., son adicionadas con $4\% I$ de complemento y se incuban, después de la muerte celular causada por la reacción antígeno-anticuerpo y la activación del complemento las células liberan Cr^{51} . Este método es complicado para ser usado en exámenes de rutina pero es excelente para estudios especiales de cuantificación (Células Mediadoras de Linfólisis, ver más adelante).

FLUOROCROMASIA.

Este método es más ventajoso, ya que se pueden valorar porcentajes bajos de células muertas, el cual no podría ser evaluado por otros métodos. Las células vivas se presentan fluorescentes y las muertas no presentan fluorescencia al ser tratadas con diacetato de fluoresceína. La gran desventaja de este método es que necesita un microscopio de fluorescencia y un cuarto oscuro (146).

2.7 ANTIGENOS HLA-Dw.

En 1964, Barbara Bain y cols. (147), observaron que cuando mezclaban linfocitos de dos donadores no consanguíneos al azar, cultivándose juntos por siete días, en el cultivo aparecía transformación blástica. Este fenómeno se investigó más a fondo usando las células de gemelos univitelinos

nos, de hermanos y de individuos no emparentados. Las reacciones entre estos últimos eran generalmente muy fuertes y entre los hermanos eran muy débiles o no existía. Esto sugiere que los antígenos que cifraban a la estimulación de la reacción de linfocitos en Cultivo Mixto (MLR), estaba bajo control genético. Estudiando familias y poblaciones se ha logrado establecer, que los genes que controlan MLR, se encuentran dentro del MHC ya que se heredan junto con las especificidades antigénicas HLA. Estos descubrimientos llevaron a algunos investigadores a postular que los determinantes de la activación linfocitaria (Lads) y las especificidades antigénicas HLA eran una misma cosa (148).

Los trabajos efectuados en otras especies (rata, ratón, pollo, cerdo, perro) también indican la presencia de genes Lads en el MHC; en el ratón sin embargo, no todos los Lads están en el MHC, ya que hay otro sistema genético en el cromosoma 1, llamado MIs dentro del que también hay Lads, así se estableció que los Lads pueden estar separados funcionalmente de las especificidades antigénicas del MHC. Experimentos posteriores demostraron que los Lads localizados en el H-2 estaban gobernados por la región I.

En lo concerniente al hombre, se acumularon datos en favor de la hipótesis de que genes Lads del MHC y los loci responsables de las especificidades antigénicas HLA eran distintos entre sí pero ligados al MHC (149). Estudios familiares en los que existía recombinación, pudo ser posible localizar el gen del MLC el cual es denominado HLA-D.

2.7.1. DISTRIBUCION TISULAR.

Los antígenos HLA-Dw se expresan sobre células que estimulan MLC (Cultivo Mixto de Linfocitos). Esto incluye linfocitos B y líneas celulares de linfoblastos B (150, 151) además se expresan en células de Langerhans (152), monocitos, macrófagos (153), células endoteliales (154) y espermatozoides (155). Sin embargo el estudio genético de los antígenos HLA-Dw, ha sido restringido al linfocito. Las células que no estimulan MLR, incluyen eritrocitos y plaquetas (147), fibroblastos, neutrófilos (156) y células T (157).

2.7.2 TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA-Dw.

En la reacción de linfocito en cultivo mixto (MLR) los linfocitos de dos donadores diferentes se mezclan, las células de ambos donadores reaccionan entre sí, reconociendo ambos aloantígenos extraños sobre la otra célula, esto se denomina MLC en "dos sentidos". La reactividad puede ser evaluada de varias formas (incluyendo conteo de células blásticas y midiendo incorporación de timidina radioactiva).

Una modificación importante de esta técnica es la llamada MLC en "un sólo sentido", en la cual la reactividad -- ocurre en una dirección; linfocitos de un individuo (A) se mezclan y cultivan con linfocitos de un individuo (c), en los cuales se bloquea síntesis de DNA, este bloqueo se -- efectúa con radiaciones subletales o tratamiento con drogas semejantes a la mitomicina C (158,159). Otras células como macrófagos, ciertas células tisulares (152) y espermatozoides (160) pueden ser usadas en lugar de linfocitos (C o estimuladores). En este caso la inactivación es usualmente -- innecesaria, estas células solo logran estimular a las células (A), pero no encuentran las condiciones óptimas para proliferar. De este modo la reacción es designada AC_X en -- donde A son las células respondedoras y C las estimuladoras y X representa la inhabilidad de C a proliferar.

Para la tipificación de antígenos HLA-D es necesario el uso de linfocitos de individuos quienes tengan en su haplotipo HLA-D idénticos, estos linfocitos HTC's (Células Homocigóticas para Tipificación).

La fuente de obtención de células homocigóticas para tipificación (HTCs) son los hijos de matrimonios entre primos hermanos, los hijos de estos tienen una probabilidad -- superior de ser individuos homocigotos, ya que en la población normal es muy baja (1 en 16 de los hijos de matrimonios entre primos hermanos es homocigoto).

En el 6o. Taller Internacional de Histocompatibilidad en 1975, van Rood y cols. (161) estudiaron 593 hijos de --

195 matrimonios entre primos hermanos, encontraron 48 individuos homocigotos para las especificidades serológicas - - HLA. De ellas sólo 20 eran homocigotos para HLA-D (los - - otros eran homocigotos para HLA-A, -B, -C, pero no para - - HLA-D), por lo cual podemos observar que es extremadamente-difícil conseguir células homocigotas para tipificación.

Las células HTC son usadas como células estimuladoras, cuando están en contacto con células de otra persona (respondedora) y no son estimuladas por las células HTC, esto quiere decir que expresan el mismo HLA-D.

Cuando una células respondedora coincide en una de sus especificidades HLA-D con la de una HTC, generalmente la - - reacción que se produce no es totalmente negativa como entre los hermanos HLA idénticos. Esta MLR débil o moderada se llama "respuesta de tipificación". En algunos casos puede llegar a ser tan alta como 50% de la reacción positiva y esto - puede ser debido a: Retroestimulación. Ni los rayos X, ni la mitomicina C bloquean totalmente la capacidad de dividirse - de las células estimuladoras, de forma que cuando se mezclan con las respondedoras, también incorporan isótopo. Además -- liberan linfocinas que estimulan inespecíficamente todas las células B en cultivo (132, 162).

Existen otros métodos de tipificación de la región - - HLA-D, mediante la prueba de linfocitos "incitados" (PLT=PRI MED LYMPHOCYTE TEST).

Los linfocitos respondedores sensibilizados en un cultivo de linfocitos (MLC) primario, pueden ser reestimulados en un cultivo mixto secundario, usando las mismas o diferentes células estimuladoras (163). Estos linfocitos pueden proliferar más rápidamente en el cultivo secundario (1 a 2 días en lugar de 5 a 7 días) con células que presentan el mismo - antígeno. Esta reestimulación puede ser usada para producir una gran especificidad de células respondedoras en PLT: Por ejemplo, si un padre (Dw1, Dw2) estimulado con células de su hija (Dw1, DwX) o con las células de su hijo (Dw1, Dw3), los linfocitos "incitados" del padre reconocen un DwX en el -- primer caso y Dw3 en el otro en un cultivo mixto secundario.

(PLT).

| MLR combinación | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Células Respondedoras | Células Estimuladoras | Respuesta Especifica en PLT |
| Padre Dw1, Dw2 | Hija Dw1, DwX | DwX |
| Padre Dw1, Dw2 | Hijo Dw1, Dw3 | Dw3 |

Las dificultades técnicas que presenta este método -- (164), se deben a la gran variabilidad de la reestimulación, según se usen las mismas células estimuladoras que en el -- primer cultivo, células distintas pero con los mismos deter^{minantes} de HLA-D, a veces es muy difícil la discriminación entre resultados positivos y negativos. También se sabe que -- en algunos casos el MLC secundario produce una supresión -- en lugar de la amplificación de la respuesta a los determi^{nantes} del locus HLA-D.

La asociación de HLA-D/DR define antígenos DP. Se han realizado diferentes estudios para poder correlacionar los -- antígenos HLA-Dw/DR/DP (165), el más reciente es el efectua^{do} por Morling (166), en el que tipificó 79 individuos para los antígenos HLA-Dw, DR y DP buscando la correlación exis^{tente}, se usaron las siguientes técnicas; para tipificar -- HLA-Dw se utilizó MLC con células homocigóticas (HTCs), pa^{ra} los antígenos DR se usó micro^{linfocitotoxicidad}, y para los antígenos DP se utilizó PLT. Se incluyeron todas las -- células y antisueros recopilados en el 8o. Taller Interna^{cional} de Histocompatibilidad.

El 80% de los individuos tipificados poseían el mismo antígeno con las tres técnicas y los valores para el coefi^{ciente} de correlación (r) fueron los siguientes DP/Dw=0.95, DP/DR=0.94 y Dw/DR=0.89. Existe una estrecha correlación -- entre DP/Dw y DP/DR, mientras que es más amplia la relación Dw/DR.

USO DE ESPERMATOZOIDES COMO CELULAS DE TIPIFICACION.

Datos recientes muestran que los espermatozoides ex--

presan en forma haploide las especificidades de los loci HLA-A, -B, -C, -D, -DR en su superficie. Por lo cual los espermatozoides, pueden ser usados en lugar de las células HTC para tipificación de los determinantes HLA-D (167).

El método es superior en principio, el método de tipificación con células HTCs ya que cualquier donador masculino puede teóricamente producir dos tipos de células para tipificación, mientras que los linfocitos homocigóticos para HLA-D son raros. Otra ventaja es que se pueden almacenar en N₂ líquido y después de usarse directamente en cultivo sin necesidad de irradiación, ni tratamiento químico, para la eliminación del factor blastogénico puesto que no proliferan.

2.7.3. CELULAS MEDIADORAS DE LINFOLISIS (CML).

Existe una gran proliferación de células T ayudadoras en MLC, una segunda respuesta proliferativa genera linfocitos citotóxicos (168), siendo estas células capaces de ocasionar lisis específica contra las células portadoras del antígeno que les incito -antígeno blanco-. Esta capacidad de ocasionar lisis, puede ser evaluada por la prueba de CML, en la cual una población celular respondedora después de 6 días en MLC, se les adiciona directamente, células blanco, marcadas con Cr 51, si existe liberación de Cr 51 después de 4 horas, esto será indicador sensitivo de muerte celular, ocasionada por la lisis específica (169).

En el ratón se ha probado que para que se generen células T cicitóxicas, debe existir identidad en la región I (probablemente la identidad en humanos sea D/DR) entre las células ayudadoras y las células citotóxicas precursoras (170).

En estudios efectuados por Long (171) usando células respondedoras y estimuladoras las cuales difieren en los antígenos HLA-A y HLA-B pero son idénticos en HLA-D, observa que existen células citotóxicas en ausencia de una respuesta proliferativa (Y que estas pueden ser generadas por-

la incompatibilidad de HLA-A y -B o incompatibilidad de - -
HLA-A o -B.

Los linfocitos citotóxicos pueden ser exquisitamente-
específicos ya que pueden discriminar entre las variantes -
antigénicas de B5(Bw51 y Bw52) (172), pero también se ha --
observado que linfocitos citotóxicos generados contra B7 --
puedan lisar células conteniendo el antígeno B27 y vicever-
sa (173).

2.8 ANTIGENOS HLA-DR.

Van Rood y sus colegas observaron en sus laboratorios que algunos sueros de mujeres multíparas, bloqueaban específicamente MLR y lograron mostrar por fluorescencia, que el bloqueo del suero reactivo era específicamente contra una porción de células del donador (174). Estas observaciones y descubrimientos similares en otros laboratorios pronto llevaron a la detección de antígenos serológicamente determinados en linfocitos B, estos antígenos se consideran fundamentalmente equivalentes a los antígenos HLA-D y fueron denominados D-relacionados o HLA-DR.

La región I del complejo H-2 en el ratón, parece tener gran similitud con la región HLA-D/DR del humano, los antígenos HLA-DR equivaldrían a los antígenos la codificados -- por la región I.

Numerosos fenómenos inmunes y susceptibilidad a enfermedad han sido mapeados dentro de la región I ya que hay gran similitud con la región HLA-D, esto podría ser extrapolado en el hombre, por lo que es de gran interés el estudio de la --- región HLA-D y sus antígenos serológicamente determinados HLA DR.

2.8.1. AISLAMIENTO.

El aislamiento de antígenos HLA-DR de la membrana celular se efectúa por dos métodos: 1) Disrupción de la membrana celular con un detergente y 2) Empleando enzimas proteolíticas, métodos por los cuales se aíslan también las moléculas de antígenos HLA/A, -B, -C, que fueron ya comentados ampliamente (94).

Al extraer los antígenos HLA-DR con un detergente o una enzima se obtiene una molécula compleja con peso molecular de 61 000 daltones, formada por dos cadenas polipeptídicas, unidas no covalentemente. Este complejo es estable a -- 55°C en SDS (Sodic dodecyl sulfate) pero incubados arriba de esta temperatura en SDS, la compleja molécula se disocia en -

dos cadenas, una con un peso molecular de 33 000 y otra de -- 28 000 daltones. Ambas cadenas polipeptídicas insertadas en - la membrana celular, con una región hidrofóbica intramembrana, tiene una larga región extracelular N-terminal y una cadena - pequeña COOH- terminal intracelular.

El método para conocer la secuencia de aminoácidos de las dos cadenas polipeptídicas, partiendo de líneas celula- - res de linfoblastos B sigue básicamente los pasos que fueron- esquematizados en la Figura (9).

Se ha podido observar que la cadena pesada (33 000) - de diferentes aloespecificidades HLA-DR son virtualmente - - idénticas mientras que la cadena ligera (28 000) es variable- para las especificidades analizadas por lo que se sugiere que es la portadora de la especificidad antigénica (175).

2.8.2 BIOQUIMICA.

Los antígenos HLA-DR están constituidos por cadenas - de gluco-proteínas, una cadena alfa o pesada de 34 000 dalton- nes y otra cadena beta o ligera de 29 000 daltones, unidades- convalentemente Figura (12). La cadena alfa contiene dos mo- léculas de oligosacáridos, de las cuales no se conoce aún el- sitio exacto de su ubicación. La cadena beta contiene una mo- lécula de oligosacáridos (177). Estas moléculas alfa y beta - son sintetizadas por genes dentro de la región HLA-D.

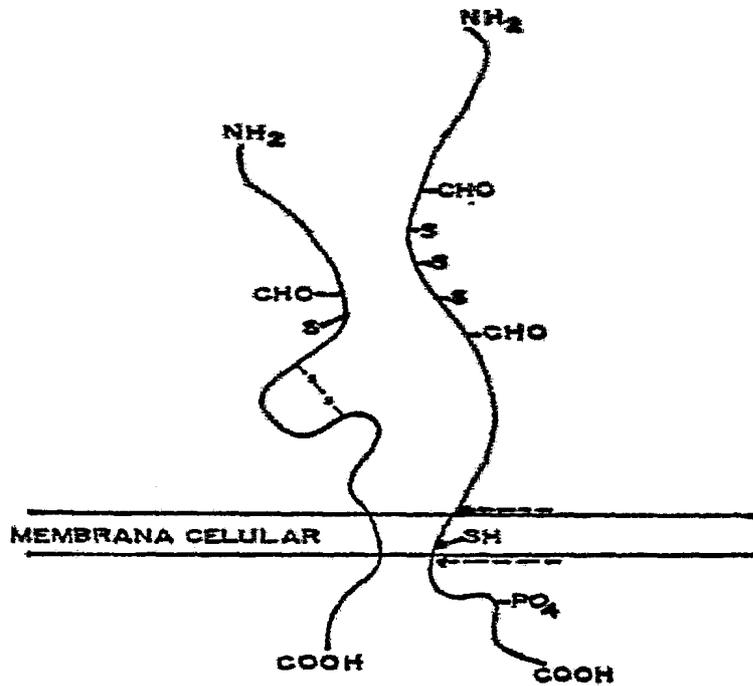


Figura 12. Dibujo esquemático de la molécula de antígenos -- HLA-DR The role the Mayor Histocompatibility Complex in Immunobiology 1981, page 115, N.Y. Garland Pu. Co.

De estudios realizados con antígenos la del ratón y antígenos HLA-DR humanos, se ha podido observar que existe una gran homología estructural entre las cadenas beta de ambos antígenos, en el ratón se conoce que las cadenas beta es tán codificadas por genes en la subregión I-A, y la cadena - alfa está regulada por genes en la subregión I-E.

Bodmer sugiere que en el humano, existen subregiones homólogas a la I-A e I-E del ratón, que contienen los genes reguladores para biosíntesis de cadenas alfa y beta de HLA-DR

(178, 179, 180).

La antigenicidad DR, ha sido atribuido a la cadena -- alfa por algunos investigadores (181) y por otros a la cadena beta. Mientras que algunos otros piensan que está dado por la secuencia aminoácídica de ambas cadenas, sin embargo este --- desacuerdo es por que no existe todavía métodos lo suficiente mente confiables como para detectar el polimorfismo genético- real de ambas cadenas (182).

Parish y colaboradores (183) refiere que existen anti- genos la en el ratón, que son carbohidratos posiblemente gli- colípidos. Existen otros reportes que fundamentan que anti- genos HLA-DR sobre células T activas son diferentes a la de las células B autólogos (184) y es posible que existan dos se- - rias de moléculas HLA-DR, una llevando el antígeno HLA-DR y - MB y la otra el antígeno HLA-DR y MT (ver más adelante).

2.8.3. DISTRIBUCION TISULAR.

Las moléculas HLA-DR están expresadas sobre linfocí-- tos B, líneas celulares de linfoblastos B, monocitos, macrófa- gos, espermatozoides, células de Langerhans, y células endote- liales (185). Se han reportado antígenos similares a los HLA- DR sobre linfocitos T activados (186). En el ratón también se han evidenciado antígenos la sobre linfocitos T activados y - posiblemente, estos antígenos sean codificados en la región -- I-J (187). Se ha determinado también antígenos HLA-DR en cul- tivo de melanomas malignos (188). Antígenos semejantes a los- DR (identificados por inmunofluorescencia indirecta usando an- ticuerpos monoclonales) se han reportado, localizados en el-- epitelio del tracto gastrointestinal, en glándula mamaria, ve- jiga, glándulas bronquiales, células acinares de la paratiroi- des, astrocitos, células de kupffer y endometrio. Se ha esta- blecido que estos antígenos son idénticos a los antígenos DR- de linfocitos sanguíneos (189).

2.8.4. SEROLOGIA.

El locus HLA-DR, es muy complejo, existen razones pa-

ra suponer que en realidad se trata de múltiples loci cercanamente ligados. Se conocen hasta ahora 11 antígenos DR y estos al igual que los antígenos HLA-A, -B, -C, presentan reacciones cruzadas entre sí. Figura 13, este esquema de reactividad no es muy detallado aún, ya que no se tienen sueros verdaderamente monoespecíficos para la definición de antígenos HLA-DR.

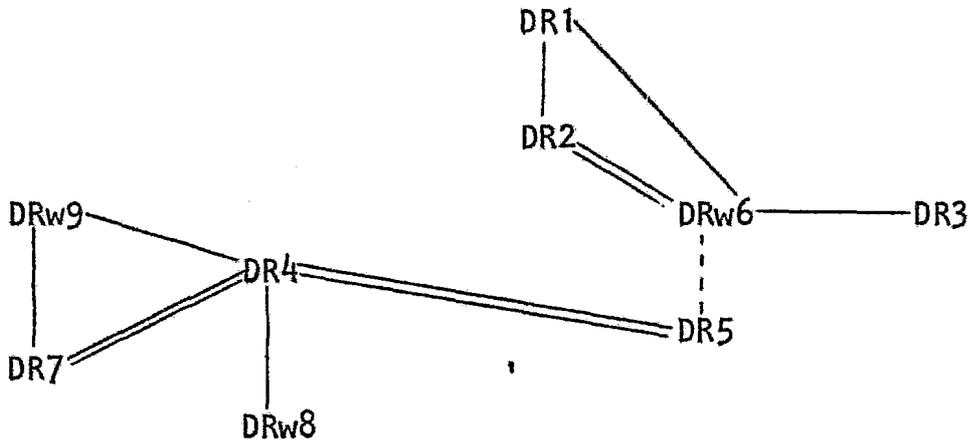


FIGURA 13. Esquema de Reactividad Cruzada para antígenos -- del locus DR. Br. Med. Bull. 1978, 34:233.

El análisis de datos serológicos del séptimo Taller Internacional de Histocompatibilidad, se propone la existencia de un loci ligado a HLA-DR, designados MB que codifica para especificidades públicas de DRs.

En el octavo Taller Internacional se discute la existencia de una nueva serie de antígenos codificados por un gen ligado a DR designado MT con tres antígenos MT1, MT2 y MT3.

