

2ej
87

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**IMPORTANCIA DE LOS HAPLOTIPOS DEL
COMPLEMENTO (COMPLOTIPOS)
EN INMUNOBIOLOGIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

ILDA ROSA OLIVARES PRADO



**MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

1986.



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 está 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.

T A B L A D E C O N T E N I D O

I.- INTRODUCCION.

II.- ANTECEDENTES Y GENERALIDADES.

- El Sistema del Complemento.
- El Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- Polimorfismo y Complotipos.

III.- MATERIAL Y METODOS.

- Obtención de Muestras.
- Tipificación de Complotipos.

IV.- RESULTADOS.

V.- DISCUSION.

- Análisis de la Frecuencia de Haplotipos del Complemento en una Población Indígena Mexicana.
- Análisis de la Frecuencia de Complotipos en Mestizos Mexicanos.

VI.- CONCLUSIONES.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

El sistema del complemento está constituido por más de 20 proteínas que actúan en forma coordinada y cooperativa con el objeto de producir la lisis celular. Tres de estas proteínas: C2 y C4 de la vía clásica, y el factor B de la vía alterna, están codificadas por genes que se encuentran dentro del sistema HLA, que en el humano se localiza en el brazo corto del cromosoma - seis.

Hasta este momento no se han encontrado recombinantes entre los genes - que codifican para C2, C4 y FB, los cuales se heredan en forma de unidad genética por lo que se les ha dado el nombre de haplotipos del complemento o complotipos.

La tipificación de los antígenos del sistema HLA es una prueba que se - usa con el objeto de encontrar el donador ideal para un transplante, debido a que tanto el sistema HLA como los complotipos (el segundo sistema más poli mórfo que se conoce en el humano, después del sistema HLA) y la enzima eri trocítica glioxalasa I constituyen el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, sería de gran utilidad la tipificación de los complotipos en el programa de transplante.

La frecuencia de los alelos cambia en las diferentes razas, por lo que uno de los objetivos del presente trabajo es encontrar dicha frecuencia en - una población indígena mexicana y en los mestizos mexicanos y compararlas - con otras poblaciones.

Como ya se mencionó, los complotipos están situados entre las regiones B y D/DR del sistema HLA al parecer más cerca de la región D/DR, la cual regula la respuesta inmune. Creemos que es importante determinar la frecuencia de los alelos de los complotipos en la población normal, para posteriormente hacer estudios de asociación con enfermedad.

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El sistema del complemento juega un papel importante inmunológicamente ya que induce a una resistencia a las infecciones y a la patogénesis del tejido dañado. Los productos de la activación del complemento regulan varios eventos biológicos que incluyen la liberación de mediadores para células precursoras, con incremento en la permeabilidad vascular. La activación de los componentes del complemento promueven también la contracción de músculo liso, la quimiotaxis de neutrófilos, células de mononucleares y eosinófilos y la inmunoadherencia de fagocitos. Otros efectos de la activación del complemento incluyen solubilización de complejos inmunes, lisis de membrana celular, neutralización de virus y la muerte de ciertas bacterias (1,6,12).

La activación del complemento puede iniciarse mediante dos vías: la vía clásica y la vía alterna, pero los dos sistemas de activación del complemento se unen en la participación de un importante componente, la molécula C3. Un individuo con deficiencia de C3 es extremadamente susceptible a infecciones y clínicamente se parece a los pacientes con hipoinmunoglobulinemia.

Los componentes de la vía alterna y de la vía clásica participan en una cascada de reacciones proteolíticas que finalmente producen la lisis de la membrana celular. Las células que tienen mucho ácido siálico no son lisadas por la vía alterna debido a que hay un aumento de la afinidad de C3b por la proteína H (que trae como consecuencia un bloqueo en la activación de la vía al

terna del complemento). Esto explica porqué las bacterias que tienen ácido siálico en su cápsula son más patógenas, por ejemplo: Streptococcus B del grupo III; Neisseria meningitidis grupos B y C; y E. coli K1. (1).

Activación de la Vía Clásica del Complemento.

La vía clásica del sistema del complemento consta de nueve componentes y dos o tres inhibidores. El primer componente comprende tres subunidades - Clq, C1r y C1s (1,2,11).

Para iniciar la activación de la vía clásica del complemento es necesaria la interacción entre Clq y agregados de inmunoglobulinas IgG e IgM (en forma de un Complejo Ag-Ac) (1,3,11).

Dicha interacción lleva a la conversión de C1r y C1s a formas enzimáticas activadas $\overline{\text{C1r}}$ y $\overline{\text{C1s}}$, esto ocurre en presencia de iones calcio (1,4,11).

$\overline{\text{C1s}}$ es una proteasa que tiene como sustrato a C4 y C2, y que necesita iones de magnesio para poder actuar sobre C2. C1s fragmenta a C4 en C4a y C4b lo mismo hace con C2.

$\overline{\text{C1s}}$ es inhibida por una proteína del suero llamada C1 INH (8).

El fragmento C4b se une con el fragmento C2a para formar un complejo - llamado convertasa C3 ($\overline{\text{C42}}$) (5). La convertasa C3 ($\overline{\text{C4b2a}}$) es anulada por la combinación del efecto de C4b y de la proteína I. La convertasa actúa sobre C3 produciendo un pequeño fragmento C3a que es una anafilotoxina y otro fragmento largo C3b.

C3b puede ser inactivado por dos proteínas la I y la H (9).

C3b se une a C4₂, formando la convertasa C5 (C4bC2aC3b), que actúa sobre C5 fragmentándolo en dos partes: C5a y C5b. C5a es una anafilotoxina y un componente quimiotáctico para leucocitos.

El fragmento C5b se une a C6 y C7 formando el complejo C6C5bC7 (el cual puede atacar en otro sitio de la membrana); a dicho complejo posteriormente se unen C8 y C9, que una vez unidos van a producir la lisis celular (6).

Activación de la Vía Alternativa del Complemento.

