



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ANTIGENOS HLA (A, B, C)
EN PACIENTES CON ANEMIA
APLASTICA

TESIS

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ

Director: QFB. RAMON CENDEJAS RAMIREZ

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL.

- 2 -

	Página
Indice de tablas	4
Indice de figuras	5
Abreviaturas	6
Glosario de términos genéticos	8
Resumen	11
Introducción	12
Antecedentes	14
El Complejo Principal de Histocompatibilidad	14
Nomenclatura	17
Historia	26
Inmunogenética	30
Los antígenos HLA	34
Antígenos A, B y C	34
Antígenos D/DR	38
Serología y reacciones cruzadas	42
HLA y enfermedad.	42
El Sistema HLA y las enfermedades	47
Mecanismos	49
Clasificación	50
La anemia aplásica	52
Etiología	52
Diagnóstico	54
Tratamiento	54
Objetivos	58
Material y métodos	60
Prueba de microlinfocitotoxicidad en placa para la detección de antígenos HLA	60
Método	60

INDICE GENERAL. Cont.

- 3 -

	Página
Análisis estadístico	64
Cálculo del riesgo relativo	64
Cálculo de ji cuadrada	65
Corrección de p	66
Resultados	67
Tratamiento de los grupos control	67
Tratamiento de los lotes de placas	70
Pacientes contra grupos control	70
Discusión	75
Conclusiones	78
Colofón	80
Agradecimientos	81
Bibliografía	82

INDICE DE TABLAS.

Nº	Tabla	Página
I	Loci ligados al Complejo HLA	22
II	Cronología de talleres de Histocompatibilidad	24
III	Especificidades HLA reconocidas por la OMS . .	25
IV	Cronología HLA	31
V	Grupos HLA de reacción cruzada	43
VI	Técnicas para la detección de antígenos HLA .	44
VII	HLA y enfermedades	48
VIII	Clasificación de los síndromes clínicos en anemia aplástica	53
IX	Diagnóstico de la anemia aplástica	56
X	Diagnóstico de la anemia aplástica	57
XI	HLA en anemia aplástica	68
XII	Antígenos HLA en población mexicana	69
XIII	HLA en anemia aplástica y controles sanos . .	72
XIV	HLA-A28 en anemia aplástica	73
XV	HLA-B7 en anemia aplástica	74

INDICE DE FIGURAS.

Nº	Figura	Página
1	Esquema del Complejo Principal de Histocompatibilidad en cuatro especies	15
2	Mapa del complejo H-2	18
3	Mapa del cromosoma VI humano	20
3a	Mapa del cromosoma VI humano	21
4	Esquema del cultivo mixto de linfocitos y de la linfólisis mediada por células	28
5	Herencia de HLA	32
6	Entrecruzamiento cromosómico en el Sistema HLA	33
7	Secuenciación de cadenas pesadas H-2	35
8	Molécula de HLA-A ó -B	37
9	HLA-D en transplante renal	40
10	Molécula HLA-DR	41
11	Concepto genético de enfermedad	46
12	Prueba de linfocitotoxicidad	61

ABREVIATURAS

A.a.	=	Anemia aplástica.
Ac	=	Anticuerpo, plural Acs.
ADN	=	Acido desoxirribonucleico.
Ag	=	Antígeno, plural Ags.
CML	=	Cultivo mixto de linfocitos, MLC en inglés (ver glosario).
CPH	=	Complejo principal de histocompatibilidad, MHC en inglés (ver glosario).
d	=	densidad
g	=	Gravedades, fuerza de centrifugación.
H-2	=	Complejo principal de histocompatibilidad murino.
HLA	=	Complejo principal de histocompatibilidad humano.
Ia	=	Antígeno asociado a la región de respuesta inmune (ver glosario).
IMSS	=	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INN	=	Instituto Nacional de Nutrición.
Ir	=	Gen de respuesta inmune (ver glosario).
ISSSTE	=	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado.
LD	=	Linfocito-definido, Ags definidos por CML (ver glosario).
mcl.	=	microlitro.
n	=	Población muestral.
NIH	=	National Institute of Health, Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos de Norteamérica.
OMS	=	Organización Mundial de la Salud.
p	=	Probabilidad.
P ó PM	=	Peso molecular.
Ref	=	Referencia bibliográfica.
r.r.	=	Riesgo relativo.

Segue...

ABREVIATURAS (Cont.)

- SD = Serológicamente-definido, Ags definidos por serología
(ver glosario).
- SSA = Secretaría de Salubridad y Asistencia.
- SSF = Solución Salina Fisiológica.
- TP = Test-plate, lote de placas de prueba para microlinfo-
citotoxicidad.
- U = Unidades.

GLOSARIO DE TERMINOS GENETICOS.

Alelo = Forma alternativa de un mismo gen que ha aparecido por mutación o duplicación; cuando dos o más alelos se encuentran en un locus con frecuencia apreciable en la misma población, lo denominamos un polimorfismo.

Alogénico = Dos individuos de la misma especie que difieren genéticamente; un aloinjerto es un injerto entre individuos alogénicos.

CML = Prueba de cultivo mixto de linfocitos; generalmente efectuada estudiando la incorporación de timidina tritiada en linfocitos estimulados por células alogénicas in vitro.

CPH = Complejo principal de histocompatibilidad, HLA en el hombre y H-2 en el ratón. Los genes incluidos en éste complejo controlan los Ags "fuertes" de transplante.

Cromosoma = Cuerpo nucleoproteínico microscópicamente observable, tiene oscuro con los colorantes básicos en la célula durante la división celular. Portan a los genes que están colocados en orden lineal. Cada especie tiene un número cromosómico característico.

Endogámico = Cruza entre miembros de la misma cepa.

Fenotipo = Las características identificables en un individuo. En relación a los antígenos de histocompatibilidad, se refiere a los Ags expresados y reconocidos sobre las células de un individuo.

Gen = Segmento de ADN que dirige la síntesis de una cadena polipeptídica dada.

GLOSARIO DE TERMINOS GENETICOS.

- Genotipo = La constitución genética de un individuo dado, por ejemplo, los genes que lleva ese individuo.
- Haplotipo = De genotipo haploide, se refiere a la región cromosómica del CPH que incluye todos los loci de esa región. Un individuo tiene dos haplotipos del CPH, uno heredado de cada padre.
- Histocompatibilidad = Se refiere a la compatibilidad de los tejidos en transplantes.
- Homeostasis = Equilibrio dinámico dependiente de procesos fisiológicos coordinados en un organismo.
- Ia = Ags asociados a la región de respuesta inmune. Ags controlados por la región H-2 del ratón que se expresan principalmente sobre los linfocitos B, macrófagos, células epidérmicas y espermáticas. Un sistema antigénico aparentemente homólogo se ha descrito en el hombre denominándose locus HLA-DR (antes "semejante al Ia" o Ag de célula B). Los Ags Ia no deben confundirse con la subregión genética I-A de la región I del ratón.
- Igualación = Se refiere a la similitud geno-fenotípica que deben poseer tanto el donador como el receptor para asegurar el éxito de un transplante o transfusión.
- Ir = Loci de respuesta inmune que controla la capacidad de un animal a responder inmunológicamente a una gran variedad de Ags.
- LD = Ags linfocito-definidos del CPH (originalmente definidos por respuesta de linfocitos en CML). Los loci LD del CPH y

GLOSARIO DE TERMINOS GENETICOS.

sus Ags, son los principales responsables de inducir la incorporación de timidina (proliferación celular) en el CML. Los más fuertes son los controlados por el locus HLA-D en el hombre y LD-1 en el ratón (Ags de serie II).

Locus = Plural loci, indica la posición de un gen en un cromosoma.

Polimorfismo = Mezcla estable de diferentes genotipos (ver alelo).

Recombinación = Las nuevas combinaciones observadas de características diferentes de las exhibidas por los progenitores. El porcentaje de recombinación es igual al porcentaje de entrecruzamiento solamente cuando los genes están sumamente juntos.

SD = Ags del CPH serológicamente definidos. Los loci y Ags del CPH (o los marcadores genéticos de esos Ags) que sirven como blanco primario para los linfocitos T citotóxicos.

Unión = Se define como la tendencia de los genes en el mismo cromosoma a segregar juntos.

Xenoinjerto = Injerto entre individuos de diferente especie.

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo principal, conocer el sistema HLA en pacientes con A.a. e inferir susceptibilidad genética a dicho padecimiento con este marcador.

Se triplicaron 25 enfermos con A.a. diagnosticada con los criterios establecidos para la misma. El grupo control fueron sujetos normales cuyo Fenotipo HLA fué informado por varios autores en la literatura.

Se utilizó la técnica aprobada internacionalmente, así como la aplicación estadística de los resultados.

Se observa que el Ag A28 se encuentra en mayor frecuencia en los pacientes que en el grupo control, la diferencia es significativa (p. menor de 0.00005).

El rr calculado para este caso es de 6.7 lo que coloca a una población con mayor predisposición a tener A.a. si es positiva a este Ag.

Para establecer otras consideraciones y conclusiones definitivas, es necesario aumentar el universo del estudio.

INTRODUCCION

El complejo principal de histocompatibilidad está formado por un grupo de genes que en el humano se encuentran localizados en el cromosoma autosómico VI. Este complejo determina la estructura de glucoproteínas superficiales de la mayoría de las células del organismo y, en conjunto, forma un 'marcador' de individualidad biológica conocido como sistema HLA. La función precisa de los antígenos de este sistema no se conoce del todo, pero se sugiere que es el principal receptor de membrana celular encargado del reconocimiento de lo propio y lo extraño (Bach, F.H., 1976 a). Por ello, el trasplante de tejidos ha sido el principal campo de estudio del sistema HLA, ya que hasta la fecha, éste representa la barrera inmunológica primordial entre individuos genéticamente no idénticos, sin embargo, en las últimas dos décadas se ha demostrado que los genes del CPH tienen un marcado efecto en la susceptibilidad a una amplia variedad de padecimientos.

El primer informe de asociación entre el CPH y susceptibilidad o resistencia a enfermedad fué reportado en 1964 por Lilly (Lilly, F.et. al., 1964), quien mostró que los genes del sistema H-2 del ratón (equivalente al HLA humano), determinaron resistencia a padecer leucemia inducida por el virus de Gross. Amiel en 1967 (Amiel, J.L., 1967), fué el primero en relacionar el sistema HLA con enfermedad, ya que demostró que los pacientes con enfermedad de Hodgkin (cáncer de los ganglios linfáticos) tenían un Ag con mayor frecuencia que la población general. El interés en este campo aumentó y actualmente son múltiples los padecimientos descritos con asociación a uno o más Ags HLA (Albert, E.D., 1976; Sasazuki, T., 1977; Vladutiu, A.O., 1974).

El significado de la combinación entre HLA y enfermedad es aún oscuro, pero parecería corresponder a un "marcador" de susceptibilidad genética (Amiel, J.L., 1967; Bach, F.H., 1976 a). Al manifestarse estas glucoproteínas como receptores de membrana (marcadores), que para su expresión en la célula requieren de una información genética precisa,

en el genotipo de un individuo se determina la mayor o menor predisposición a padecer enfermedad, comprendiendo ésta como un trastorno no compensado de la homeostasis (Pérez Tamayo, R., 1970). Esto significa que para que una población persista, requiere modificar su genotipo a fin de adaptarse a los cambios ambientales. De no ocurrir esto, fallaría la expresión de algunos receptores de la célula capaces de conservar la homeostasis y la predisposición a no responder adecuadamente a una agresión externa sería potencial. Así la combinación entre predisposición y exposición sería igual a enfermedad (Velázquez, A., 1979).

La anemia aplásica puede ser un ejemplo de enfermedad que resulta de predisposición y exposición, pero hasta ahora no se conoce ningún marcador genético que permita colocar a una población con mayor o menor propensión a este padecimiento. Se desconoce el mecanismo responsable de la aplasia medular, aunque para satisfacer el concepto etiológico de enfermedad se postula que es un padecimiento resultante de un defecto intrínseco de la célula pluripotencial (stem cell) (Sánchez Medal, L., 1974 b.). Se acepta que al menos en la mitad de los casos hubo relación con un agente agresor ambiental, en el resto se considera idiopática (Linman, J.W., 1975) aunque recientemente se ha demostrado, en algunos casos, una alteración inmunológica (Ascensao, J.A., et. al., 1976; Hoffman, R., et. al., 1977).

ANTECEDENTES

El Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Cuando se transplanta un fragmento de piel o un órgano de un individuo a otro, el injerto no suele sobrevivir. Al cabo de aproximadamente una semana, el tejido transplantado se inflama y poco después muere y se desprende. La medicina premoderna atribuía tales fracasos a la sepsis, pero actualmente se sabe que el sistema inmune del receptor reconoce como extrañas ciertas moléculas presentes sobre la superficie de las células injertadas atacándolas y destruyéndolas del mismo modo que lo haría con bacterias u otros agentes invasores. Las moléculas que se reconocen como extrañas se denominan Ags de histocompatibilidad ó Ags de transplante y proporcionan a los tejidos de cada individuo su propia identidad química (Cunningham, B.A., 1977).

De todos los sistemas genéticos que cifran para Ags de transplante, sólo uno parece tener importancia decisiva en la supervivencia de aloinjertos y sus efectos son difíciles de superar incluso con sustancias inmanosupresoras. Este sistema es el Complejo Principal de Histocompatibilidad denominado HLA en el humano, H-2 en el ratón, RhLA en el mono, DLA en el perro, etcétera (figura 1) (Festestein, H., 1981). Aunque en un principio el interés por estas moléculas antigénicas de superficie celular partió de su papel en el rechazo de injertos, ésta no puede ser su función biológica normal, ya que en la naturaleza no se dá el transplante de tejidos entre individuos. Estos Ags se integran en un sistema de defensa inmunológico que protege al cuerpo de sus propias células cuando éstas se hallan infectadas por virus o se tornan cancerosas (Cunningham, B.A., 1977).

Mucha de la dinámica inmune está entendida en el sistema de histocompatibilidad murino (H-2); sin embargo, se conoce menos del CPH humano (HLA). Grandes esfuerzos se están haciendo para ir entendiendo el

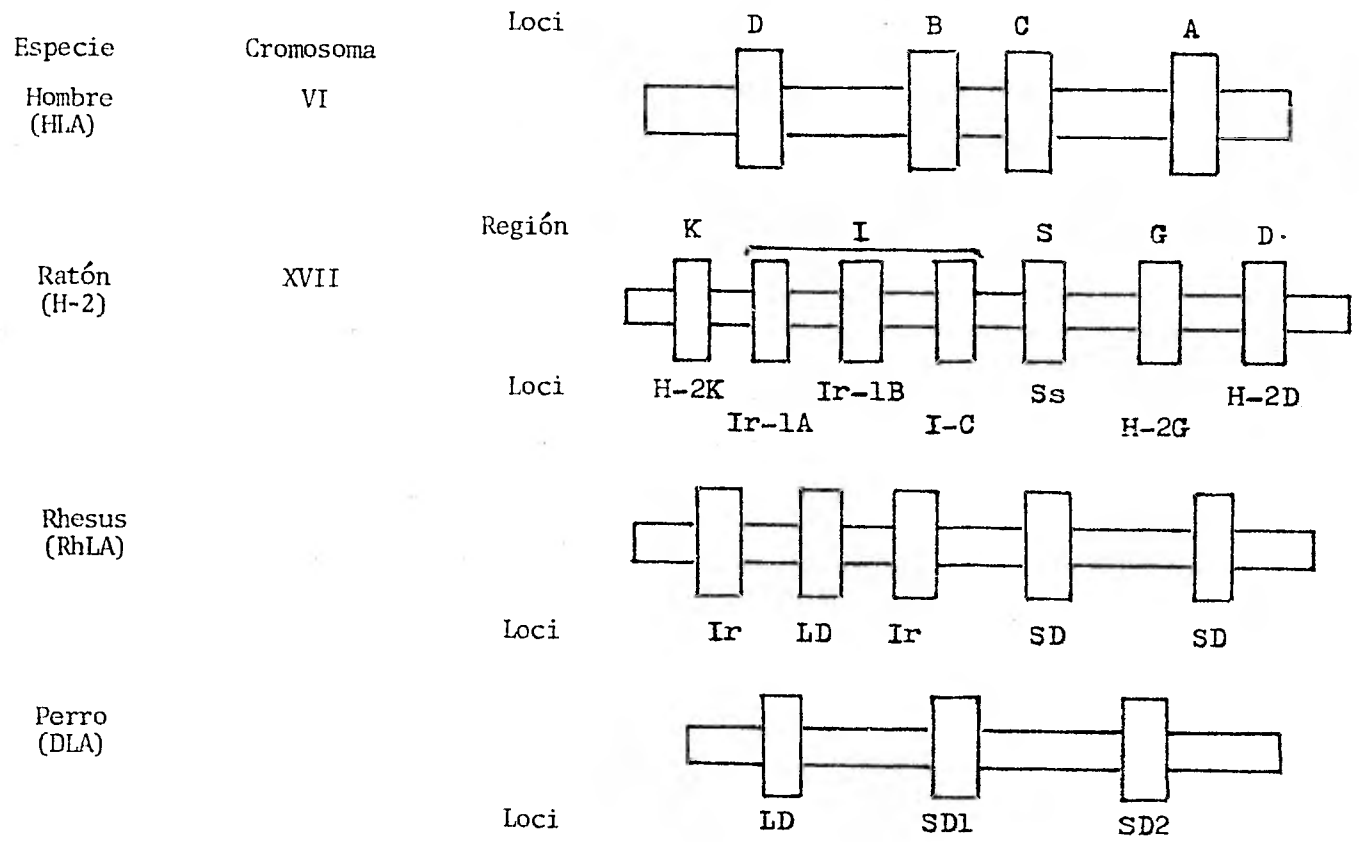


Figura 1

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN CUATRO ESPECIES (Bach, F.H., 1976a).
Ver explicación en la siguiente hoja.

Figura 1 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN CUATRO ESPECIES (Bach, F.H., 1976a).