Estos dos nuevos loci MB y MT son menos polimórficos que DR, muestran asociación o están contenidos en las especificidades de antígenos DR, su presencia ha sido descrita como reactividad cruzada. Por ejemplo un antisuero MB1 reacciona positivamente con aquellas células que contengan antígenos HLA-DR1, 2 y 6 en caucásicos. Un esquema que representa-

la asociación de los antígenos MB, MT y DR es denotado a continuación en la Figura 14 (190).

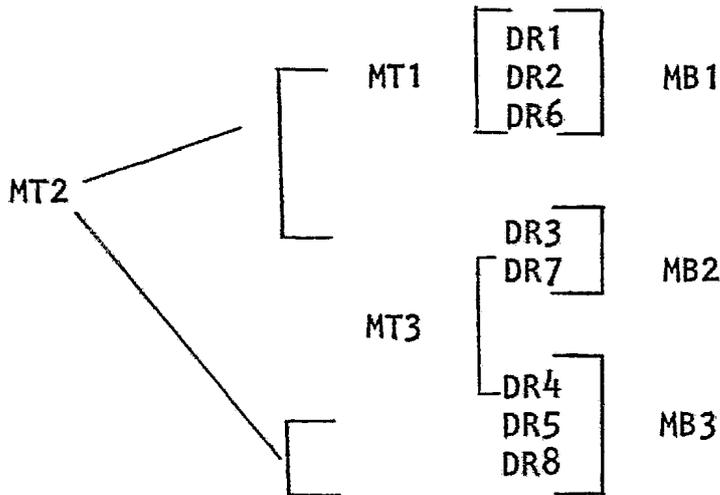


Figura 14. Asociación de los antígenos MB, MT y DR.

De datos recientes obtenidos se deduce que los antígenos humanos, están compuestos de por lo menos, cinco componentes cada uno de los cuales, pueden ser productos de genes separados.

En estudios efectuados en líneas celulares de linfoblastos B (Pala) se detectó la presencia de cinco componentes para los antígenos Ia, tres alfa-subunidades, y dos beta-subunidades, una subunidad alfa y otra beta que definen el antígeno DR; 2 subunidades alfa y una beta para los antígenos MB y MT, la interpretación de estos datos, nos pueden llevar a verificar la estrecha relación existente entre los antígenos HLA-DR, MB y MT, de análisis con electroenfoque e inmuno precipitación podemos evidenciar que son productos de loci separados (191, 192).

Shaw (193), ha estudiado individuos quienes son HLA-A, -B, -C, -D, -DR y MB idénticos pero quienes, sin embargo generan una reacción PLT fuertemente positiva. Shaw postula un nuevo locus llamado SB o locus de células B secundario. Los

antígenos SB tienen las siguientes características: 1) Se encuentran en células B y no en células T, 2) Están codificadas por un gen entre HLA-B y GLO, 3) Estimulan una pequeña respuesta primaria; pero 4) Estimulan fuertemente PLT y una fuerte respuesta secundaria de células T citotóxicas. La asociación con enfermedad parece probable, ciertas combinaciones de HLA-B y SB son frecuentes en Dermatitis Herpetiformis (194).

La relación entre los antígenos HLA-DR y HLA-D es aún muy compleja, en poblaciones caucásicas existe correlación entre los antígenos Dw1-7 definidos por MLC y los antígenos DR1-7 serológicamente determinados, pero en población oriental e indios americanos y negros no existe tal correlación (195). En estudios familiares no existen datos convincentes que muestren recombinación entre los loci HLA-D y DR, estas evidencias indican que los antígenos definidos por tipificación celular son productos génicos de loci extremadamente cercanos.

2.8.5. OBTENCION Y SELECCION DE SUEROS INMUNES PARA TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA-DR.

Las fuentes de obtención de antisueros anti-DR, son las mismas empleadas en la obtención de antisueros anti-HLA, -A, -B, -C.

Los sueros de mujeres multíparas frecuentemente contienen anticuerpos anti-HLA-A, -B, -C y -DR, los títulos de anticuerpos HLA-A, -B, y -C en estos sueros son muy altos con respecto al contenido de anticuerpos anti-HLA-DR, esto es debido a que la gran mayoría de linfocitos periféricos son T y no expresan antígenos DR. La población de linfocitos B es menor.

En inmunizaciones planeadas, se usan extractos de linfocitos B para aumentar el título de anticuerpos DR aunque siguen prevaleciendo los anticuerpos HLA-A, -B, y -C, los cuales pueden ser removidos del suero por absorción con plaquetas (las plaquetas poseen antígenos HLA-A, -B, y -C pero no -

DR), lo cual representa muchos mililitros de sangre para obtener las plaquetas necesarias para absorber un mililitro de suero anti-HLA-DR.

Inmunización de conejos con linfocitos B, nos provee de un antisuero con aloespecificidad, pero este suero requiere una absorción con plaquetas más extensiva; para hacerlo específico.

El desarrollo de técnicas para la obtención de anticuerpos monoclonales resolvería el problema de absorción de anticuerpos indeseables para obtener un antisuero operativamente monoespecífico (195).

2.8.6. TECNICAS DE TIPIFICACION.

Los antígenos HLA-DR son serológicamente determinados, las técnicas de tipificación son similares a las usadas en la determinación de antígenos HLA-A, -B, y -C. Ambos utilizaban, antisueros humanos y suero de conejo como fuente de complemento. Sin embargo las técnicas de tipificación de antígenos HLA-DR, requieren de una población enriquecida de linfocitos B y los tiempos de incubación son más largos.

Los linfocitos B constituyen del 10 al 15% de la población total de linfocitos periféricos, al aislar linfocitos de sangre periférica con Ficoll-Hypaque, tenemos en nuestro extracto celular linfocitos B y linfocitos T, las células no-B deben ser removidas del extracto celular, las razones más obvias para el enriquecimiento es tener una población uniformemente reactiva, para poder fácilmente valorar la lectura de la reacción. Una segunda razón, es que algunos reactivos usados en la técnica de linfocitotoxicidad pierden especificidad, si la población enriquecida contiene un porcentaje menor del 85% de células B.

Diferentes métodos de aislamiento de linfocitos B han sido usados. Desde formación de rosetas T con eritrocitos de carnero, tratados con neuraminidasa o papaína seguido de centrifugación de Ficoll-Hypaque, las células formando rosetas

y los eritrocitos libres sedimentaran, mientras que linfocitos B quedarán en la interfase de Ficoll-Hypaque con un grado alto de pureza. Se puede aprovechar ciertas características de los linfocitos B para su aislamiento, tienen receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas o su propiedad de adherencia a fibras de nylon. Para lo cual se utiliza fibra de nylon pre-tratada, empacada en una columna, los linfocitos son adicionados en una alícuota de medio de cultivo e incubados, los linfocitos B se adhieren a la fibra de nylon y los T no lo hacen, al eluir la columna los linfocitos T salen rápidamente al no estar adheridos, mientras que los linfocitos B necesitan que se friccionen la columna para que salgan (196).

La prueba de microlinfocitotoxicidad para antígenos - HLA-DR con extracto celular puro de linfocitos B, necesitan de tiempos más prolongados de incubación que cuando se tipifican antígenos HLA-A, -B, -C, 60 min. en la primera incubación para que se efectúe la reacción antígeno-anticuerpo y 120 min. de incubación a temperatura ambiente con el complemento, esta prolongación de tiempo de incubación es por la débil reactividad de muchos de los antisueros usados.

Van Rood (197), aprovecha el principio de linfocitotoxicidad, y usando dos tinciones fluorescentes sobre linfocitos de sangre periférica, marca a los linfocitos B mediante "encasquetamiento" de la porción Fc y suero anti-Ig fluorescente (verde).

Las células son expuestas a los antisueros anti-HLA-DR y complemento para realizar el ensayo de citotoxicidad, añadiéndoseles Bromuro de etilo (rojo) para identificar las células de la siguiente manera:

1. Células con casquete verde-células B vivas.
2. Células con "casquete" verde y color rojo fluorescente (bromuro de etilo) =cél. B muertas
3. No fluorescencia y no "casquete" =cél. T vivas
4. No "casquete" y fluorescencia roja =cél. T muertas

La ventaja obvia de esta técnica es que no es necesario separar linfocitos T y B.

2.9 GENETICA DE POBLACION Y DESEQUILIBRIO GENICO.

La tipificación de antígenos HLA es una de las herramientas más valiosas para el estudio de genética de población. Existe un gran polimorfismo en el sistema HLA, antígenos que son comunes en una población pueden estar completamente ausentes en otras, existe desequilibrio génico entre algunas especificidades HLA que pueden caracterizar a una población.

Se han realizado estudios de tipificación de antígenos HLA en diferentes grupos étnicos, para tratar de caracterizarlos, tipificándose esquimales, indios americanos, negros africanos, aborígenes australianos, japoneses, negros americanos, pero el grupo que ha sido más estudiado en el caucásico.

Algunos antígenos como el A2 y Bw35 se encuentran en casi todas las poblaciones. Los antígenos A1, A3, B8, y B27 se encuentran en caucásicos pero muy raramente en orientales, ciertos antígenos son exclusivos en negros como el Aw43 o Bw45, en chinos el Bw46. En japoneses A9 y B5 son muy frecuentes y en indios americanos A2, A9, y Bw35.

El conocimiento de la distribución de antígenos HLA en la población nos podría proporcionar la información necesaria, acerca de las migraciones prehistóricas, ocurridas en las civilizaciones.

En 1975 basándose en los antígenos conocidos para HLA; 19 antígenos para HLA-A, 26 antígenos HLA-B, 6 antígenos HLA-C y 8 antígenos HLA-D se calculó la existencia de 26 676 haplotipos, 33 194 624 fenotipos y 355 817 826 genotipos. Algunos haplotipos tal vez no se encuentren para ciertos haplotipos como: A1-B8-DR3 y A3-B7-DR2 son extremadamente frecuentes. Una tendencia de los antígenos de histocompatibilidad, es la aparición de dos alelos más frecuentemente de lo esperado en un haplotipo, lo cual denomina "Desequilibrio Génico", denotando su valor numérico

como Δ .

En caucásicos el mejor ejemplo es el haplotipo A1-B8, HLA-A1, tiene una frecuencia de 0.17 y HLA-B8 de 0.11, la frecuencia esperada para la combinación A1B8 sería $0.17 \times 0.11 = 0.019$, sin embargo la frecuencia observada es de 0.088. La diferencia entre la frecuencia observada y la esperada es la medida del "Desequilibrio Génico", entre los dos alelos y que es de $\Delta = 0.069$.

El desequilibrio génico puede caracterizar a una población así Bw35-Cw3 y Aw24-B7 son muy comunes en japoneses, B7-Cw4 en blancos africanos, B12-Cw4 en indios brasileños. B40-Cw3 en indios americanos.

Existen innumerables argumentos para explicar el "Desequilibrio Génico", se ha atribuido a una selección natural, a migraciones, mezcla de poblaciones heterogéneas, tal vez éstas sean las causas o puede ser que existan otras más. (203).

2.10 RELACION HLA Y COMPLEMENTO.

La primera evidencia de que el sistema de Complemento, estaba asociado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), fué demostrado en el ratón. Demánt (24) demostró que la proteína Ss estaba codificando por la región S del complejo H-2, siendo esta proteína un componente de complemento.

En el hombre los genes para tres factores de Complemento C2, C4 y Bf han sido localizados dentro del Complejo HLA, el primer reporte de asociación de HLA y alguno de los factores de Complemento dentro del Complejo HLA fue: La descripción de variantes Bf ligados al haplotipo HLA (199); y deficiencia de C2 también ligada a un determinado haplotipo HLA (200).

Las tres características genéticas principales de los componentes de complemento son:

La primera es la existencia de un gran polimorfismo entre los componentes de complemento, condicionado genéticamente.

El segundo es la existencia de deficiencias de Componentes de Complemento que pueden ser el resultado de una mutación ocurrida en el locus estructural debido a la producción de un principio inactivamente condicionado genéticamente.

El tercero, incluye el control de la concentración de los componentes de complemento en suero. Este es un fenómeno difícil de evaluar. La concentración de los Componentes de Complemento están afectados por factores de producción y activación de Complemento o hipercatabolismo.

Alotipos C₄ han sido descritos y ligados a HLA por Teisberg (66), describiendo cuatro patrones alotípicos -- (F, S, F₁, M), tres ocurren muy frecuentemente, pero el -- M rara vez aparece. Además encuentra familias recombinantes entre C₄ y HLA-A entre C₄ y HLA-C, describiendo además desequilibrio génico entre los alelos C₄ y ciertos haplotipos HLA.

Se han descrito dos familias con un estado homocigoto para la deficiencia de C₄ (201). Ambas familias mostraban ligamiento entre la deficiencia de C₄ y haplotipos -- HLA, los sujetos con deficiencia C₄, padecían Lupus Eritematoso Sistémico (L.E.S.).

En nuestro laboratorio del Hospital General de México, S.S.A. hemos encontrado una familia, con tres sujetos deficientes de C₄, los cuales poseen el mismo haplotipo -- HLA, cursando con Artritis Reumatoide, siendo éste el primer reporte hasta el momento de deficiencia de C₄ y A.R. -- (aún sin publicar).

Allotipos de C₂ han sido descritos y mostrados a tener asociación con HLA (65), existen tres allotipos C₂ --- (C₂¹, C₂², C₂³), de los cuales C₂³ es el menos común.

La deficiencia de C2 parece ser la más común en el hombre, se han descrito innumerables familias con deficiencias de C2, y además se demostró que la deficiencia está en desequilibrio técnico con un haplotipo HLA en particular (A10, B18, Bfs, Dw2). Pacientes homocigotos a la deficiencia de C2 pueden ser enteramente sanos, pero exhiben cierta susceptibilidad a formación de complejos inmunes como el L.E.S. (202).

Existen reportes de una frecuente baja concentración de C4 y También de C2 en la población, particularmente en asociación con el haplotipo B18, Dw2 en caucásicos. En el caso de estos sujetos se ha considerado que son heterocigotos para la deficiencia de C2 ó C4.

Glass ha puntualizado que existe una elevada frecuencia de individuos heterocigotos para C2 con enfermedades reumáticas. Sin embargo, no está ciertamente establecido que, sujetos con concentraciones bajas C2 y C4 son necesariamente heterocigotos (202).

El polimorfismo de el Factor B de la vía Alternativa de Complemento es descrito por Alper (203), y Allen muestra que está ligado al complejo HLA (199). Los alelos Bfs y BfF son los más comunes aunque existen otros cuatro alelos más, pero estos son muy raros, se ha encontrado cierto desequilibrio génico entre los alelos Bf y HLA (B8, Bfs/Bw35 BfF). (202).

No se ha encontrado aún, algún caso de deficiencia del Factor B, pero en algunos pacientes homocigotos para la deficiencia de C2 se han encontrado valores bajos en la concentración de Bf en suero.

Los componentes de Complemento que son homólogos, uno en la vía clásica y otro en la vía alternativa, C2 y el Factor B son físico-químicamente similares, y pueden proceder de un gen ancestral común que sufrió duplicación. C4 es codificado también en la región HLA, pero no es físico-químicamente similar a C2 y Bf pero es funcionalmente análogo.

logo de C3, en la vía Alternativa. Es bastante claro que C3 -- no es codificado por la región HLA. (202).

2.11 RELACION HLA Y RESPUESTA INMUNE.

En el ratón, una serie de genes controlan la magnitud de la respuesta inmune. Existen evidencias de genes similares en el humano. Estos genes Ir (Genes de Respuesta Inmune) son capaces de determinar el nivel de producción del anticuerpo y la activación de células T efectoras -- (204). Los genes Ir del ratón mapean en la región I del -- complejo H-2.

Genes Ir humanos, parecen estar asociadas con HLA, -- pero aún no ha sido localizados, en ninguna región en particular dentro de la región HLA.

Greenber (205), reporta, que individuos con el antígeno HLA-B5 son grandes respondedores para antígenos streptocócicos. Los individuos HLA-B5 han sido también reportados a tener niveles altos de complejos inmunes en Fiebre Reumática (206). Ciertos antígenos HLA están también asociados con glomerulonefritis post-streptococcica y con una respuesta baja a antígenos esquistosomales.

La función MHC involucra la generación y regulación de la respuesta inmune. Una respuesta inmune específica involucra la cooperación específica entre dos o más subclases de linfocitos y deben ser MHC compatibles para una -- efectiva cooperación. En algunos casos se requiere identidad de antígenos H-2D ó K en el ratón; HLA- A o -B en humanos (Como en la lisis de células blanco) o identidad H-2I, HLA-DR (En respuesta citotóxica o producción de anticuerpos). La eficiencia en la interacción entre células T ayudadoras (T_H), las cuales presentan el antígeno a células T citotóxicas y células B conducen a la diferenciación y proliferación de células T citotóxicas y producción de anticuerpos respectivamente. Factores solubles "ayudadores" y "supresores" producidos por células T llevando determinantes I-A o I-J.

Se han desarrollado varios modelos para explicar la interacción de células T con el antígeno, pero hasta ahora no existen pruebas experimentales que demuestren realmente la participación del MHC en la respuesta inmune, en esta -- área quedan muchas preguntas que no podrían ser contesta-- das, pero lo importante es que día con día, la investiga-- ción continúa, tal vez muy pronto, todo esto pueda ser fá-- cilmente explicado.

2.12 HLA Y TRASPLANTES.

La tipificación de antígenos de histocompatibilidad es la herramienta más valiosa para la supervivencia de un trasplante renal. De experimentos en ratas y ratones, fué posible demostrar que el MHC, es el sistema responsable -- del rechazó de un trasplante, si existe compatibilidad -- para los antígenos del MHC no existe rechazo, la incompati-- bilidad de estos implica un rápido rechazo del transplan-- te (207).

Los trasplantes renales en los humanos, se han efec-- tuado con gran éxito durante estos últimos años, debido a-- que las técnicas quirúrgicas se han desarrollado notoria-- mente y los problemas técnicos que presentaba el trasplan-- te, han sido vencidos, pero principalmente el éxito es de-- bido a la compatibilidad de antígenos HLA en el par dona-- dor-receptor.

Los trasplantes renales se realizan en donadores vi-- vos dentro de una familia (entre hermanos o padres a hi-- jos) y en el caso de trasplantes entre individuos no empa-- rentados se realiza casi siempre de un donador cadáver.

Cando se estudia una familia para seleccionar el po-- sible donador, se recurre a las técnicas serológicas de -- detección de antígenos de histocompatibilidad (HLA-A, -B, -C, -DR) y el Cultivo Mixto de Linfocitos (MLC), con linfo-- citos del posible donador y del receptor valorando la -- "Transformación Blástica" existente.

El donador ideal será aquel que comparta los mismos -- haplotipos HLA del receptor, pero si este no existe, será -- aquel que por lo menos tenga un haplotipo igual.

En el caso de un trasplante entre individuos no empa-- rentados, se efectúa las determinaciones serológicas, pero -- el cultivo mixto no puede ser posible en esta situación de -- urgencia, ya que se tiene que esperar más de 72 hrs., para -- el resultado de la prueba en estos casos se pide por lo me-- nos sean compatibles en las especificidades HLA-A, -B de un-- haplotipo.

La compatibilidad HLA-A y -B mejora notoriamente los -- resultados de los trasplantes y constituye la base principal de los estudios de tipificación, es casi seguro que las espe-- cificidades antigénicas HLA-A y =B estén incluidos entre los principales antígenos de trasplante del MHC (208).

Los sistemas HLA y ABO son los únicos usados en caso -- de trasplantes de órganos. La compatibilidad del grupo san-- guíneo ABO es esencial para el éxito del trasplante con la -- excepción de los sistemas P y Rh, sobre los cuales aún no -- hay evidencias concluyentes.

No se sabe si otros sistemas antigénicos, influyen en-- la supervivencia de un órgano trasplantado en receptores in-- munosuprimidos.

La adopción del trasplante como tratamiento para algu-- nos pacientes con insuficiencia renal, dió un ímpetu impor-- tante a la investigación sobre HLA. Desde entonces el siste-- ma HLA ha sido estudiado en relación con otro tipo de tras-- plantes, algunos de los cuales han sido llevados a cabo du-- rante varios años sin tener en cuenta los HLA. El trasplante de córnea por ejemplo, ha sido durante mucho tiempo una ruti-- na terapéutica y sólo hace poco se demostró que la compatibi-- lidad HLA entre el donador y el receptor mejora el resultado de los injertos vascularizados (209).