La vía alternativa del sistema del complemento o vía de la properdina, consiste en la activación de C3, la cual ocurre en ausencia de C2, C4 y C1; esta activación puede ser producida por polisacáridos de levaduras, bacterias y ciertos parásitos, endotoxinas y algunos complejos insolubles.

Para que la vía alternativa del sistema del complemento se lleve a cabo se requieren algunas proteínas que incluyen al factor B, el factor P (properdina) y una proteína similar a C2 que es D, la cual es una enzima.

En presencia de iones de magnesio el factor D divide al factor B en FBb para que junto con C3b formen la convertasa C3 de la vía alternativa C3bBb.

La convertasa C3 divide a C3 en C3a y C3b. Cuando se incorporan varias C3b se forman la convertasa C5 en forma análoga a la convertasa C5 de la vía clásica. Como la adición de moléculas de C3bBb puede fragmentar más C3, -

existe una amplificación de la activación del Complemento. Para regular este proceso en la vía alterna actúan las proteínas H e I que inhiben a C3b (9,10).

La convertasa de la vía alterna (C3bBb) es un estabilizador de la pro--perdina (7).

Se siguen los mismos pasos de la vía clásica, produciendo finalmente la lisis celular.

TABLA I

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS PROTEINAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

PROTEINA	P.M. en DALTONES	MOVILIDAD ELECTROFORETICA	CONCENTRACION EN SUERO (ug/ml)
C1q	390,000	γ_2	70
C1r	95,000	β	35
C1s	87,000	α_2	35
C4	209,000	β_1	430
C2	117,000	β_2	30
C3	190,000	β_i	1,200
C5	206,000	β_1	75
C6	128,000	β_2	60
C7	120,000	β_2	55
C8	163,000	γ	80
C9	79,000	α^1	160
VIA ALTERNA			
P(properdina)	223,000	γ_2	25
D	25,000	α	2
B	100,000	β_2	40
PROTEINAS CONTROL			
C1 INH	105,000	α_2	180
I (C3b INA)	90,000	β_2	50
H (β IH)	150,000	β_1	520
C4-bp	1200,000	β	250

(1).

EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El cromosoma 6 tiene aproximadamente 150 centimorgans* de longitud. En el brazo corto del cromosoma 6 se localizan los genes que codifican para los antígenos del sistema HLA (antígenos de histocompatibilidad); los genes de las enzimas GLO-1 y PGM3 (glioxalasa I y fosfoglucomutasa 3) y los genes que codifican para las proteínas del complemento C2, FB, C4A y C4B, además de otros genes.

La GLO-I es una enzima intracelular que generalmente se estudia en los eritrocitos; esta enzima cataliza la conversión de metilglioxal y glutatión a s-lactoil-glutatión. La PGM3 es una enzima intracelular que generalmente se estudia en leucocitos; esta enzima es importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa (hace una translocación del grupo fosfato del carbono 1 al carbono 6 de la glucosa). Los genes de la GLO-I se encuentran cerca al sistema HLA, y la GLO está localizada más allá del HLA-D casi a 6 centimorgans del HLA-B. La PGM3 está a 15 centimorgans del HLA-B (13).

Los *loci* del HLA fueron asignados al brazo corto del cromosoma 6 en base a estudios realizados en una familia en la cual el brazo corto y largo de este cromosoma estaban invertidos cerca del centrómero. También se hicieron estudios de cultivos de fibroblastos conteniendo una translocación recíproca entre el brazo corto del cromosoma 1 y del cromosoma 6, fusionados con una línea de células de hamster de China, y estudios del cromosoma 6 en teratomas. La distancia entre el *locus* para el HLA-B y el HLA-D es de un centi-

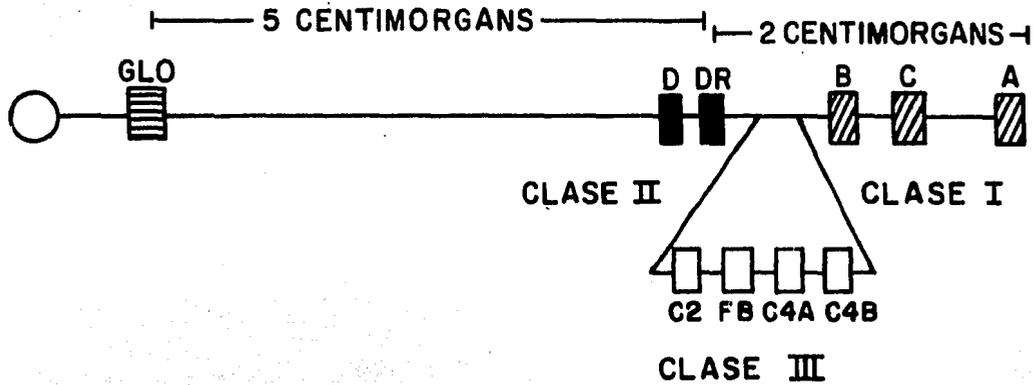
morgans.

Las proteínas del sistema del complemento C2, FB, C4A y C4B, son codificadas en el cromosoma 6 por cuatro genes. El *locus* estructural para el FB está muy cerca del HLA en el hombre, lo cual se llegó a determinar debido a que inicialmente se hicieron estudios en familias y que no se demostró entre cruzamiento entre el HLA y el FB; sin embargo, estudios posteriores mostraron que sí había entrecruzamiento entre el HLA y el FB. El *locus* estructural para C2 incluye un alelo deficiente y también se ha demostrado que se encuentra cerca del HLA, debido a que no se ha encontrado entrecruzamiento entre C2 y el FB. Se piensa que los *loci* de C2 y FB son producto de una duplicación en cascada del gen, porque estudios en familias y (por) análisis de la secuencia de aminoácidos han demostrado una semejanza estructural grande entre C2 y FB. Los *loci* de C4 están muy cerca del HLA, la cercanía del *loci* de C4 al HLA fue deducida por estudios de familias deficientes de C4, los alelos nulos de C4 pueden identificarse por inmunoelectroforesis cruzada (11).