En el hombre existen tres loci SD identificados, A, B, y C, cuyos alelos determinan los Ags serológicamente definidos. Las diferencias en el locus HLA-D producen la activación en el CML. El complejo H-2 del ratón, está dividido en cinco regiones, K, I, S, G y D, cada una identificada por un locus marcador, H-2K, Ir-1A, Ss, H-2G y H-2D. Los alelos de los loci -- H-2K y H-2D determinan los Ags H-2 serológicamente definidos. Los loci Ir-1A e Ir-1B, determinan la respuesta inmune del animal y el locus Ss controla los niveles cuantitativos de una proteína sérica. Los Ags determinados por H-2G, se expresan en los eritrocitos.

Se muestra el orden de los loci del perro y el mono rhesus. La existencia de loci de respuesta inmune en el cromosoma RhLA del rhesus se ha reportado; al menos dos de ellos se encuentran fuera de la región SD del RhLA, probablemente cerca del locus LD pero separados de él.

complejo HLA a fin de comprender mejor las interacciones célula-célula, función y respuesta inmune, cáncer, desarrollo y susceptibilidad a enfermedad (Todd-Sanford-Davidsohn, 1979).

El sistema H-2 del ratón ha sido, en muchos aspectos, un modelo comparativo importante para estudiar el sistema HLA humano, especialmente en relación a las funciones de respuesta inmune e interacción celular que controla (figura 2). Ya que en humanos no es posible contar con cepas endogámicas como en los animales de laboratorio, el estudio del sistema HLA se ha desarrollado, principalmente, analizando familias o poblaciones y empleando una metodología estadística apropiada usando el desarrollo de los grupos eritrocíticos humanos como modelo (Bodmer, W.F., 1978).

En suma, el CPH humano (HLA), se localiza en una región que comprende un grupo de genes situados en el brazo corto del cromosoma autosómico VI (figura 3 y 3a). Esos genes (aproximadamente 1/3000 del genoma total humano), determinan la estructura de glucoproteínas de superficie celular de la mayoría de los tejidos del cuerpo. Colectivamente forman la base de un complejo grupo de determinantes antigénicos que incluyen los "marcadores de individualidad biológica" o Ags de histocompatibilidad (Wetherall, J.D., 1978), así como genes que codifican para algunos componentes del complemento y receptores para las fracciones C3b y C3d, genes que controlan la reacción de CML, genes que dominan los Ags inmunoasociados o equivalentes al Ia murino (algunos de los cuales pueden ser genes de susceptibilidad a enfermedad) y genes para grupos sanguíneos eritrocíticos (tabla I) (Bodmer, W.F., 1978; Festenstein, H., 1981; Wetherall, J.D., 1978).

Nomenclatura. Cada rama de la ciencia tiende a poseer su propio lenguaje característico. La definición de un sistema es: "un grupo de partes o elementos relacionados", así que es apropiado que las regiones genéticas HLA y H-2 con sus grupos interrelacionados

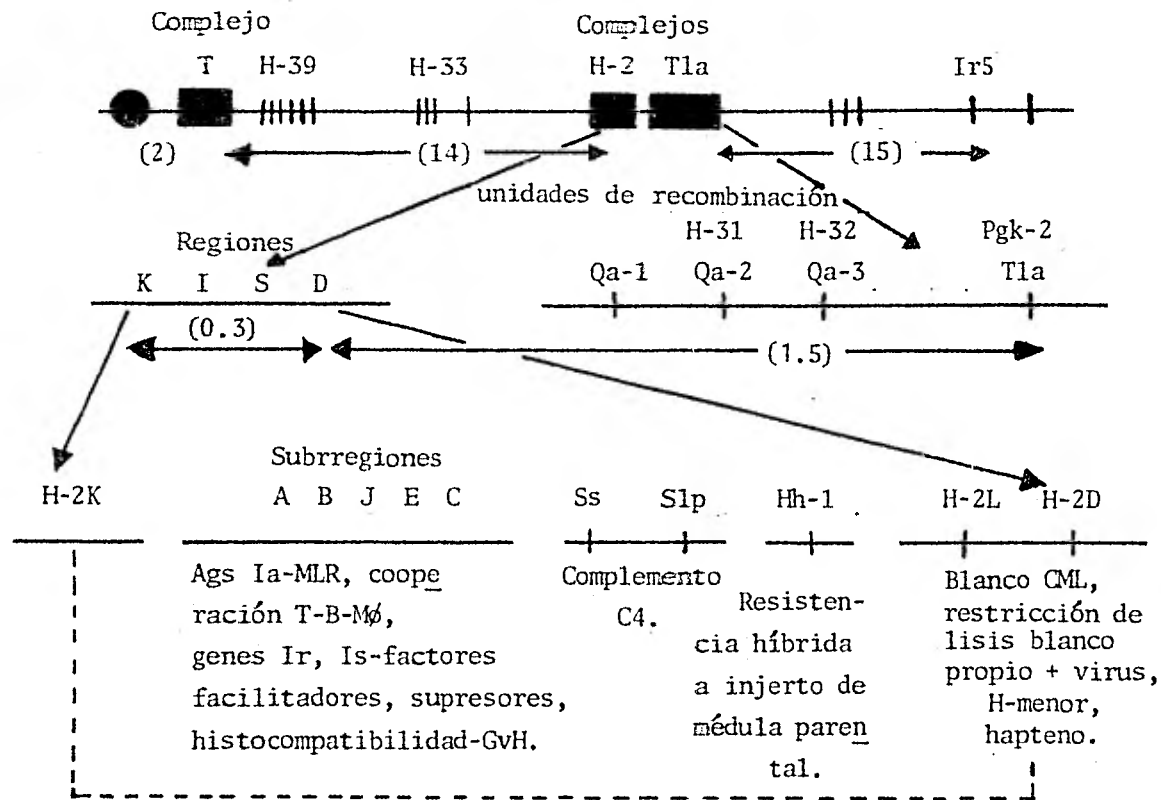


Figura 2 MAPA DEL CROMOSOMA H-2 (XVII) Y DE LOS COMPLEJOS H-2 Y Tla (DAUSSET, J., 1981)
Ver texto en la siguiente hoja.

Figura 2 MAPA DEL CROMOSOMA H-2 (XVII) y DE LOS COMPLEJOS H-2 y Tla
(Dausset, J., 1981).

- H-31, 32, 33 y 39: loci menores de histocompatibilidad.
- Ir-5 : gen que controla la respuesta inmune al Ag Thy. 1 (θ).
- Las posiciones relativas de H-2L y H-2D no están determinadas.
- Complejo T: el largo de la cola en los heterocigotos (T/t), varía de casi normal a ausente. La forma homocigota (T/T) es letal al décimo día de gestación.
- Complejo Tla: controla la presencia o ausencia de Ags en la membrana de timocitos y de ciertas células leucémicas. Tres alelos: Tla^a (Ags Tla. 1, 2, 3), Tla^b (ausencia de Ags: Tla negativo) y Tla^c (Ag Tla.1). Los Ags Tla están ausentes en los linfocitos T periféricos. Son distintos de los Ags Thy. 1 (θ , locus en el 9^o cromosoma) presentes a la vez en timocitos y linfocitos T periféricos. Los Ags Qa son marcadores de subpoblación de linfocitos T periféricos. Quizá se comporten como blancos en la linfólisis mediada por células.
- Pgk-2: cinasa-2 de fosfoglicerato.
- Los números entre paréntesis indican las unidades de recombinación entre los loci.

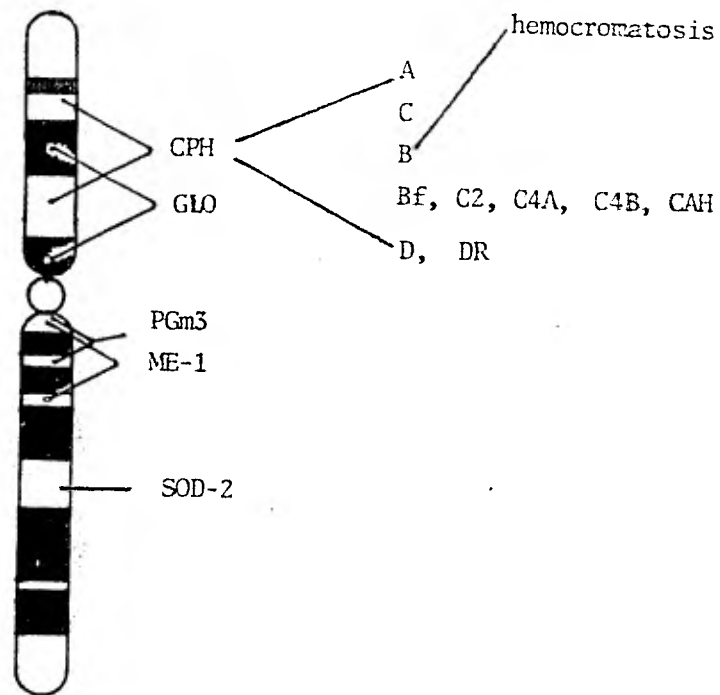


Figura 3 MAPA DEL CROMOSOMA VI HUMANO (DAUSSET, J., 1981)

Localización fina de ciertos loci sobre el cromosoma VI humano.

Series alélicas de:

- Clase I) HLA-A, -B y -C.
- Clase II) HLA-D, -DR.
- Clase III) Bf, C2, C4A, C4B, etc.

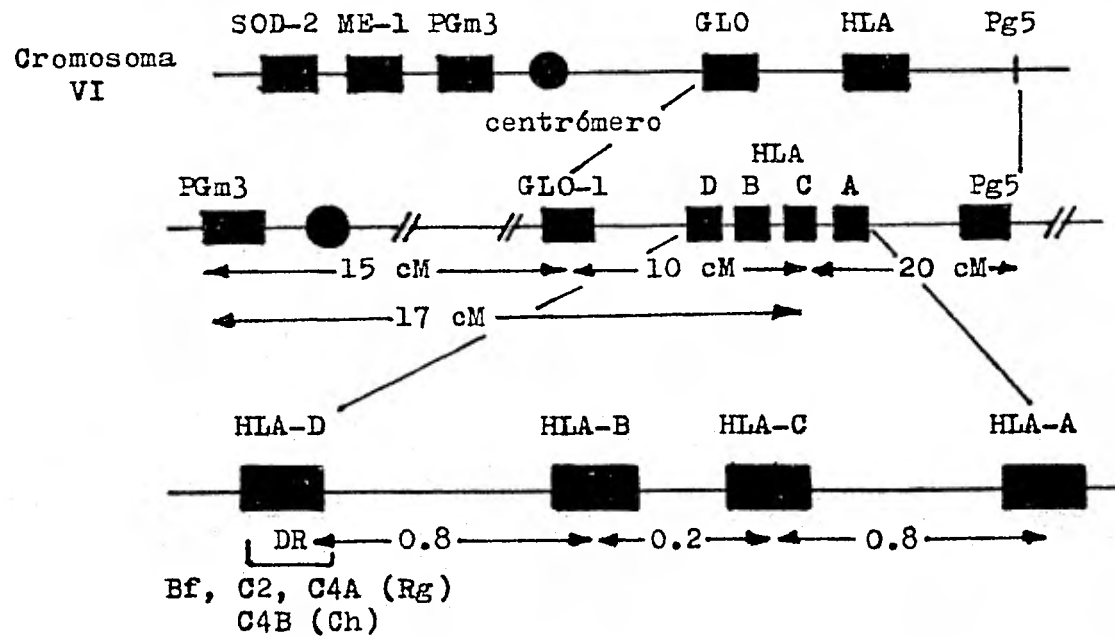


Figura 3a. MAPA DEL CROMOSOMA VI HUMANO (Dausset, J., 1981)

- | | | | |
|--------|--------------------------------|------|--------------------------------------|
| -cM | = Centimorgans | -Pg5 | = Pepsinógeno |
| -SOD-2 | = Superóxido Dismutasa | -Bf | = Factor de la Vía
alterna del C. |
| -ME-1 | = Enzima Málico Citoplasmática | -C2 | = Factor 2 del C |
| -PGm3 | = Fosfoglucomutasa 3 | -C4A | = Grupo Sanguíneo Rogers |
| -GLO | = Glioxilasa | -C4B | = Grupo Sanguíneo Chido |

Tabla I LOS DIFERENTES LOCI LIGADOS GENETICAMENTE
AL COMPLEJO HLA (Dausset, J., 1981)

Locus	Símbolo	F ó S	P ó C
Grupo Chido	Ch	F	
Grupo P	P	S y F	P
Grupo Rodgers	Rg	F	C
Pepsinógeno urinario 5	Pg5	F	C
Fosfoglucomutasa 3	PGm3	F y S	
Enzima málica citoplasmática 1	ME-1	S	
Superóxido dismutasa 2	SOD2		
Indofenoloxidasa B	IPO-B	S	
Complejo protéico de adenosín desaminasa	ADCP	S	C
Glioxilasa I	GLO I	S y F	C
Déficit en la actividad de C2	C2	F	
Alotipía en C2		F	
Déficit en la actividad de C4		F	
Alotipía en C4		F	
Properdina, factor B	Bf o GBG	F	
Receptor C3b	rC3b	S	C
C3d	rC3d	S	C
Receptor para glóbulos de mono	rMBC	S	C
Virus tipo C de babuino	Bevi	S	P y C
Activador del Plasminógeno	PA	S	P
Respuesta inmune al estreptococo	IS	F	P
Factor Hageman	HF	S	P
Ir TGAL, HGAL	Ir	F	P

F : ligado por estudio familiar

S : ligado por hibridación somática

P : probado

C : controversial

C2, C4, C3b, C3d: Factores de complemento.

de genes, se les denomine como sistemas, siguiendo la tradición usada en los estudios de grupos sanguíneos humanos. El término "complejo", a veces es usado en lugar de sistema, esencialmente con el mismo fin.

Cuando, como en el sistema HLA, existen muchas cosas que necesitan definirse y nombrarse, es extremadamente importante tener un acuerdo común en la nomenclatura por lo que se instituyó un comité internacional patrocinado por la OMS. Tal comité acuñó el nombre HLA, donde H significa humano, L por leucocito y A por el primer sistema y no por Ag como en ocasiones se asegura (Bodmer, W.F., 1978). La función principal de este comité es revisar la terminología de los Ags, en particular con referencia a la información vertida durante los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad (International Workshops), donde se intercambian reactivos, se analizan datos y puntos de vista de todos los aspectos del sistema HLA entre un gran número de laboratorios participantes (tabla II) (Bodmer, W.F., 1978).

Originalmente los Ags se identificaban por un número precedido por las letras HL-A, pero la complejidad del sistema hizo necesario el empleo de letras para el loci, con el prefijo HLA reservado para describir el sistema completo. Así, ahora, cada Ag se identifica por una letra para el locus que lo controla, seguida por un número que define la especificidad particular de ese locus. La letra w (por workshop) que sigue a un símbolo de locus y precede al número, indica que la especificidad está identificada provisionalmente. Esta designación se cambia cuando no existe duda acerca de la claridad y reproductibilidad de definición de un Ag y cuando el antisuero apropiado está disponible para su definición (tabla III). Por razones históricas, para los loci HLA-A y -B, no hay repetición en los números asignados a sus Ags. Para los determinantes HLA-C, -D y -DR, los números se han asignado secuencialmente, empezando en el orden en el que se han reconocido por el comité de la OMS (Bodmer, W.F., 1978).

Tabla III

ESPECIFICIDADES HLA RECONOCIDAS POR LAS OMS - 1980
(Festestein H., 1981)

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR
A1	B5	Bw46	DR1
A2	B7	Bw47	DR2
A3	B8	Bw48	DR3
A9	B12	Bw49 (w21)	DR4
		Cw5	DR5
A10	B13	Bw50 (w21)	DRw6
A11	B14	Bw51 (5)	DR7
Aw19	B15	Bw52 (5)	DRw8
Aw23 (9)	Bw16	Bw53	DRw9
			DRw10
Aw24 (9)	Bw4	Bw54 (w22)	HLA-D
A25 (10)	Bw6	Bw55 (w22)	
A26 (10)	B17	Bw56 (w22)	Dw1
A28	B18	Bw57 (17)	Dw2
			Dw3
A29	Bw21	Bw58 (17)	Dw4
Aw30	Bw22	Bw59	Dw5
Aw31	B27	Bw60 (40)	Dw6
Aw32	Bw35	Bw61 (40)	Dw7
			Dw8
Aw33	B37	Bw62 (w15)	Dw9
Aw34	Bw38 (w16)	Bw63 (w15)	Dw10
Aw36	Bw39 (w16)		Dw11
Aw43	B40		Dw12
	Bw41		
	Bw42		
	Bw44 (12)		
	Bw45 (12)		

El sistema HLA es el más polimórfico conocido pues cuenta, hasta la fecha, con 92 especificidades reconocidas, designadas con la nomenclatura explicada en el texto. Los números en paréntesis indican el antígeno original a partir del cual se derivan las divisiones (splits).

Historia. El origen de la inmunogenética como tal, se relaciona a la histocompatibilidad con cercano paralelismo al descubrirse la regla fundamental del trasplante, los autoinjertos tomados y retornados al mismo donador tienen éxito, mientras que los injertos entre dos individuos genéticamente distintos fallan. Este entendimiento avanzó por el desarrollo de cepas intracruzadas de animales de laboratorio; uno de los primeros experimentos que estableció los principios básicos del trasplante fué realizado en ratones por Little en 1916. El demostró que la aceptación de aloinjertos depende de factores comunes (Ags de trasplante) entre el donador y el receptor, los cuales están determinados por genes independientes. Por consiguiente, si la combinación de los factores presentes en el aloinjerto no se igualan a los del receptor, el aloinjerto podría no sobrevivir, ya que si el donador expresa un determinante antigénico que está ausente en el receptor, puede ser reconocido por el sistema inmune del huésped y conducir al rechazo del injerto (Todd-Sanford-Davidsohn, 1979).