En el trasplante de corazón, existen dificultades técnicas para lograr exitosamente el trasplante, sin interrumpir el flujo de sangre al encéfalo y a otros órganos vitales, -- siendo el problema inicial más importante, sólo después de resolverlo, los cirujanos empezarán a pensar en la compatibilidad HLA aunque considerándola al final de una larga lista de prioridades.

Los trasplantes de hígado son técnicamente muy difíciles, tanto como el trasplante cardíaco. Se han efectuado números muy limitados de trasplante de hígado y ocasionalmente los receptores sobreviven. La causa principal del fracaso y muerte ha sido casi siempre por sepsis abdominal provocada por ruptura de las anastomosis miliar.

Como en el caso de los trasplantes de corazón, los efectos de la compatibilidad HLA son casi siempre imposibles de determinar.

Intentando tratar anemias aplásticas, leucemias y otras enfermedades que implican disfunción de la médula ósea, se ha recurrido al trasplante de Médula ósea. Llegándose a determinar que la mayor compatibilidad HLA debe ser en la región HLA-D, lo cual se logra en trasplantes entre familiares. Sin embargo ocasionalmente se han efectuado también -- trasplantes entre personas no emparentadas compatibles con HLA-D con éxito variable.

En estudios recientes efectuados en la Universidad de Washington Seattle se sabe que el trasplante de riñón de donador y receptor de la misma familia compatible para HLA, -- tiene 95% de probabilidad de éxito comparado en un trasplante de médula ósea en las mismas condiciones. Parece pues -- que están involucrados, además de HLA, otros sistemas genéticos no ligados a HLA, que participan en la supervivencia de un trasplante (208).

2.13 HLA Y ENFERMEDAD.

Durante los últimos años, se ha encontrado que el sistema HLA está involucrado en la susceptibilidad de contraer una variedad de enfermedades como: esclerosis múltiple, diabetes juvenil, artritis reumatoide, entre otras.

Esta relación HLA y enfermedad es de considerable interés e importancia, proveen de nuevas herramientas para el estudio de la herencia, clasificación y patología de la enfermedad en cuestión.

En algunos casos la relación es muy fuerte y la tipificación de antígenos HLA juega un papel muy importante en el diagnóstico, como es el caso de Espondilitis Anquilosante y el antígeno HLA-B27.

Es entendible por esto que muchos laboratorios de tipificación tisular; han enfocado principalmente su investigación a estudios de HLA y enfermedad, tratando de descubrir nuevas asociaciones y han introducido la técnica de tipificación de antígenos HLA como un método rutinario de diagnóstico.

MÉTODOS DE ESTUDIO.

Dos métodos fundamentales pueden ser aprovechados para investigar la relación entre HLA y enfermedad. Estudios en Población abierta y estudios familiares (210).

Estudios en Población. Este método consiste en la comparación de la frecuencia de antígenos HLA en un grupo de pacientes y un grupo control, siendo esencial que estos dos grupos, sean seleccionados correctamente, para buscar una posible asociación HLA y enfermedad.

Ambas muestras deben consistir en individuos no consanguíneos, siendo crucial que tanto los pacientes como los controles sean una población homogénea, ya que existen considerables variaciones entre la frecuencia de un antígeno

de una población a otra dentro de una misma ciudad, de ser-- posible deben estar en el mismo rango de edad, nivel socio-económico y sexo.

Dentro del grupo de los pacientes debe además consi-- derarse, el estadio en el que se encuentra la enfermedad, ya- que la asociación puede estar involucrada; en el inicio de - la enfermedad y en la respuesta a la terapia.

Para poder evaluar la posible asociación de un marca-- dor genético HLA y enfermedad, se recurre a métodos estadís- ticos, en los cuales se determina el RIESGO RELATIVO.

El Riesgo Relativo se calcula comparando la frecuencia- de los antígenos HLA en la población control y el grupo de - enfermos y elaborando una tabla de contingencia de 2 X 2.

Por ejemplo: Si en una población se encontró que hay - un exceso de el antígeno HLA-B8 en los pacientes en compara- ción con la frecuencia del antígeno en la población normal, - los datos se colocan en la tabla de 2 X 2.

| | | | |
|----------|-----|------|------|
| ENFERMOS | 38 | 47 | 85 |
| | 467 | 1500 | 1967 |
| | 505 | 1547 | 2052 |

El Riesgo Relativo se calcula con la fórmula:

$$\frac{a \times d}{a \times b}$$

a.- No. de pacientes con el antígeno.
 b.- No. de controles sin el antígeno.
 c.- No. de pacientes sin el antígeno.
 d.- No. de controles con el antígeno.

Sustituyendo:

$$\frac{38 \times 1500}{47 \times 467}$$

$$R.R. = 2.6$$

Un riesgo relativo superior a 1 indica que el antígeno es más frecuente en los pacientes que en los controles (asociación positiva), mientras que el R.R. menor de 1 indica -- asociación negativa.

El R.R. se define como el riesgo de desarrollar una -- enfermedad cuando un antígeno está presente en comparación -- con el que habría si el antígeno no estuviera.

Estudios Familiares. En este método se investiga si -- el gen de susceptibilidad a la enfermedad se hereda ligado -- al haplotipo HLA.

Este método presenta grandes dificultades de ser reali-- zado, ya que en muchas ocasiones no se cuenta con una fami-- lia con más de un miembro afectado para poder encontrar un -- posible ligamiento entre el loci marcador (HLA) y el gen de la enfermedad. Es por ello que más frecuentemente, se reali-- zan estudios en población abierta y no familiar.

MECANISMOS DE ASOCIACION.

Más de cien diversas enfermedades han sido estudiadas -- buscando una posible asociación con HLA y casi la mitad de -- ellas han sido reportadas con una asociación positiva y con -- altos R.R. en diferentes grupos étnicos.

Es por esto que es aparentemente difícil poder encon-- trar un mecanismo que explique la asociación entre un compo-- nente particular de el sistema HLA o un haplotipo HLA y en-- fermedad.

Las enfermedades asociadas a HLA han sido agrupadas -- para su mejor estudio en:

1.- Enfermedades Malignas, para las cuales hay una es-- casa evidencia definitiva de asociación.

2.- Enfermedades Inflamatorias, semejantes a Espondi-- litis Anquilosante y Síndrome de Reiter los cuales se aso--

cian con el antígeno HLA-B27.

3.- Errores Congénitos del Metabolismo, semejantes a - hemocromatosis y deficiencia de 21- hidróxilasa, las cuales se encuentran ligadas a un determinado haplotipo HLA.

4.- Deficiencias de Factores de Complemento.

5.- Enfermedades de Diferenciación Anormal como: Neuropenia congénita.

6.- Enfermedades Endócrinas asociadas con D/DR.

7.- Otras enfermedades, como es el caso de Lepra; también dentro de este grupo están aquellas enfermedades que su asociación se estima dudosa como: Esquizofrenia, Poliomielitis, etc.

Los posibles mecanismos que pretenden explicar la asociación HLA y enfermedad se enumeran a continuación (211, -- 212, 213).

1.- Modificación en la estructura de antígenos HLA.

Una infección o agente químico puede afectar a un individuo en su capacidad de producir una respuesta inmune, por otra parte si estos agentes infecciosos o químicos producen una alteración en la molécula HLA, y de ordinario estas alteraciones son detectadas por el sistema inmune, las células que han sido alteradas son eliminadas, pero si existe un bloqueo en el sistema inmune la molécula HLA alterada no será detectada, ni eliminada, dando como resultado la implantación de la enfermedad. Ejemplo: Cáncer o Enfermedades autoinmunes.

2. Pantomíma antigénica.

Los productos génicos del MHC comparten estructura molecular similar a la de un agente infeccioso, y el sistema inmune, no es capaz de reconocerlo como extraño.

Este modelo puede explicar la reactividad cruzada que tiene el antígeno HLA-B27 y Klebsiella sp. y algunos otros microorganismos Gramnegativos, existen evidencias para suponer que la Espondilitis Anquilosante (asociado con B27) se desarrolla como un resultado de la infección previa con este grupo de microorganismos en individuos en los cuales poseen en su haplotipo HLA-B27, no reconocen a Klebsiella como un agente extraño, desencadenándose la enfermedad (213).

3. Genes de Respuesta Inmune.

Otra explicación para asociar antígenos HLA y enfermedad, implica a genes de la respuesta inmune. Como ya mencionamos anteriormente en el ratón existen genes de respuesta inmune (I_r), dentro del complejo H-2, y en el humano se tienen algunas evidencias de genes I_r cercanos o dentro de la región HLA-D, y que se encuentran en "Desequilibrio Génico" con algunos alelos HLA por consiguiente con la susceptibilidad a la enfermedad.

4. Hipótesis del Receptor.

Los antígenos HLA pueden funcionar como receptores de superficie celular para virus y toxinas. Helenius (214) ha demostrado que antígenos HLA-A y HLA-B sirven como receptores para el virus Semliki Forest.

5. Deficiencias de Componentes de Complemento.

Los antígenos HLA pueden servirnos como marcadores para la deficiencia de factores de Complementos cercanos a HLA (C2, C4, y Bf), ya que existe una fuerte asociación entre el haplotipo HLA y la deficiencia de estos factores.

También los antígenos HLA nos sirven como marcadores para la deficiencia de enzimas que se encuentran cercanas a el complejo HLA, pueden estar en desequilibrio génico la deficiencia y un determinado haplotipo HLA, como es el caso de deficiencia de 21-hidroxilasa y el haplotipo B14 Dr1. (79)

La Tabla (7) muestra algunos ejemplos de asociación -- HLA y enfermedad, los cuales fueron tomados de Histocompatibility Testing 1980 (60).

| Antígeno Asociado | Enfermedad | Riesgo Relativo | Comentarios |
|-------------------|-------------------------------|-----------------|---|
| A3 | Hemacromatosis | 4 | Herencia recesiva con 95% de penetrancia -- ligada más comúnmente con el haplotipo A3,- B14, BfF DR6. |
| B27 | Espondilitis Anquilosante | 90 | Asociado en todas las poblaciones. |
| Bw47 | Deficiencia de 21-Hidroxilasa | 15 | Deficiencia de 21 Hidroxilasa con aparición en la adolescencia esta ligado al -- haplotipo B14; DR1. |
| sólo DR3 | Diabétes Mellitus. | . 6 | DR4 asociado con tipo I DR3 asociado con tipo II de la enfermedad. |
| ambos DR3 y DR4 | | 33 | |
| DR3, B8 | Hepatitis Crónica activa. | 2 | Especialmente en mujeres jóvenes con autoanticuerpos. |
| DR3, B8 | Myastemia Gravis | 3 | La asociación HLA -- tiene variaciones -- con la raza. |
| DR3 | Enfermedad Celiaca | 17 | Herencia recesiva; -- DR7 también esta -- asociado. |
| DR2 | Esclerosis Múltiple | 4 | Este gen HLA es muy importante en la -- susceptibilidad de -- esta enfermedad. |

TABLA 7. ALGUNAS ASOCIACIONES HLA Y ENFERMEDAD.

III. TIPIFICACION DE ANTIGENO HLA EN MESTIZOS
MEXICANOS

3.1 INTRODUCCION.

Existen diferentes marcadores genéticos que pueden caracterizar a una población, tales como los grupos sanguíneos y ciertas hemoglobinas anormales, que tienen una determinada distribución geográfica la hemoglobina S es típica del noroeste y centro de Africa, las variantes enzimáticas deshidrogenasa del ácido fosfogluconico (PGD) que cataliza la reacción Glucosa 6P a 5Pentosa fosfato, tiene tres variantes genéticas siendo la variante PGD^A muy frecuente en poblaciones amerindias. La variante 1 de la fosfoglucomutasa (PGM), se encuentra con mucha frecuencia en estas poblaciones: también han sido descritas variantes proteicas, por ejemplo, la albúmina tiene cuando menos 12 variantes. Una de ellas, denominada México, se describe en indígenas mexicanos, en el sur de los Estados Unidos y en Guatemala; existen la variante makú en Brasil y la Warao en Venezuela (215).

Sin embargo, ninguno de estos sistemas puede definir a una población o grupo étnico tan ampliamente como el sistema HLA.

Los antígenos del sistema HLA son extremadamente útiles en la caracterización de los distintos grupos humanos, debido principalmente al gran polimorfismo existente en este sistema. Algunos antígenos HLA son exclusivos de un determinado grupo étnico, por lo cual se puede valorar la mezcla existente en las diferentes poblaciones, sus orígenes y hasta cierto punto las migraciones ocurridas en los siglos pasados.

Basándonos en estos conceptos, el estudio de los antígenos de histocompatibilidad en la población mestiza mexicana reviste gran interés. En la actualidad se le considera como un grupo étnico independiente, siendo el resultado de la mezcla de indígenas y españoles que llegaron en 1521 a conquistar México.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los mestizos--

mexicanos en las diferentes regiones del país, han tenido -- influencia de otros grupos étnicos como en el caso de la población de la costa, donde existen escasos marcadores negroi -- des debido a la inmigración de esclavos africanos desde -- los primeros años de la dominación española. Se calcula que -- en el año de 1640 alrededor de 150,000 esclavos ya habían -- sido traídos a México aún cuando se desconoce su sitio de -- origen (216).

El ingreso de extranjeros en el país, con excepción de españoles, estuvo limitado hasta 1810; a partir de esta fecha se abrieron las puertas a la inmigración, la cual alcanzó su máximo nivel entre los años de 1910 y 1940. Los principales inmigrantes fueron: españoles, estadounidenses, ingleses, judíos, alemanes, franceses, italianos y árabes que se establecieron en las principales ciudades de la República.

La población mestiza mexicana conforma un 95% de la -- población total del país que es alrededor de 70 millones, -- existen además 5 millones de méxico-americanos, que viven -- en diferentes Ciudades de los Estados Unidos de Norteamérica. Si bien este grupo procede de mestizos mexicanos, ha estado sometido a mezclas con otros grupos étnicos y se esperarí -- a que sus marcadores genéticos fueran diferentes.

El estudio de la estructura genética de la población -- mestiza es de gran interés antropológico y podría dar la pauta al entendimiento de las enfermedades más frecuentes en esta población.

El propósito principal de esta tesis es caracterizar -- a un grupo de mestizos mexicanos tomados al azar de los pacientes que acuden al HOSPITAL GENERAL DE LA S.S.A., para lo cual se efectuó tipificación de antígenos de histocompatibilidad (HLA). Nuestros resultados fueron comparados con los -- obtenidos por otros autores en mestizos mexicanos y méxico--americanos tratando, de buscar la existencia de una correlación.

Algunos autores (210) sugieren que al realizar estudios-

de asociación HLA y enfermedad debe tenerse especial cuidado en la selección de el grupo control y el grupo de enfermos - tratando que estos dos grupos sean lo más homogéneos posible.

Es por esto que nuestra muestra la subdividimos por estrato socio-económico y edad en la búsqueda de posibles diferencias entre los subgrupos formados; esta información será de gran utilidad para la correcta selección de pacientes y controles en estudios de asociación HLA y enfermedad.

3.2 MATERIAL Y METODO.

Población estudiada.

Fueron seleccionados 301 individuos no consanguíneos, sanos de los cuales 152 individuos eran pacientes de Ginecología en el post-parto inmediato y pacientes de Ortopedia -- que ingresaron por algún traumatismo (fractura, luxación, etc.): los otros 149 pertenecen al personal del hospital (médicos, químicos, personal administrativo, intendencia y estudiantes de medicina).

De estos 301 individuos, 167 eran del sexo femenino y 134 del sexo masculino, con una edad mínima de 15 años y máxima de 81 años con una media de 32.74 años. El único requisito que debían cumplir los individuos seleccionados era tener padres y abuelos mexicanos.

Para su mejor estudio la población fué subdividida por extracto socio-económico y edad. Arbitrariamente se fijaron dos niveles socio-económicos: alto y bajo; el primero está compuesto por médicos y personal del hospital y el bajo por los pacientes que acuden al hospital.

Por edades se formaron cuatro grupos; el primero de ellos, el intervalo de edad se fijó de 15 a 30 años, compuesto por 199 sujetos; el segundo de 31 a 45 años con 36 individuos, el tercero de 46 a 60 años con 39 sujetos, el cuarto

de 61 años en adelante, integrado por 27 individuos.

Para la tipificación de antígenos HLA-A, -B y -DR, se efectuó la técnica de Microlinfocitotoxicidad. La tipificación de antígenos de histocompatibilidad por esta técnica, se efectúa en tres pasos principales:

- 1.-) Separación de linfocitos totales, a partir de sangre periférica (217, 218).
- 2.-) Separación de linfocitos totales en linfocitos -- T y B, por columna de nylon (219).
- 3.0) Ensayo de Microlinfocitotoxicidad (220).

1.-) SEPARACION DE LINFOCITOS TOTALES.

Los linfocitos son separados de la sangre aprovechando las diferentes densidades de las células sanguíneas. Con una mezcla de Ficoll-Hypaque cuya densidad sea de 1.076 a 1.078- se logra la separación de linfocitos, mediante centrifugación. Las células más densas quedan en el fondo del tubo - - (eritrocitos), la siguiente capa celular formada entre el Ficoll-Hypaque y el plasma, es la de los linfocitos y polimorfo nucleares que también quedan en esta capa, siendo extraída mediante aspiración con pipeta Pasteur.

MATERIAL.

- Jeringas desechables de 20 ml.
- Agujas hipodérmicas desechables de 20 X 38 mm.
- Tubos con tapón de rosca de 14 X 140 mm.
- Perlas de vidrio de 2 mm. de diámetro.
- Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.
- Pipetas Pasteur de 9 pulgadas.
- Pipetas serológicas de 10 ml.
- Pipetas " " 5 ml.
- Densímetro.

REACTIVOS.

- Solución de Hanks.
- Hypaque (Winthrop Products) es una solución de diatrizoato de sodio (3,5 diatemia, 2,4,6 triyodobenzoato de sodio) en presentaciones al 50% y al 75%.
- Ficoll 400 Sigma Chemical Company.
- Solución de Ficoll-Hypaque con densidad de 1.076 a 1.078-- lo cual se logra con 10 partes de Hypaque al 33.9% y 24 -- partes de Ficoll al 9%. La mezcla debe ser esterilizada -- (10 Lb/15 min.) y se mantiene en refrigeración.

APARATOS.

- Centrífuga Clínica.

PROCEDIMIENTO.

1.- Obtener 30 ml. de sangre mediante punción venosa.

2.- La sangre así obtenida es depositada en dos tubos con tapón de rosca en porciones iguales; los tubos deben -- contener de 6 a 8 perlas de vidrio, para realizar la desfi-- brinización de la sangre con movimientos suaves.

El uso de desfibrinización de la sangre en lugar de anticoagulante, presenta una gran ventaja, y es que al desfibrinar las plaquetas son eliminadas y con el anticoagulante permanecen en la sangre, causando problemas en pasos posteriores.

3.- La sangre se diluye con solución de Hanks en re-- lación 1:1, en caso necesario se filtra.

4.- La sangre diluida y filtrada se distribuye en - - alícuotas de 5 ml en tubos de 13 X 100.

5.- Mediante una Pipeta Pasteur, colocada en el fondo de los tubos con la sangre se añaden aproximadamente 3 ml -- de Ficoll-Hypaque con ayuda de otra pipeta Pasteur, lográndo se la estratificación de cada alícuota.

6.- Centrifugar los tubos a 1 500 rpm por 40 min.

7.- Los linfocitos se separan de la interfase, por medio de una pipeta Pasteur, colocándolos en tubos de 13 X 100 hasta un volúmen de 3 ml en cada tubo.

8.- A cada tubo conteniendo los 3 ml de la suspensión de linfocitos, se les añade solución de Hanks, hasta llenar el tubo.

9.- Centrifugar a 1 500 rpm por 10 min.

10.- Lavar el paquete de linfocitos tres veces con solución de Hanks y centrifugándose a 1 500 rpm por 10 min.

2.-) SEPARACION DE LINFOCITOS TOTALES EN T Y B POR COLUMNA - DE NYLON.

Existen varios métodos para el aislamiento de células T y B pero el más simple es el que utiliza la propiedad que tienen los linfocitos B de adherirse al nylon. Si cargamos una columna con fibra de nylon y adicionamos una alícuota de la suspensión celular obtenida en el paso anterior, los linfocitos B se adhieren fuertemente a la fibra, mientras que -- los linfocitos T no lo hacen. Los linfocitos T se recuperan fácilmente al eluir la columna con medio de cultivo, mientras que los linfocitos B por estar adheridos a la fibra necesitan que se estruje vigorosamente la columna para que puedan salir.

MATERIAL.

- Lo anteriormente mencionado.
- Fibra de nylon fenwal. Sino se cuenta con este nylon, se emplea fibra de nylon de tapicería.

- Popotes de plástico, comerciales para bebidas, de 5 a 7 -- mm de diámetro y de 12 a 16 cm. de largo.
- Cajas Petri.
- Tubos Capilares.
- Cámara de Neubauer.