El MHC es una región genética en la porción media del cromosoma 6, y que comprende aproximadamente 7 unidades recombinantes o cM (centimorgans) y que contiene a los *loci* HLA-A, -B, -C, D-DR, a los del complemento (C2, FB, C4A, C4B) y los de GLO. Cada uno de estos *loci* es polimórfico y todos son heredados como unidad por lo que se les llama haplotipos: (13-15).

GENES DEL CMH

BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA
6 HUMANO



(12, 15 y 16)

Los productos de los genes del CMH controlan el reconocimiento antigénico, la producción de Ac, la proliferación de linfocitos, la toxicidad y la supresión de la respuesta inmune a través de 3 tipos de moléculas presentes en la superficie de las células (15-16).

Las moléculas de clase I son importantes sobre todo en la fase efectora de la inmunidad, estas moléculas son codificadas por tres *loci* A, B y C los cuales se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano. Los antígenos (Ags) de los genes del HLA (A, B y C) se expresan en todas las células nucleadas del cuerpo y en plaquetas. Las moléculas de clase II son importantes en el reconocimiento o iniciación de la fase de respuesta inmune Ia, estas moléculas son codificadas en la región HLA-D, que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 humano y son llamadas HLA-DR (moléculas asociadas a D). Los Ags DR se expresan en linfocitos B y linfocitos T activados.

Los macrófagos presentan Ags a través de las moléculas Ia a células T y a células B. Ahora bien, como resultado de la interacción de macrófagos y células T a través de las moléculas Ia se generan células T de ayuda y células T efectoras. Del balance de la interacción célula-célula (macrófagos y linfocitos T y B) resulta la inmunidad celular, los efectos citotóxicos y las reacciones de hipersensibilidad retardada. Un ejemplo de este tipo de respuesta es el rechazo a los trasplantes (17).

La regulación de células T es muy importante en enfermedades autoinmu-

nes. Por ejemplo, en individuos con lupus eritematoso generalizado existe un desequilibrio en células T supresoras (18). Además en enfermedades tales como lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, Sarcoma de Kaposi y SIDA existen manifestaciones inmunológicas que tienen un desequilibrio inmune como un importante mecanismo patógeno (19). Estas enfermedades que muestran un desequilibrio inmunológico o perturbaciones de la regulación inmune han sido descritas como enfermedades con un componente genético, por lo que la susceptibilidad a algunas enfermedades está asociada a los alelos de los genes del CMH.

Los genes de la respuesta inmune son importantes en determinar si hay una respuesta inmune a un Ag en particular. Sin embargo, los antígenos virales pueden combinarse con Ags de la clase I del CMH en la superficie de las células y presentan una alteración del mismo virus que infecta células, parasitan la porción interna de los Ags del HLA de la clase I y producen cambios conformacionales. Sin embargo, algunas veces el huésped puede detectar el cambio en los Ags y eliminar las células infectadas por virus. Cuando las células infectadas no pueden ser eliminadas, estas pueden estimular clonas de células T.

Otra función de los Ags del CMH es que dichos Ags tienen sitios de reconocimiento de proteínas que están directamente involucradas en la interacción célula-célula en la formación de órganos en el embrión. A continuación, se muestra un cuadro con las funciones de los genes del CMH.

FUNCIONES DE LOS GENES QUE FORMAN EL CMH

- 1.- Regulación de la producción de Ac humorales.
- 2.- Regulación de la producción de célula T de ayuda
- 3.- Regulación de ciertas respuestas inmunes.
- 4.- Regulación de la reacción de injerto contra huésped (GVHD).
- 5.- Biosíntesis de los componentes del complemento
- 6.- La vigilancia inmune. Los Ags codificados por ésta región pueden servir como sustrato para la eliminación de patógenos.
- 7.- Marcadores para la identificación de genes involucrados en la patogénesis de varias enfermedades, sobre todo de enfermedades autoinmunes.
- 8.- Regulación de embriogénesis.
- 9.- Regulación de la síntesis y niveles de hormonas esteroides (15).

Tabla II.

EJEMPLOS DE PADECIMIENTOS ASOCIADOS AL CMH

Antígeno	Enfermedad	Comentario	RR.
A3	HEMOCROMATOSIS	Herencia recesiva con más del 95% de penetrancia Hap. A3, B14, BFF, DRw6.	4
B27	ESFONDILITIS ANQUILOSANTE	Todas las poblaciones	90
B47	HIPERPLASIA ADRENAL CONGENITA	Inicio tardío B14-DR1.	15
DR7	PSORIASIS	DR7 en caucásicos, también asociado a Cw6.	43
DR4	DIABETES	El DR3 asociado con el tipo II y el DR4 con el tipo I.	6
DR3	MELLITUS		3
DR4/DR3			33
B8-DR3	HEPATITIS CRONICA ACTIVA	Especialmente en mujeres jóvenes	2
B8-DR3	MIASTENIA GRAVIS	La asociación varía con la raza	3
DR3	ENFERMEDAD CELLACA	Herencia recesiva, también asociada a DR7.	17
DR2	ESCLEROSIS MULTIPLE	Caucásicos	4

POLIMORFISMO Y COMLOTIPOS

El polimorfismo genético es la propiedad que tienen los genes de adquirir varias formas conservando su naturaleza.

El polimorfismo se ha podido conocer, sobre todo observando la movilidad electroforética de las proteínas que son codificadas por los genes. - Así por ejemplo: se ha podido observar el polimorfismo del gen de la transferrina, de la hemoglobina, de los grupos sanguíneos, de las proteínas del complemento, etc.

El polimorfismo de proteínas en animales se debe principalmente a factores simples pero muy importantes tales como: dieta, sobrepoblación, temperatura, etc.

Las poblaciones idénticas están sujetas a diferentes tipos de selección y la frecuencia de varios genotipos se determina en función del tiempo (21).

Un ejemplo de la selección del polimorfismo es proporcionado por un estudio de un trabajo ruso, en el cual utilizaron inversión de cromosomas (polimórficos) en "*Drosophila funebris*" (22), el índice de inversión en la localidad es del 50%, pero en tres meses bajó al 10%, indicando con esto una fuerte selección en contra de la inversión. Aunque los bajos niveles de inversión sugieren alguna pequeña ventaja selectiva al heterocigoto.