Landsteiner en 1931 enfatizó el paralelismo entre los problemas de igualación (de donador y receptor) para la transfusión sanguínea y para el trasplante y sugirió una investigación de grupos sanguíneos para los trasplantes usando técnicas serológicas. Con estas bases, P. A. Gorer en 1938 inició el trabajo que lo condujo a descubrir el CPH murino (H-2) por métodos serológicos. El desarrollo subsecuente de las investigaciones sobre el sistema H-2 dependió mucho del uso de cepas intracruzadas de ratones, muchas de ellas desarrolladas especialmente para este propósito. Snell en 1948 denominó a los genes que determinan el destino de los aloinjertos como genes H ó de histocompatibilidad y estableció firmemente las bases genéticas de su acción (Bodmer, W.F., 1978).

El descubrimiento del sistema HLA fué, de hecho, independiente de la investigación del sistema murino. Entre 1920 y 1950 aparecieron varias publicaciones intentando demostrar la existencia de actividad anti leucocitaria en la sangre de pacientes leucopénicos; de esos esfuerzos, Dausset en 1952 describió la existencia de Acs antileucocito en el sue-

-ro de individuos politransfundidos. En 1954 sugirió que tales Acs debían ser aloespecíficos, ya que reaccionaban sólo con un pequeño número de individuos no relacionados. Comenzó un estudio sistemático a fin de investigar los Acs que se desarrollan después de las transfusiones y en 1958 J. van Rood y R. Payne independientemente, demostraron Acs similares después del embarazo.

Se acredita a Dausset la primera caracterización de un Ag leucocitario humano, el Mac, en 1958, que se detectó usando seis sueros que reaccionaban de modo similar pero no idéntico. La importancia de tal descubrimiento fué reconocida inmediatamente ya que Amos en 1953 había probado que los Ags H-2 podían detectarse en leucocitos de ratón por leucoaglutinación. Usando ese tipo de sueros y una aproximación estadística basada en el análisis de asociaciones 2 x 2 de reacciones de sueros sobre un panel de células (Zmijewski, Ch. M., 1982), van Rood definió en 1962 un sistema de dos alelos que llamó "grupo 4" (4a y 4b). Esos métodos estadísticos fueron desarrollados por Payne y colaboradores, quienes en 1964 definieron un sistema de Ags alélico aparentemente independiente y que denominaron LA (L por leucocito y A por el primer locus) con dos especificidades, LA-1 y LA-2 que aparecían en la población y segregaban en familias como alelos. Aunque Dausset y su equipo pensaban que los dos grupos de Ags estaban genéticamente relacionados, Bodmer los consideraba productos de diferentes regiones genéticas. Cepellini demostró que ambos conceptos eran correctos ya que los Ags LA y 4 están controlados por loci separados pero situados en el mismo cromosoma (Bodmer, W.F., 1978).

En adición a las dos series antigénicas LA y 4 (también llamadas primera y segunda series), se sospechó de una tercera en 1970, reportándose especificidades definidas serológicamente del tercer grupo de Ags o serie AJ. Más aún, otras especificidades controladas por otro locus se descubrieron a través del cultivo mixto de linfocitos (figura 4) siendo llamadas LD ó Ags de serie II, en contraste a las primeras tres especificidades, que fueron definidas serológicamente llamándose Ags SD

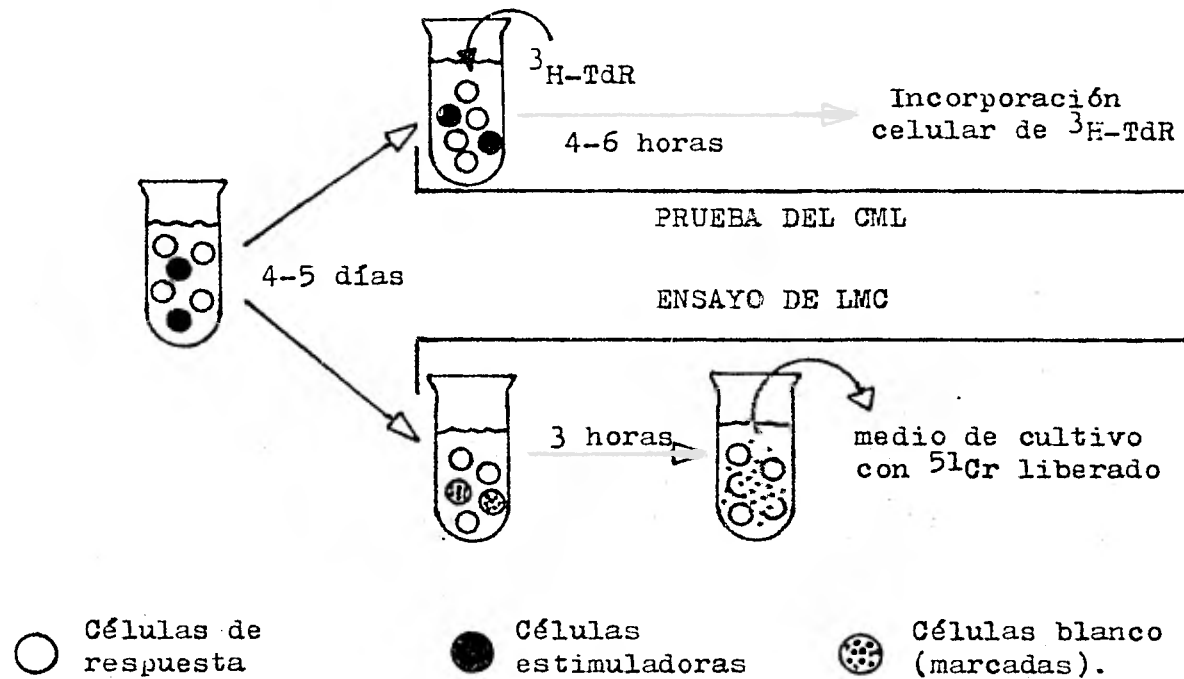


Figura 4

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CML Y DE LA LINFOLISIS
MEDIADA POR CELULAS (Bach, F.H., 1976b).

Ver explicación en la siguiente hoja.

Figura 4

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CML Y DE LA
LINFOLISIS MEDIADA POR CELULAS (Bach, F.H., 1976b)

En el CML las células de respuesta y las estimuladoras son mezcladas y dejadas por cuatro ó cinco días, la respuesta proliferativa se mide mediante la incorporación de timidina tritiada. Para la linfólisis mediada por células (LMC), un CML es efectuado e incubado por 4 o 5 días. Durante este tiempo, las células estimuladoras mueren y las de respuesta o efectoras se dejan en el cultivo. Esas células se mezclan con células blanco marcadas con cromato de sodio radioactivo. Las células blanco son linfocitos estimulados 3 días antes con fitohemaglutinina. Las células efectoras del CML y las células blanco se dejan 3 o 4 horas y posteriormente se mide la cantidad de cromo liberado en el medio.

6 de serie I (Dausset, J., 1981), Un resumen cronológico se presenta en la tabla IV.

Inmunogenética (Todd-Sanford Davidsohn, 1979). En el hombre hay 46 cromosomas distribuidos en 23 pares; 22 pares son cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Los cromosomas de cada par son homólogos porque la información genética de cada uno concentra las mismas características fenotípicas. Un individuo en el que aparecen los mismos alelos o genes en un locus dado, en ambos cromosomas homólogos, se dice que es homocigoto a ese locus. Por otro lado, cuando los dos alelos no son los mismos, el individuo es heterocigoto, si ambos genes en un individuo heterocigoto se expresan, se dice que son codominantes.

La herencia de los alelos envuelve la segregación, que se refiere a la distribución de alelos entre los descendientes, por ejemplo, considerando un solo locus genético al cual ambos padres sean heterocigotos, si los dos alelos del padre se denominan a y b y los de la madre c y d (figura 5), entonces hay cuatro fenotipos posibles (ac, ad, bc, y bd).

Las posibilidades de que un hermano dentro de una familia sea idéntico a otro son de 25%. La oportunidad de ser idéntico en sólo un alelo (haploidéntico) es de 50% y de ser totalmente distinto 25%. Es posible que ocurran recombinaciones en las que las regiones homólogas de cada par de cromosomas intercambien material genético (entrecruzamiento, figura 6). La frecuencia de recombinación entre dos loci, es proporcional a la distancia que los separa. Loci muy cercanos generalmente segregan como una unidad y se dice por ello que están unidos o ligados; dos loci relativamente separados en un cromosoma pueden mostrarse como identidades independiente. Entre los loci HLA-A y -B, aproximadamente un gamento en cien (0.8%) muestra recombinación; en forma semejante, la frecuencia de recombinación entre HLA-B y -D también es de 0.8%.

El valor de los estudios de recombinación ha sido acrecentado por el descubrimiento de loci cercanamente unidos al HLA. Los componentes

Tabla IV

CRONOLOGIA HLA

1916	Little establece los principios básicos del transplante.
1931	Landsteiner sugiere investigación serológica para igualación de transplante.
1938	Gorer define el CPH del ratón (H - 2).
1948	Snell llama genes "H" a los que determinan el destino de los aloinjertos.
1952	Dausset describe anticuerpos antileucocito.
1953	Amos detecta Ags H-2 por leucoaglutinación.
1954	Dausset sugirió aloespecificidad en los anticuerpos antileucocito.
1958	Van Rood-Payne demostraron anticuerpos semejantes en mujeres embarazadas.
1958	Dausset caracteriza el primer Ag leucocitario humano, el Ag MAC.
1962	Van Rood define el sistema dialélico llamado Grupo 4 (4a y 4b).
1964	Payne define el sistema LA.
1969	Kissmeyer - Nielsen indica que los dos sistemas están controlados por loci separados pero unidos en el mismo cromosoma.
1970	Se reporta la tercera serie antigénica, AJ.
1975	Se establece el Locus HLA-D por CML en el VI taller internacional de histocompatibilidad.
1977	Se definen las series alelicas HLA-DR en el VII taller internacional de histocompatibilidad.

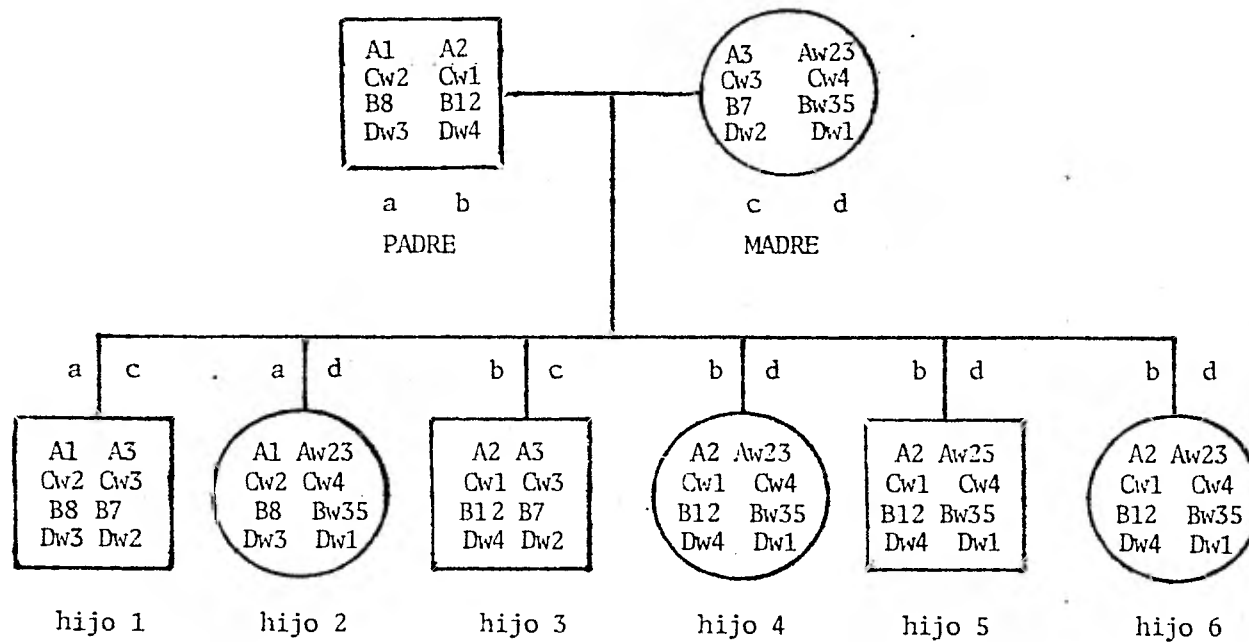


Figura 5 EJEMPLO DE HERENCIA HLA (Mc Intyre, J.A., et.al., 1978).

Los haplotipos de los padres están abreviados como a, b y c, d.
 Nótese la identidad HLA de los hijos cuarto, quinto y sexto.

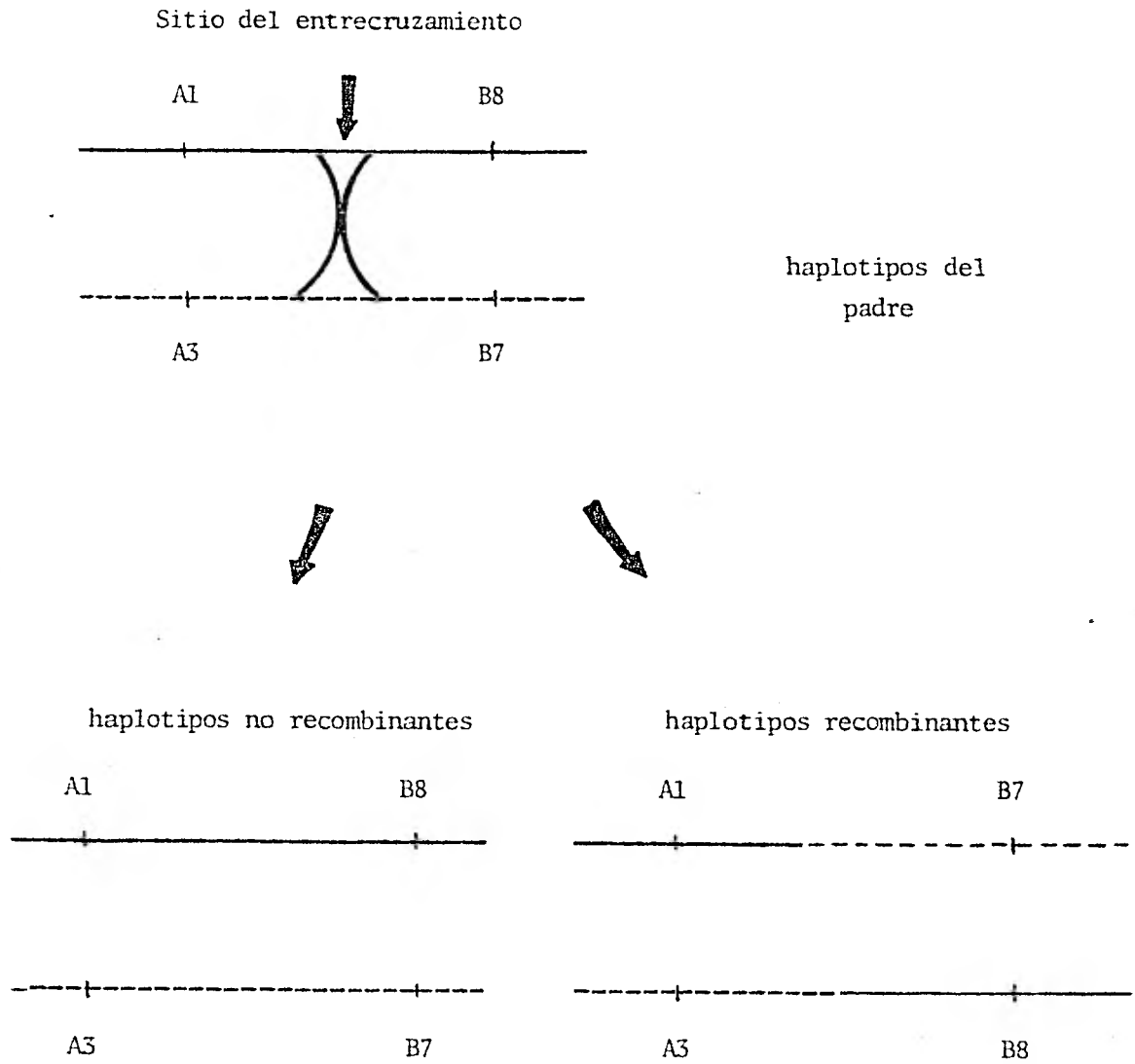


Figura 6 DIAGRAMA DEL ENTRECruzAMIENTO CROMOSOMICO Y PRODUCCION DE HAPLOTIPOS RECOMBINANTES EN EL SISTEMA HLA (Schaller, J.G., 1976)

El cromosoma VI del padre lleva los haplotipos HLA A1/B8 y A3/B7. Esos haplotipos parenterales serán transmitidos intactos a los descendientes, a menos que ocurra un entrecruzamiento entre los loci HLA A y B que produzca los haplotipos recombinantes A1/B7 y A3/B8 .

asociados al grupo de unión HLA pueden observarse en la tabla I. El conocimiento de estos loci polimórficos localizados dentro o cerca de la región HLA facilita el estudio de los eventos de recombinación que definen la presencia y posición de loci aún no detectados.

La distribución de los Ags HLA en la población no es completamente al azar. La teoría genética predice que a lo largo de la evolución, alelos específicos de dos loci unidos cercanamente, como los HLA-A y -B, se encontrarían juntos en el mismo cromosoma con una frecuencia igual al producto de sus dos frecuencias genéticas independientes. Sin embargo, ciertos Ags de diferentes series están asociados en un grado mayor que lo esperado en base a sus frecuencias individuales. Esta asociación inusual entre alelos se denomina desequilibrio de unión o asociación genética.

Un aspecto interesante de la genética de población, radica en las diferencias en las frecuencias de los Ags HLA entre varios grupos raciales, por ejemplo, HLA-A1 y -B8 se encuentran entre los Ags más comunes en blancos, pero son casi inexistentes en orientales. Tales diferencias genéticas pueden ayudar al estudio de migración de poblaciones y a la asociación de Ags HLA a otros aspectos dentro de las poblaciones.