APARATOS.

- Estufa de incubación.
- Microscopio óptico.
- Máquina Selladora de Plásticos.
- Piano cuenta células.

REACTIVOS.

- Medio de cultivo McCoy 5a. modif. (Microlab. Méx.) adicionado de 5% de suero fetal de ternera inactivado.
- TC fetal Serum Dessiccated. Difco Laboratories, Detroit -- Michigan U.S.A.
- 2 Yodo acetamida. JT. Baker Chem Co. empleándose al 0.1% - adicionada la solución con rojo de fenol como indicador.
- Rojo de Fenol 1059, Sigma de México, S.A.
- Preparación de la fibra de nylon y preparación de las co-
lumnas.

1. La fibra de nylon se lava con HCl 1N 3 veces cui- - dando de que totalmente sumergida en el ácido.

2. El ácido es eliminado con lavados, los cuales se -- efectúan con NaOH 1N.

3. El exceso de álcali se elimina con lavados con agua destilada, las veces necesarias, para que el pH del último - lavado sea igual al del agua.

4. Se pone a secar la fibra, extendida en la estufa a - 37°C hasta que seque totalmente.

5. La fibra seca es pesada en proporciones de 0.1 g.

Las columnas se preparan a partir de popotes comerciales sellados por un extremo, formando un ángulo de 45° , siendo recortados hasta una longitud de 9 a 10 cm.

PROCEDIMIENTO.

1.- Fibra de nylon previamente tratada y pesada, se extiende en una caja Petri.

2.- Se le adiciona solución de Hanks hasta cubrirla -- (8 ml), procurando que se remoje, dejando reposar por espacio de 15 min.

3.- La columna es empacada con la fibra, procurando -- que no queden burbujas de aire, ayudándonos de una pipeta -- Pasteur, la longitud del relleno debe ser aproximadamente de 6 cm. Se practica un orificio en el extremo sellado de la columna, el cual permitira salir la solución de Hanks por goteo.

4.- La columna se adiciona con medio de cultivo hasta llenarse, colocándola en posición horizontal.

5.- Es incubada por 30 min. a 37°C .

6.- Se saca la columna y se elimina todo el medio de cultivo.

7.- Los linfocitos purificados por gradiente (linfocitos totales) se resuspenden en 0.5 ml de medio y se pasa a la columna hasta que todo el líquido penetra la fibra. Inmediatamente después se coloca la columna en forma horizontal y se le agrega suficiente medio para llenar la columna.

8.- Se incuba a 37°C por 30 min.

9.- Posteriormente la columna se coloca en un soporte y se deja eluir en un tubo de 13 X 100, para lo cual se pasa medio de cultivo precalentado a 37°C , hasta llenar la capacidad del tubo que contiene la población de linfocitos T.

10.- Se lava la columna pasando 10 ml. de medio de cultivo precalentado.

11.- Los linfocitos B que se han adherido al nylon se recuperan en otro tubo marcado como linfocitos B, presionando y exprimiendo el nylon, pasando por ella medio de cultivo frío, hasta llenar el tubo.

12.- Ambos tubos, el que contiene las células T y el que contiene las B, son centrifugados a 1 500 rpm por 10 - - min.

13.- Los tubos se decantan, y se resuspenden los linfocitos T en 0.5 ml. de medio de cultivo y los linfocitos B en 0.5 ml. de 2 yodo-acetamida, incubándose 30 min., a temperatura ambiente; esto es para eliminar a los polimorfonucleares que contaminan la muestra.

14.- La concentración de ambas poblaciones deben ajustarse a una concentración de 4×10^6 linfocitos/ml.

3.-) ENSAYO DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD.

Cuando anticuerpos citotóxicos son incubados con linfocitos vivos que poseen el correspondiente antígeno en presencia de complemento, entonces el anticuerpo se fija al antígeno sobre la superficie del linfocito junto con el complemento, el cual se activa resultando en citotoxicidad, causando daño en la membrana celular. Esta citotoxicidad puede ser -- evaluada con diferentes colorantes vitales que penetran en las células dañadas pero no en las vivas.

MATERIAL.

- Lo anteriormente mencionado.
- Placas de Terasaki. Cooke Histocompatibilidad plate. Dynatch, Lab. Inc. Virginia, U.S.A.
- Jeringas Hamilton de 50 Ml. Microliter Syringe-705 N, Hamilton Co. Reno, Nevada, U.S.A.

- Jeringa Hamilton de 100 L. Microliter Syringe, Hamilton - Co., Reno, Nevada, U.S.A.
- Despachador de repetición Hamilton PB 600. Hamilton Co., - Reno, Nevada, U.S.A.

REACTIVOS.

- Complemento de conejo liofilizado ORAX 06-07, Behring Inst.
- Solución amortiguadora concentrada de fosfatos 0565 44-45 Behring Inst.
- Colorante azul tripán 23850. Sigma de México, S.A.
- Cloruro de magnesio 2444, J.T. Baker, S.A.
- Cloruro de calcio 1508 Allied Chemical.
- Etilendinitrilotetracetato disódico J.T. Baker, S.A.
- Petrolato líquido U.S.P., viscosidad 255/350 centistokes, densidad 0.850, Sigma de México.
- Aloantisueros típicadores. Los antisueros utilizados -- provienen de los Institutos Nacionales de la Salud de los E.U.A. (NIH), Bethesda Maryland.

La lista de antisueros con los que se contaron son:

- Locus A: A1, A2, A3, A9, A10, (A25,A26), A11, Aw19, A28, -- A29, Aw32.
- Locus B: B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B17, Bw21, Bw22, - Bw27, Bw35, B37, B40.
- Locus DR: DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 y DR7.

APARATOS.

Agitador tipo vortex.

PREPARACION DE REACTIVOS.

- Complemento de conejo. Se reconstituye el complemento liofilizado, con 1ml de agua destilada y 0.5 ml. de solución diluyente de complemento. Una vez diluida se mantiene a - 4°C.

- Diluyente de Complemento. Se prepara con $MgCl_2$ 0.008% y -- $CaCl_2$ 0.008%
- Rojo de Fenol al 1% como indicador. Se disuelve en solución salina de fosfatos y se conserva en refrigeración.
- Azul tripán al 1% en agua.
Solución Stock. 1 g. de azul tripán en 100 ml de H_2O destilada, es conveniente filtrar. Para uso diario se diluyen -- 2 ml de solución al 1% con 1 ml de E.D.T.A. al 2%.
- EDTA al 2%. 2 gr. de EDTA disódico disuelto en solución salina amortiguada, ajustando el pH entre 7.0 y 7.4 con $NaOH$ concentrada.

PREPARACION DE PLACAS DE TERASAKI.

En cada uno de los pozos de la placa de Terasaki, se deposita 1 μ l de antisuero tipificador de especificidades HLA, -- con ayuda de una microjeringa Hamilton con despachador.

Las placas de Terasaki se colocan sobre una placa fría, -- para evitar evaporación, y se adiciona 1 μ l de antisuero co-- rrespondiente en cada pozo, además de control positivo y negativo, en seguida se cubre el pozo con una gota de petrolato -- líquido, esto es para evitar la desecación y cambios de PH -- del aloantisuero. Las placas se almacenan a $-70^{\circ}C$.

La reacción es para tipificar antígenos HLA-A y -B (er-- linfocitos T) y HLA-DR (en linfocitos B) tienen diferentes -- tiempos de incubación por lo cual no es posible tener antisue-- ros anti HLA-A, -B y -DR en la misma placa y es necesario te-- ner los antisueros anti HLA-DR en otra placa.

PROCEDIMIENTO.

1.- Se parte de una suspensión celular con una concentra-- ción de 4×10^6 células/ml para las diferentes poblaciones de-- linfocitos, sembrando 1 μ l de las suspensiones celulares en -

cada pozo de la placa correspondiente: linfocitos T en la -- placa que contiene los antisueros anti-HLA-A, -B, y linfocitos B en la placa que contiene los antisueros anti-HLA-DR.

2.- Mezclar el contenido de los pozos, por medio de vibración ayudándose con el vortex.

3.- Las placas son incubadas; para los linfocitos T 30-min y para los linfocitos B 60 min a temperatura ambiente ambas.

4.- Se añade una gota de solución de Hanks, con la ayuda de una pipeta Pasteur, a cada uno de los pozos de las placas.

5.- Se permite que las células sedimenten por 10 min.

6.- Las placas se sacuden con un movimiento enérgico y rápido lográndose eliminar el petrolato líquido que conte--ñan las placas y la solución de Hanks antes adicionada, quedándonos las células en el fondo de cada pozo.

7.- Con ayuda de una microjeringa se adiciona a cada -- pozo 4 μ l de complemento de conejo diluído.

8.- Nuevamente se agitan las placas en el vibrador.

9.- Las placas que contienen los linfocitos T se incu--ban 30 min a 37°C y las placas con linfocitos B son incuba--dos durante 120 min. a temperatura ambiente.

10.- En cada pozo de las placas se adiciona una gota -- de colorante.

11.- Incubándose por 20 min. a temperatura ambiente ambas placas.

12.- Las placas son sacudidas con un movimiento enérgi--co y rápido, eliminando el exceso de colorante.

13.- Se añade una gota de Hank a cada pozo, dejando -- sedimentar las células por 10 min.

14.- Quitar el exceso de solución de Hanks de cada pozo, ya sea sacudiendo la placa o secando cada pozo con papel filtro.

15.- Se lee al microscopio a 10X de aumento. Se calcula el porcentaje de células vivas y muertas, las cuales se tiñen de azul por haber sido dañada su membrana y penetrado el colorante. Los linfocitos vivos se ven refringentes y pequeños y los muertos además de estar teñidos son más grandes, perdiendo su redondez.

La calificación otorgada a cada pozo es en base al siguiente criterio:

| | | | |
|----|-----|-------------------|-------|
| 0 | --- | 10% de mortalidad | (1) |
| 11 | --- | 20% | " (2) |
| 21 | --- | 40% | " (4) |
| 41 | --- | 80% | " (6) |
| 81 | --- | 100% | " (8) |

se interpreta:

| | | |
|-------|-----|--------------------|
| 1 y 2 | --- | resultado negativo |
| 4 | --- | resultado dudoso |
| 6 y 8 | --- | resultado positivo |

3.3 CALCULOS.

La evaluación estadística de los datos obtenidos en la tipificación serológica de los antígenos HLA-A, -B y DR fue la siguiente:

1.-) Para estimar la frecuencia antigénica o fenotípica (F) en la población estudiada se utilizó la siguiente fórmula:

$$F = \frac{\text{No. de individuos positivos para el antígeno}}{N}$$

donde:

N = al número de individuos que componen la muestra.

2.-) La frecuencia genotípica (P), fué calculada con la fórmula:

$$P = 1 - \sqrt{1-F}$$

3.-) El desequilibrio génico (D) fué calculada mediante la fórmula de Mattiuz y cols. (221) .

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

en donde:

a =No. de individuos positivos para ambos antígenos.

b =No. de individuos positivos para uno de los antígenos.

c =No. de individuos positivos para el otro de los antígenos.

d =No. de individuos negativos para los dos antígenos.

$N=(a+b+c+d)$ o número de individuos que componen la muestra.

4.-) La significación estadística se estimó por la prueba de Chi cuadrada (χ^2), para valorar la probabilidad (p) de la diferencia de los valores observados y esperados.

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

5.-) La frecuencia del haplotipo P (AB) se calculó:

$$P_{AB} = P_A \times P_B + D_{AB}$$

Estos cálculos fueron realizados por computación y el programa fué elaborado por el Dr. José de Jesús Manriques - Jefe de Computación de la Unidad de Patología del Hospital- General de México, S.S.A.

3.4. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en la población estudiada son presentados en las siguientes tablas.

En la Tabla (I) y (II) se muestran las frecuencias del antígeno y génicas para los locus HLA-A y HLA-B respectivamente. Además las frecuencias del antígeno obtenidas por Gorodezky (222) y Arellano (223) en mestizos mexicanos; Chauvenet (224) y Terasaki (225) en México-Americanos.

La Tabla (III) presenta los haplotipos más frecuentes y la Tabla (IV) los haplotipos con Desequilibrio Génico (D) significativo para los locus HLA-A y HLA-B en nuestra muestra.

La frecuencia del antígeno y la génica para la serie HLA-DR en la población estudiada se encuentran en la Tabla (V), además las frecuencias del antígeno obtenidas por Stasny (226) y Zeidler (227) en México-Americanos para este locus.

La Tabla (VI) y (VII) contienen los haplotipos más frecuentes y los haplotipos con Desequilibrio Génico significativo para las series HLA-B y -DR en la población estudiada.

En las Tablas (VIII), (IX) y (X) se presentan las frecuencias del antígeno y génicas para las series HLA-A, HLA-B y HLA-DR, para los diferentes subgrupos por nivel socio-económico.

La Tabla (XI) muestra los haplotipos más frecuentes y los haplotipos con Desequilibrio Génico significativo en los subgrupos por nivel socio-económico.

Las frecuencias del antígeno y frecuencias génicas para las series HLA-A, -B y -DR para los diferentes subgrupos por edades se encuentran en las tablas (XII), (XIII) y (XIV) respectivamente.

Los haplotipos más frecuentes y con Desequilibrio Génico significativo se encuentran en las Tablas (XVI) y (XVIIA)- para los diferentes subgrupos por edades.

| ESPECIFICIDAD | HOSPITAL GENERAL S.S.A. | | GORODEZKY | ARELLANO | CHAUVENET | | TERASAKI | |
|---------------|-------------------------|-------|-----------|----------|-----------|-----|----------|-----|
| | F. Ag. | F.G. | F. Ag. | F. Ag. | F. | Ag. | F. | Ag. |
| A1 | 0.060 | 0.030 | 0.120* | 0.136** | 0.143** | | 0.120* | |
| A2 | 0.581 | 0.353 | 0.530 | 0.579 | 0.517 | | 0.540 | |
| A3 | 0.030 | 0.015 | 0.145*** | 0.130*** | 0.143*** | | 0.100** | |
| A9 | 0.300 | 0.160 | 0.352 | 0.270 | 0.087 | | 0.300 | |
| A10 | 0.150 | 0.078 | 0.125 | 0.150 | 0.033*** | | 0.080 | |
| A25 | 0.013 | 0.060 | | | 0.027 | | 0.030 | |
| A26 | 0.019 | 0.010 | 0.010 | 0.007 | 0.030 | | 0.070** | |
| A11 | 0.060 | 0.030 | 0.155** | 0.112* | 0.067 | | 0.080 | |
| Aw19 | 0.026 | 0.013 | | | | | | |
| A28 | 0.086 | 0.044 | 0.150* | 0.113 | 0.163** | | 0.160* | |
| A29 | 0.033 | 0.016 | 0.015 | 0.008 | 0.077** | | 0.100*** | |
| | 0.033 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.050** | | 0.060*** | |

* $p \leq 0.05$

** $p \leq 0.005$

*** $p \leq 0.0005$

TABLA (I) FRECUENCIAS ENCONTRADAS PARA LOS ANTIGENOS DE LA SERIE HLA-A
EN COMPARACION CON OTROS GRUPOS.

| ESPECIFICIDAD | HOSPITAL GENERAL S.S.A. | | GORODEZKY | ARELLANO | CHAUVENET | TERASAKI |
|---------------|-------------------------|-------|-----------|----------|-----------|----------|
| | F. Ag. | F. G. | F. Ag. | F. Ag. | F. Ag. | F. Ag. |
| B5 | 0.183 | 0.100 | 0.240 | 0.206 | 0.180 | 0.100* |
| B7 | 0.276 | 0.150 | 0.110*** | 0.176** | 0.120*** | 0.150** |
| B8 | 0.040 | 0.020 | 0.115* | 0.082* | 0.97* | 0.070 |
| B12 | 0.120 | 0.061 | 0.070 | 0.210*** | 0.180** | 0.200** |
| B13 | 0.020 | 0.010 | 0.020 | 0.050* | 0.123*** | 0.040 |
| B14 | 0.066 | 0.033 | | | | |
| B15 | 0.086 | 0.044 | 0.070 | 0.120 | 0.100 | 0.040* |
| B17 | 0.036 | 0.018 | 0.090 | 0.048 | 0.040 | 0.020 |
| Bw21 | 0.140 | 0.072 | 0.065* | 0.066** | 0.097 | 0.080* |
| Bw22 | 0.017 | 0.008 | 0.045 | 0.030 | 0.030 | 0.010 |
| B27 | 0.026 | 0.013 | 0.050 | 0.041 | 0.047 | 0.040 |
| Bw35 | 0.412 | 0.233 | 0.420 | 0.221*** | 0.353 | 0.330* |
| B37 | 0.066 | 0.033 | | | | |
| B40 | 0.070 | 0.035 | 0.200** | 0.085 | 0.163 | 0.120 |

* $p \leq 0.05$

** $p \leq 0.005$

*** $p \leq 0.0005$

TABLA (11) FRECUENCIAS ENCONTRADAS PARA LOS ANTIGENOS DE LA SERIE HLA-B
EN COMPARACION CON OTROS GRUPOS.

| Haplotipo | Frecuencia del haplotipo (10^3) |
|-----------------|-------------------------------------|
| A2 - B blanco | 115.0 |
| A2 - Bw35 | 101.0 |
| A blanco - Bw35 | 95.7 |
| A blanco - B7 | 51.7 |
| A9 - B7 | 41.6 |
| A9 - Blanco | 39.8 |
| A2 - B5 | 36.7 |
| A blanco - B5 | 36.1 |
| A2 - B7 | 30.2 |

blanco = antígeno que aún no está definido.

Tabla (III). Haplotipos más frecuentes, para las series HLA-A y HLA-B en la población estudiada.

| Haplotipo | D (10^3) | χ^2 |
|--------------|--------------|----------|
| A 10 - Bw 35 | 22.70 | 10.80* |
| A 25 - B 14 | -0.04 | 10.64* |
| A 25 - B 37 | -0.04 | 10.64* |
| A 26 - B 14 | -0.06 | 7.50* |
| A 26 - B 37 | -0.06 | 7.50* |
| A 29 - B 8 | -0.06 | 7.63* |
| A 29 - B 13 | -0.03 | 13.80* |
| A 29 - B 14 | -0.01 | 39.01** |
| A 29 - B 17 | -0.06 | 8.20* |
| A 29 - Bw 22 | -0.02 | 16.40** |
| A 29 - B 27 | -0.04 | 10.70* |
| A 29 - B 37 | -0.01 | 39.00** |
| Aw32 - B 8 | -0.06 | 7.63* |
| Aw32 - B 13 | -0.03 | 13.88** |
| Aw32 - B 14 | -0.01 | 39.00** |
| Aw32 - B 17 | -0.06 | 8.20* |
| Aw32 - Bw22 | -0.02 | 16.40** |
| Aw32 - B 27 | -0.04 | 10.70* |
| Aw32 - B 37 | -0.01 | 39.00** |

* $p \leq 0.01$

** $p \leq 0.001$

TABLA (IV) Haplotipos con desequilibrio génico (D) significativo en la población mestiza mexicana estudiada.

| ESPECIFICIDAD | HOSPITAL GENERAL N = 301 | | STASNY N = 85 | ZEIDLER N = 189 |
|---------------|-----------------------------|-----------|------------------|--------------------|
| | F. ANTIGENO | F. GENICA | F. ANTIGENO | F. ANTIGENO |
| DR1 | 0.295 | 0.160 | 0.041 +++ | 0.200 + |
| DR2 | 0.063 | 0.032 | 0.077 + | 0.150 + |
| DR3 | 0.140 | 0.073 | 0.083 | 0.200 |
| DR4 | 0.300 | 0.150 | 0.154 | 0.380 |
| DR5 | 0.070 | 0.036 | 0.147 +++ | 0.150 ++ |
| DR7 | 0.180 | 0.094 | 0.121 | 0.140 |

TABLA (V) FRECUENCIAS ENCONTRADAS PARA LOS ANTIGENOS DE LA SÉRIE
HLA-DR EN COMPARACION CON OTROS GRUPOS.