Por otra parte se ha observado en algunas localidades que la inversión es baja en la primavera y alta en el otoño (23). Esto sugiere que la selec-

ción del polimorfismo también depende de la temperatura.

Otros investigadores hicieron estudios introduciendo nuevos genes en una población de faisanes salvajes "Phasianus calchicus" el cual es un faisán nativo de Illinois que es monomórfico para la transferrina. Los genes que introdujeron fueron de la cepa de un gallo que es polimórfico para esta proteína (24) con la finalidad de obtener en los años siguientes un heterocigoto para el polimorfismo de la transferrina. Sin embargo, no fue posible ver si existía un incremento en el nuevo gen de transferrina (F_1), el cual se encuentra en una frecuencia relativamente alta en los faisanes de Kansas, y esto se puede deber a una adaptación de los genes.

El uso del polimorfismo de proteínas puede ser la solución a problemas prácticos, como el valor real de la introducción de nuevos genes en poblaciones nativas, ya que existen evidencias de que la introducción de nuevos genes ocasiona una desastrosa baja de dichas poblaciones (21).

Las variantes raras del polimorfismo de proteínas favorecen la resistencia a la infección (25), ya que los agentes infecciosos rara vez encuentran dichas variantes, y esto hace que no tengan oportunidad de adquirir una forma de atacar al huésped. Por lo que la diversidad del polimorfismo puede salvar a una población de la extinción por algún agente infeccioso.

Se ha probado que en el humano varios polimorfismos de proteínas llevan la resistencia a la malaria, esto incluye el polimorfismo de hemoglobinas

(HbS) y posiblemente varias hemoglobinas anormales (26), deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (27), y enzimas que determinan el nivel de ATP en eritrocitos (28).

La dominancia de algunos genes es un factor importante en la resistencia a enfermedades. Por ejemplo la hemoglobina, en el caso del heterocigoto que tiene la HbS, el cual combina la HbS con la HbA para resistir la malaria y evitar las consecuencias de tener únicamente HbS.

Existe un gran polimorfismo genético de factor B, de C2 y sobre todo de C4 (C4A y C4B). Este polimorfismo se ha detectado por medio de inmunoelectroforesis en gel de agarosa para FB y C4, y para detectar el polimorfismo de C2 se ha utilizado la técnica de electroenfoque en gel de poliacrilamida. (30).

El primero en descubrir el polimorfismo del FB fue Alper (30). Haciendo uso de inmunoelectroforesis en pH 8.6, obtuvo 4 bandas diferentes de FB y que fueron nombradas según el desplazamiento electroforético de que presentaban dichas bandas. A una de ellas se le llamó FBF (por "fast"=rápido) a otra se le designó como FBS (por "slow"=lento). La diferencia entre el FBF y FBS consiste en el desplazamiento de las bandas por una posición electroforética; otra de las bandas fue llamada F_1 , esta banda se desplaza a una posición electroforética más hacia el ánodo que la variante F (30). A la banda que se desplaza más lenta que la variante S fue denominada S_1 , la cual se encuentra a una distancia más catódica que la posición electroforética de la banda S. -

Las variantes más comunes son F y S, mientras que las variantes raras son F_1 y S_1 . Estas cuatro variantes del FB, que se obtienen por electroforesis, se muestran en la figura 2.

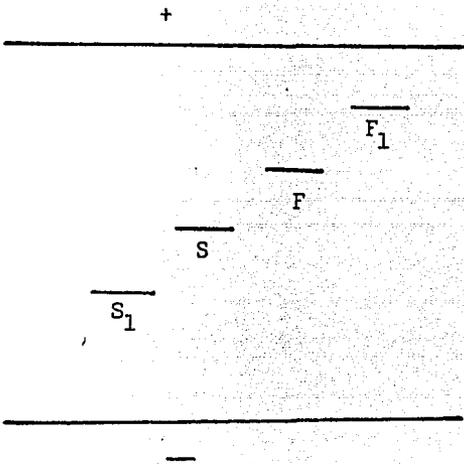


Fig. 2.
Variantes del FB que se obtienen por inmunoelectroforesis en gel de agarosa de pH 8.6

Las variantes comunes del factor B, F y S se localizan en el fragmento Ba del factor B, mientras que las variantes raras F_1 y S_1 se han encontrado en el fragmento Bb del factor B (31), y la mayoría de otras variantes raras se encuentran en el fragmento Bb (32). El fragmento Ba parece idéntico para las variantes F y S pero probablemente existe una mutación puntual y la diferencia entre estas dos formas genéticas del factor B es una sustitución de aminoácidos.

El polimorfismo del FB ha sido descrito en otras especies como el Mono

Rhesus (33), en el cobayo (34), el ratón (35), y en el chimpancé (36).

Se ha demostrado que en el humano el órgano que sintetiza más factor B es el hígado (38).

En estudios realizados con familias se ha observado que el FB se hereda en forma autosómica codominante (37).

Haciendo estudios en diferentes razas para determinar la frecuencia de las variantes del FB, se ha observado que en el caso de los caucásicos, la variante que tiene una mayor frecuencia es el FBS; mientras que en la raza negra la frecuencia mayor corresponde al FBF. Esto quiere decir que la frecuencia de los alelos es característica de cada raza, como se puede observar en la tabla III.

Tabla III

FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DEL FB EN DIFERENTES RAZAS.

GRUPO	FBB	FBS	FBF ₁	FBS ₂
Negros Norteamericanos	0.512	0.437	0.051	
Negros Africanos	0.655	0.282	a	a
Orientales Norteamericanos	0.110	0.890		
Alemanes	0.174	0.808	0.009	0.0
Blancos Norteamericanos	0.278	0.709		0.013
Caucásicos Europeos	0.174	0.808	0.007	0.009

Italianos	0.250	0.718	0.008	0.024
Japoneses	0.176	0.824		
Españoles	0.266	0.658	0.052	0.022
Vascos	0.270	0.562	0.145	0.02

(38)

El polimorfismo de C⁴ en humanos ha sido descrito por Rosenfeld y colaboradores (39).