Los Antígenos HLA

Es posible extraer las glucoproteínas HLA de las membranas celulares con ayuda de detergentes y antisueros específicos. Pueden entonces determinarse la estructura terciaria de esas moléculas y sus secuencias de aminoácidos (figura 7). Los Ags de histocompatibilidad murinos, han sido analizados en detalle y ultimamente se ha aclarado la estructura de los Ags humanos (Cunningham, B.A., 1977; Wetherall, J.D. 1978).

Antígenos A, B y C. Los Ags HLA-A, -B y -C están compuestos de dos cadenas polipeptídicas unidas por enlaces no covalentes; el PM de éstas cadenas es de 12000 y 44000 daltons (figura 8). La cadena más pequeña (PM 12000 = P12) ha sido identificada como una beta 2 microglobulina, ésta globulina no está glucosilada y aparentemente es

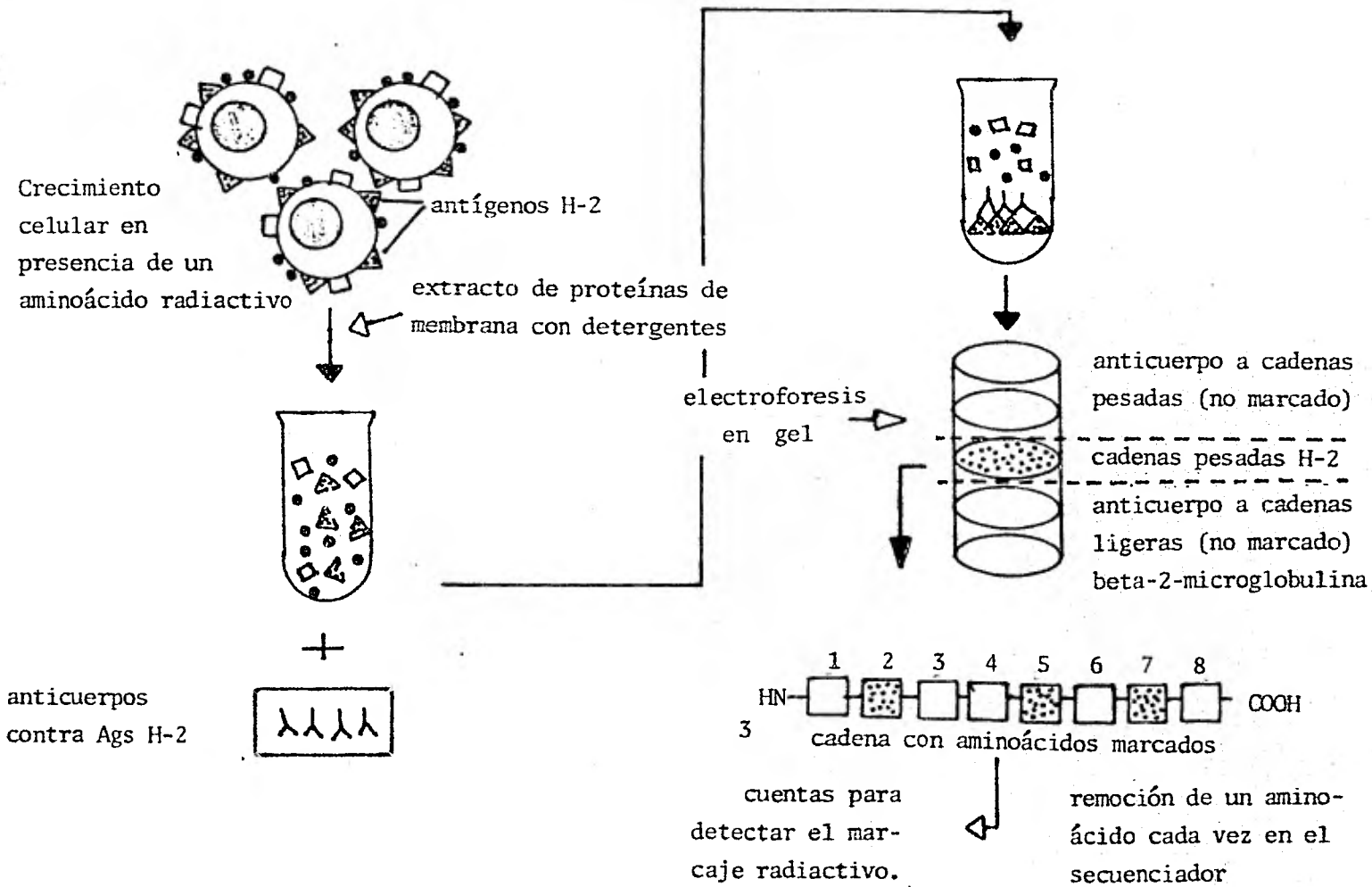


Figura 7

SECUENCIACION DE Ags H-2

Ver texto en la siguiente hoja.

Figura 7 SECUENCIACION DE CADENAS H-2

La secuenciación de las cadenas pesadas H-2 requiere de una nueva técnica analítica microquímica. Se cultivan células de ratón en presencia de un aminoácido radiactivo que se incorpora en todas las proteínas nuevamente sintetizadas, incluyendo los Ags H-2. Las proteínas de membrana marcadas se van extrayendo con detergentes y se aíslan los Ags H-2 por precipitación con anticuerpos específicos; luego las moléculas de Ag se redisuelven en sus componentes (cadenas ligeras y pesadas) por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las cadenas pesadas purificadas se eluyen del gel y se determina la posición en que aparece el aminoácido radiactivo a lo largo de la cadena eliminando un aminoácido cada vez de la proteína, con la ayuda de una máquina automática llamada "secuenciador". Finalmente, se mide la radiactividad de los aminoácidos eliminados secuencialmente, para detectar la presencia o ausencia de la etiqueta radiactiva. Todo el proceso debe repetirse muchas veces para determinar la localización a lo largo de la cadena polipeptídica de cada uno de los veinte aminoácidos de que están formadas las moléculas proteicas (CUNNINGHAM, B.A., 1977)

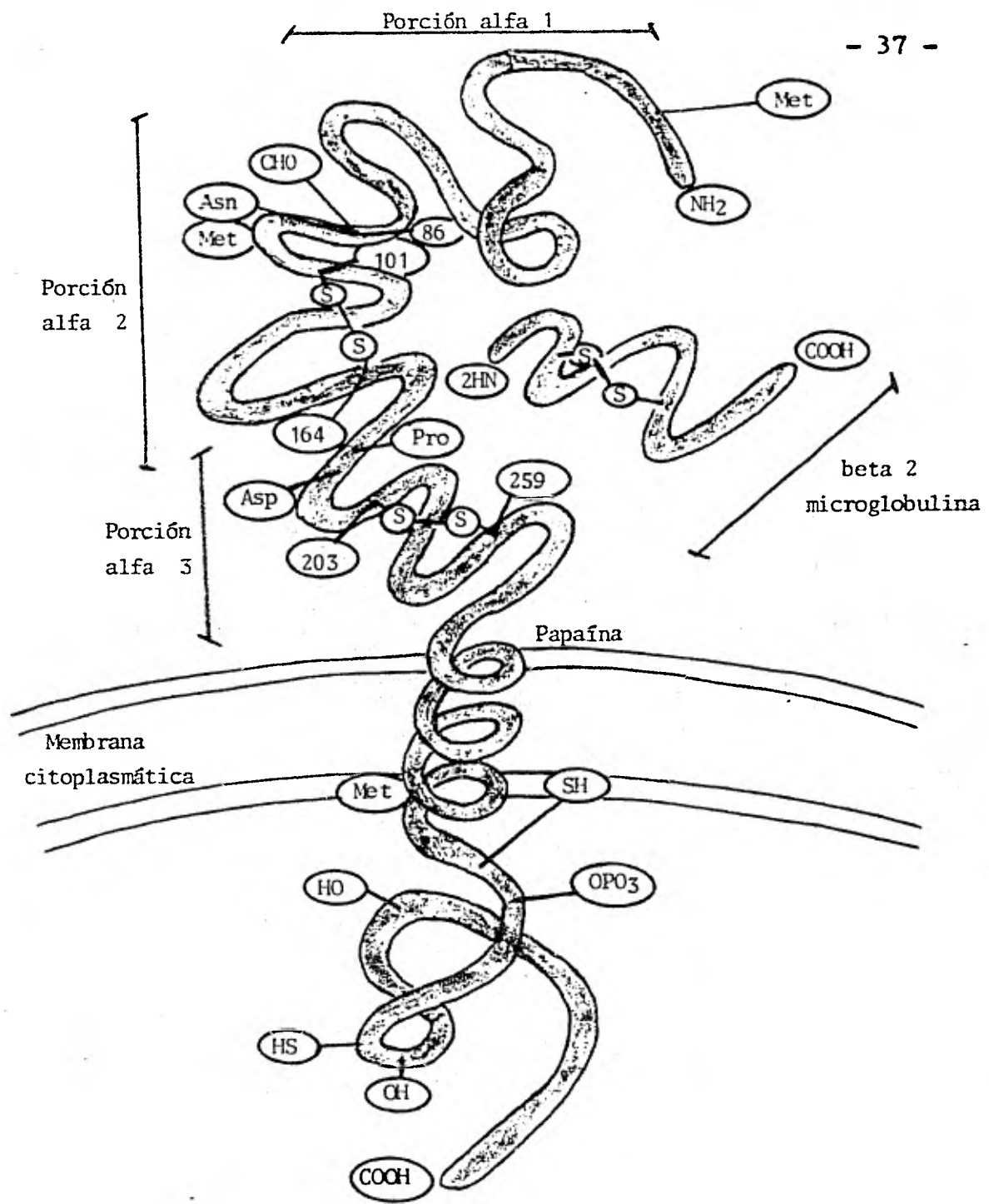


Figura 8. Representación esquemática de la molécula HLA-A ó HLA-B (Dausset, J. 1981)

idéntica a la urinaria, su secuencia de aminoácidos tiene homología con la de algunos dominios de las moléculas de inmunoglobulina, lo que podría sugerir su origen ancestral común. Se ha demostrado que la síntesis de la beta 2 microglobulina está controlada por un gen en el cromosoma XV. La cadena polipeptídica más pesada (PM 44000 = P44) es la glucoproteína que exhibe la antigenicidad alogénica de las especificidades HLA. La cadena P12, aunque está asociada con la P44 no contribuye a la especificidad antigénica del complejo bimolecular. La cadena P44 se extiende a través de la membrana celular hasta que su porción interna hace contacto con el citoesqueleto. Esta orientación es ideal para la transferencia directa de información de la superficie celular al interior y podría evidenciar un rasgo estructural esencial para la función biológica. La región de la molécula asociada con la membrana es hidrofóbica mientras el resto de la molécula es principalmente hidrofílica. Algunos carbohidratos están asociados con la cadena P44, pero no contribuyen a la antigenicidad. Recientemente, las secuencias preliminares de aminoácidos de las cadenas P12 y P44 se han obtenido. Además de un sorprendente grado de similitud entre los Ags HLA y sus análogos murinos, la cadena P44 muestra cierta homología con las regiones constantes de la inmunoglobulina humana IgG1 (Bach, F.H., 1976 b; Barnstable, C.J., 1978; Dausset, J., 1981; Festenstein, H., 1981).

Antígenos D/DR. En contraste a la tipificación por medios serológicos (detección de Ags de clase I), la realizada con el CML (detección de Ags de clase II) envuelve un principio basado en las observaciones de Bain y Bach quienes notaron que cuando dos poblaciones alogénicas de linfocitos se cultivaban juntas, los linfocitos sufrían alteraciones morfológicas definitivas: el núcleo aumentaba su volumen, la célula entraba en mitosis y tomaba la apariencia de un blastocito inmaduro. La reacción primero se estableció de manera que las dos poblaciones respondían una contra otra (CML bidireccional). Posteriormente, se descubrió que tratando los linfocitos con mitomicina C ó rayos X podía eliminarse su capacidad para responder aunque su facultad de estimular permanecía viable; así se originó el CML unidireccional, donde

los linfocitos de un individuo (células de respuesta de un receptor potencial) crecen y se dividen en contestación a los Ags extraños de las células estimuladoras de un segundo individuo (el donador potencial). La prueba mide la capacidad del receptor para responder a los Ags del donador (figura 4). Así, el principal uso clínico del CML ha sido seleccionar donadores compatibles para trasplante. Existe una buena correlación entre la supervivencia del injerto y una débil o nula reacción del CML entre el par donador/receptor, especialmente en familiares (fig. 9) (Barnstable, C.J., 1978; Dausset, J., 1981; Wetherall, J.D., 1978).

El control genético del CML está gobernado dentro de la misma región cromosómica del HLA; usando familias con recombinación genética, se demostró que la principal reactividad está controlada por el locus HLA-D. Por medio de adsorción de sueros con plaquetas (que poseen Ags HLA-A y -B) y después con Acs fluorescentes, se vió que era posible definir los tipos de CML serológicamente y en 1977 se determinaron las series alélicas DR (D-relacionadas) en el séptimo Taller de Histocompatibilidad. A diferencia de los Ags HLA-A, -B y -C cuya expresión ocurre en la superficie de todas las células excepto los eritrocitos, los Ags HLA-DR tienen una distribución tisular más restringida, estando presentes en los linfocitos B y monocitos, no así en los linfocitos T y otros tipos de células (Barnstable, C.J., 1978).

Los Ags HLA-DR están formados por dos cadenas polipeptídicas de 23000 y 28000 daltons de PM, sin tener asociada la beta 2 microglobulina (figura 10). Estos Ags son parecidos a los Ia del ratón y del caballo por poseer este tipo de cadenas. Las cadenas no están unidas covalentemente y están glucosiladas, ambas cadenas se codifican en el cromosoma VI. Existe la opinión de que los Ags identificados por serología (-DR) y por CML (-D) corresponden al producto genético del locus HLA-D, difiriendo únicamente por el método de identificación (Barnstable, C.J. 1978; Dausset, J., 1981).

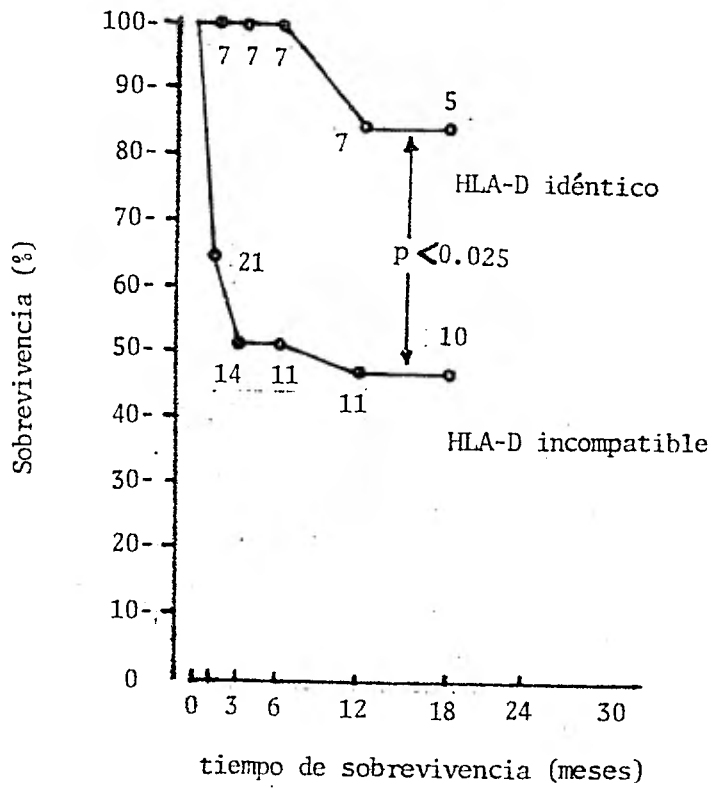


Figura 9 LA INFLUENCIA DE LA COMPATIBILIDAD HLA-D EN LA SOBREVIVENCIA DE 28 TRANSPLANTES RENALES.