+ p \leq 0.05

++ p \leq 0.005

+++ p \leq 0.0005

| HAPLOTIPO | FRECUENCIA DEL HAPLOTIPO (10^3) |
|-----------------|-------------------------------------|
| D blanco - Bw35 | 108.0 |
| D blanco - B 7 | 62.1 |
| D blanco - B 5 | 40.9 |
| DR4 - Bw35 | 32.5 |
| DR4 - B blanco | 28.5 |
| DR1 - B 7 | 27.5 |

TABLA (VI) Haplotipos más frecuentes para las series
HLA-B y -DR en la población estudiada.

| Haplotipo | D (10^3) | χ^2 |
|----------------|--------------|-----------|
| DR3 - B8 | 9.78 | 18.1* |
| DR5 - B12 | 9.00 | 11.8* |
| DR blanco - B8 | -14.20 | 10.45* |
| | | * P=0.001 |

Tabla (VII) Haplotipos con desequilibrio génico
(D) significativo en la población -
estudiada.

| ANTIGENO | NIVEL SOCIO/ECONOMICO ALTO | | NIVEL SOCIO/ECONOMICO BAJO | |
|----------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| | FREC. DEL ANTIGENO | FREC. GENEICA | FREC. DEL ANTIGENO | FREC. GENEICA |
| A 1 | 0.067 | 0.034 | 0.052 | 0.026 |
| A 2 | 0.617 | 0.381 | 0.546 | 0.326 |
| A 3 | 0.020 | 0.010 | 0.039 | 0.019 |
| A 9 | 0.281 | 0.152 | 0.296 | 0.160 |
| A 10 | 0.134 | 0.069 | 0.164 | 0.085 |
| A 25 | 0.013 | 0.006 | 0.013 | 0.006 |
| A 26 | 0.040 | 0.020 | 0.000 | 0.000 |
| A 11 | 0.067 | 0.034 | 0.052 | 0.026 |
| Aw19 | 0.033 | 0.016 | 0.019 | 0.009 |
| A 28 | 0.053 | 0.027 | 0.118 | 0.061 |
| A 29 | 0.000 | 0.000 | 0.006 | 0.003 |
| Aw32 | 0.000 | 0.000 | 0.006 | 0.003 |

TABLA (VIII) FRECUENCIAS DEL ANTIGENO Y GENEICAS PARA LA SERIE
HLA-A EN LOS SUBGRUPOS POR NIVEL SOCIO-ECONOMICO

| ANTIGENO | NIVEL SOCIO-ECONOMICO ALTO | | NIVEL SOCIO-ECONOMICO BAJO | |
|----------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| | FREC. DEL ANTIGENO | FREC. GENICA | FREC. DEL ANTIGENO | FREC. GENICA |
| B 5 | 0.181 | 0.095 | 0.184 | 0.096 |
| B 7 | 0.241 | 0.129 | 0.309 | 0.168 |
| B 8 | 0.033 | 0.016 | 0.046 | 0.023 |
| B 12 | 0.100 | 0.051 | 0.138 | 0.071 |
| B 13 | 0.013 | 0.006 | 0.026 | 0.013 |
| B 14 | 0.000 | 0.000 | 0.013 | 0.006 |
| B 15 | 0.067 | 0.030 | 0.111 | 0.057 |
| B 17 | 0.067 | 0.030 | 0.013 | 0.006 |
| Bw21 | 0.140 | 0.073 | 0.138 | 0.071 |
| Bw22 | 0.006 | 0.003 | 0.026 | 0.013 |
| B 27 | 0.033 | 0.016 | 0.019 | 0.009 |
| Bw35 | 0.409 | 0.231 | 0.414 | 0.234 |
| B 37 | 0.006 | 0.003 | 0.006 | 0.003 |
| B 40 | 0.080 | 0.041 | 0.059 | 0.030 |

TABLA (IX) FRECUENCIAS DEL ANTIGENO Y GENICAS PARA LA SERIE HLA-B EN LOS SUBRUPOS
POR NIVEL SOCIO-ECONOMICO.

| ANTIGENO | NIVEL SOCIO-ECONOMICO ALTO | | NIVEL SOCIO ECONOMICO-BAJO | |
|----------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| | FREC. DEL ANTIGENO | FREC. GENICA | FREC. DEL ANTIGENO | FREC. GENICA |
| DR1 | 0.214 | 0.113 | 0.230 | 0.122 |
| DR2 | 0.060 | 0.030 | 0.056 | 0.026 |
| DR3 | 0.147 | 0.076 | 0.118 | 0.061 |
| DR4 | 0.261 | 0.140 | 0.223 | 0.118 |
| DR5 | 0.067 | 0.034 | 0.046 | 0.023 |
| DR7 | 0.134 | 0.069 | 0.217 | 0.115 |

TABLA (X) FRECUENCIAS DEL ANTIGENO Y GENICAS PARA LA SERIE HLA-DR EN LOS SUBGRUPOS POR NIVEL SOCIO-ECONOMICO.

| NIVEL SOCIO-ECONOMICO | HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES | | HAPLOTIPOS CON DESEQUILIBRIO GENICO | | |
|-----------------------|---------------------------|--|-------------------------------------|----------------------|----------------|
| | HAPLOTIPO | FREC. DEL HAPLOTIPO (10 ³) | HAPLOTIPO | D (10 ³) | X ² |
| BAJO | A blanco - Bw35 | 107.60 | A 3 - B37 | -0.133 | 7.72* |
| | A 2 - Bw35 | 99.00 | Aw19 - B17 | -0.132 | 7.62* |
| | A 2 - B blanco | 80.13 | Aw19 - B37 | -0.065 | 14.05** |
| | A blanco - B 7 | 55.30 | A 25 - B14 | -0.087 | 10.88** |
| | A 9 - B 7 | 55.20 | A 25 - B17 | -0.087 | 10.88** |
| | A 2 - B 7 | 39.21 | A 25 - B37 | -0.043 | 20.41** |
| | | | A 29 - B13 | -0.087 | 10.88** |
| | | | A 29 - B14 | -0.043 | 20.41** |
| | | | A 29 - Bw22 | -0.087 | 10.88** |
| | | | A 29 - B37 | -0.021 | 39.52** |
| | | | Aw32 - B13 | -0.087 | 10.88** |
| | | | Aw32 - B17 | -0.043 | 20.41** |
| | | | Aw32 - Bw22 | -0.087 | 10.88** |
| | | | Aw32 - B 27 | -0.065 | 14.05** |
| | | Aw32 - B 37 | -0.021 | 39.52** | |
| | Bw35 - DR blanco | 113.00 | B 37 - DR5 | -1.55 | 6.83* |
| | B 5 - DR blanco | 53.20 | B 8 - DR3 | 0.01 | 10.23** |
| | B 7 - DR1 | 39.30 | | | |
| | B blanco - DR1 | 37.60 | | | |
| | Bw35 - DR4 | 37.10 | | | |
| ALTO | A 2 - B blanco | 152.10 | A 1 - B blanco | -20.60 | 9.07* |
| | A 2 - Bw35 | 104.50 | A 3 - B 13 | -0.13 | 7.49* |
| | A blanco - Bw35 | 83.59 | Aw19 - Bw22 | -0.14 | 8.83* |
| | A 9 - B blanco | 60.10 | A 3 - B 37 | -0.06 | 13.8* |
| | A 2 - B 5 | 44.20 | A 25 - Bw22 | -0.09 | 20.0** |
| | A 9 - Bw35 | 39.4 | | | |
| | Bw35 - DR blanco | 101.90 | B 37 - DR blanco | -4.57 | 7.37* |
| | B 7 - DR blanco | 54.30 | B 12 - DR5 | -14.50 | 14.44** |
| | B 12 - DR5 | 16.20 | | | |

TABLA (XI) HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES Y CON DESEQUILIBRIO GENICO (D) PARA LOS DIFERENTES SUBGRUPOS POR NIVEL SOCIO-ECONOMICO.

*p ≤ 0.01
**p ≤ 0.001

| ANTIGENO | De 15 a 30 años | | De 31 a 45 años | | De 46 a 60 años | | De 61 años en adelante | |
|----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------------|-----------|
| | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA |
| A 1 | 0.055 | 0.028 | 0.027 | 0.013 | 0.076 | 0.039 | 0.111 | 0.057 |
| A 2 | 0.603 | 0.369 | 0.472 | 0.273 | 0.461 | 0.266 | 0.740 | 0.490 |
| A 3 | 0.035 | 0.017 | 0.050 | 0.028 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| A 9 | 0.306 | 0.167 | 0.305 | 0.166 | 0.256 | 0.137 | 0.185 | 0.097 |
| A 10 | 0.125 | 0.064 | 0.167 | 0.087 | 0.256 | 0.137 | 0.148 | 0.077 |
| A 25 | 0.015 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.025 | 0.012 | 0.000 | 0.000 |
| A 26 | 0.030 | 0.015 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| A 11 | 0.060 | 0.030 | 0.055 | 0.028 | 0.051 | 0.025 | 0.074 | 0.037 |
| Aw19 | 0.025 | 0.012 | 0.055 | 0.028 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.018 |
| A 28 | 0.065 | 0.033 | 0.083 | 0.042 | 0.153 | 0.080 | 0.148 | 0.077 |
| A 29 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.018 |
| Aw32 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.018 |

TABLA XII. FRECUENCIAS DEL ANTIGENO Y FRECUENCIAS GENICAS PARA LA SERIE HLA-A EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS POR EDADES.

| | De 15 a 30 años | | De 31 a 45 años | | De 46 a 60 años | | De 61 años en adelante | |
|----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------------|-----------|
| ANTIGENO | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA |
| B 5 | 0.226 | 0.120 | 0.055 | 0.028 | 0.179 | 0.094 | 0.037 | 0.018 |
| B 7 | 0.291 | 0.158 | 0.277 | 0.150 | 0.256 | 0.137 | 0.185 | 0.097 |
| B 8 | 0.030 | 0.015 | 0.027 | 0.013 | 0.102 | 0.052 | 0.037 | 0.018 |
| B 12 | 0.090 | 0.046 | 0.083 | 0.042 | 0.230 | 0.122 | 0.222 | 0.118 |
| B 13 | 0.010 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.070 | 0.039 | 0.037 | 0.018 |
| B 14 | 0.000 | 0.000 | 0.027 | 0.013 | 0.025 | 0.012 | 0.000 | 0.000 |
| B 15 | 0.075 | 0.038 | 0.138 | 0.072 | 0.128 | 0.066 | 0.037 | 0.018 |
| B 17 | 0.045 | 0.022 | 0.027 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.018 |
| Bw21 | 0.150 | 0.078 | 0.111 | 0.057 | 0.102 | 0.052 | 0.148 | 0.077 |
| Bw22 | 0.020 | 0.010 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.018 |
| B 27 | 0.035 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.018 |
| Bw35 | 0.422 | 0.239 | 0.472 | 0.273 | 0.358 | 0.199 | 0.333 | 0.183 |
| B 37 | 0.005 | 0.002 | 0.027 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| B 40 | 0.070 | 0.035 | 0.083 | 0.042 | 0.051 | 0.025 | 0.074 | 0.037 |

TABLA (XIII). FRECUENCIAS DEL ANTIGENO Y GENICAS PARA LA SERIE HLA-B EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS POR EDADES.

| | De 15 a 30 años | | De 31 a 45 años | | De 46 a 60 años | | De 61 años en adelante | |
|----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------------|-----------|
| ANTIGENO | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA | F. ANTG. | F. GENICA |
| DR1 | 0.266 | 0.120 | 0.333 | 0.183 | 0.179 | 0.094 | 0.111 | 0.057 |
| DR2 | 0.065 | 0.033 | 0.083 | 0.042 | 0.025 | 0.012 | 0.000 | 0.000 |
| DR3 | 0.145 | 0.075 | 0.027 | 0.013 | 0.153 | 0.080 | 0.148 | 0.077 |
| DR4 | 0.261 | 0.140 | 0.277 | 0.150 | 0.205 | 0.108 | 0.111 | 0.057 |
| DR5 | 0.055 | 0.028 | 0.055 | 0.028 | 0.102 | 0.052 | 0.000 | 0.000 |
| DR7 | 0.150 | 0.078 | 0.250 | 0.133 | 0.205 | 0.108 | 0.222 | 0.118 |

TABLA (XIV) FRECUENCIAS DEL ANTIGENO Y GENICAS PARA LA SERIE HLA-DR EN LOS DIFERENTES SUGRUPOS POR EDADES.

| SUBGRUPOS | ANTIGENOS | PROBABILIDAD |
|----------------------------------|-----------|--------------|
| De 15 a 30 contra 31 a 45 años | B 5 | 0.030 |
| De 15 a 30 contra 46 a 60 años | A 10 | 0.050 |
| De 15 a 30 contra 46 a 60 años | B 12 | 0.020 |
| De 15 a 30 contra 61 en adelante | B 5 | 0.030 |
| De 31 a 45 contra 61 en adelante | A 2 | 0.050 |
| De 46 a 60 contra 61 en adelante | A 2 | 0.040 |
| De 46 a 60 contra 61 en adelante | B 15 | 0.002 |

TABLA (XV) ANTIGENOS CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENCONTRADAS AL COMPARAR LOS DIFERENTES SUBRUPOS POR EDADES.

| SUBGRUPOS | HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES | | HAPLOTIPOS CON DESEQUILIBRIO GENICO | | |
|-----------------|---------------------------|---------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------|
| | HAPLOTIPO | FREC. DEL HAPLOTIPO | HAPLOTIPO | D (10 ³) | X ² |
| De 15 a 30 años | A blanco - Bw35 | 89.4 | A 3 - B 37 | -0.08 | 8.48* |
| | A 2 - B blanco | 112.0 | Aw19 - B 37 | -0.06 | 11.31* |
| | A 2 - Bw35 | 120.9 | A 25 - B 13 | -0.07 | 9.56* |
| | | | A 26 - B 7 | -0.07 | 9.56* |
| | | | A 25 - B 37 | -0.03 | 17.95** |
| | DR blanco - B 7 | 64.0 | DR7 - B 37 | -3.16 | 6.73* |
| | DR blanco - Bw35 | 93.3 | DR blanco - B 8 | -14.70 | 10.83** |
| De 31 a 45 años | A 9 - Bw35 | 85.6 | A 1 - B 8 | 13.7 | 8.49* |
| | A blanco - B 7 | 94.5 | A 1 - B 14 | -0.39 | 10.60* |
| | A blanco - Bw35 | 119.0 | A 1 - B 17 | -0.39 | 10.60* |
| | A 2 - Blanco | 163.0 | A 1 - B 37 | -0.39 | 10.60* |
| | | | A blanco - B 14 | -19.60 | 7.65* |
| | DR 4 - Bw35 | 90.3 | DR 3 - B 8 | 13.70 | 8.49* |
| | DR 1 - B blanco | 97.2 | DR 3 - B 14 | -0.39 | 10.60* |
| | DR blanco - Bw35 | 128.0 | DR 3 - B 17 | -0.39 | 10.60* |
| | | | DR 3 - B 37 | -0.39 | 10.60* |
| | | | DR blanco - B 8 | -17.90 | 6.91* |
| De 46 a 60 años | A 2 - Bw35 | 85.7 | A blanco - B 13 | -44.50 | 9.21* |
| | A blanco - B 12 | 78.4 | A blanco - B 40 | -28.80 | 7.27* |
| | A blanco - Bw35 | 106.0 | A 25 - B 14 | -3.37 | 11.35* |
| | DR blanco - B 12 | 44.7 | DR1 - Bw35 | -45.80 | 6.86* |
| | DR blanco - B 7 | 59.5 | DR7 - Bw35 | -53.50 | 7.76* |
| | DR blanco - Bw35 | 148.0 | DR2 - B 14 | -0.33 | 11.35** |

TABLA (XVI) HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES Y CON DESEQUILIBRIO GENICO (D)
PARA LOS DIFERENTES SUBGRUPOS POR EDADES.

| SUBGRUPOS | HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES | | HAPLOTIPOS CON DESEQUILIBRIO GENICO | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------|----------------|
| | HAPLOTIPO | FREC. DEL HAPLOTIPO | HAPLOTIPO | D(10 ³) | X ² |
| De 61 años en adelante. | A blanco-Bw35 | 76.4 | A 1 -Bw21 | 11.70 | 9.17* |
| | A2 -Bw21 | 77.0 | A 2 -B 8 | -28.50 | 8.32* |
| | A2 -Bw35 | 104.6 | A 2 -B 27 | -28.20 | 8.32* |
| | | | Aw19 -B 5 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A219 -B 8 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A219 -B 13 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw19 -B 15 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw19 -B 17 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw19 -B 27 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -B 5 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -B 8 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -B 13 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -B 15 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -B 17 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -Bw22 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | A 29 -B 27 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw32 -B 5 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw32 -B 8 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw32 -B 13 | - 0.71 | 8.39* |
| | | | Aw32 -B 15 | - 0.71 | 8.39* |
| | | Aw32 -Bw22 | - 0.71 | 8.39* | |
| | | Aw32 -B 27 | - 0.71 | 8.39* | |
| | DR 1 -B blanco | 52.7 | DR blanco-Bw22 | -37.30 | 11.80* |
| | DR 7 -B blanco | 52.7 | | | |
| | DRblanco-B 7 | 97.3 | | | |
| | DRblanco-Bw35 | 138.0 | | | |

TABLA (XVIA) HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES Y CON DESEQUILIBRIO GENICO (D)

PARA LOS DIFERENTES SUBGRUPOS PRO EDAD.

Al comparar nuestros resultados para el locus HLA- A-- con los resultados obtenidos en mestizos mexicanos encontramos diferencias significativas en A1, A3 y A11 en el estudio de Arellano (223), además de estos antígenos A 28 con Gorodezky (222).

Los dos grupos de México-americanos comparados con el nuestro revelaron diferencias en A1, A3, A29, A 29. Además - A9 y A10 se presentaron con el grupo de Chauvenet (224) y -- A26 con el de Terasaki (225).

Los antígenos más frecuentes de esta serie son el A2 - y A9 en todos los trabajos presentados, excepto en el de - - Chauvenet en el cual los más frecuentes fueron A2 y A3.

Analizando la Tabla (II) y comparando nuestros resultados con los cuatro estudios citados, encontramos que el antígeno B7 fué significativamente diferente a todos ellos, el B8 únicamente fué concordante con Terasaki y el B12 lo fué - con Gorodezky; el B13 fué concordante con Gorodezky y Terasaki, pero tuvo diferencias significativas con los dos grupos de mestizos, pero no con los México-americanos. Bw35 difirió con Arellano y Terasaki y finalmente B40 tuvo diferencias significativas con Gorodezky y no con los demás.

Los antígenos más frecuentes en nuestra muestra y en las otras cuatro series fueron los antígenos B5 y Bw35, sin embargo en nuestra muestra también lo fueron el B7 y el Bw21.

Si comparamos estos cuatro grupos estudiados, entre -- si en las dos series, encontramos las siguientes diferencias significativas:

Gorodezky con Arellano.

A9, B7, B15, B17 con una probabilidad (p)=0.05
Bw35, B40 =0.0005

Gorodezky con Terasaki.

| | | |
|---------------------|----------------------|--------------|
| A11, A25, Bw22, B40 | con una probabilidad | (p) = 0.5 |
| A26, B12 | " | (p) = 0.005 |
| A29, B5, B17 | " | (p) = 0.0005 |

Gorodezky con Chauvenet.

| | | |
|---------------|----------------------|--------------|
| A25, B 17 | con una probabilidad | (p) = 0.05 |
| A11, A29, B12 | " | (p) = 0.005 |
| A9, A10, B13 | " | (p) = 0.0005 |

Arellano con Terasaki.

| | | |
|-------------------------|----------------------|--------------|
| B5, B12, B15, Bw16, B40 | con una probabilidad | (p) = 0.05 |
| Aw30 | " | (p) = 0.005 |
| A25, A26, A28 | " | (p) = 0.0005 |

Arellano con Chauvenet.

| | | |
|--|----------------------|------------|
| A25 | con una probabilidad | (p)=0.005 |
| A9, A10, A25, A29, Aw31, Bw16, B27, B40 | " | (p)=0.0005 |

Terasaki con Chauvenet.

| | | |
|-------------------|----------------------|------------|
| A10, A26, B5, B15 | con una probabilidad | (p)=0.05 |
| B13 | " | (p)=0.005 |
| A29 | " | (p)=0.0005 |

En cuanto a los haplotipos más frecuentes para las series HLA-A y -B aparecen en la Tabla (III). Dos de ellos - A2-B5 y A2-Bw35 coinciden en ser de lo más frecuentes tanto en nuestra serie como en las otras cuatro.

El haplotipo A Blanco-Bw35 también es muy frecuente, - Gorodezky (222), ha sugerido que quizá este antígeno blanco sea en realidad un antígeno inherente a la población mestiza mexicana.

Los resultados del locus HLA-DR aparecen en la Tabla (V), junto con los obtenidos para esta serie por Stasny (60) y Zeidler (226) en México-americanos. Estos son los únicos autores que han tipificado antígenos de este locus, para mestizos mexicanos aún no se han publicado trabajos en este sentido.

El antígeno más frecuente tanto en nuestro grupo como en los anteriormente mencionados es el DR4, seguido del DR1 en nuestra serie y la de Zeidler.