O'Neill y sus colaboradores usando la técnica de inmunoelectroforesis observaron que los fenotipos no correlacionaban con el modelo de un solo *locus*, por lo que propusieron un modelo con dos *loci* (40) y estos dos *loci* de C⁴ se encuentran uno muy cerca del otro; uno de ellos marca reactividad para el antígeno chido y el otro para el antígeno Rodgers (41). Sin embargo en el sistema de O'Neill no fue posible detectar heterocigotos, pero haciendo uso de una inmunoelectroforesis cruzada fue posible determinar heterocigotos y homocigotos de C⁴ (42).

Con la finalidad de unificar la nomenclatura y reconocer algunas variantes de C⁴, se ha propuesto una nomenclatura de alotipos de C⁴ revisada por el IV Workshop Internacional para la Genética del Complemento, realizado el 15 de julio de 1982 en Boston. Esta nomenclatura se basa en el desplazamiento de las proteínas en una electroforesis de gel de agarosa y posteriormente inmunofijación con el suero anti-C⁴. Las proteínas que migran más hacia el ánodo (más ácidas) son llamadas C⁴A, y las proteínas que migran menos (más

básicas) son llamadas C4B. Ambas proteínas llevan varios patrones.

FRECUENCIA DE ALELOS DE C4A y C4B en CAUCASICOS

C4A	Q0	1	2	3	4	5	6	7
FRECUENCIA	0.191	0.009	0.054	0.630	0.075	0.001	0.035	0.001
C4B	Q0	1	2	3	4			
FRECUENCIA	0.104	0.743	0.118	0.02	0.009			

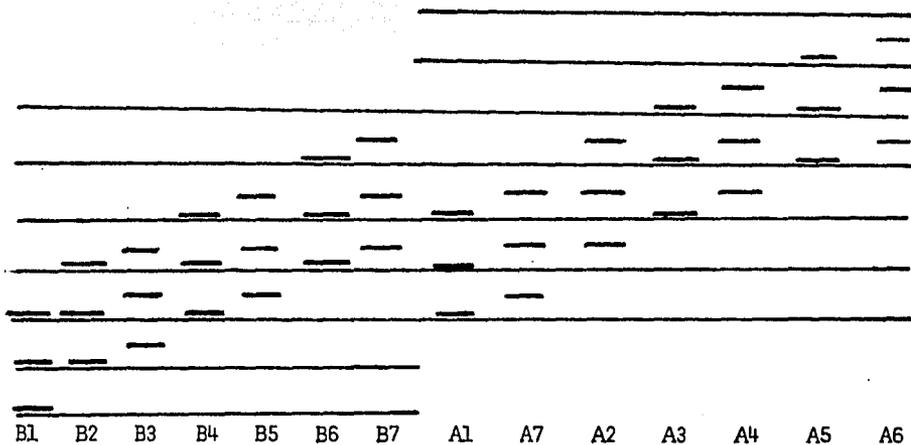


Fig. 3. Variantes electroforéticas de C4A y C4B.

Los alotipos están clasificados por un sistema numérico de A1 al A6 en el caso de C4A, y para C4B de B1 al B7. El incremento en la designación numérica es según el desplazamiento de las bandas del cátodo al ánodo, como se observa en la figura 3. Ahora para simbolizar los alelos se hace de la

siguiente manera: para el alelo A3 de C4, y para el alelo B1 de C4 tenemos: C4A3 y C4B1. En el caso de que C4A no se expresa, se simboliza como: C4AQ0 y se hace de la misma manera para C4B en la descripción genotípica, los alelos son separados por una coma, por ejemplo, C4A3,2B2,1. Cuando el locus tiene una duplicación se simboliza por repetición del símbolo del locus: - ejem., C4A2 B2B1/C4A3B1 (43).

El polimorfismo de C4 ha sido demostrado en el cobayo (34). Hace algunos años se descubrieron las proteínas del suero de ratón y les llamaron Ss (por "serum substance") (44). Por métodos inmunoquímicos y funcionales se ha demostrado que la proteína Ss es C4 en el ratón (45).

El polimorfismo genético de C2 humano fue descubierto usando la técnica de electroenfoque de suero humano en gel de poliacrilamida y en posterior revelación utilizando un gel de agarosa conteniendo eritrocitos de carnero sensibilizados y suero deficiente en C2.

Una de las variantes que se obtienen es llamada C2C (por "common"=común) otra es llamada C2B (por "basic"=básica) esta variante esta muy cerca al cátodo; y la otra es C2A (por "acidic"=ácida) la cual esta muy cerca del ánodo (46). La frecuencia de esta variante se muestra en el siguiente cuadro:

Blancos	C2C 0.95	C2B 0.04	C2A 0.01
---------	----------	----------	----------

C2 se hereda en forma autosómica codominante (47).

La síntesis de C2 en el humano es por monocitos de sangre periférica y es parcialmente controlada por linfocitos (48).

En una población al azar se encontró que el 1.2% de individuos son homocigotos deficientes de C2. Esta deficiencia es debida a un alelo nulo del *locus* estructural de C2. (46).

El polimorfismo de C2 ha sido descrito en otras especies como: el chimpancé (36), en el cobayo (49), en el Hámster (50) y en el mono Rhesus (51).

El polimorfismo de la glicoxalasa ha sido descrito en el humano y consiste en dos alelos heredados en forma autosómica codominante: GLO-1 y GLO-2 (52). El *locus* de la GLO ha sido descrito también en el ratón (53), y se sabe que está asociado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (54). En el humano la GLO esta situada a 6-cM del HLA-B hacia el centrómero del cromosoma 6 (55). Los *loci* de GLO y los antígenos de Histocompatibilidad tienden a estar ligados a lo largo del tiempo a pesar de que existe una larga distancia de recombinación entre ellos, algunos alelos de GLO y HLA se encuentran en desequilibrio de unión (55, 56). Este desequilibrio es diferente para la población normal de la población enferma, por lo que se sugiere la existencia de genes susceptibles a la enfermedad (immuno-respuesta) entre los *loci* de HLA y GLO (57).