El descenso inicial de la curva ha sido observado también cuando se han usado otros marcadores del CPH para compatibilidad. En este caso los determinantes de la activación linfocitaria (Lads) del locus D (Festestein, H., 1981)

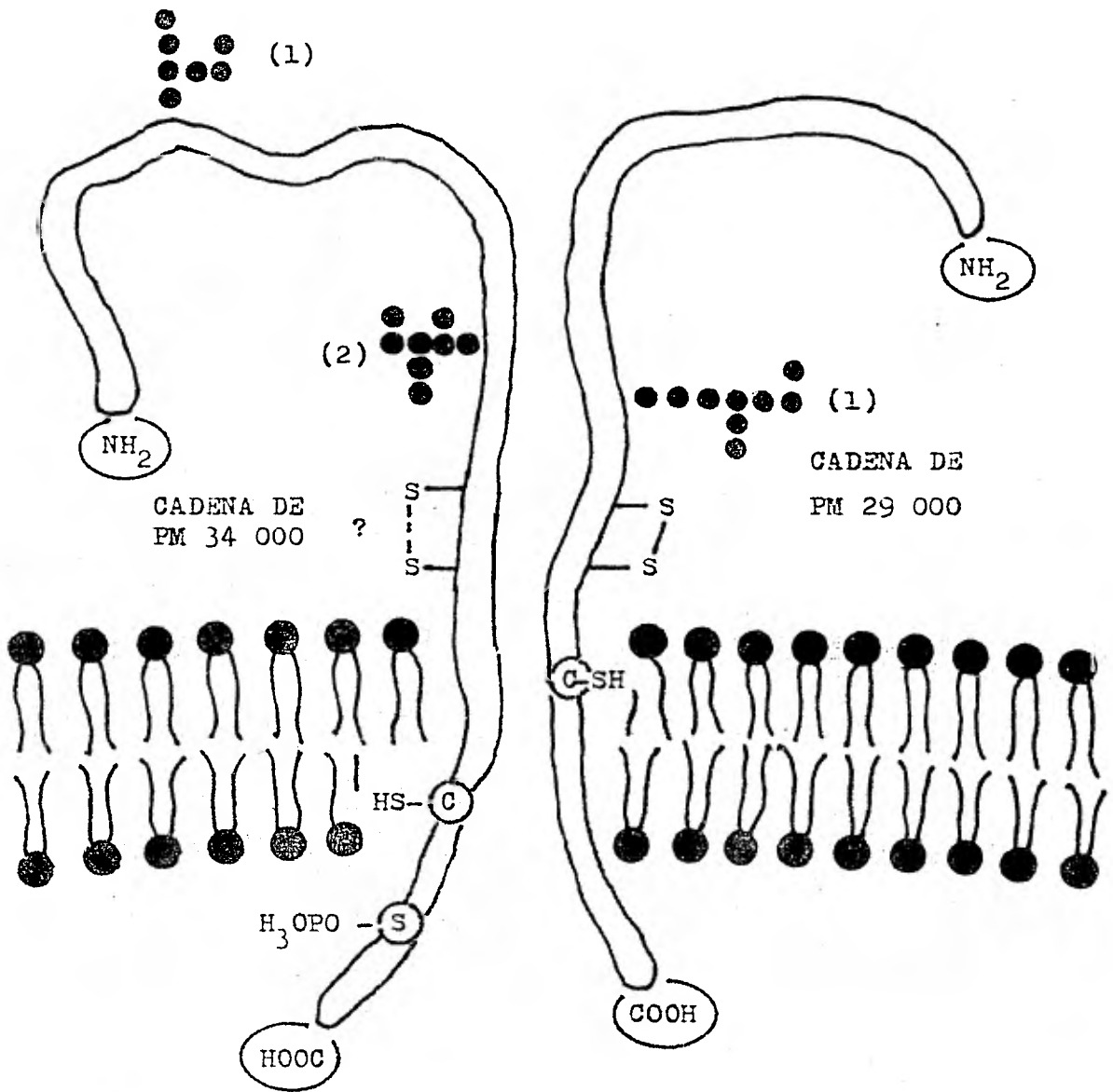


Figura 10 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MOLECULA HLA-DR
(Dausset, J., 1981; Barnstable, C.J., 1978)

(1) Cadena de polisacárido complejo; (2) cadena de polisacárido rica en manosa.

Serología y reacciones cruzadas (Joysey, V.C., 1978).

Muchos de los Ags originalmente definidos, al estudiarse detenidamente, se ha encontrado que se dividen en dos o más componentes de reacción cruzada que se conocen como "divisiones" (Splits), por ejemplo, una persona con el Ag A9 puede tener tanto el Aw23 como el Aw24 ó posi
blemente una tercera variante (tabla V).

La estimulación de un individuo con un Ag HLA de una sola especificidad extraña, producirá, a menudo, Acs no solo contra el Ag estimulador sino también contra especificidades relacionadas. Esto puede reflejar la complejidad de los Ags y la presencia de gran número de determinantes antigénicos, algunos de los cuales son compartidos por más de una especificidad. Los Ags dentro de cada serie alélica, muestran una abundancia de reacciones cruzadas, pero no existen estas reacciones en
tre diferentes series. (tabla V), por esto, la mayoría de los antisueeros disponibles poseen una especificidad dominante pero también reaccionan en menor grado con otras especificidades. La obtención de estos sueros por lo general, es a partir de mujeres multíparas, pacientes transplan
tados y algunas veces de voluntarios después de inmunización deliberada, pero la respuesta de Acs no es predecible con exactitud y ocasionalmente puede darse una respuesta aparentemente no relacionada con el es
tímulo.

Recientemente se han producido Acs monoclonales contra Ags del CPH de rata y de ratón. Cuando esta técnica se aplique a los Ags HLA, muchos de los problemas asociados con la fuente de suero, reacción
cruda y dificultad para definir con precisión los Ags, serán cosa del pasado. En la tabla VI podemos ver cuales son las principales técnicas usadas para la identificación de los Ags HLA.

HLA y enfermedad.

Virchow postulaba que la enfermedad es la reacción de las células

Tabla V

GRUPOS HLA DE REACCION CRUZADA
(Todd-Sanford-Davidsohn, 1979)

Reacciones cruzadas del locus A	Reacciones cruzadas del locus B	Divisiones del locus B (Cont.)
I A2 ↔ A28	I B5 ↔ B18	V B16 ↗ Bw38 ↘ Bw39
II A1 ↗ A3 ↖ A10 ↗ A11 ↖	I B15 ↔ Bw35 B17 ↔ Bw53	VI Bw17 ↗ Larga* ↘ Corta**
III A10 ↔ Aw19 (cualquiera de las divi- siones de Aw19)	II B7 ↗ Bw22 ↖ Bw42 B27	VII Bw21 ↗ Bw49 ↘ Bw50
Divisiones del locus A	III B8 ↔ B14	VIII Bw22 ↗ Bw22.1 ↘ Bw22.2 Bw54
I A9 ↗ Aw23 ↘ Aw24 A9.3	IV B13 ↗ B12 ↖ B40	IX Bw35 ↗ Bw53 ↘ Bw35A Bw35B
II A10 ↗ A25 ↘ A26	Divisiones del locus B	X B40 ↗ B40.1 ↘ B40.2 Bw47 B248
III Aw19 ↗ A29 ↘ Aw30 Aw31 Aw32 Aw33 Aw34	I B5 ↗ Bw51 ↘ Bw52 Bw5.3 Bw5.4	* incluido en Bw4
	II B12 ↗ Bw44 ↘ Bw45	** incluido en Bw6
	III B14 ↗ B14.1 ↘ B14.2	
	IV B15 ↗ B15.1 ↘ B15.2 B15A	

Tabla VI

TECNICAS PARA LA DETECCION DE ANTIGENOS HLA.

Técnica	Usada para	Referencias
Microlinfocitotoxicidad	Identificación de Ags HLA -A, -B, -C y -DR.	Joysey, V.C., 1978; Mittal, K.K., 1978; Terasaki, P.I., 1978; Todd Sanford-Davidsohn, 1979.
Cultivo mixto de linfocitos (CML)	Identificación de Ags HLA-D	Bach, F.H., 1976 b; Breannndan - Moore, S., 1979; Gradwohl's, 1980.
Linfólisis mediada por células	Identificación de Ags HLA-D	Bach, F.H., 1976b; Miller, M.V., 1978.
Tipificación con linfocitos cebados (primed lymphocyte test)	Identificación de Ags HLA-D	Festestein, H., 1981; Miller, M.V., 1978.
Fijación de complemento en plaquetas	Identificación de Ags HLA-A, -B y -C y "Dausset 6"	Gradwohl's, 1980.
Fijación de complemento en linfocitos B	Identificación de Ags HLA-DR	Colombani, J., 1977.
Linfocitotoxicidad por doble fluorescencia	Identificación de Ags HLA-DR	Van Rood, J.J., 1976.

en condiciones alteradas. De aquí parte el concepto moderno de enfermedad, no como algo que el organismo sufre pasivamente a consecuencia de una causa morbosa, sino como la reacción del organismo frente a la causa que la produce. Walter B. Cannon acuñó en 1939 el término homeostasis para referirse a los estados de equilibrio dinámico que dependen de procesos fisiológicos coordinados. (Cannon, W.B., 1939; Velázquez, A., 1979).

En un sentido más amplio, homeostasis se refiere no solo al mantenimiento constante de metabolitos, sino también a la continuidad en el desarrollo de estructuras y a las relaciones entre el organismo y su medio ambiente. Desde este punto de vista, la enfermedad es un trastorno no compensado de la homeostasis y revela la incapacidad de los mecanismos homeostáticos para mantener el equilibrio dinámico frente a eventos desorganizadores. Ahora sabemos que la existencia de estos mecanismos está determinada por el genotipo del individuo, consecuencia de la selección natural en el largo proceso de la evolución biológica, por ello, la constitución genética del individuo determina la homeostasis ante los eventos desorganizadores, esto es, la capacidad de adaptación del organismo; por lo tanto, el genotipo determina su mayor ó menor predisposición a padecer enfermedad. (Pérez Tamayo, R., 1970).

Si como hemos señalado, enfermedad es un trastorno no compensado de la homeostasis, este trastorno se producirá solo cuando ciertos genotipos se encuentren en ciertos ambientes (Velázquez, A., 1979).

Harry Harris diseñó un diagrama que facilita considerar esto (figura 11). El área dentro del círculo exterior representa a la población; la comprendida dentro del círculo interior es la fracción de esta población predispuesta genéticamente (por ejemplo, con una incapacidad homeostática). El área dentro del gajo es la fracción expuesta a un ambiente perturbador y por lo tanto, el gajo en el círculo interno (la región sombreada) representa a los individuos enfermos (Harris, H., 1975).

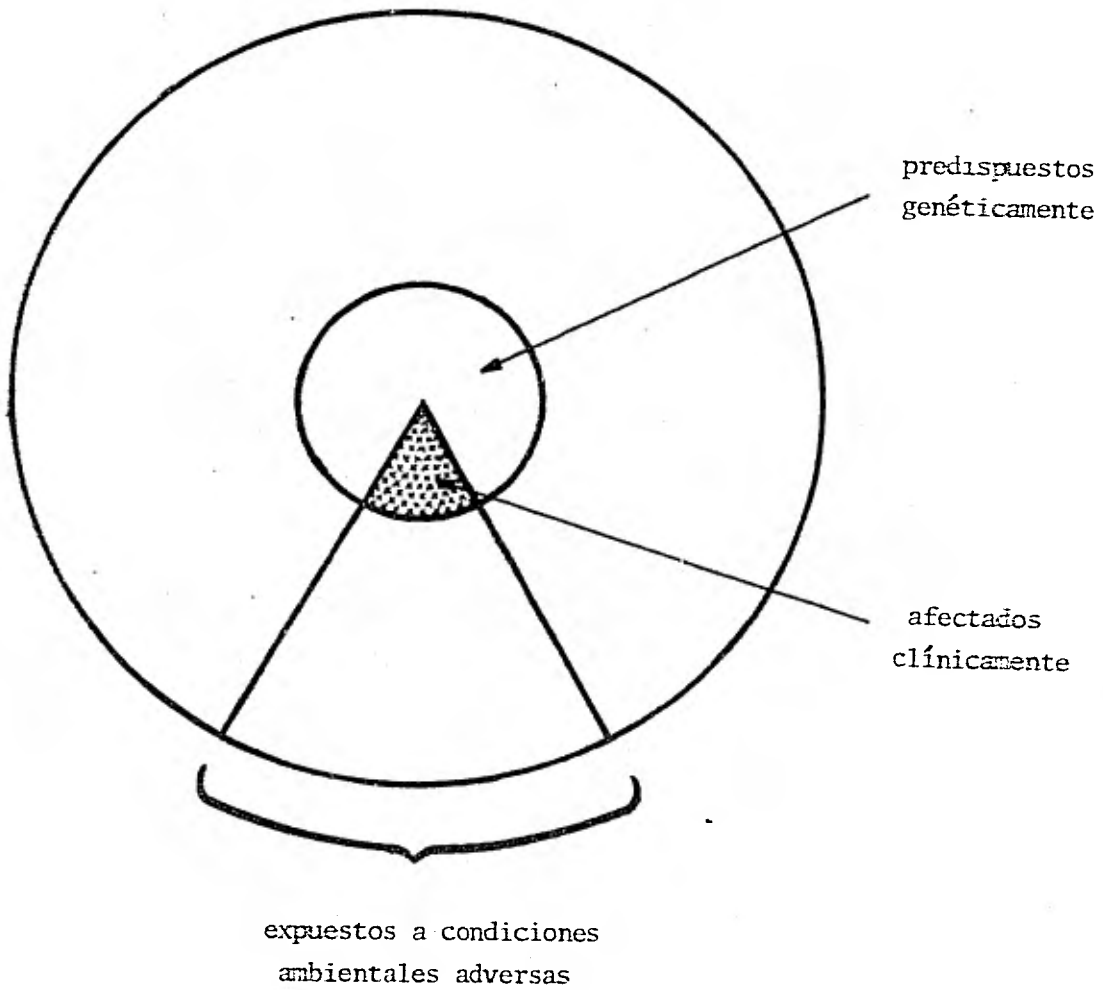


Figura 11 ESQUEMA QUE ILUSTR A LA PARTICIPACION DE GENOTIPOS PREDISPONENTES Y DE FACTORES AMBIENTALES, EN LA PRODUCCION DE UNA ENFERMEDAD (Velázquez, A., 1979).

El concepto genético de enfermedad nos enseña que solo en los individuos predispuestos es necesario evitar la exposición a condiciones ambientales adversas. El estudio de la genética de muchas enfermedades conducirá, probablemente, a su prevención o mitigación por métodos exclusivamente ambientales (Pérez Tamayo, R., 1970; Velázquez, A., 1979).

El sistema HLA y las enfermedades (Dausset, J., 1981; Dick, H.M., 1978).

Las relaciones entre sistemas polimórficos y enfermedad en el hombre se han estudiado usando muchas técnicas, con atención inicialmente enfocada a los grupos sanguíneos ABO. Exceptuando la enfermedad hemolítica fetal, las asociaciones encontradas no fueron lo suficientemente claras como para tener un impacto dramático sobre el diagnóstico o manejo. Las asociaciones más obvias fueron las de los grupo ABO y algunas formas de enfermedad maligna (úlceras duodenales y grupo O y cáncer gástrico y grupo A).

En todas esas asociaciones reportadas, el aumento en el riesgo a padecer la enfermedad por las personas del grupo sanguíneo apropiado fué ligeramente mayor que para los otros grupos sanguíneos, siendo a lo más dos veces que el común. Por ello, esas variantes polimórficas no son aplicables con claridad para el diagnóstico o pronóstico. El descubrimiento de sistema de Ags HLA condujo a la investigación de asociaciones entre éste sistema y las enfermedades humanas, estimulada por los hallazgos significativos en ratones endogámicos de asociaciones entre H-2 y algunas clases de leucemia. Amiel (1967) presentó sus hallazgos sobre las frecuencias de Ags HLA en un grupo de pacientes con linfoma de Hodgkin. Él notó una frecuencia aumentada de un Ag de la segunda serie, el 4c, en los pacientes comparados con un grupo control sano. Este Ag se identificó posteriormente como un grupo de Ags del locus HLA-B que incluye B5, Bw35, B18 y B15.

En la actualidad son múltiples los padecimientos descritos con asociación a uno ó más Ags HLA (tabla VII).

Tabla VII HLA Y ENFERMEDADES (Dausset, J. 1981)

Enfermedades	HLA	Frecuencia %		
		E	C	r.r.
Enfermedad de Hodgkin	A1	40	32.0	1.4
Hemocromatosis idiopática	A3	76	28.2	8.2
	B14	16	3.8	4.7
Hiperplasia renal congénita	B47	9	0.6	15.4
Espondilitis anquilosante	B27	90	9.4	87.4
Síndrome de Reiter	B27	79	9.4	37.0
Uveitis anterior aguda	B27	52	9.4	10.4
Tiroiditis subaguda	B35	70	14.6	13.7
Psoriasis vulgar	Cw6	87	33.1	13.3
Dermatitis herpetiforme	D/DR3	85	26.3	15.4
Enfermedad celiaca	D/DR3	79	26.3	10.8
Síndrome de Sjogren	D/DR3	78	26.3	9.7
Enfermedad de Addison	D/DR3	69	26.3	6.3
Enfermedad de Basedow	D/DR3	57	26.3	3.7
Diabetes insulino-dependiente.	D/DR3	56	28.2	3.3
Miastenia	D/DR3	50	28.2	2.5
L.E.S.	D/DR3	70	28.2	5.8
G.E.M.	D/DR3	75	20.0	12.0
Esclerosis en placas	D/DR2	59	25.8	4.1
Neuritis óptica	D/DR2	46	25.8	2.4
Síndrome de Goodpasture	D/DR2	88	32.0	15.9
Poliartritis reumática	D/DR4	50	19.4	4.2
Pénfigo	D/DR4	87	32.1	14.4

E: enfermos

C: controles sanos

r.r.: riesgo relativo

L.E.S. : lupus eritematoso sistémico

G.E.M.: glomerulonefritis extramembranosa

Las enfermedades que se estudian para conocer su asociación al CPH parecen tener varios rasgos peculiares, principalmente porque son enfermedades de característica familiar, etiología obscura, presentan cierta cronicidad y frecuentemente alteraciones inmunológicas.

Mecanismos. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la asociación entre el sistema HLA y enfermedad, pudiendo encuadrarse en dos categorías principales (Schaller, J.G., 1976 b).

- 1 El Ag HLA está involucrado directamente.
 - a) El Ag funciona como un receptor, en particular de virus, o actúa como ligando para hormonas y productos similares (Dausset, J., 1981; Dick, H.M., 1978; Nijenhuis, L.E., 1977).
 - b) Una similitud estructural entre las moléculas HLA y las de los agentes infecciosos podría imposibilitar al organismo para montar una respuesta inmune (mimetismo molecular).
 - c) Un desorden inmunitario que implique una acción inadecuada de los genes de repuesta inmune (Ir) o de supresión de respuesta inmune (Is) cuyos productos son, muy probablemente, las moléculas DR.
 - d) Una restricción preferencial a nivel de Ags HLA-A, -B y -C, de la lisis por linfocitos T de células infectadas por un virus o conjugadas a un hapteno (Dausset, J., 1981).

- 2 Un gen asociado al HLA está envuelto en el mecanismo fisiopatológico.
 - a) El papel del complemento en la respuesta inmune y en estas asociaciones podría ser más importante de lo que pensamos en la actualidad.

- b) Una deficiencia enzimática, como en la hemocromatosis idiopática y en la deficiencia de 21 hidroxilasa (21-OH).
- c) Un gen de susceptibilidad está cercanamente unido (Dausset, J., 1981; Nijenhuis, L.E., 1977).

El significado de la combinación entre HLA y enfermedad es aún obscuro, pero podría estar en relación a cierta susceptibilidad genética ya sea intrínseca o asociada.