Cuando comparamos los grupos de México-americanos entre sí, encontramos discrepancias en los antígenos DR1 y DR5 con una $(p)=0.05$.

La Tabla (VI) muestra los haplotipos más frecuentes en las series HLA-B y -DR, siendo los más frecuentes: DR blanco Bw35 y DR blanco-B7, de nuevo encontramos a Bw35 asociado con un antígeno blanco.

Los haplotipos para las series HLA/B y -DR que tuvieron Desequilibrio Génico significativo se muestran en la Tabla (VIII).

La Tabla (VIII) muestra las frecuencias del antígeno y génicas en los antígenos de la serie HLA-A, obtenidas en los diferentes subgrupos formados en cuanto a su nivel socio-económico, tomando como nivel alto a médicos y personal del hospital y bajo a pacientes que acuden a él.

Al comparar los resultados obtenidos para estos dos subgrupos, encontramos que sólo existe una diferencia, en el antígeno A 26 con significancia estadística ($p=0.034$). Si comparamos este mismo antígeno con la población total cuya frecuencia antigénica fue de 0.019 no encontramos diferencia significativa.

La tabla (IX) muestra las frecuencias del antígeno y génicas en los antígenos del locus, HLA-B. Al comparar los resultados obtenidos en los dos subgrupos no se encontró ninguna diferencia significativa para esta serie.

La Tabla (X) que presenta las frecuencias antigénicas y génicas para el locus HLA-DR, al comparar los dos subgrupos por nivel socio-económico, no se encontró diferencias significativas entre ambos grupos.

Los haplotipos más frecuentes que coincidieron en ambos grupos son: A2-B blanco, Ablanco-Bw35, A2-Bw35 y Bw35 - DR blanco; como observamos el antígeno Bw35 aparece en las dos poblaciones asociado con un antígeno blanco, sin que exista variación por nivel socio-económico.

Ningún haplotipo con Desequilibrio Génico (D) coincidió en ambos grupos, los haplotipos con mayor (D) en el nivel socio-económico alto son: A25-Bw22 y B12-DR5, para el nivel socio-económico bajo son: A29-B37, Aw32-B37 y B8-DR3.

Las Tablas (XII), (XIII) y (XIV) presentan las frecuencias del antígeno y génicas para los locus HLA-A, -B y -DR, respectivamente para los cuatro subgrupos por edades.

Comparando los resultados de los subgrupos por edades entre sí, encontramos algunas diferencias significativas, las cuales se muestran en la Tabla (XV).

Los haplotipos más frecuentes en los cuatro subgrupos por edades, son: Ablanco-Bw35 y Bw35 - DR blanco, y se vuelve a encontrar un antígeno blanco y Bw35 como muy frecuentes, sin que exista variación por edad o por nivel socio-económico y esto tal vez sugiera que estos haplotipos A blanco - Bw35 - DR blanco sean inherentes a la población mestiza mexicana.

3.5 DISCUSION.

Este trabajo presenta las frecuencias antigénicas del sistema HLA, en un grupo particular de mestizos. Las discrepancias encontradas entre nuestro grupo y los de comparación y entre ellos mismos, las podemos dividir y localizar como sigue:

1. La especificidad y sensibilidad variable de los antisueros utilizados puede provocar la aparición de diferencias (227). Aún cuando los antisueros utilizados provengan de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (INH), se ha encontrado que no siempre son monoespecíficos.

En nuestro caso, dos antisueros para las especificidades A3 y DR5 marcaban inespecíficamente. Al comparar las frecuencias antigénicas que obtuvimos con las de los otros grupos las diferencias fueron bastante significativas en estas dos especificidades.

2. Las diferencias en el tamaño de la muestra pueden ser importantes, especialmente en antígenos poco frecuentes como es el A1, A25, B13, Bw22.

3. Reacciones cruzadas entre los antígenos que pertenecen a un mismo CREGs.

4. Diferencias reales entre las poblaciones estudiadas. Es significativo que el nivel de discrepancias y el número de ellas es mayor entre nuestro grupo y el de méxico-americanos, esto es explicable ya que los méxico-americanos han estado sujetos a la mezcla con caucásicos y orientales. (223).

Sin embargo, las discrepancias encontradas entre nuestro grupo y los otros de mestizos mexicanos del D.F., son más difíciles de explicar. El estudio de Gorodezky (222) refiere que los 200 individuos estudiados eran donadores aparentemente sanos seleccionados al azar de la población mestiza mexicana del D.F., El Trabajo de Arellano (223) refiere que los 665 individuos eran adultos sanos que asisten al La-

boratorio de Histocompatibilidad del C.M.N.

Nuestro grupo estuvo conformado en un 50% por médicos y personal del hospital y el 50% restante de pacientes que acuden al Hospital General de la S.S.A.

El Hospital General atiende en su consulta externa en promedio 100 321 individuos anualmente.

Pertenecen al D.F. y al Edo. de México el 84.28% de estos individuos. De este porcentaje el 40.0% proviene de Cd. Nezahualcoyotl, que sabemos está integrada por una población foránea muy importante y el 43.88% restante proviene de otras zonas del Edo. de México. El resto de la consulta (15.72%) la conforman en orden decreciente pacientes originarios de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Oaxaca, Veracruz, Zatecas y Yucatán.

Si bien estas cifras son aproximadas revelan la gran heterogeneidad de la muestra.

Resulta por otra parte, de bastante interés poder constatar la presencia de antígenos en nuestra muestra y en las de comparación que apoyan la hipótesis del origen de los Amerindios.

Se cree que la América fué poblada en el tiempo de los grandes glaciales, ya que facilitaron el paso de los moradores del Asia a América por el Estrecho de Bering, estos al transcurso de los siglos, llegaron a extenderse por toda América.

El antígeno A9 es muy común en la población mongoloides (59) tiene una frecuencia del antígeno de 0.37 siendo también muy común en poblaciones Amerindias, como por ejemplo los nahuas y los mayas que en México tienen una frecuencia del antígeno de 0.25 u 0.20 respectivamente, los ticunas en Brasil (0.53) y los quechuás de Perú 0.20 (228).

Las poblaciones mestizas tienen una frecuencia elevada de este antígeno (A9), que en nuestra muestra fué de 0.30 lo

mismo que en los México-Americanos.

Estos resultados tal vez llegan a reforzar la hipótesis del origen de los primeros moradores de América.

El antígeno A28 que es muy frecuente en poblaciones -- negras africanas, con una frecuencia antigénica de 0.089 - - (59), está también presente en mestizos y México-Americanos, (0.086 y 0.160 respectivamente) lo cual nos demuestra un componente negroide dentro de la población mestiza mexicana.

Existen antígenos como el Bw35 que es muy abundante -- dentro de los mestizos y méxico-americanos, siendo frecuen-- te también en poblaciones indígenas de América (228), pero - aparece poco en otras razas (59), por lo que se podría sugerir que se trata de un antígeno inherente a la población de América.

El antígeno DR4, es otro antígeno muy frecuente en mestizos mexicanos (0.30) y en México-Americanos (0.38) sin em-- bargo no es frecuente en caucásicos (0.078) o negros africa-- nos (0.035) (59) por lo que es otro antígeno característico-- de poblaciones americanas.

Debe de mencionarse que ciertos antígenos frecuentes - en españoles A1, A3, A-9, B12, B7, y B8 (229), se encuen-- tran presentes en nuestra muestra de mestizos, aunque con -- una frecuencia más baja, lo cual ha de esperarse.

Como se puede apreciar existen en los mestizos mexica-- nos antígenos marcadores de raza mongoloide y que están más-- acentuados en los Amerindios. Existen también marcadores - - caucásoides y negroides, que da por resultado, cambios en -- la composición racial y génica del mestizo por lo cual se le considera un grupo étnico independiente.

La subdivisión de la población por nivel socio-económí-- co y por edad también nos proporciona datos importantes e interesantes en el estudio de la población mestiza.

Al subdividir la población por nivel socio-económico y comparar estas subdivisiones entre sí, no se encontraron diferencias significativa, excepto en el antígeno A26, por lo cual podría concluirse que en nuestra población no existen diferencias debidas a nivel socio-económico.

Los datos obtenidos en los subgrupos por edades son -- muy interesantes como es el caso del antígeno A9, en el cual la frecuencia del antígeno va aumentando paulatinamente en las generaciones más jóvenes, sugiriendo el predominio de la raza amerindia.

El antígeno A 28 va disminuyendo su frecuencia conforme disminuye la edad, lo cual nos demuestra que el componente negroide se va diluyendo cada vez más en la población.

La frecuencia del antígeno B7 se va incrementando en las poblaciones jóvenes al contrario del antígeno B12 que -- disminuye su frecuencia cuanto más joven es la población. El antígeno Bw35 tiene una frecuencia muy uniforme en los subgrupos, tal vez se trate de un antígeno que caracteriza a la población mestiza mexicana desde siempre.

Existen antígenos como el B5 que no tienen una tendencia a subir o bajar sino que su frecuencia es oscilatoria; -- las frecuencias más altas las encontramos en los subgrupos de 15 a 30 y 46 a 60 años y los menores en los subgrupos de 31 a 45 y 61 en adelante, lo cual difícilmente podría ser -- explicado.

En la serie DR el antígeno DR1, aumenta muy discretamente su frecuencia conforme disminuye la edad, lo contrario -- del antígeno DR7 que aumenta su frecuencia en el grupo de -- edad avanzada.

Todo esto nos corrobora la importancia de la edad en -- un estudio de genética de población, sobre todo en poblaciones como la nuestra en la que existen constantes mezclas con otras razas, para no incurrir en errores de análisis, sobre -- todo cuando se realiza un estudio de asociación HLA y enfermedad.

3.6 CONCLUSION.

La información sobre la estructura genética del mexicana no proviene principalmente de dos tipos de estudios: unos -- con orientación fundamentalmente médica y otros con orientación antropológica, realizados con el objeto de caracterizar biológicamente a determinada población.

Los estudios médicos se han intensificado en la actualidad para poder delinear el componente genético de la población y lograr entender la patología derivada de ella.

La tipificación de antígenos de histocompatibilidad es una herramienta muy valiosa, para caracterizar la estructura genética de la población, pero además tiene una gran importancia clínica, ya que algunos antígenos de este sistema están asociados con enfermedad.

La importante asociación de antígenos de Histocompatibilidad y enfermedades reumáticas, les confiere gran valor en el diagnóstico.

La investigación profunda de las asociaciones de antígenos del sistema HLA y enfermedad nos llevará en un futuro no lejano, a la prevención y detección temprana de estos padecimientos. Es de importancia para la realización de trabajos de asociación entre antígenos HLA y enfermedad, tomar -- muy en cuenta la gran heterogeneidad existente en las diferentes poblaciones mestizas.

Esta tesis nos pone de manifiesto la importancia que -- reviste la tipificación de antígenos tanto en el área antropológica como en la caracterización de la estructura genética de la población, enfatizando la gran heterogeneidad genética en antígenos de este sistema en mestizos. Es de esperarse que en futuros trabajos que se realicen con la finalidad de -- asociar antígenos del sistema HLA y enfermedad se tome muy -- en cuenta esta heterogeneidad para no incurrir en errores -- que puedan llevarnos a la obtención de resultados falsos.

APENDICE I.

Esta tesis no quedaría concluída sin antes hacer men--
ción del estudio que presenta Mendoza (230), en el cual se -
tipifican antígenos HLA para las series A, B, y DR en mesti-
zos mexicanos.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por-
este autor, encontramos que existe una estrecha correlación-
en las frecuencias fenotípicas para los antígenos HLA-A, -B;
para los antígenos de la serie HLA-DR encontramos algunas di-
ferencias significativas como en el caso del antígeno DR4 --
con una $p=0.00002$ y el antígeno DR5 con una $p=0.006$.

Estas diferencias pueden ser explicadas por los argu--
mentos antes expuestos.

IV. BIBLIOGRAFIA

V. Bibliografía.

- 1.- Gorer, P.A. (1936). The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by employment of immunesera. - Brit. J. exp. Path. 17, 42.
- 2.- Gorer, P.A. (1937). The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. J. Path. Bact. 44, 691.
- 3.- Gorer, P.A., Lyman, J. and Snell, G.D. (1948). Studies on the genetic and antigenic basis of tumor transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and "fused" in mice. Proc. Roy. Soc. B. 135, 449.
- 4.- Conce, S., Smith, P., Barth, R. and Snell, G.D. (1956). - Strong and weak histocompatibility differences in mice - and their role in the rejection of homografts of tumours and skin. Ann. Surg. 144, 198.
- 5.- Gorer, P.A. and O'Gorman, P. (1956). The cytotoxic activity of isoantibodies in mice. Transplant. Bull. 3, 142.
- 6.- Snell G.D., Dausset, J., Nathenson, S., (1980). Serologically and Histogenetically Demonstrated Loci of the H-2 complex in Histocompatibility. Page 92-125. Academic Press New York.
- 7.- Shreffler D.C. (1977). The H-2 Model: Genetics Control of Immune Functions in HLA and disease, page 32-45. - - Munksgaard Copenhagen.
- 8.- Amos, D.B. (1962). Isoantigens of mouse red. cells. Ann-N.Y. Acad. Sci. 97; 69.
- 9.- Snell, G.D., Hoëcker, G., Amos, D.B. and Stimpfling, J.-H. (1964). A revised nomenclature for the Histocompatibility-2 locus of the mouse. Transplantation 2, 777.

- 10.- Klein, J., Bach, F.H., Festenstein, H., McDevitt, H.O., Shreffler, D.C., Snell, G.D. and Stimpfling, J.H. (1974). Genetics nomenclature for the H-2 complex of the mouse. *Immunogenetics* 1,184.
- 11.- Shreffler D.C., David, C.J., Gotze, D., Klein, J., Mc -- Devitt, H.O. and Sachs, D.H. (1974). Genetics nomenclature for new lymphocyte antigens controlled by the re- - gion I of the H-2 complex. *Immunogenetics* 1,189.
- 12.- Singer, S.J., and Nicholson, G.L. (1972). The fluid - - mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175,720.
- 13.- Nathenson, S.G., Brown, J.K., Ewemstein, B.M., Rajan, -- T.U., Freed, J.H., Sears, D.W., Mole, L.E., Scharff, M.- D. (1976).
Studies on the chemical basis of variability and the - - complex cellular expression of the H-2K and H-2D products. In: *The role of the Histocompatibility Gene Complex in - Immune Responses*, page 647. Ed. by Katz and B. Benace- - rraf. Academic Press, N.Y.
- 14.- Cullen, S.E., Schwartz, B.D., Nathenson, S.G. and Cherry M. (1972). The molecular basis of codominant expression - of the Histocompatibility-2 genetic region. *Proc. Nat. - Acad. Sci. (Wash)* 69, 1394.
- 15.- Neauport-Sautes, C., Lilly, F., Silvestre, D. and Kouril sky, F.M. (1973). Independence of H-2K and H-2D antigenic -- nic determinants on the surface of mouse lymphocytes. *J. exp. Med.* 137,511.
- 16.- Cullen, S.A., David, C.S., Shreffler, D.C., and Hathen-- son, S.G. (1974). Membrane molecules determined by the - H-2 associated immune response region. Isolation and so- me properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 71,648.

- 17.- Lemonnier, F., Neauport-Sautes, C., Kourilsky, F. and -
Démant, P. (1975). Relationship between private and --
public H-2 specificities on the cell surface. Immunoge-
netics 2, 517.
- 18.- Morello, D., Neuport-Sautes, C. and Démant, P. (1977).-
Topographical relation ship among H-2 specificities con-
trolled by the D region. Immunogenetics 4, 349.
- 19.- Démant, P. Snell, G.D., Hess, M., Lemonnier, F., Neu- -
port-Sautes, C. and Kourilsky, F. (1975). Separate and-
polymorphic loci controlling two types of polypeptide -
chain bearing the H-2 private and public specification-
J. Immunogenet. 2, 263.
- 20.- Neauport-Sautes, C., Joskiewitz, M. and Démant, P. - -
(1978). Molecular relationship between private and - -
public H-2 specificities. Further evidence for two sepa-
rate loci (H-2D y H-2L) in the D region of the H-2 com-
plex. Immunogenetics 6, 321.
- 21.- Passmore, H.C. and Shereffler, D.C. (1978). A sex limi-
ted serum protein variant in the mouse: Inheritance and
association with the H-2 region. Biochem. Genet. 4, - -
351.
- 22.- Saunders, D. and Ediden, M. (1974). Sites of localiza-
tion and synthesis of Ss protein in mice. J. Immunol.--
112, 2210.
- 23.- Festenstein, H. and Démant, P. (1978) HLA and H-2 Basic
Immunogenetics, Biology and Clinical Relevance. Biolo-
gy and Clinical Relevance. Biologia del MHS. En: Inmuno-
genetica Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas-
de HLA y H-2, 1981, pág. 181, Ed. por el Manual Moderno,
S.A.

- 24.- Démant, P., Cpakova, J., Hinzova, E. and Voracova, B. - (1978). The role of the Histocompatibility-2 linked - - Ss-Slp region in the control of mouse complement. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 70,863.
- 25.- Hinzova, E., Démant, P. and Ivanyi, P. (1972). Genetics control of haemolytic complement in mice: association - with H-2. Foliabiol. (Praha) 18, 237.
- 26.- Lachmann, P.J., Grennan, D., Martin, A. and Démant, P.- (1978). Identification of Ss protein as murine C4. Nature (Lond.) 258, 242.
- 27.- Shreffler, D.C. and David, C.S. (1975). The H-2 major - histocompatibility complex and the I immune response re gion: Genetics variation, function and organization. -- Adv. Immunol. 20, 125.
- 28.- David, C.S., Shreffler, D.C. and Frelinger, J.A. (1978). New lymphocyte antigen system (Lna) controlled by the - Ir region of the H-2 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2509.
- 29.- Lieberman, R., Paul, W.E., Humphrey, W. and Stimpfling, J.H. (1976). H-2 linked immune response genes. Independence loci for Ir-IgG and Ir-IgA genes. J. exp. Med. -- 136, 1231.
- 30.- Delovitch, T.L., and McDevitt, H.O. (1975). Isolation-- and characterization of murine Ia antigens. Immunogenetics 2, 39.
- 31.- Okumura, K., Herzenberg, L.A., Murphy, D.B. and Mc De-- vitt, H.O. (1976). Selective expression of H-2 (I-re- - gión) loci controlling determinants on helper and suppre- ssor T lymphocytes. J. exp. Med. 144, 685.

- 32.- Hammerling, G.J., Mauve, G., Goldberg, E., and McDevitt H.O. (1975). Tissue distribution of Ia antigens. Ia on spermatozoa, macrophages, and epidermal cells. *Immunogenetics* 1, 428.
- 33.- Hauptfeld, V., Hauptfeld, M., and Klein, J. (1974). Tissue distribution of I region associated antigens in the mouse. *J. Immunol.* 113, 181.
- 34.- Sanderson, A.R., and Davies, D.A. (1974). Genetic control of cell surface. *Progr. Immunol.* 2, 364.
- 35.- McKenzie, I.F., Clarke, A., and Parish, C.R. (1977). Ia antigenic specificities are oligosaccharide in nature: haptens inhibition studies. *J. exp. Med.* 145, 1039.
- 36.- McDevitt, H.O., and Benacerraf, B. (1979). Genetic control of specific immune response. *Adv. Immunology* 11, 31.
- 37.- McDevitt, H.O. and Tyan, M.L. (1978). Genetic control of antibody response in inbred mice. Transfer of response by spleen cells and linkage to the major histocompatibility (H-2) locus. *J. exp. Med.* 128,1.
- 38.- McDevitt, H.O., Deak, B.O., Shreffler, D.C., Klein, J., Stimpfling, J.H. and Snell, G.D. (1972). Genetic control of immune response. Mapping of the Ir-1 locus. *J. exp. Med.* 135, 1259.
- 39.- Snell, D.G., Dausset, J., Nathanson, S. (1980). Immune response genes. In: *HLA and disease*, page 133-144. - - Munksgaard Copenhagen (Ed).
- 40.- Dorf, M.E., Mauren, P.H., Merryman, F.C. and Benacerraf, B. (1976). Inclusion group systems and cis-trans effects in responses controlled by the two complementing Ir-GLD genes. *J. exp. Med.* 143, 889.