A continuación se muestra un cuadro con frecuencias de GLO.

Población	GLO-1	GLO-2	
Caucásicos	0.432	0.568	(58).
Orientales	0.132	0.868	(59).

El polimorfismo de la glioxalasa se observa haciendo una electroforesis del lisado de glóbulos rojos en acetato de celulosa, revelada con metilglioxal y glutatión. Las bandas que se observan en la electroforesis se muestran en la figura 4 (60).

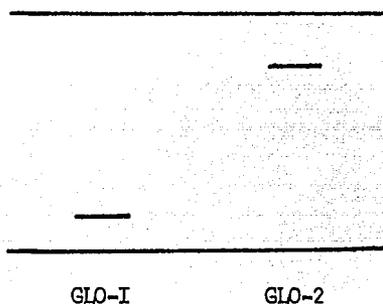


Fig. 4.- Polimorfismo de glioxalasa

Los *loci* para las proteínas del complemento C2, FB y los dos *loci* para C4 (C4A y C4B) se encuentran muy cerca uno del otro. Se han hecho varios estudios de meiosis y no se ha detectado entrecruzamiento entre estos cuatro *loci* este hecho sugiere que los alelos de FB, C2, C4A y C4B son heredados como una unidad genética en forma de haplotipos, de la misma manera que ocurre con los alelos del sistema Rh y MNS en combinaciones específicas no predichas por las frecuencias génicas. Debido a que los haplotipos del complemento se heredan en forma de unidad genética se les ha dado el nombre de "Complotipos" (13-17).

Los complotipos tienen un orden para escribirse. Primero es el FB, - después C2 y por último C4A y C4B, por ejemplo un complotipo común en caucásicos es: FB S, C2 C, C4A 3, C4B1; y esto se abrevia: SC31. Los alelos - nulos son designados "Q0" (por quantity zero), o su forma abreviada "Q". - como en: SC01. Y otra variante de FB es designada FBFQL (por quantity -- lowered) (14).

Uso de los Complotipos.

Existen varias dificultades para asignar los Haplotipos del HLA en los pacientes que van a ser transplantados. Por ejemplo: el HLA-C es un *locus* que no es muy informativo debido a que existen muchos blancos.

Por otra parte existen dificultades a nivel de laboratorio para asignar el HLA-DR y el CML. Esto ocurre sobre todo en pacientes que van a ser sometidos a trasplante de médula ósea ya que la mayoría son casos de anemia - aplásica y presentan resultados que dan falsos negativos en el CML (61), además de que el número de linfocitos es bajo y no es posible tipificar el -- HLA-DR. Y los pacientes con leucemia presentan un incremento en las cuentas por minuto en el CML (62). Todos estos factores dificultan la asignación - del donador ideal.

Se ha podido comprobar que los complotipos confirman los resultados del asignamiento del HLA-D/DR o CML en una alta proporción como lo muestra la - tabla IV.

Si se usan los complotipos como marcadores genéticos para comprobar la identificación del HLA-DR se puede observar si existen recombinantes, debido a que los genes que codifican para las proteínas del complemento están muy cerca del HLA-D/DR, como se observa en la fig. 5.

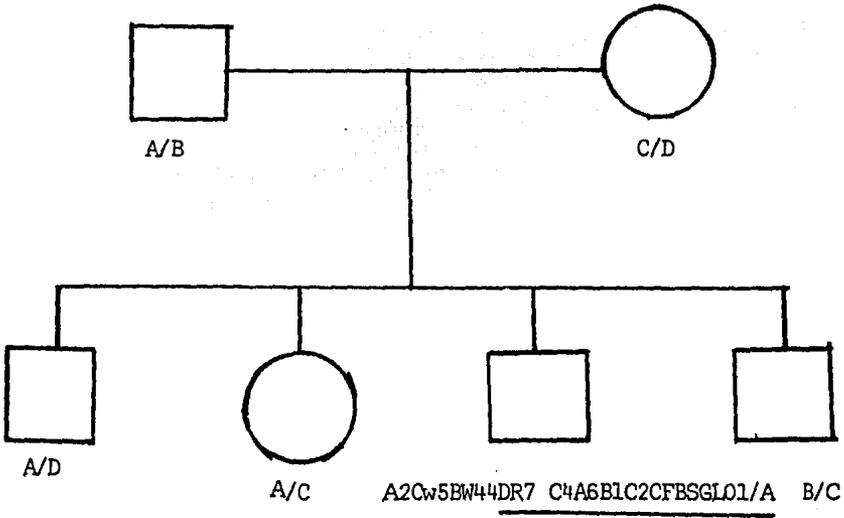
Es importante la tipificación de los complotipos, de la glicoxalasa-I y por supuesto del HLA, ya que se sugiere que existen genes que predisponen a enfermedades entre los *loci* del HLA y GLO, y además de que se pudiera encontrar alguna asociación entre los alelos de los complotipos con alguna enfermedad (56).

TABLA IV

INFORMACION QUE PUEDE PROPORCIONAR UN MARCADOR SIMPLE O
COMBINADO CON OTROS

MARCADOR	INFORMACION
HLA-B	78%
HLA-DR	48%
COMPLOTIPOS	68%
HLA-A y B	83%
HLA, B y DR	87%
HLA-A, B, DR y COMPLOTIPOS	99%

COMPROBACION DE UN RECOMBINANTE USANDO
LOS COMPLETOS



A= HLA-A1 B8 DR3 DW3 C4AQB1 C2C FBS GL02
A= HLA-AW23 CW4 Bw44(12) DR7 C4A3B1 C2C FBF GL02
C= HLA-A2 CW5 Bw44(12) DR5 DW5 C4A3B1 C2C FBS GL01
D= HLA-A3 CW6 Bw57(17) DR7 DW7 C4A6B1 C2C FBS GL01

Fig. 5. La tipificación del CMH en una familia, muestra a un individuo que presenta recombinación con HLAB/D. Los antígenos del HLA (A2Cw5Bw44) pertenecen al haplotipo C y el DR7 C4A6B1 FBS GL01, al haplotipo D. (15).