Clasificación (Dausset, J. 1981) Muchas clasificaciones de enfermedades asociadas a HLA son posibles. Una está basada en los loci del complejo HLA aparentemente más ligados. Otra consiste en considerar la categoría de la afección (infecciosa, tumoral, etc.).

- 1 Según el locus más asociado (tabla VII):
 - a) Enfermedades asociadas al locus A; por ejemplo, la hemocromatosis idiopática y A3.
 - b) Enfermedades asociadas al locus B; el ejemplo típico es la espondilitis anquilosante y B27.
 - c) Enfermedades asociadas al locus C; psoriasis vulgar y Cw6.
 - d) Enfermedades asociadas al locus D/DR.
 - e) Enfermedades asociadas a un gen no HLA del complejo; en éstas se agrupan las deficiencias de C2, C4 y 21-OH.

- 2 Según la categoría de la afección:
 - a) Enfermedades infecciosas; poliomiелitis y B16, herpes labial y A1, A29 y B8.

- b) Tumores y afecciones malignas; enfermedad de Hodgkin y A1, leucemia aguda linfoblástica y A2, teratocarcinoma testicular y Dw7.
- c) Enfermedades del metabolismo; hemocromatosis idiopática y A3.
- d) Enfermedades alérgicas; debe confirmarse su asociación en padecimientos como la hipersensibilidad aviar, fiebre del heno, alergia a la ambrosía, etc.

Existen varios factores importantes a considerar en los estudios de HLA y enfermedad, ya que, a pesar de la sorprendente liga entre ciertos padecimientos y la frecuencia de Ags HLA, en la mayoría de los casos la asociación, aunque estadísticamente significativa, no es absoluta.

En primer lugar, si los genes del CPH asociados en frecuencia aumentada con una enfermedad no son los Ags HLA por sí mismos, sino más bien genes unidos a aquellos que determinan los Ags HLA, la asociación depende del desequilibrio de unión entre los genes de susceptibilidad a enfermedad y los genes HLA (Bach, F.H., 1976c).

En segundo término, existe el problema de la heterogeneidad de la entidad diagnóstica. La separación de pacientes en subgrupos que son positivos o negativos a un Ag particular, podría ser un modo útil para diferenciar enfermedades ó factores precipitantes de las mismas (Shaller, J.G., 1976 b).

Tercero, una exposición ambiental a virus, alergenos u otras subtancias, puede contribuir a la enfermedad. El efecto podría no ser del todo o nada; el grado de exposición ambiental podría interactuar cuantitativamente con los efectos de un gen predisponente. Así, individuos con el gen de susceptibilidad a la enfermedad podrían no enfermarse si no se exponen al medio adverso, mientras que individuos sin predisposición genética podrían contraer la enfermedad en caso de una gran exposición al medio ambiente hostil (Schaller, J.G., 1976 b).

Cuarto, genes adicionales pueden influir en la susceptibilidad a enfermedad; esos genes pueden estar fuera del sistema HLA (Schaller, J. G., 1976 b).

Quinto, los Ags HLA aún se están subdividiendo y redefiniendo según la disponibilidad de los sueros tipificadores, por lo que una asociación dada podría cambiar en el futuro (Bach, F.H., 1976 c).

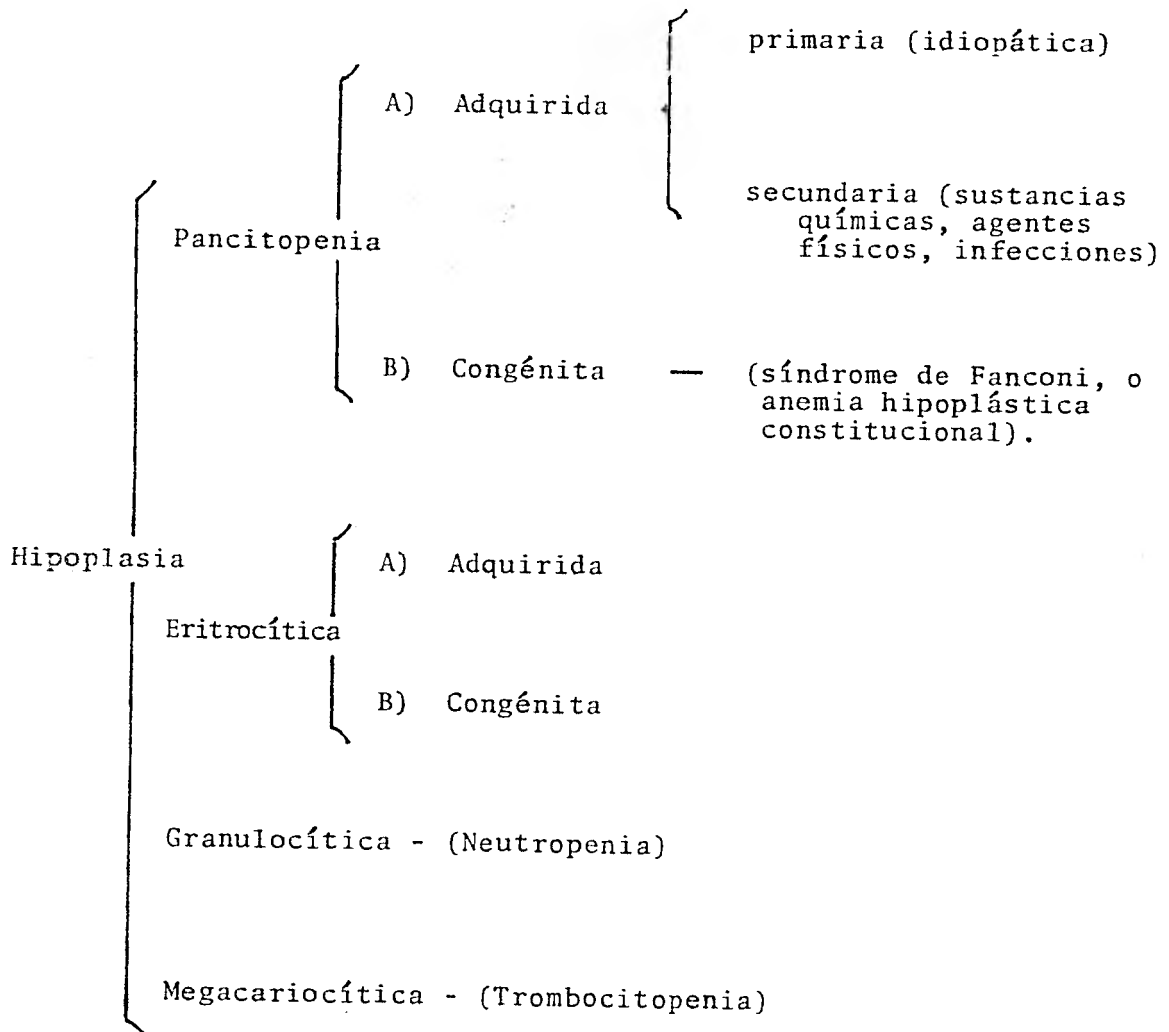
La anemia aplástica

La A.a. es un desorden hematológico caracterizado por la disminución o ausencia de la función de la médula ósea (Gale, R. P. et. al.). Funcionalmente se caracteriza por actividad medular cualitativamente normal, pero cuantitativamente inadecuada. Morfológicamente se distingue por pancitopenia de sangre periférica e hipocelularidad medular sin células precursoras atípicas o evidencia de infiltrados (Linman, J.W. 1975), si persiste una pequeña cantidad de tejido hematopoyético en la médula, la mayoría está distribuido focalmente. Los focos aislados en médula normal o hiper celular pueden encontrarse particularmente en el esternón. (Sánchez Medal, L., 1974 a). Todos los elementos de la médula ósea están generalmente afectados por lo que en sangre periférica podemos tener una o varias citopenias como podemos ver en la tabla VIII.

Etiología. Tradicionalmente implica a diversas sustancias químicas (drogas, insecticidas y disolventes), radiaciones y virus. En nuestro medio parecen ser las causas más frecuentes, a diferencia de otros países donde la mitad de los casos son idiopáticos (Hurtado Monroy, R., 1979).

Los mecanismos potenciales de función anormal de la médula ósea incluyen (Ascensao, J.A., 1976; Elfenbein, G.J., 1979; Hurtado Monroy R., 1979):

Tabla VIII CLASIFICACION DE LOS SINDROMES CLINICOS



- 1) Falla de la proliferación y/o diferenciación de las células tronco hematopoyéticas (defecto de la célula pluripotencial).
- 2) Defectos en el micromedioambiente de la médula ósea, que actuando sobre la célula pluripotencial evitan su proliferación y/o diferenciación sucesiva.
- 3) Recientemente se han evidenciado factores inmunológicos, informándose de la presencia de lipoproteínas, prostaglandinas, linfocinas y Acs inhibidores o células que interaccionan en retroalimentación negativa de hematopoyesis (linfocitos T supresores.)

Diagnóstico. Diversos desórdenes pueden confundirse con la A.a. La pancitopenia periférica más una médula ósea hipocelular no hacen por sí mismas el diagnóstico. Las leucemias agudas, tuberculosis miliar linfohematógena, cáncer con metástasis ósea, lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades pueden producirlas. Por fortuna tales enfermedades se acompañan por algunos síntomas o signos físicos que no se ven en la A.a. y cuya presencia nos conduce al diagnóstico correcto (tabla IX). Los principales rasgos de laboratorio en la A.a. se describen en la tabla X.

Tratamiento. El tratamiento de la A.a. es un tema muy controvertido pues mientras unos autores aseguran que los andrógenos o esteroides anabólicos son el mejor agente terapéutico (Sánchez Medal, L., 1974 a), otros, con más reserva, consideran al padecimiento adquirido con tendencia a remisión espontánea parcial o completa por lo que los resultados de una terapia específica deben interpretarse con cautela (Linman, J.W., 1975).

En general existen varias medidas recomendadas, por ejemplo, alejar al paciente de los fármacos o sustancias químicas que puedan dañarlo, intentar suplir los diversos elementos celulares con transfusiones, tratar de estimular la proliferación de células primitivas o de producir hiperplasia de las células hematopoyéticas restantes e inten-

tar reconstruir la médula ósea mediante injertos (Hurtado Monroy, R., 1979).

Tabla IX DIAGNOSTICO CLINICO DIFERENCIAL DE LA ANEMIA
APLASTICA (Sánchez Medal, L., 1974)

La presencia de uno o más de los siguientes rasgos clínicos hace el diagnóstico de anemia aplástica altamente improbable:

1. Fiebre, en ausencia de infección.
2. Sudoración nocturna o dolor de huesos.
3. Adenomegalia significativa, persistente y particularmente generalizada.
4. Hepatomegalia, en ausencia de fallo cardiaco.
5. Esplenomegalia. Sin embargo, el extremo del bazo puede palpase en pacientes politransfundidos.

La presencia de ictericia, hipertensión o signos de endocrinopatía deben conducir al Médico a investigar la patología apropiada.

Tabla X DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA ANEMIA APLASTICA
(Sánchez Medal, L., 1974)

Sangre periférica.

Rasgos	Anemia aplástica	Otras enfermedades
citopenia	pancito, severa	generalmente bi o uni
normoblastos	ninguno, raro 1-2%	comúnmente frecuentes
reticulocitos	menos del 2%	variable, más del 10%
cuerpos de H.J.	ausentes	pueden presentarse
cambios en G.R.	ninguno-ligeros	comunes
blastos	ausentes	a menudo pocos
granulocitos jóvenes	ausentes	a menudo pocos
Hb F	generalmente alta	variable
Fosf. Alc. G.B.	generalmente alta	puede estar disminuída
Electroforesis de suero	normal	puede estar anormal

Médula ósea.

celularidad	generalmente hipo	a menudo hiper
megacariocitos:		
número	ausentes-disminuídos	bajo-normal-aumentados
morfología	normal	puede ser normal
eritroblastos:		
número	generalmente bajo	a menudo aumentado
morfología	normal	formas megaloblastoides
granulocitos:		
número	por lo general bajo	variable
morfología	normal o con granulación tóxica	blastos o células jóvenes aumentados

Eritrocínética.

hierro sérico	alto	variable
transferr. satur.	80% +	variable
⁵⁹ Fe T _{1/2}	largo	corto
⁵⁹ Fe toma en G.R.	muy baja	baja
⁵⁹ Fe, toma hepática	alta	variable
⁵⁹ Fe, toma en médula	baja	variable
Urobilinógeno fecal	normal	a menudo alto

OBJETIVOS.

En una enfermedad con alto índice de mortalidad que va de 58 a 76% (Reynoso, E., et.al., 1968), con gran incidencia en la población mexicana y con una historia natural sumamente variable que dificulta la terapéutica, es importante prevenir el padecimiento en los individuos susceptibles. A fin de llevar a cabo esta profilaxis, se hace necesario identificar con oportunidad a las personas que tienen un riesgo mayor de contraer el padecimiento y evitar su exposición a los ambientes adversos que pueden desencadenarlo.

Tal identificación se realiza buscando 'marcadores' que permitan dividir a las personas susceptibles de las que no lo son ya que la profilaxis debe efectuarse sólo en aquellas. En este trabajo, el objetivo primordial es la búsqueda de un "marcador genético" que en este caso son los Ags HLA de "individualidad biológica". La correlación entre un Ag HLA y la A.a. permitirá identificar, en poblaciones sanas, aquellos individuos susceptibles al padecimiento y hacer, entonces, la profilaxis adecuada.

También se estudiaron las diferencias existentes entre varios trabajos reportados de Ags de histocompatibilidad en población mexicana sana y la conveniencia de usar esos datos como controles en estudios como el presente y, por último, se evaluaron dos lotes de placas comerciales para microlinfocitotoxicidad que se emplearon para detectar los Ags HLA en esta investigación.

A continuación se resumen los objetivos fundamentales de ésta tesis:

OBJETIVOS

- I Búsqueda de un marcador genético (Ag HLA) en pacientes con anemia aplástica.

- II Estudio de las diferencias en antígenos de histocompatibilidad en población mexicana sana en trabajos hechos por diferentes autores.

- III Evaluación de dos lotes de placas para microlinfocitotoxicidad usados para detectar antígenos HLA en este trabajo.

MATERIAL Y METODOS.

- 1) Prueba de microlinfocitotoxicidad en placa para la determinación de antígenos HLA (Mittal, K.K., 1978; Terasaki, P.I., et.al., 1978).

Método:

Básicamente la prueba consiste en la reacción de 1 mcl de linfocitos con 1 mcl de anticuerpo seguido por la adición de 5 mcl de complemento de conejo (figura 12).

El manejo de cantidades tan pequeñas se logra empleando una cubierta de aceite mineral (Petrolato líquido pesado) en la microplaca que evita la evaporación y es fácilmente atravesada por los reactivos acuosos agregados después. La técnica se realiza según se describe en el instructivo de las placas de prueba HLA y de acuerdo a la bibliografía (Festestein, H., 1981; Harris, R., 1969; Mittal, K.K., 1978; Terasaki, P.I., 1978), brevemente se describen los pasos principales.

Por las características de la A.a. se requiere mayor muestra de sangre heparinizada (1000 U/ml, 1 ml/10 ml de sangre) ó desfibrinada (de 5 a 15 ml), que se diluye en un volumen igual de solución Hanks (pH 7.4). Esta mezcla se vierte sobre un gradiente de Ficoll - Hypaque (índice de refracción 1.3545 y $d = 1.077$) sin mezclar las fases y se centrifuga 15 minutos a 1000 x g. Los linfocitos se separan de la interfase del gradiente con una pipeta Pasteur y se lavan dos veces con Hanks, se ajusta su número a $1.5 - 2.0 \times 10^6$ células por mililitro en un hemocitómetro de Neubauer.