- 41.- Dorf, M.E., Stimpfling, J.H. and Benacerraf, B. (1975). Requirement for two H-2 complex Ir genes for the immune response to the L-Glu, L-lys, L-lys, L-phe terpolymer.- J. exp. Med. 141, 1469.
- 42.- Shearer, G.M., Mozes, E. And Sela, M. (1972). Contribution of different cell types to the genetic control of immune responses as a function of the chemical nature -- of the polymeric side chain (Poly-L-proly and poly-Di-alanyl) of synthetic Immunogens. J. Exp. Med. 135, 1009.
- 43.- Kapp, J., Pierce, C.W. and Benacerraf, B. (1979). Genetic control of immune response in vitro III. Tolerogenic properties of the terpolymer L- glutamic acid⁶⁰ - - L-alanina³⁰ L-tyrosine (GAT) for spleen cells from non-responder (H-2^S and H-2^E) mice. J. exp. Med. 140, 172.
- 44.- Katz, D.H., Graves, M., Dorf, M.E., Dimuzio, H. and - - Benacerraf, B. (1975). Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. VII. Cooperative responses between lymphocytes are controlled by genes in the I region of the H-2 complex. J. exp. Med. 141, 263.
- 45.- Emill, R., Unanue, M.D. (1980). Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. New - Eng. J. Med. 303, 977.
- 46.-Lilly, F. and Pincus, T.H. (1979). Genetic control of murine viral leukemogenesis. Adv. Cancer Res. 17, 231.
- 47.- Blanden, R.V., Hapel, A.J. and Jackson, D.C. (1976). -- Mode of action of Ir genes and the nature of T cell receptors for antigen. Immunochemistry 13,179.
- 48.- Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Althage, A., Cooper, S., Klein, P.A. and Klein, J. (1978) On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition. J. exp. Med. 147, 882.

- 49.- Ivanyi, P., Hampi, R., Starka, L. and Mickova, M. (1972) Genetic association between H-2 gene and testosterone - metabolism in mice. *Nature, New Biol.* 238,280.
- 50.- Cheserebro, B., Webrly, K., and Stimpfling, J. (1974).- Host Genetic control of recovery from Friend leukaemia-virus-induced splenomegaly: mapping of a gene within -- the mayor histocompatibility complex. *J. exp. Med.* 140, 1457.
- 51.- Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Klein, J., Dennert, G. (1978). Cytotoxic T cell learn specificity for self-H-2 during differentiation in the thymus. *Nature*, 271,-251.
- 52.- Dausset, J. (1958). Iso-leucoanticorps. *Acta Haemat (Basel)* 20, 56.
- 53.- Van Rood, J.J. (1962). The leukocyte grouping. A method and its application (Thesis for PhD degree) University of Leiden.
- 54.- Payne, R., Tripp, M., Weigle, J., Bodmer, W.F. & Bodmer, J.G. (1964). Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol. 29, -285.
- 55.- Van Rood, J.J., Ed. (1965). Histocompatibility testing-- 1965 (Report of a Conference and Workshop, 15 August - - 1965). Munksgaarg, Copenhagen.
- 56.- Kissmeyer-Nielsen, F., Svejgaard, A., H auge, M., (1968). Genetics of the Human HL-A transplantation system. *Nature (London)* 219, 1116.
- 57.- Terasaki, P.I., ed. (1970). Histocompatibility 1970 (Report of an International Workshop held at UCLA and Palm Springs, Calif., 20 26 January 1970). Munksgaard, Copenhagen.

- 58.- Dausset, J. & Colombani J., ed. (1973). Histocompatibility testing (1972 (Report of and International Workshop held at Evian, 23-27 May 1972). Munksgaard, Copenhagen.
- 59.- Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H. & Morris, P.J., ed. (1978). Histocompatibility testing 1977 (Report of the Seventh International -- Histocompatibility Workshops and Conference, Oxford). - Munksgaard, Copenhagen.
- 60.- Terasaki, P.I. (1980). Histocompatibility Testing 1980. Los Angeles UCLA. Tissue Typing Laboratory.
- 61.- Jongsma, A., Someren, J., Westerwald, A., Hage-Meijer, A., and Pearsen, P., (1973). Localization of genes of human chromosomes by studies of human-chinese hamster-somatic cell hybrids. Human genetik 20, 195.
- 62.- Lamm, L.M., Fredrich, U., Peterson, G.B., Jorgensen, J., Nielsen, J., Therkelsen, A.J. and Kissmeyer-Nielsen, F., (1974). Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome 6 in a family with a -
- 63.- Breuning, M.H., van den Berg-Loone, E.M., Bernini, L.F., Bijlsma, J.B., van Loghem, E., Khan, P.M., and Nijenhuis, L.E. (1977). Localization of HLA on the - - short arm of chromosome 6. Hum. Genet. 37, 191.
- 64.- Kinderpoliklinik, E.A., Amos, D.B., Bodmer, W.F., Cappelini, R., Dausset, J., Kissmeyer-Nielsen, F., - - Mayr, W., Payne, R., van Rood, J.J., Terasaki, P.I., - Wolford, R.L. (1980). Nomenclature for Factors of the HLA system 1980. Tissue Antigens 16, 113.
- 65.- Alper, C.A. (1976). Inherited structural polymorphism in human C2; Evidence for genetic linkage between C2 - and Bf. J. exp. Med. 144, 1111.

- 66.- Ochs, H.D., Rosenfeld, I.S., Thomas, D.E., Giblett, R.-E., Alper, A.C., Dupont, B., Schaller, G.J., Gilliland, C.B., Hausen, A.J., Wedgwood, S.R. (1977). Linkage between the gene (or genes) controlling synthesis of the - fourth component of complement and the Mayor Histocompa_utibilidad Complex. *New Eng. J. Med.* 296, 470.
- 67.- Peterson, B.G., Lamm, U.L., Junker, S.I., Buskjrer, L., and Plen, M.J. (1981). Family studies of Complement C4- and HLA in man. *Hum. Genet.* 58, 260.
- 68.- Teisberg, P., Akeson, I., Olaisen, B., Gedde-Dahl, T., - Thorsby, E., (1976). Genetic polymorphism of C4 in man- and localization of a structural C4 locus to the HLA -- gene complex of chromosome 6. *Nature* 264, 253.
- 69.- O'Neil, G.J., Yang, S.Y., Dupont, B. (1978b). Two HLA- linked loci controlling the fourth component of human - complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 5165.
- 70.- O'Neil, G.J., Yang, S.Y., Tegoli, S., Berger, R., Du- - pont, B., (1978a). Chido and Rodgers blood group are -- distinct antigenic components of human complement C4. - *Nature*, 273, 668.
- 71.- Filley, C.A., Romans, D.G., Crookston, M.C. (1978). Lo- calization of Chido and Rodgers determinants to the C4d fragment of human C4. *Nature* 276, 713.
- 72.- Lamm, L.U., Jorgensen, F., Kissmeyer-Nielsen, F., (1976) Bf maps between HLA-A and D loci. *Tissue Antigens* 7, -- 122.
- 73.- Hauptmann, G., Susportes, M., Tongio, M.M., Mayer, S., - Dausset, J., (1976). Localization of the Bf locus wi- - thin the MHS region on chromosome 6. *Tissue Antigens* -- 7, 52.

- 74.- Raum, D., Glass, D., Carpenter, B.C., Schur, H.P., and Alper, A.C. (1979). Mapping of the structural gene for the Second Component of Complement with respect to the Human Major Histocompatibility Complex Am. J. Hum. Genet. 31, 35.
- 75.- Curry, R.A., Dierich, M.P., Pellegrino, M.A., Hoch, J.A. (1976). Evidence for linkage between HLA antigens and receptors for components C3b y C3d in human-mouse hybrids. Immunogenetics 3, 465.
- 76.- Merritt, A.D., Peterson, B.H., Biegel, A.A., Meyers, D. A., Brooks, G.F., and Hodes, M.E., (1976). Chromosome 6: Linkage of the eight componente of complement (C8) to the histocompatibility region (HLA), in: Baltimore Conference (1975), Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, Vol. 12, 364, The National Foundation, New York.
- 77.- Jerseld, C., Rubenstein, P., Day, N.K., (1976). The HLA-system and inherited deficiencies of the complement system. Transplant. Rev. 32, 43.
- 78.- Muller-Eberhard, H.J. (1975). Complement. Ann. Rev. Bioch. 44,697.
- 79.- Pollack, S.M., New, M.I., O'Neil, J.G., Levine, L.S., Callaway, C., Pang, S., Cacaroni, F., Mantero, F., Cassio, A., Searoni, C., Chiumello, G., Rondanini, G.F., Gargantini, L., Giovannelli, G., Vindis, R., Bartolatto, E., Mighori, C., Pintor, C., Tato, L., Barboni, F., and Dupont, B., (1981). HLA Genotypes and HLA-Linked Genetic Markers in Italian patients with classical 21-Hydroxylase Deficiency. Hum. Genet. 58, 331.
- 80.- Olaisen, B., Gedde-Ahl, Jr. T., Thorsby, E. (1976). Localization of the human GLO gene locus. Hum. Genet. 32, 301.

- 81.- Lamm, U.L., Kissmeyer-Nielsen, F., and Henningsen, K. - (1970). Linkage and association studies of two phosphoglucomutase loci (PGM1 and PGM3) to eighteen other markers. *Human Heredity* 20, 305.
- 82.- Van Someren, H., Westerveld, A., Mess, R.J. and Khan, M. P. (1974). Human antigen and enzyme markers in man-chinese Hamster somatic cell Hybrids: Evidence for syntenic between the HLA, PGM3, Me1 and IPO-B loci. *Proc. Natl.-Acad. Sci. U.S.A.* 71, 962.
- 83.- Pellegrino, MA., Curry, R.A., Pellegrino, A.C., Hock, - J.A. (1976). Linkage between the B cell specific receptor for monkey red blood cells and HLA. *Immunogenetics*-2, 543.
- 84.- Craig, W., Tolley, E., and Bobrow, M. (1977). Assignment of a gene necessary for the expression of mitochondrial glutamate oxalo acetate transaminase in human-mouse - - hybrid cell. *Forth International Workshop in Human Gene Mapping, Canada.*
- 85.- Smith, M., Hirschhorn, K. (1978). Location of genes for human heavy chain immunoglobulin to chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 3367.
- 86.- Weitkamp, R.L. (1977). Further data concerning the linkage relationship of loci for urinary pepsinogen and - HLA. *Fourth International Workshop on Human Gene Mapping Winnipeg, Canada.*
- 87.- Bodmer, W.F. (1972). Evolutionary significance of the - HL-A system. *Nature (Lon.)* 237, 139.
- 88.- Bodmer, W.F., Bodmer, J.G. (1978). Evolution and function of the HLA system. *Br. Med. Bull.* 34, 309.

- 89.- Bijnen, A.B., Schreuder, I., Meera Khan, P., Allen, F.-H., Giles, C.M., Los, W.r.t., Voikers, W.S., and van Rood J.J. (1976). Linkage relationship of the major histocompatibility complex in families with a recombination in the HLA región. *J. Immunogenet.* 3, 171.
- 90.- Nielsen, L.S., Ryder, L.P. and Svejgaard, A. (1975). -- The third (AJ) segregant serie in: *Histocompatibility - Testing 1975*, (F. Kissmeyer Nielsen, ED.) pp. 324-329, - Munksgaard, Copenhagen.
- 91.- Keuning, S.S., Termijtelen, A., Blusse van Oud Alblas, A., Gabb, B.W., D'Amaro, J. and van Rood, J.J. (1975). - LD (MLC) population and family studies in a Dutch population in: *Histocompatibility Testing, 1975* (F. Kissmeyer-Nielsen, ed.), pp. 533-543. Munksgaard, Copenhagen.
- 92.- Lamm, L.U., Kristensen, T., Kissmeyer-Nielsen, F., and Sorgensen, f. (1977). On the HLA-B; -D map distance. -- *Tissue Antigens* 10, 394.
- 93.- Weitkamp, L.R. (1976). Linkage of GLO with HLA y Bf effect of population and sex on recombination frequency *Tissue-Antigens* 7, 273.
- 94.- Barnstable, C.J., Jones, E.A. y Crupton, M.J. (1978). - Isolation, esturcture and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens *Br. Med. Bull.* 34, 241.
- 95.- Springer, A.T., and Strominger, L.J. (1976). Detergent-soluble HLA antigens contain a hydrophilic region at -- the cool-terminus and a penultimate hydrophobic region *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 2481.
- 96.- Bridgen, J., Snary, D., Crumpton, J.M., Barnstable, C , Goodfellow, P., and Bodmer, F.W. (1976). Isolation and N-terminal amino and sequence of membrane-bound human - HLA-A and HLA-B antigens *Nature* 261, 200.

- 97.- Springer, A.T. Strominger, L.J. and Mann, D., (1974). -
Partiel Purification of detergent-soluble HLA antigen -
and its cleavage by Papain Proc. Nat. Acad. Sci. 71, --
1539.
- 98.- Cinningham, A.B. (1977). Estructura y Funcionamiento de
los Antigenos Histocompatibles. Investigación y Cien- -
cia 15, 66.
- 99.- Goodfellow, P.N., Jones, E.A., Heyningen, V. van, Salo-
món, E., Bebrow, M., Miggiano, V. and Bodmer, W.F. - -
(1975). The B2 microglobulina gene is on chromo some --
15 and not in the HLA region. (Lond) 254, 267.
- 00.- Crumpton M.J. (1976). The antigens, Sela M., ed. pp 1-78.
Academic Press New York.
- 01.- Henriksen, O., Apella E., Smith, D.F., Tanigaki, N. and
Pressman, D. (1976). J. Biol. Chem. 251, 4214.
- 102.- Terhorst, C., Robb, R., Jones, C. and Strominger, J.L.-
(1977). Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 4002
- 103.- Parham, P., Alpert, B.N., Orr, H.T. and Strominger, J.-
L. (1977). Carbohydrate moiety of HLA antigens; antige-
nic properties and amino acid sequences around the site
of glycosylation. J. Biol. Chem. 252, 7555.
- 104.- Strominger, J.L., Engelhard, V.H., Fuks, A., Guild, B.-
C. Hyafil, F., Kaufman, J.F., Korman, A.J., Kostyk, - -
T.G., Krangel, M.S., Lancet, D., López de Castro, J.A.-
Mann, D.L., Orr, H.T., Parham, P.R., Parker, K.C., Loegh,
H.L., Pober, J.S., Robb, RL., Schackelford, D.A. (1981).
The Biochemical analysis of products of the major histo-
compatibility complex, in: The Role of the Major Histo-
compatibility Complex in Immunobiology, Benacerraf, B.,
and Dorf, M. ed. New York. Garland Publishing Co. pp.--
115.

- 5.- Ferrara, G., Tosi, R., Longo, A., Castellani, A., Vivani, C., Carminati, G. (1978). Silent alleles at the HLA-C locus. *J. Immunol.* 121, 731.
- 06.- Lee, S.J., Trowsdale, J. and Bodmer, F.W. (1980). Synthesis of HLA antigens from membrane-associated messenger-RNA. *J. Exp. Med.* 152, 3.
- 07.- Trowsdale, J., Travers, P., Bodmer, F.W. and Patillo -- A.R. (1980). Expresión of HLA-A, -B, y -C and beta-2 - microglobulina antigens in human choriocarcionama cell-lines. *J. Exp. Med.* 152, 11.
- 108.- Ploegh, L.H., Cannon, E.L. and Strominger, J.L. (1979). Cell-free translation of the mRNAs for the heavy and -- light chain of HLA-A and -B antigens, *Proc. Natl. Acad.* 76, 2273.
- 109.- Amos, D.B., and Ward, F.E. (1975). Immunogenetics of -- the HLA system. *Physiol. Rev.* 55, 206.
- 110.- Albert, E.D. and Götze, D. (1977). The major histocompa tibility system in man in: *The Major Histocompatibili- ty system in man and animals.* D. Gotse, ed. pp. 7, - - Springer-Verlag. New York.
- 111.- Moraes, J.R. and Stasny, P. (1975). Alloantibodies and o thelial cell antigens, in: *Histocompatibility Testing,* - (1975). Kissmeyer-Nielsen F., ed. pp 391, Munksgaard, - Copenhagen.
- 112.- Gibofsky, A., Jaffe, E.A., Fettino, M. and Becker, C.G. (1975). The identification on HLA antigens on fresh and cultured human endothellial cells, *J. Immunol.* 115, - - 730.
- 13.- Faulk, W.P., Sanderson, A.R., Temple, A. (1977). Distrí bution of MHC antigens in human placental chorionic - - villi. *Transplant. Proc.* 9, 1379.

- 114.- Nordhagen, R. and Orjasaeter, H. (1979). Association -- between HLA and red cell antigens. An autoanalyzer -- study. *Vox Sang.* 26, 97.
- 115.- Morton, J.A., Pickles, M.M., Sutton, L. and Skov, F. -- (1977). Identification of further antigens on red cell- and lymphocytes: association of Bg^B with w17 (Te57) and Bg^C with w28 (Da15, Ba+). *Vox Sang.* 21, 141.
- 116.- Gilphart, M.J., Doyer, E. and Bruning, J.W. (1975). -- Quantitative aspects of HLA-A2 antigenic surface determinants studies with radio-labelled antibodies, in: *Histocompatibility Testing, 1975*, Kissmeyer-Nielsen, F. -- ed. pp. 739-746. Munksgaard, Copenhagen.
- 117.- Billing, R.J., Safani, M. and Peterson, P. (1977). Solu- ble HLA antigens present in normal human serum. *Tissue - Antigens*, 10, 75.
- 118.- Reisfeld, A.R., Pellegrino, A.M. and Errone, S. (1977). -- The Immunologic and molecular profiles of HLA antigen - isolated from urine. *J. Immunol.* 118, 264.
- 119.- Mittal, K.K. (1975). Human Histocompatibility HLA anti- gens in semen and their role in reproduction. *Fertil.-- Steril.* 26, 704.
- 120.- Kachru, R.B. and Mittal, K.K. (1975). Serological detec- tion of HLA antigen in human mammary secretion, in: *H s tocompatibility Testing, 1975*, Kissmeyer-Nielsen, ed. -- pp. 404-413. Munksgaard, Copenhagen.
- 121.- Mattiuz, P.L., Mas obrio, M. and Richiardi, P. (1978) -- Espressione degli antigenidel sistema HLA sulle allu^le fetali. *Estratto Minerva. Ginecol.* 25, 8.
- 122.- Faulk, W.P. and Tample, A. (1976). Distribution of Beta 2 microglobulin and HLA in chronic villi of human pla^e centae. *Nature (Lond.)* 262, 799.

- 123.- Van Rood, J.J., Schuurman, R.K., Vossen, J.M., Schellekens, P.T., Feltkamp-Vroom, M., Doyer, E., Gmelig-Meyling, F. and Visser, H.K. (1979). Failure of Lymphocyte-membrane HLA-A and -B. Expression in two siblings -- with combined Immunodeficiency. Clin. Immunol. Immunopath. 14, 418.
- 124.- Betuel, H., Kouraine, J.L., Souillet, G. and Jeune, M. (1978). Absence of cell membrane HLA antigens in an -- immunodeficient child. Tissue Antigens. 11, 68.
- 125.- Ceppellini, R. (1971). Old and new Facts and speculation about transplantation antigens of man. Prog. Immunol. 1, 973.
- 126.- Mayr, W.R., Pausch, V., and Schnedl, W. (1979). Human - Chimaera detectable only by investigation of her progeny. Nature (Lond). 277, 210.
- 127.- Pearson, G., Mann, J.D., Bensen, J. and Bull, R.W. - - (1979). Inversion duplication of chromosome 6 with trisomic codominant expression of HLA antigens. Am. J. Hum. Genet. 31, 29.
- 128.- Aster, R.H., Szatkowski, N., Liebert, M. and Duquesnoy, R.J. (1977). Expression of HLA-B12, HLA-B8, w4 and w6 on platelets. Transplant. Proc. 9, 1695.
- 129.- Halim, A., Abbasi, K. and Festenstein, H. (1974). The expression of the HLA antigens on human spermatozoa. - Tissue Antigens 4, 1.
- 130.- Majsky, A., Jakoubková J. (1976). Loss of HLA antigens associated with hormonal state. Lancet 2, 859. (Letter).
- 131.- Festenstein, H. and Démant, P. (1978). El sistema - - principal de Histocompatibilidad (MHS) en el humano. - En: Immunogenética Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas de HLA y H-2, pág. 53. Edit. por el Manual Moderno, S.A.