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE MUESTRAS.

Las muestras que se tipificaron fueron obtenidas de 6 familias normales con 22 individuos (no enfermos) de una población indígena Tzotzil (maya) del Edo. de Chiapas, Méx*., y de 23 indígenas del mismo grupo étnico no pertenecientes a la familia, haciendo un total de 45 individuos.

Las muestras de mestizos mexicanos se obtuvieron de 8 familias mexicanas normales, y la otra parte de las muestras se obtuvieron de 5 familias - que tenían un enfermo con dermatitis solar. Inicialmente pensamos que podría existir alguna asociación entre estos enfermos y algún alelo de los - complotipos pero como no fue así, además de que los datos clínicos de estos enfermos eran confusos para considerar que realmente tenían D.S., consideramos que las muestras de estas familias eran normales, con lo cual se tipificaron 13 familias de mestizos con 140 individuos.

* Los Tzotziles actualmente se localizan en los municipios de Cinatolapa, Ocozocuatla; Fecpatan y las Margaritas, en el Edo. de Chiapas y constituyen uno de los grupos indígenas más conservados de México (64).

TIPIFICACION DE COMLOTIPOS

Factor B de la Vía Alternativa del Complemento.

A.- Introducción.

El polimorfismo del factor B y C4 se determina mediante las técnicas de inmunofijación y electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis es de alto voltaje y una vez finalizada, las bandas de la proteína en cuestión se fijan mediante anticuerpos específicos. Los geles son posteriormente lavados con solución salina isotónica para remover las proteínas no fijadas, posteriormente se secan y se tiñen con una tinción común para proteínas como es el azul de Coomassie.

B.- Equipo.

- 1.- Cámara Deluxe para electroforesis Gelman Science.
- 2.- Fuente de poder Deluxe Gelman Science.
- 3.- Bomba de agua circulante Thomas Scientific.
- 4.- Centrífuga CO-500 Damon/JEC Division.
- 5.- Balanza analítica Sartorius.
- 6.- Agitador magnético con platina de calentamiento.

C.- Material.

- 1.- Rectángulo de película de plástico de 10x20 (Gel Bond Film Marine-Calloids. Maine. USA).

- 2.- Placas de vidrio de 10x20 cms.
- 3.- Marcos de plástico en forma de U. de 1 mm de espesor.
- 4.- Papel filtro tipo Whatman #1.
- 5.- Aplicador de muestras.
- 6.- Micropipetas de 15 ul y de 25 ul.
- 7.- Sujetadores.

D.- Reactivos.

- 1.- Amortiguador de Barbital y lactato de calcio pH 8.6 0.05M.
- 2.- Agarosa Sea-Kem Marine Colloids Maine USA. (se prepara al 1% en agua bidestilada).
- 3.- Solución salina al 0.85%.
- 4.- Glicerol
- 5.- Solución de Azul de Coomassie al 2.5% (en una sol. de 45% de metanol, 10% de Ac. acético en agua).
- 6.- Metanol al 50% en agua destilada + la 5ta. parte del volumen total de Ac. acético. (Solución decolorante).

E.- Material Biológico.

- 1.- Plasma EDTA obtenida de 5 ml de sangre.
- 2.- Una alícuota de hemoglobina humana.
- 3.- Anticuerpo anti-factor B. Atlantic Antibodies. Scarborough, Mo.USA.

F.- Técnica.

1.- Preparación de la placa del gel de agarosa.

Cubrir la placa de vidrio mediante una brocha con una capa fina de glicerol, inmediatamente colocar la película de plástico y presionar para sacar las burbujas de aire. Posteriormente colocar el marco de plástico en forma de U el cual se fija a la placa mediante los sujetadores, una vez lista la cámara vaciar la solución de agarosa caliente y se deja solidificar. Ya que solidificó el gel, quitar los sujetadores y el marco de plástico, secar con papel filtro la zona donde se aplicarán las muestras.

2.- Aplicación de las muestras.

Utilizando el aplicador de muestras depositar 15 ul de plasma (se pueden correr 9 muestras) reservando un espacio para la aplicación de hemoglobina normal que sirve como marcador visual.

Colocar la placa en la cámara de electroforesis con las muestras hacia el cátodo, mediante el papel filtro tipo Whatman conectar la placa con el amortiguador de corrimiento que previamente se vació en los compartimientos de la cámara de electroforesis (800 ml en c/u).

3.- Corrimiento de las muestras.

Correr la placa a 300 volts utilizando el sistema de enfriamiento; y detener el corrimiento una vez que el marcador de hemoglobina haya -

vajado 5 cms hacia el ánodo.

4.- Inmunofijación.

Uniformemente depositar 0.25 ml de anticuerpo anti-factor B humano sobre el gel en un área de 4 cms. de ancho, empezando por abajo del marcador de hemoglobina. Incubar durante dos horas en una cámara húmeda.

Al final de la incubación, las placas son presionadas con papel absorbente utilizando un peso de 4 Kgs., durante 10 minutos, con el objeto de absorber las proteínas precipitadas en el gel en forma inespecífica.

5.- Lavado y tinción.

- 1.- Lavar con solución salina el gel.
- 2.- Secar el gel con aire caliente.
- 3.- Teñir la placa con solución de azul de Coomassie.
- 4.- Lavar la placa con solución decolorante.
- 5.- Hacer la lectura de la placa.

El Cuarto Componente del Sistema del Complemento.

A.- Equipo.

El mismo que se usa para el factor B.

B.- Material.

- 1.- Fibra de vidrio Corning Glass Works, N. Y.

- 2.- Placas de vidrio de 13x20 cms.
- 3.- Todo el material restante es el mismo que para determinar el factor B excepto que no lleva la película de plástico.

C.- Reactivos.