Un mcl de ésta suspensión se adiciona con una jeringa de repetición Hamilton (PB-600-1) a cada pozo de la placa de prueba HLA (Behringwerke-Química Hoechst) previamente hidratada y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregan 5 mcl de complemento de conejo (Behringwerke) a cada pozo y se incuba la placa una

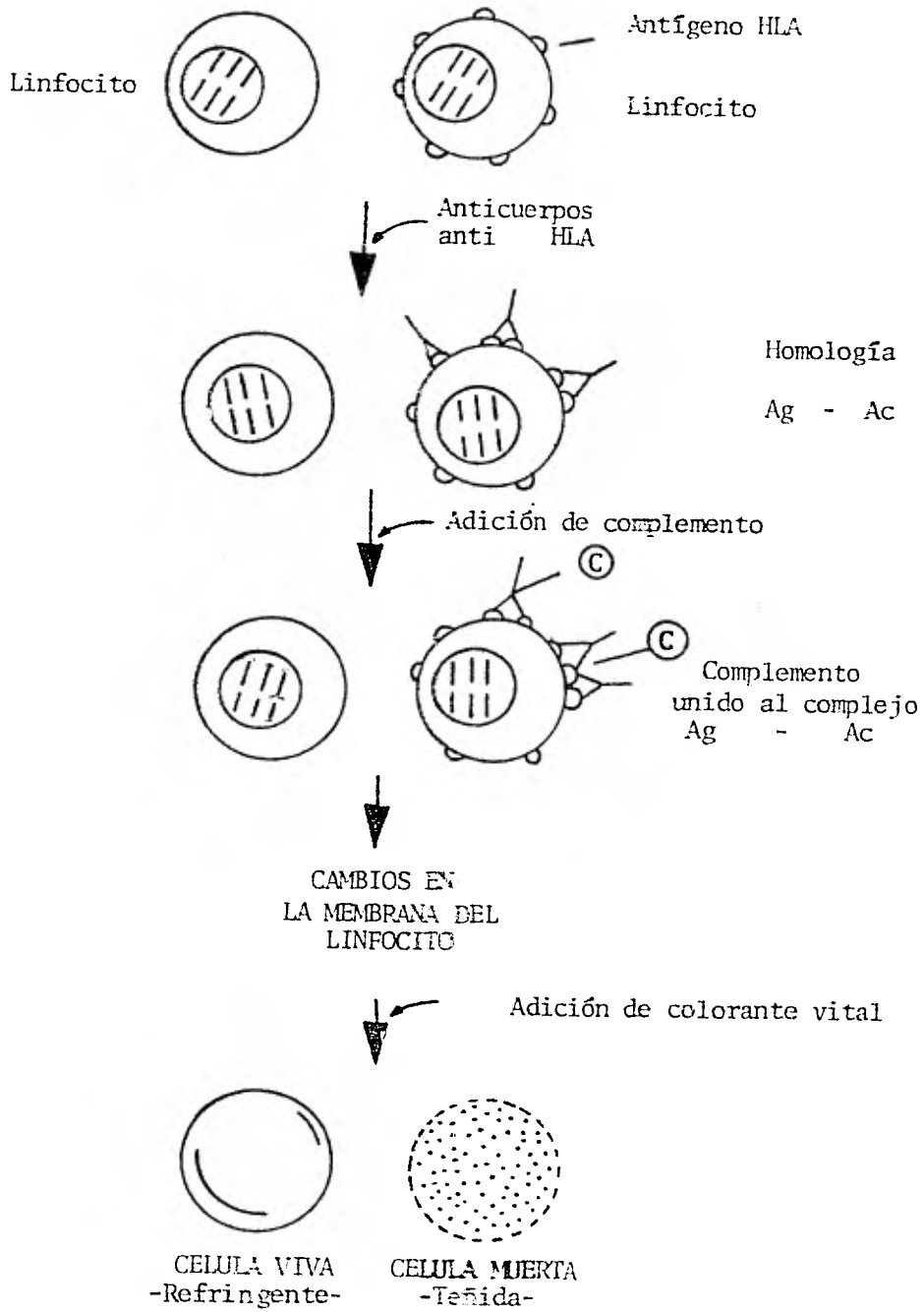


Figura 12. PRUEBA DE LINFOCITOTOXICIDAD

hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se sacude la placa para eliminar el exceso de reactivos sin perder las células y se añaden 10 ml de solución de azul de tripano-EDTA (3 partes de azul de tripano 0.25% en Hanks y 7 partes de EDTA en SSF pH 7.2) a cada pozo, se agita la placa con cuidado en un agitador Vortex (Clay Adams, Co.) y se deja 15 minutos en reposo después de los cuales se elimina el colorante sacudiendo la placa una vez más y se colocan 10 ml de Hanks a cada pozo para leer.

Debido a que no se emplea formaldehído para fijar, la lectura debe hacerse dentro de las siguientes dos horas ya que el complemento remanente sigue actuando pudiendo aumentar la mortandad celular con el tiempo.

La lectura de las placas emplea la siguiente escala de porcentaje de células muertas en exceso del control negativo:

1 = 0 a 10%	negativo
2 = 11 a 20%	-
4 = 21 a 30%	+
6 = 31 a 80%	positivo
8 = 81 a 100%	positivo

La lectura se realiza en un microscopio invertido de contraste de fases (American Optical, Co.), con aumento de 10X, lo que permite visualizar el fondo del pozo en un solo campo facilitando la lectura y disminuyendo errores. El sentido de lectura es a lo largo del borde del pozo y terminando en cruz. El reporte de resultados se realiza en hojas especiales como la mostrada en la página siguiente.

Protokollformular / Data Sheet

HLA-Testplatte für den Zytotoxizitätstest nach NIH
HLA testplate for the cytotoxicity test according to NIH

- 63 -

Testplatte Nr./tray No: TP 15

Patient/patient: _____

gelesen von: _____
testet by: _____

Datum: _____
date: _____

Verzeichnis der Antisera/arrangement of antisera

Spezifität/specificity	A1	A1	A1 + B8	A2	A2	A2
K.-/Lot No.	0104*	0105*	8002*	17496*	20016*	0204*
Ergebnis/result						
1	neg.	A2 + A28	A3	A3	A9	A9
		20017*	0304*	17328*	20019*	0802*
2	A9 + Bw38	A11	A11	A25	A25 + A28	A25 + A28 + Aw32
	20328*	18659*	1102*	18198*	17945*	13263*
3	A29	A29 + B12	A29 + B17	Aw30 + Aw31	B5	B5
	2901*	18941*	12472*	9101*	11020.8*	0503*
4	B5	B5	B5 + Bw35	B5 + Bw21	B5 + B15 + Bw35	B7
	20200*	17492*	R451*	18318*	9001*	17497*
5	B7	B7	B7 + B27	B7 + B27	B3	B6
	0703*	4858*	7221*	8502*	20020*	0803*
6	B8	B12	B12	B12	B13	B13
	20018*	17491*	20012*	1203*	9178.2*	10906*
7	B14	B14	B15	B15	B17	B17
	20013*	20014*	R45*	20015*	13264.4*	1705*
8	B17	Bw21 (w49 + 50)	Bw49	Bw22 + B7	B27	B27
	20164*	21830*	2101*	16400*	11007.2*	2702
9	B37	B40 + B13	Cw3	Cw4	pos.-Kontr.	neg.-Kontr.
	3702*	18397*	[5301*]	5401*		
10						
	A	B	C	D	E	F

* vom Menschen / of human origin ▲ vom Schimpansen / from chimpanzee ● vom Kaninchen / from rabbit
[] häufig schwache Reaktionen

Auswertung / result:

HLA-A	1	2	3	9	11	25	26	28	29	w00	w31	w32	w33					
HLA-B	5	7	8	12	13	14	15	17	18	27	37	40	w49	w50	w22	w35	w38	w39
HLA-C	w1	w2	w3	w4	w5	w6												

verwendetes Komplement:
complement used:

OTWI X47 04448

2) Análisis estadístico

El tratamiento estadístico se efectuó sobre cada uno de los objetivos propuestos:

- 1) Tratamiento de los grupos control que comprende la evaluación de las diferencias en los Ags reportados por los grupos usados en este estudio.
- 2) Tratamiento de los lotes de placas, que consiste en la comparación de resultados obtenidos en cada uno de los lotes de placas usados (TP-15 y TP-16) a fin de valorar las diferencias que existan entre ellos.
- 3) Comparación de los pacientes con A.a. con el grupo control elegido.

Para determinar la asociación de los Ags HLA con una enfermedad, se calcula el riesgo relativo y la ji cuadrada respectivos y con ello se infiere la probabilidad de que tales asociaciones sean debidas al azar ó a una relación significativa.

a) Cálculo del riesgo relativo.

Se define el rr como la posibilidad de desarrollar una enfermedad cuando un Ag está presente en comparación con el que habría si el Ag no estuviera. Un riesgo superior a uno indica que el Ag es más frecuente en los pacientes que en los controles, mientras que un rr menor de uno indica asociación negativa (Festestein, H., 1981).

El método de Ryder y Svejgaard (Ryder, L.P., 1976) de cálculo de rr se basa en el procedimiento original de Woolf (Woolf, B., 1954), modificado por Haldane.

A partir de una tabla de contingencia dd 2 x 2, se calculan tanto el rr como la χ^2 de una muestra de pacientes, a fin de comparar sus frecuencias antigénicas (HLA) con las de una población normal.

Tabla de contingencia de 2 x 2 :

		Antígeno		Totales
		+	-	
Enfermedad	Positivo	a	b	M3
	Negativo	c	d	M4
	Totales	M1	M2	n

En donde:

- a = pacientes con el Ag en cuestión.
- b = pacientes sin el Ag.
- c = controles con el Ag.
- d = controles sin el Ag.

El riesgo relativo es (Festestein, H., 1981):

$$r r = \frac{a \cdot d}{c \cdot b}$$

b) Cálculo de ji cuadrada:

Las cifras obtenidas en nuestro estudio (resultados), se colocan en la tabla de contingencia y χ^2 se calcula como sigue (Festestein, H. 1981; Snedecor, G.W., 1974; Zmijewski, CH. M. 1982) :

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2}{M1.M2.M3.M4} \cdot n$$

En este caso se comparan dos grupos de individuos (pacientes y controles) cuyas diferencias deseamos evaluar para conocer si son debidas al azar o existe algún factor en los enfermos con A.a. que los predisponga al padecimiento. El valor de X^2 se consulta en tablas (Fisher, R. A., 1979; Snedecor, G.W., 1974) considerando un grado de libertad y obtenemos el valor de p que es la probabilidad de que la asociación observada sea debida al azar. Mientras menos sea el valor de p (X^2 más grande) mayor es el significado de la asociación.

c) Corrección de p .

Para establecer una relación definitiva entre una enfermedad y un determinado Ag HLA, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones estadísticas.

Existen varias trampas de las que hay que estar consciente, por ejemplo, hay muchas asociaciones débiles debidas solo a la probabilidad estadística de encontrarlas al azar; una de cada 20 comparaciones hechas entre Ags con un valor de p menor de 0.05 podría ser el caso. Esto puede llevar a considerar significativas asociaciones que no lo son, así que hay que usar siempre un factor de corrección. Esta corrección se hace multiplicando el valor de p por el número de comparaciones hechas (Ags probados). El valor de p corregido, que inicialmente en el ejemplo era menor de 0.05, cuando se comparan 20 Ags, sería de 1.0 que claramente no es significativo (Festestein, H., 1981).

Este procedimiento, basado en la desigualdad de Bonferroni, asegura que si no existen realmente diferencias entre los dos grupos, la oportunidad de declarar erróneamente una o más de las diferencias observadas como "significativas" será menor que el valor de p ajustado, por ello, los valores de p corregida mayores de 0.05 se consideraron no significativos. (Schaller, J.G., 1976 a).

RESULTADOS

Se tipificaron 25 pacientes con anemia aplásica que cumplieron con los requisitos de diagnóstico del Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades de Centro Médico La Raza del I.M.S.S. El grupo estuvo compuesto por 15 hombres (60%) y 10 mujeres (40%) no existiendo en la elección criterios sobre etiología, evolución o tratamiento de los pacientes. Los resultados de esta tipificación se compararon con los de varios grupos de población sana reportados en la literatura. Los Ags encontrados en los pacientes tipificados con los dos lotes de placas usados (TP-15 y TP-16) se muestran en la tabla XI.

Podemos observar que los Ags que se presentan con más frecuencia son: HLA-A2 (40%), -A28 (44%), -B7 (28%) y -Cw4 (28%). El grado de aparición de ciertos Ags en cada lote de placas varía con cierta amplitud, por ejemplo, A2 se detectó en 7 pacientes con las placas TP-15 y sólo en 3 con las TP-16; A28 en tres casos con las TP-15 y en ocho con las TP-16 y por último B7 se detectó 7 veces con las primeras placas y ninguna con las segundas. Puede notarse que los pacientes con el Ag Cw4 presentan también el Ag Bw35, sobre todo en el lote TP-16, lo que podría sugerir alguna relación en la expresión de estos Ags.

Un paciente enviado para su tipificación (R.H.J.) resultó blanco a la prueba, es decir, no se detectaron en sus linfocitos Ags para las especificidades probadas lo que habla de la existencia de marcadores exclusivos para población mexicana que no se detectan con antisueros importados.

1) Tratamiento de los grupos control.

Se compararon varios grupos control publicados por diferentes autores (tabla XII) para evaluar estadísticamente las diferencias existentes en sus resultados.

Tabla XI

HLA EN ANEMIA APLASTICA

Pacientes

Ags	Placas TP-15							Subtot 1	Placas TP-16							Subtot 2	TOTAL									
	G.R.N.	O.M.P.	C.G.A.	A.G.S.	M.R.S.	F.N.P.	A.C.C.		O.P.S.	C.A.H.	H.H.F.	O.C.P.	F.Z.P.	B.P.U.	C.C.M.			L.S.P.	V.G.M.	L.G.M.	B.C.C.	M.L.E.	G.G.M.	R.M.E.	T.G.J.	N.B.S.
HLA-A																										
1		X		X		X					X															
2	X	X	X		X			X	X			X												X	X	
3											X															
9			X				X												X	X				X		
11				X																						
26					X									X												
28						X					X	X		X		X	X		X	X	X		X	X		
HLA-B																										
5				X			X			X	X									X						
7	X	X	X	X			X			X	X															
12	X				X						X															
13							X																			
14					X																			X		
15									X																	
17							X																			
27												X														
w35								X												X				X		
w38																			X							
40																								X		
HLA-C																										
w3		X																								
w4				X		X		X						X	X				X					X		

28 Ags en total

Los Ags HLA-A24, A29, w30 y w32, así como los HLA-Bw21 y w22, fueron probados no encontrándose positividad en la población muestral, lo mismo ocurrió con los Ags B8 y B37.

Tabla XII ANTIGENOS HLA EN POBLACION MEXICANA

Antígeno	Terasaki (n=225)		Albert (n=100)		Fraga (n=105)		Gorodezki (n=200)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A1	12	5.3	12	12	16	15.2	24	12
A2	54	24.0	50	50	74	70.4	106	53
A3	10	4.4	15	15	14	13.3	29	14.5
A9	30	13.3	31	31	28	26.6	70	35.0
A11	8	3.5	8	8	4	3.8	31	15.5
A25	3	1.3	-	-	8	7.6	0	0
A26	7	3.1	-	-	13	12.3	2	1
A28	16	7.1	10	10	2	1.9	30	15
A29	10	4.4	4	4	-	-	3	1.5
Aw30	12	5.3	10	10	-	-	8	4
Aw32	6	2.6	17	17	5	4.7	3	1.5
B5	10	4.4	14	14	33	31.4	48	24
B7	15	6.6	9	9	8	7.6	22	11
B8	7	3.1	9	9	3	2.0	23	11.5
B12	20	8.8	20	20	21	20.0	14	7
B13	4	1.7	-	-	13	12.3	4	2
B14	12	5.3	11	11	7	6.6	16	8
B15	4	1.7	8	8	-	-	14	7
B17	2	0.8	5	5	0	0	18	9
Bw21	8	3.5	4	4	12	11.4	13	6.5
Bw22	1	0.4	7	7	-	-	9	4.5
B27	4	1.7	4	4	6	5.7	10	5
Bw35	33	14.6	28	28	19	18.1	84	42
B37	1	0.4	-	-	3	2.0	4	2
Bw38	8	3.5	-	-	-	-	-	-
B40	12	5.3	20	20	20	19.0	40	20

Al valorar los grupos publicados por Terasaki (1978), Gorodezki (1979), Fraga (1979) y Albert (1972), se encontraron marcadas diferencias entre sus resultados.

Las diferencias entre los grupos 1 y 2 (Terasaki y Albert) que corresponden a población mexicana radicada en los Estados Unidos de Norteamérica, resultan altamente significativas pues la probabilidad de que existan, debidas al azar, diferencias como las encontradas es menor de 1/1000. Entre los grupos 3 y 4 (Fraga y Gorodezki) aunque no hay discrepancias tan consistentes, existen diferencias significativas en ciertos Ags como A2 y Bw35 ($\chi^2 = 8.69$ y 17.59) considerando que ambos trabajos tipificaron individuos de la Cd. de México.

Ante estos hechos, se decidió comparar la muestra de pacientes con los grupos control 3 y 4 por tratarse de trabajos más recientes, realizados en el País y con sujetos cercanos al hábitat de los enfermos (Cd. de México). Además de esas comparaciones, se obtuvo un tercer grupo control sumando los resultados de los grupos 3 y 4 a fin de obtener mayor homogeneidad intentando reducir, con este recurso, las discrepancias existentes entre esos trabajos.

2) Tratamiento de los lotes de placas.

Los pacientes con A.a. se tipificaron con dos lotes de placas comerciales para microlinfocitotoxicidad, el lote TP-15 (n=13) y el lote TP-16 (n=12). Ya que existe la posibilidad de que la respuesta de los antisueros contenidos en cada lote sea distinta hacia los Ags probados (distinta sensibilidad), los resultados de cada lote se compararon entre sí sin encontrar significancia en sus diferencias, por lo que se manejó la muestra total de pacientes (n=25) sin dividirla en subgrupos.

3) Pacientes contra grupos control.

Los resultados de esta comparación se resumen en la tabla XIII.

Sólo los Ags A28 y B7 rebasan el límite de significancia para ji cuadrada (3.83) y muestran consistencia al compararse con los tres grupos control, es decir, en las tres comparaciones hechas (con los grupos de Fraga, Gorodezki y sumado), son los únicos Ags con X^2 mayor de 3.83.

El riesgo relativo y la p corregida para estos Ags se muestran en las tablas XIV y XV.

Para los Ags HLA-C, la comparación se hizo contra el grupo reportado por Baur y Danilovs (1980) no encontrándose diferencias significativas.

Tabla XIII COMPARACION DE ANTIGENOS HLA EN PACIENTES CON ANEMIA APLASTICA Y CONTROLES SANOS.

Ag	A.a. (n=25)		Fraga (n=105)		Gorodezki (n=200)		Σ Controles (n=305)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A1	4	16	16	15.2	24	12	40	13.1
A2	10	40	74	70.4	106	53	180	59
A3	1	4	14	13.3	29	14.5	43	14
A9	5	20	28	26.6	70	35	98	32.1
A11	1	4	4	3.8	31	15.5	35	11.4
A25	0	0	8	7.6	0	0	8	2.6
A26	2	8	13	12.3	2	1 +	15	4.9
A28	11	44	2	1.9 +	30	15 +	32	10.4 +
A29	0	0	-	-	3	1.5	-	-
Aw30	0	0	-	-	8	4	-	-
Aw32	0	0	5	4.7	3	1.5	8	2.6
B5	6	24	33	31.4	48	24	81	26.5
B7	7	28	8	7.6 +	22	11 +	30	9.8 +
B8	0	0	3	2	23	11.5	26	8.5
B12	5	12	21	20	14	7	35	11.4
B13	1	4	13	12.3	4	2	17	5.5
B14	3	12	7	6.6	16	8	23	7.5
B15	2	8	-	-	14	7	-	-
B17	1	4	0	0 +	18	9	18	5.9
Bw21	0	0	12	11.4	13	6.5	25	8.1
Bw22	0	0	-	-	9	4.5	-	-
Bw27	1	4	6	5.7	10	5	16	5.2
Bw35	5	20	19	18.1	84	42 +	103	33.7
Bw37	0	0	3	2	4	2	7	2.2
Bw38	1	4	-	-	-	-	-	-
Bw40	1	4	20	19.0	40	20	60	19.6

+ = X² mayor de 3.83

Tabla XIV.