- 2.- Ivanyi, P. (1970). The major Histocompatibility anti-
gens in various species. *Curr. Top. Microbiol.* 53, 1.
- 3.- Cresswell, P. and Ayres, J.L. (1976). HLA antigens: ra-
bbit antisera reacting with cell A series on all B se-
ries Specificities. *Eur. J. Immunol.* 6, 82.
- 34.- Batchelor, J.R. and Keunedy, L.A. (1973). HLA antibody-
responce in volunteers immunized with skin grafts and -
leucocytes. *Symp. Ser. Immunobiol. standarization Inter.
Symp. HLA Reagents 1972.* 18, 33.
- 35.- Ferrara, G.B., Tosi, R., Longo, A., Castellani, A., and
Carminati, G. (1978a). A safe blood transfusion produce
dure for immunization againt MHC determinants in man. -
Transplantation 26, 150.
- 36.- Doughty, D.W. and Gelsthorpe, K. (1976). Some parameter--
sof lymphocyte antibody a activity through pregnancy --
and further eluates of placental material. *Tissue, An--
tigens*, 8, 43.
- 37.- Ferrara, G.B. (1971). Proceeding 1st. International - -
Meeting National Association of Biologists, Florence, --
September, 1971.
- 38.- Trucco, M.M., Stocker, J.W. and Ceppellini, R. (1978).-
Monoclonal antibodies against human lymphocyte antigens.
Nature (Lond.) 273, 666.
- 139.- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., -
Milstein, C., Williams, A.F. and Ziegler, A. (1978a). -
Production of monoclonal antibodies to group A erythro-
cytes, HLA and their human cell surface antigens-new --
tools for genetic analysis *Cell* 14, 9.
- 40.- Kennett, R.H. McKearnt, T.J., Bechtol, K.B., eds. (1980)
Monoclonal antibodies, Hybridomas: A new Dimension in -
Biological Analyses, New York, Plenum Press.

- 141.- Eguro, S.Y., Dorf, M.E. and Amos, D.B. (1973). Cross- - reactions of HLA antibodies Dissection of a complex serum. *Tissue Antigens*, 3, 195.
- 142.- Rodey, G.E., Sturm, B. and Aster, R.H. (1973). Cross- - reactive HLA antibodies separation of multiple HLA antibody specificities by platelet absorption and elution. *Tissue Antigens* 3, 63.
- 143.- Van Rood, J.J., van Leuwen, A., Keuning, J.J. and van - Ablas, A.B. (1975a). The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxicity -- technique. *Tissue Antigens*, 5, 73.
- 144.- Terasaki, P.I. and McClelland, J.D. (1964). Micropro- - let assay of human serum cytotoxins. *Natur (Lond)* 204, - 998.
- 145.- Walford, R., Gallagher, R. and Taylor, P. (1965). Cito- - toxicity of pathologic human sera for lymphocytes and -- neutrophils. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 124, 563.
- 146.- Dick, M.H. (1979). Tissue typing and HLA antigens in -- Histocompatibility techniques. Dick, M.H. and Kissme- - yer-Nielsen, F. ed. Elsevier/North Holland Biomedical - Press.
- 147.- Bain, B., Vas, M.R. and Lowenstein L. (1964). The deve- - lopment of large immature mononuclear cells in mixed -- leukocyte cultures. *Blood*, 23, 108.
- 148.- Amos, D.B. and Bach, F.H. (1968). Phenotypic expression of the main histocompatibility locus in man (HL-A) leu- - kocyte antigens and mixed leukocyte culture reactivity. *J. Exp. Med.* 128, 623.
- 149.- Yunis, E.J. and Amos, D.B. (1971). Three closely linked genetic systems relevant to Transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 3031.

- 10.- Lohrman, H.P., Novi-Kous, L., and Graw, R.L., Jr. (1974) Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in -- the mixed leukocyte culture. *Nature (Lond.)* 250, 144.
- 51.- Han, T., Dady, B. and Minowada, J. (1977). Stimulating-capacity of fresh and cultured human leukemic lymphoid- and myeloid cell in "one way" mixed lymphocyte culture-reaction. *Immunol.* 33, 543.
- 152.- Thorsby, E., Albrechtsen, D., Hirschberg, H., Kaakinen, A. and Solheim, B.G. (1977). MLC-activating HLA-D determinants. Identification, tissue distribution and significante. *Transplant. Proc.* 9, 393.
- 53.- Kaakinen, A. and Hirschberg, H. (1977). Stimulation of human lymphocytes by allogeneic macrophages in vitro.- *Tissue Antigens* 10, 306.
- 154.- Moen, T., Moen, M. and Thorsby, E. (1980). HLA-D Region Products are expressed in Endothelial Cell. *Tissue Antigens* 15, 112.
- 155.- Festenstein, H. and Halim K. (1977). HLA-D locus determinants detected by sperm-lymphocyte culture. *Transpl. Proc.* 9, 1239.
- 156.- Bain, B. and Pshyk, K. (1972). Enhanced reactivity -- in mixed leukocyte cultures after separation of mono--nuclear cell on Ficoll-Hypaque. *Transplant. Proc.* 4, - 163.
- 157.- Sondel, P. and Bach, F. (1975). Recognitive especificity of human cytotoxic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 142, 1339.
- 158.- Bach, F.H. and Woynow, N.K. (1966). One way estimula--tion in mixed leucocyte cultures. *Science*, 153, 545.

- 9.- Kassakura, S. and Lowenstein, L. (1965). Report of conference and Workshop held in Leidar. Histocompatibility-Testing 1965. pp. 211-212. Balmer, H., Ceton, F.J. and-
Ermesse, J.G., ed. Munksgaard, Copenhagen.
- 10.- Festenstein, H. Halim, K. and Arnaiz-Villena, A. (1977). Selection of haploid spermatozoa and its application -
to HLA-D typing Scand. J. Immunol. 6, 511.
- 11.- Keuning, J.J., Termijtelen, A., Blusse van Oud, Alblas,
A., van Den tweel, J.G., Schreuder, J. and vand Rood,-
J.J. (1975). Typing for MLC (LD). Transl. Proc. 7, --
Suppl. 1,35.
- 12.- Termijtelen, A. and Bradley, B.A. (1979). Mixed Lympho-
cyte reaction and primed lymphocyte typing (MLR and --
PLT) in Histocompatibility techniques. Pp. 59-86, Dick,
H.M. and Kissmeyer-Nielsen, F. ed. Elsevier/North-Ho--
lland, Biomedical Press.
- 13.- De Wolf, W.C., Carroll, G.P. and Yunis, E.J. (1979). -
The genetics of PLT response. J. Immunol. 122, 860.
- 14.- Morling, N., Platz, P., Ryder, P.L., Svejgaard, A. and
Thomson, M. (1981). Technical aspects of the Primed --
Lymphocyte Typing (PLT). Tissue Antigens. 17, 162.
- 15.- Morling, N., Jackobsen, K.B., Platz, P., Ryder, P.L.,-
Svejgaard, A., and Thomsen, M. (1980). Typing for - -
HLA-D/HLA-DR associated DP antigens with the primed --
Lymphocyte Typing (PLT) Technique. Tissue Antigena. --
15, 471.
- 16.- Morling, N., Jakobsen, K.B., Platz, P., Ryder, P.L. --
Svejgaard, A. and Thomsen, M. (1981). Correlation - -
between HLA-D/DR associated Primed Lymphocytes (PLT) -
Defined Dp-antigens, HLA-D and HLA-DR antigens. Tissue
Antigens 17, 421.

- 67.- Halim, K. and Festenstein, H. (1975). HLA-D on sperm is haploid enabling use of sperm for HLA-D typing. *Lancet* ii 1255.
- 68.- Kristensen, T. and Jorgensen, F. (1978). False HLA-D -- assignment may be caused by cytotoxic responder lympho-- cytes. *Tissue A. Tigen* 11, 443.
- 169.- Kristensent, T., Madsen, M. and Johnsen, H.E. (1979). - Cell Mediated Lympholyses in Histocompatibility Techni-- ques. Dick, M.H. and Kissmeyer-Nielsen, F. ed. Elsevier/ North Holland Biomedical press. pp 87-113.
- 170.- Sprent, T., Korngold, R. and Molnar-Kember, K. (1980). T cell recognition of antigen in vivo. Role of the H-2 complex. *Springer-Semin Immunopathol* 3, 213.
- 171.- Long, M.A., Handwerger, B.S., Amos, D.B. and Yunis, -- E.J. (1976). The genetic of cell-medisted lympholysis. *J. Immunol.* 117, 2092.
- 172.- Robinson, M.A., Noreen, H.J., Amos, D.B., Yunis, E.J.- (1978). Target antigens of cell mediated lympholysis.- Discrimination of HLA subtypes by cytotoxic lymphocytes *J. Immunol* 121, 1486.
- 173.- Singel, D.P. and Wadia, Y.J. (1980). Genetics of cell-Mediated lympholysis (CML) in man. *Tissue Antigens* 15, 177.
- 174.- Van Leeuwen, A., Winchester, R.J. and van Rood, J.J. - (1975). Serotyping for MLC 11. Technical Aspects. *Ann- N.Y. Acad. Sci.* 254, 289.
- 175.- Kaufman, J.F., Anderson, R.L. and Strominger, J.L. - - (1980). HLA-DR antigens have polymorphic light chain-- and invariant heavy chain as assessed by Lysine-con- - taining tryptic peptide analysis. *J. Exp. Med.* 152, -- 37.

- 76.- Strominger, J.L., Engelhard, V.H., Fuks, A., Giuld, B.-
C., Hyafil, F., Kaufman, J.F., Korman, A.J., Kostyk, --
T.G., Krangel, M.S., Lacent, D., López de Castro, J.A.,
Mann, D. L., Orr, H.T., Parham, P.R., Parker, K.C., - -
Ploegh, H.L., Pober, J.S., Robb, R.J., and Shackelford,
D.A. (1981). The Biochemical analysis of products of --
the major histocompatibility complex. in Benaccerraf, -
B. and Dorf, M. eds.
The role of the Major Histocompatibility Complex in - -
Immunobiology, New York. Garland Publishing Co., p. - -
115.
- 77.- Korman, J.L., Ploegh, L.H., Kaufman, J.F., Owen, J.M.--
and Strominger, J.L. (1980). Cell-free synthesis and --
processing of the heavy and light chain of the HLA-DR -
antigens J. Exp. Med. 152, 65.
- 78.- Allison, J.P., Walker, L.E., Russell, W.A., Pellegrino, M.A., Ferrone, S., Reisfeld, R.A.Jr., Freilingen, -
A. and Silver, (1980). Murine Ia and Human DR antigens:
Homology of aminoterminal sequences. Proc. Natl. Acad.-
Sci. 75, 3953.
- 79.- Silver, J., Russell, W.A., Reis, L., and Frelinger, J.-
A. (1977). Chemical characterization of murine Ia - -
alloantigens determined by the I-E/I-C Subregions of --
the H-2 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5131.

- 80.- Mc Millar, M., Cecka, J.M., Murphy, D.B., McDevitt, H.O. and Hood, L.C. (1977). Structure of murine Ia antigens, partial NH₂-terminal amino-acid sequences of products of the I-E or I-C subregion. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5135.
- 81.- Kläreskog, K., Rask, L., Fohlman, J. and Pearson, P.-A. (1978). Heavy HLA-DR (Ia) antigen chain is controlled by the MHC region. Nature (Lond) 275, 762.
- 82.- Charron, D.L. and McDevitt, H.O. (1980). Characterization of HLA-D region by two-dimensional gel electrophoresis, J. Exp. Med. 152, 18.
- 83.- Parish, C.R., Higgins, T.J., McKenzie, F.C. (1978). Comparison of antigens recognized by xenogenic and allogenic anti-Ia antibodies: Evidence for two classes of Ia antigens. Immunogenetic 1.343.
- 84.- Yudt, Y., McCune, J.M., Fun, S.M., Winchester, R.J., and Kunkel, H.G. (1980). Two types of Ia-positive cells. J. Exp. Med. 152, 89.
- 85.- Winchester, R.J., Kunkel, H.G. (1979). The human Ia-system Adv. Immunol. 28, 221.
- 86.- De Wolf, W.C., Schlossman, S.F. and Yunis, E.J. (1979) DRW antisera react with activated T Cells. J. Immunol. 122, 1780.
- 87.- Murphy, D.B., Herzenberg, L.A., Okumura, K. and McDevitt, H.O. (1976). A New I subregion (I.J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface Determinants on Suppressor T lymphocytes. J. Exp. Med. 144, 699.
- 88.- Winchester, R.L., Wang, C.Y., Gibofsky, A., Kunkel, H.G., Llyod, K.D. and Old, J.L. (1978). Expression of Ia-antigen on cultured human malignant melanoma cell-lines. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 6235.

- 189.- Natali, P.G., de Martino, C., Quaranta, V., Nicotra, M.R., Frezzaf, T., Pellegrino, M.A. and Ferrone, S. (1980). Expression of Ia-like antigens in normal human non lymphoid tissue. *Transplantation* 31, 75.
- 190.- Kostyu, D.D. and Amos, D.D. (1980). The Histocompatibility complex, in genetic polymorphism and Disease-susceptibility in: *The metabolic basis in Inherited - Disease*. Fifth. Ed. Mc Graw Hill Book Company, Pág.-77-95.
- 191.- Markert, M.L. and Cresswell, P. (1980). Polymorphism of human B cell alloantigens: Evidence for three loci within the HLA system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 6101.
- 192.- Tosi, R., Tanigaki, N., Cestis, D., Ferrara, G.B. -- and Pressman, D. (1978). Immunological Dissection of human Ia molecules. *J. Exp. Med.* 148, 1592.
- 193.- Shaw, S., Pollack, M.S., Payne, S.M. and Johnson, -- A.H. (1980). HLA linked B cell alloantigens of a -- new segregant series: Population and family studies of the SB antigens. *Hum. Immunol.* 1, 177.
- 194.- Shaw, S., Hall, R.P., Duquesnoy, R.J. and Katz, S.I. (1981). Interaccion between HLA-SB and HLA-DR phenotypes in determining the risk of dermatitis herpetiformis. *Hum. Immunol.*
- 195.- Bodmer, J.G. (1980). Ia antigens. Definition of the HLA-DRw specificities. *Br. Med. Bull.* 34, 233.
- 196.- Lowry, R., Goguen, J., Carpenter, C.B., Strom, T.B - Garaway, M.R. (1979). Improved B cell typing for -- HLA-DR using nylon wool column enriched B lymphocyte preparation. *Tissue Antigens* 14, 325.
- 197.- Van Rood, J.J., van Leeuwen, A., Ploem, J.J. (1978). A method to detect simultaneously two cell population by two colour fluorescence. *Nature (Lond.)* 262.-795.

- 198.- Amos, D.B. and Kostyu, D.D. (1980). HLA-A Central -- Immunological Agency of man. Adv. Hum. Genet. 10, -- 137.
- 199.- Allen, F.H. Jr. (1974). Linkage of HLA and GBG (Factor B). Vox Sang, 27, 382.
- 200.- Fu, S.M., Kunkel, H.G., Brusman, H.G., Allen, F.H. - and Fotino, M. (1974). Evidence for linkage HLA histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement. J. Exp. Med. 140, 1108.
- 201.- Ochs, H.D., Rosenfeld, S.L. Thomas, E.D., Giblett, - E.R., Alper, C.A., Dupont, B., Scholler, J.G., Gilliland, B.C., Hansen, J.A. and Wedgwood, R.J. (1977). -- Linkage between the gene (or genes) controlling the synthesis of the fourth component of complement and the Major Histocompatibility complex. New Eng. J. -- Med. 296, 470.
- 202.- Lachman, P.J. and Hobart, M.J. (1978). Complement Genetic in relation to HLA. Br. Med. Bull. 34, 247.
- 203.- Alper, C.A., Boenisch, T. and Watson, L. (1972). Genetic polymorphism in human glucine-rich beta-glyco protein. J. Exp. Med., 135, 68.
- 204.- Munro A. and Waldman H. (1978). The Major Histocompatibility system and the immune response. Br. Med. -- Bull. 34,253.
- 205.- Greenberg, L.J., Gray, E.D., Yunis, E.J. (1975). - - Association of HLA-A5 and immune responsiveness in -- vitro to streptococcal antigen. J. Exp. Med. 141,- 935.
- 206.- Patorroyo, M.E., Winchewter, R.J., Verejano, A., - - Gibofsky, A., Chalem, F., Zabriskie, J.B. and Kunkel, H.G. (1979). Association of a B-cell alloantigen - - with susceptibility to rheumatic fever. Nature 278, - 173.

- 207.- Sakai, A. and Simonsen, M. (1969). Kidney Transplantation in sibling. *Transplantation* 7,444.
- 208.- Morris, P.J., Batchelor, J.R. and Festenstein, H. -- (1978). Matching for HLA in transplantation. *Br. Med. Bull.* 34,259.
- 209.- Opelz, G. and Terasaki, P.I. (1977b). Effect of blood group in relation between HLA match and outcome of - cadaver Kidney transplants. *Lancet* i 220-222.
- 210.- Svejgaard, A. and Ryder, P.L. (1979). Disease Associations in: *Histocompatibility techniques*. Dick - - M.H. and Kissmeyer Nielsen, F. (ed.). Elsevier/North-Holland Bimedical Press pp. 185-205.
- 211.- Susazuki, T., Grumet, F.C., McDevitt, H.O. (1977). -- The association between genes in the major histocompatibility complex and disease susceptibility. *Ann. Rev. Med.* 28, 425.
- 212.- Dick, H.M. (1978). HLA and disease. *Br. Med. Bull.* -- 34, 271.
- 213.- De Wolf, W.C., Bo Dupont, D.S. and Yunis, E.J. (1980) HLA and disease. *Hum. Path.* 11, 332.
- 214.- Helenius, A., Monreing, B., Fries, E., Simone, K., -- Robinson, P., Schirmacher, V., Terhorst, C. and - - Strominger, J.L. (1980). Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2k and H-2D). histocompatibility antigens - are cells surface receptors for semliki forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 3846.
- 215.- Rubén Lisker. (1981). *Estructura Genética de la Población Mexicana Aspectos Médicos y Antropológicos*. Salvat Mexicana de Ediciones.

- 216.- Aguirre Beltrán, G. (1972). La población negra en -- México. Fondo de Cultura Económica, México.
- 217.- Patutke, M. (1980). Transplantation Immunology Son-- renwith, A.C., Jarett, L. (ed). Clinical Laboratory-- methods and diagnosis--octava edición. The C.U. Mosby Co.
- 218.- Thorby, E. Brathe, A. (1970). A rapid method for the production of pure lymphocyte suspensions. Terasaki, P.I. (ed.). Histocompatibility Testing. Munksgaard,-- Copenhagen, pp 655-6.
- 219.- Danilous, J.A., Ayoud, G. and Terasaki, P.I. (1980). B lymphocyte isolation by trombin nylon wool. Tera-- saki, P.I. (ed.) Histocompatibility testing. Cal. -- E.U.A. 287-8.
- 220.- Terasaki, P.I. Bernoco, D., Park, S.M., Oztur, K.G., and Iwaki, Y. (1978). Microdotlet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am. J. Clin. Path. 69, 103-9.
- 221.- Mattiuz, P.L., Inde, D. Prazza, A. Cepellini, R. and Bodmer, W.F. (1970). New approaches to the popula-- tion genetics and segregation analysis of the HLA -- system. In: Histocompatibility Testing, Munksgaard,-- Copenhagen. pp. 193-205.
- 222.- Gorodezky, C., Terán, L. and Escobar-Gutiérrez, A. - (1979). HLA frecuencies in a Mexican Mestizo Popula-- tion. Tissue Antigens 14, 347.
- 223.- Arellano, A., Gómez-Estrada, H. and Krestschmer, R.- (1981). HLA profile of the Mexican Mestizo Popula-- tion. Tissue Antigens 18, 242.
- 224.- Chauvenet, P.H., Anderson, S.A. and Banowsky, L.H. - (1981). HLA frecuencies in a Mexican-American Popula-- tion. Tissue Antigens, 17, 323.

- 225.- Terasaki, P.I. Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G.,- and Iwaki, Y (1978). Microdroplet Testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. The Philip Levine Award Lecture. Am. J. Clin. Path. 69, 103.
- 226.- Zeidler, A., Loon, J., Frasier, D., Penny, R. and Terasaki, P.I. (1980). HLA-DRw antigenes in Mexican-American and Black American Diabetic Patients. Diabetes 29, 247.
- 227.- Zmijewsky, C.M. and Terasaki, P.I. (1977). SD New -- World Workshop Report, eds. Carpenter, C.B. & Miller, W.V. In clinical Histocompatibility Testing 1, paag. 7-1 Grune & Stratton, N.Y.
- 228.- Kostyu, D.D. and Amos, D.B. (1981). Mysteries of hte Amerindians. Tissue Antigens, 16,111.
- 229.- Vives, J., Ercilla, E. Castillo R. and Rozman, C. -- (1975). A study of the HLA system in the Spanish population. Histocompatibility Testing 1975, Munksgaard Copenhagen pp. 233-238.
- 230.- Mendoza, M.A. (1983). Estudios de las frecuencias -- de los antígenos HLA en la población mestiza mexicana y su aplicación en transplante renal y en trabajos de asociación HLA-enfermedad Págs. 54, Tesis. -- Facultad de Química.