HLA-A28 en ANEMIA APLASTICA

	Casos	A28 +	Frecuencia %
Pacientes	25	11	44
Controles (Suma)	305	32	10.5

rr = 6.7

$\chi^2 = 22.89$

Ags probados = 26

p = 0.00000172

Pcorregida = 0,00004472

Tabla XV

HLA-B7 en ANEMIA APLASTICA

	Casos	B7 +	Frecuencia %
Pacientes	25	7	28
Controles (suma)	305	30	9.8

rr = 3.56

$\chi^2 = 7.66$

Ags probados = 26

p = 0.005646

P_{corregida} = 0.146796 no significativa

DISCUSION

Podemos decir que si bien éste estudio no es definitivo, parece existir cierta relación entre el Ag A28 y la A.a. que podría tratarse de un marcador de susceptibilidad genética. Este Ag tiene reacción cruzada principalmente con el A2 (tabla V) considerado como marcador de población mexicana. Esencialmente esta reacción es en un solo sentido (Terasaki, P.I., 1980), el suero anti A2 no reacciona con células positivas a A28 a menos que el Ag A2 esté también presente; sin embargo, el antisuero A28 en ocasiones dá resultados positivos falsos en presencia del Ag A2. En este caso, ningún paciente con el Ag A28 poseía a la vez el A2 ya que precisamente para evitar esas reacciones indeseables, la placa de microcitotoxicidad está provista con antisueros contra A2 por triplicado (ver hoja de reporte en material y métodos), es decir, si el linfocito probado posee el Ag A2 será detectado por los antisueros de los pozos 1D, 1E, 1F y posiblemente, aunque en menor grado, en el 2A; si el linfocito posee sólo el Ag A28, será detectado únicamente en el pozo 2A y por último, si la célula tiene ambos Ags, dará positividad en los cuatro pozos.

En cuanto al Ag B7 que apareció en 7 de los 25 pacientes, en la tabla XV se muestra que la p corregida no resultó significativa, debiendo mencionarse que este Ag fué el que presentó mayor discrepancia entre los subgrupos tipificados con los lotes de placas (TP- 15=7, TP-16=0), la X^2 fué de 7.8 ($p=0.005$) que al corregir nos dá una $p=0.15$, este valor aunque no significativo, nos hace pensar en la conveniencia de usar un solo lote de placas para estudios subsecuentes a fin de evitar cualquier diferencia en la sensibilidad de los antisueros.

El estudio realizado a los grupos control publicados, demuestra que aún cuando la población mexicana ha sufrido un mestizaje continuo

a lo largo de 450 años, aún no existe una homogeneidad absoluta en la población. Así mismo, las diferencias que seguramente existen en la técnica de tipificación entre los laboratorios resultan evidentes en los reportes. Las posibles causas de las diferencias encontradas en los grupos control estudiados pueden incluir:

- 1 Variaciones en la población muestreada.
- 2 Distinta sensibilidad de los antisueros usados.
- 3 Diversos criterios en la evaluación de las pruebas.
- 4 Diferencias en las técnicas empleadas.

El caso del paciente que resultó negativo a todos los Ags tipificados no significa que no posea Ags HLA en sus linfocitos, sino más bien, que los Ags que posee son distintos a los de la población de donde provienen los antisueros de las placas (Alemania). Esto hace necesaria la búsqueda e identificación de Acs anti HLA exclusivos de población mexicana. Un esfuerzo de este tipo se ha realizado en el ISSSTE (Gurrola Briones, G., 1981) mismo que definitivamente debe continuarse.

A fin de aclarar la asociación existente entre el Ag A28 y la A.a. se hace necesario:

- 1 Ampliar el universo del estudio.
- 2 Tipificar grupos control paralelos.
- 3 Reducir el costo de la investigación.

En muchos laboratorios, se tipifican personas normales cuyos datos se emplean para conformar un grupo control que se compara con pacientes de diversas enfermedades. Es claro que si el estudio busca personas con cierta susceptibilidad a determinado padecimiento, postulándose que un agente externo (ambiental) puede ser el desencadenante, los grupos control deben estar constituidos por individuos desarrollados o en contacto cercano con el medio ambiente de los enfermos, ya que de otro

modo sería imposible saber si las personas usadas como controles pudieran desarrollar el padecimiento al ponerse en contacto con el posible agente causal. Por lo anterior se sugiere que el estudio debe comprender tres grupos:

- 1 Grupo de pacientes.
- 2 Grupo de familiares (no enfermos) de los pacientes.
- 3 Grupo de individuos no familiares que estén en contacto cercano con el medio ambiente del paciente (vecinos, compañeros de escuela o trabajo).

El costo del estudio es bastante alto (cada placa costaba en 1980 \$1500.00 M.N.), ya que el material es importado. Por ello es recomendable conseguir otra fuente de antisueros (por ejemplo del NIH) que reduzca el desembolso además de lograr uniformidad en cuanto a sensibilidad, mientras se consigue su elaboración en el País.

Los pacientes con A.a. sujetos a estudios futuros, deberán dividirse en grupos, a fin de controlar aquellas variables que posiblemente afecten los resultados, es decir, deben agruparse por edades, etiologías, sexo, etc., para aclarar, en su caso, alguna posible heterogeneidad diagnóstica.

CONCLUSIONES.

Después de analizar los resultados obtenidos en éste trabajo, podemos resumir las conclusiones en lo siguiente:

- I El Ag A28 se presentó en casi la mitad (44%) de los pacientes con anemia aplástica tipificados, lo que puede sugerirnos su posible utilidad como "marcador genético" de susceptibilidad aunque, definitivamente, debe aumentarse el universo del estudio.
- II Los trabajos publicados sobre Antígenos HLA en población mexicana sana, difieren tanto en sus resultados que consideramos no conveniente su uso como grupos control para estudios de ésta índole.
- III Los lotes TP-15 y TP-16 de placas comerciales para microlinfocitotoxicidad no difieren apreciablemente en su sensibilidad, pero es recomendable el empleo de un solo lote en cada investigación.
- IV El presente trabajo constituye la base de un estudio longitudinal a largo plazo que el Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico "La Raza" del I.M.S.S. ha implementado en los pacientes con A.a., con los siguientes objetivos:
 - a) Determinación de los grupos HLA en pacientes con aplasia medular (cuyos resultados prospectivos se dan en ésta tesis).
 - b) Investigación del estado de la inmunidad celular y humoral en pacientes con A.a.

La información que se derive de los resultados de éstos estudios se orientan al mejor conocimiento de una enfermedad particularmente frecuente en la zona norte de la Ciudad de México y de ellos pueden obtenerse datos valiosos acerca de la etiología, tratamiento y prevención de algunas complicaciones que se observan en éstos pacientes.

COLOFON.

En una enfermedad con un altísimo índice de mortalidad, con gran incidencia en la población del norte de la Ciudad de México y con una historia natural sumamente variable que hace difícil la valoración del éxito de cualquier programa terapéutico, es importante definir las características etiológicas a fin de prevenir el padecimiento en las personas susceptibles y controlar su desarrollo en los enfermos para conseguir la rehabilitación completa así como el abatimiento de la tasa de mortalidad.

Estudios que involucren al sistema HLA en relación con enfermedad, pueden ser la herramienta adecuada que nos ayude a alcanzar esos objetivos. Los trabajos efectuados continuamente en los principales laboratorios de investigación del mundo así como en las instituciones más importantes del País (IMSS, ISSSTE, SSA, INN) demuestran el marcado interés que existe en éste campo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial a las siguientes personas ya que sin su ayuda éste trabajo no se hubiera realizado:

M. en C. Carlos E. Salas C.	Asesoría y Revisión
Dr. Dennis Hurley Phee	Estadística
QFB. Elsa Irene Sánchez M.de O.	Redacción, Corrección Mecanografía y Dibujo.
Dra. Judith Pérez Giroud	Asesoría Técnica
Sra. Ma. Cristina Vega L.	Mecanografía
QFB. Norma Schmill López.	Asesoría Técnica.
Sr. Víctor G. Zapata G.	Tipografía y Clisés

Y a todas aquellas personas quienes sin participar directamente pero otorgando el apoyo moral y las facilidades materiales permitieron el logro de éste estudio.

A todos.

GRACIAS.

B I B L I O G R A F I A .

Albert, E.D., Mickey, M.R. y Terasaki, P.I.: Genetics of the HLA system in four populations, american caucasians, japanese americans, american negroes and mexican americans. *Histocompatibility Testing 1972*, pp 233-238, Munksgaard, Copenague, 1972.

Albert, E.D.: The HLA system, serologically defined antigens. En "*Clinical Immunobiology*", Vol. 3, Bach F.H. y Good R.A. Eds. Academic Press, Nueva York, 1976.

Aniel, J.L.: Study of the leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease. En "*Histocompatibility testing 1976*", pp 79-81, Curtoni, E.S., Mattiuz, P.L., Tosi, R.M. Eds. Munksgaard Copenague, 1967.

Ascensao, J.A., Kagan, W., Moore, M., Pahwar, R., Hansen, J., y Good, R.A.: Aplastic anemia, evidence for an immunological mechanism. *Lancet* I : 669, 1976.

Bach, F.H. y van Rood, J.J.: The major histocompatibility complex - genetics and biology (First of three parts). *New Engl. Jour. Med.* Vol. 295 N° 15, 806-815, 1976 a.

Bach, F.H. y van Rood, J.J.: The major histocompatibility complex-genetics and biology (Second of three parts). *New Engl. J. Med.* Vol. 295, N° 16, pp 872-878, 1976 b.

Bach, F.H. y van Rood, J.J.: The major histocompatibility complex-genetics and biology (Third of three parts). *New Engl. J. Med.* Vol. 295, N° 17, pp 927-936, 1976 c.

Barnstable, C.J. y Jones, E.A.: Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. Br. Med. Bull. Vol. 34, Nº 3, pp 241-246, 1978.

Baur, M.P. y Danilovs, J.A.: Population analysis of HLA-A, -B, -C, -DR and other genetic markers. En "Histocompatibility Testing 1980" pp 955-957. Terasaki P.I. Ed. Los Angeles Calif. EE.UU., 1980.

Bodmer, W.F.: The HLA system, introduction. Br. Med. Bull. Vol. 34, Nº 3, pp 213-216, 1978.

Breanndan Moore, S.: HLA, subject review. Mayo Clin. Proc. 54: 385-393, 1979.

Byrd, S. Leavell y O.A. Thorup, Jr.: Hematología, 4a. Ed. Nueva Ed. Interamericana, México, D.F., 1978.

Cannon, W.B.: The wisdom of the body. W.W. Norton & Co., Inc. Nueva York, 1939.

Colombani, J., D'Amaro, J., Gabb, B., Smith, G. y Svejgaard, A.: International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation. Transpl. Proc. 3: 121, 1971.

Colombani, J., Colombani, M., Dastot, M., Reboul, M., Degos, L.: Detection of B lymphocyte alloantigens by complement fixation. Transplantation, 24 : 230, 1977.

Cunningham, B.A.: Estructura y funcionamiento de los antígenos histocompatibles. Investigación y Ciencia, Nº 15, diciembre 1977.

Dausset J. Ed.: HLA 1982, complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Flammarion Médecine-Sciences, París, 1981.

Dick H.M.: HLA and disease, introductory review. Br. Med. Bull. Vol 34, N° 3, pp 271-274, 1978.

Elfenbein, G.J., Kallman, C.H. y Tutschka, P.J.: The immune system in 40 aplastic anemia patients receiving conventional therapy. Blood, Vol. 53, N° 4, pp 652-665, 1979.

Festestein, H. y Démant, P.: Inmunogenética fundamental, biología y aplicaciones clínicas de HLA y H-2. Editorial El Manual Moderno, México, 1981.

Fisher, R.A. y Yates, F.: Statistical tables for biological agricultural and medical research. Longman, Edimburgo, 1979.

Fraga A., Gorodezky, C. y Lavalle, C.: HLA-B27 in mexican patients with ankylosing spondylitis. Arthritis and Rheumatism, Vol. 22, N° 3, marzo-1979.

Gale, R.P., Mitsuyasu, R. y Yale, C.: Immunologic function in aplastic anemia. The center for the health sciences, Los Angeles Calif. EE.UU.

Gorodezky, C., Terán L. y Escobar-Gutierrez A.: HLA frequencies in a mexican mestizo population. Tissue Antigens, 14 : 347-352, 1979.

Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, Capítulo 66. Sonnenwirth A.C. y Jarett L. Eds. 8a. Ed. The C.V. Mosby Co., San Luis Misuri EE.UU., 1980.

Gurrola Briones G.: Búsqueda e identificación de anticuerpos contra antígenos del sistema HLA. Tesis de Licenciatura, UNAM - Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México, 1981.

- Harris, H.: The principles of human biochemical genetics. 2a. Ed. North-Holland Publishing Co. Amsterdam, 1975.
- Harris, R. y Ukaejiofo, E.: Rapid preparation of lymphocytes for tissue typing. *Lancet* II : 327, 1969.
- Hoffman, R., Esmail, M., Zanjani, D., Lutton, J.D., Zalusky, R. y Wasserman, L.R.: Suppression of erythroid-colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. *New Engl. J. Med.* 296: 10, 1977.
- Hurtado Monroy R.: Anemia aplástica (avances). XX jornada anual, Agrupación mexicana para el estudio de la Hematología, A.C., Memorias, pg 448, Mérida, Yuc., México, 1979.
- Joysey, V.C. y Wolf, E.: HLA-A, -B, and -C antigens, their serology and cross-reaction. *Br. Med. Bull.* Vol. 34, N° 3, pp 217-222, 1978.
- Lilly, F., Boyse, E.A., Old, L.S.: Genetic basis of susceptibility to viral leukaemogenesis. *Lancet* II: 1207, 1964.
- Linman, J.W.: Hematology, physiologic, pathophysiologic and clinical principles; Capítulo 9, Hypoplastic anemias, Mc Millan Publishing Co., Inc. Nueva York, 1975.
- Mc Intyre, J.A., Turner, R.E. y Carwile Le Roy, E.: Human leukocyte antigens (HLA). *South. Med. J.* Vol. 71, N° 10, pp 1269-1279, 1978.
- Miller, R.J. Jr.: Simultaneous statistical inference. Mc Graw-Hill Book Co., Ing. Nueva York, N.Y., 1966.
- Miller, W.V.: The human histocompatibility complex, a review for the hematologist. *Progress in Hematology*, pp 173-191, 1978.

Mittal, K.K.: Standaridization of the HLA typing method and reagents. Transplantation, brief communications, Vol. 25, N° 5 pp 275-279, 1978.

Nijenhuis, L.E.: Genetic considerations on association between HLA and disease. Hum. Genet. 38: 175-182, 1977.

Pérez Tamayo R.: El concepto actual de la enfermedad. Texto de Patología, pg 37. Correa P., Arias-Stella J., Pérez Tamayo R. y Carbonell L. Eds. Prensa Médica Mexicana, México, 1970.

Reynoso E., Martínez C. y Argáez M.: Hipoplasia de la médula ósea Rev. Med. del IMSS, Vol. VII, N° 3 1968.

Ryder L.P. y Svejgaard A.: Associations between HLA and Disease. Report from the HLA and Disease Registry of Copenhagen. Publicado por los autores, Copenague, 1976.

Sánchez Medal L.: Aplastic anemia. XV Congress of the international Society of Hematology, Jerusalén, 1974 a.

Sánchez Medal L. y Dorantes S.: Aplastic anemia. Paediatrician 3:74, 1974.

Sasazuki T. y Mc Devitt H.O.: The association between genes in the major histocompatibility complex and disease susceptibility. Ann. Rev. Med. 28:425, 1977.

Schaller J.G., Ochs, H.D., Donnall Thomas, E., Nisperos, B., Feigl P. y Wedgwood R.J.: Histocompatibility antigens in childhood-onset arthritis. The Journal of Pediatrics, Vol. 88, N° 6, pp 926-930 1976 a.

Schaller J.G. y Omenn G. S.: The histocompatibility system and human disease. The Journal of Pediatrics, Vol. 88, N° 6, pp 913-925, 1976 b.

Snedecor G.W. y Cochran W.G.: Statistical methods. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, EE.UU., 1974.

Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G. e Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. J. Clin. Pathol., Vol. 69, N° 2, pp 103-120, 1978

Terasaki P.I.: Histocompatibility testing 1980, pp 292-295, Terasaki P.I. Ed. Los Angeles Calif. EE.UU., 1980.

Thomson G. y Bodmer W.: HLA haplotype associations with disease. Tissue Antigens, 13:91-102, 1979.

Todd-Sanford-Davidsohn: Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 16a. Ed. Capítulo 41. W.B. Saunders Co. Filadelfia EE.UU., 1979.

Van Rood J.J., van Leeuwen A. y Ploem J.S.: Simultaneous detection of two cell populations by two-colour fluorescence and application to the recognition of B-cell determinants. Nature, 262: 795, 1976

Velázquez A.: El concepto genético de enfermedad. Rev. Inv. Clin. (Méx). 31:1, 1979.

Vladutiu A.O. y Rose N.R.: HL-A antigens association with disease. Immunogenetics 1:305, 1974.

Wetherall J.D. y Dawkins R.L.: The major histocompatibility complex in man, HLA antigens. Aust. N. Z. J. Med. Vol. 8, Suppl. 1, pp 25-29, 1978.

Woolf B.: On estimating the relation between blood group and disease. Ann. Hum. Genetics. Vol. 19, Nº 4, pp 251-253, 1954.

Zmijewski Ch. M. y Haesler W.E.: Textbook of blood banking science. Appleton-Century-Crofts, Nueva York, N.Y. 1982.