- 1.- Amortiguador de fosfatos pH 6.8 y 5 milimolar de Na₂ EDTA (59) - para diálisis.
- 2.- Amortiguador de corrimiento (59)
Tris-Glicina/Barbital pH 8.8.
- 3.- Agarosa de electroendosmosis mediana de INC PHARMACEUTICAL CO.USA.
Solución de agarosa al 0.75%: de amortiguador de corrimiento. 4 ml.
de EDTA al 0.2 M.
Agua destilada suficiente para completar 100 ml.
- 4.- Solución salina al 0.85%.
- 5.- Solución de azul de Coomassie (la misma usada en FB).
- 6.- Solución decolorante (la misma de FB).

D.- Material biológico.

- 1.- Plasma EDTA obtenido de 5 ml de sangre.
- 2.- Hemoglobina S. (no es necesaria).
- 3.- Anticuerpo anti-C4 humano. Atlantic Antibodies,
Scarborungh, Mo. USA.
- 4.- Neuraminidasa tipo VI. obtenida Sigma Chemicals Co.
de Clostridium perfringens. St. Louis Mo. USA.

E.- Técnica.

1.- Preparación de la muestra.

Incubar 10 ul de la muestra, con 5 ul de neuraminidasa (10 U.), en un sistema de diálisis continua mediante 18 hrs., con un amortiguador de fosfatos de pH 6.8.

2.- Preparación de las placas de gel.

Colocar a la placa de vidrio el marco de plástico y fijarla haciendo uso de los sujetadores. Posteriormente, agregar la solución de agarosa caliente y dejar enfriar.

3.- Aplicación de las muestras.

Una vez solidificado el gel de agarosa, secar el área donde se aplicarán las muestras utilizando papel tipo Whatman. Haciendo uso del aplicador de muestras depositar 10 ul de plasma EDTA tratado con neuraminidasa y poner 10 ul de hemoglobina S que va a servir como marcador visual (se pueden correr 9 muestras).

4.- Corrimiento de las muestras.

Llenar los depósitos de la cámara de electroforesis con 800 ml del amortiguador de corrimiento. Después, depositar la placa en la cámara de electroforesis con las muestras hacia el ánodo y conectar la

placa con el amortiguador usando como puente el papel filtro tipo - Whatman. Ahora, correr la placa a 30V x cm x 6 horas, hasta que la hemoglobina "S" haya viajado 7 cms.

5.- Imunofijación.

Una vez que terminó la electroforesis, depositar uniformemente 0.5 ml de anticuerpo anti-C4 humano sobre el gel en una área aproximadamente de 4 cms, por abajo del marcador visual de hemoglobina S. Dejar incubar dos horas en una cámara húmeda.

4.- Lavado y tinción.

Se siguen los mismos pasos que para el factor B.

El Segundo Componente del Sistema del Complemento.

A.- Introducción.

El polimorfismo de C2 es detectado usando la técnica de electroenfoque en una placa de gel de poliacrilamida y posterior ensayo hemolítico - con G.R. de carnero sensibilizados y suero humano deficiente de C2. Las bandas se revelan al incubar a 37°C la placa de electroenfoque con los glóbulos rojos y el suero.

B.- Equipo.

Equipo de electroenfoque.

Multiphore LKB.

Balanza analítica.	Sartorius.
Centrífuga	CO-500 Duman JEC Devisson
Estufa	National Meincke Company.
Lámpara de luz normal.	
Agitador magnético con platina de calentamiento.	

C.- Material.

Placas de vidrio de 10x20 cm de 2 mm de espesor.
Marcos de plástico de 10x20 cm de 1 mm de espesor.
Marcos de plástico de 20.5x11 cm de 1 mm de espesor.
Sujetadores.
Micropipeta de 10 ul.
Pinzas.
Termómetro
Papel filtro tipo Whatman #1.

D.- Reactivos.

Acrilamida	Eastman Kodak Company Printed USA.
Anfolinas pH 5-8 y de 3.5-10	LKD Sweden, USA.
Riboflavina (sol. al 1% en agua destilada)	BIO-RAD. Laboratories Richmond, Calif. USA.

E.- Material biológico.

Plasma EDTA proveniente de 5 ml de sangre.

Suero humano deficiente de C2.

Eritrocitos de carnero sensibilizados (64).

F.- Técnica.

1.- Preparación del gel.

En un matraz colocar 40 ml de solución de acrilamida al 6%, 10.8 ml. de Riboflavina al 1%, 2 ml de anfolina pH 5-8, 0.4 ml de anfolina pH 3.5-10. Se mezclan y se degasifican.

2.- Preparación de la placa.

Las placas de vidrio se limpian perfectamente con etanol. En medio de dos placas colocar el marco de plástico 1 mm de espesor y colocar los sujetadores, vaciar el gel en la placa y polimerizar con luz normal.

3.- Aplicación de las muestras.

Para la aplicación de las muestras usar rectángulos de papel filtro de dimensiones 0.5x1.5 cms, situándolos a 3 mm de distancia uno de otro y colocados a 2.5 cm de distancia del electrodo anódico. Cuidadosamente aplicar tres microlitros del suero en cada rectángulo de papel filtro, empapando uniformemente el papel.

4.- Corrimiento de las muestras.

Correr las muestras a 1200 V durante cuatro horas.

5.- Preparación del gel para revelar C2.

A un matraz agregar 14.5 ml de agarosa al 0.6%, 10 microlitros de suero humano deficiente de C2. Se calienta la solución y cuando está a 70°C, se agregan 14.5 ml de eritrocitos de carnero sensibilizados.

6.- Ensayo hemolítico.

Una vez que ha terminado de correr la muestra; colocar sobre la placa de electroenfoque un marco de plástico (20.6x11), y cortar el gel sobrante. A esta placa que tiene las muestras y el marco ponerle otra placa y colocar los sujetadores, vaciar el gel (para revelar C2) e incubar a 37°C por espacio de dos horas. Una vez finalizada la incubación se hace la lectura de la placa.

7.- Fijación de la placa.

Si se quiere conservar la placa para hacer lectura las veces que se quiera, se fija la placa con una solución de glutaraldehído al 0.1% en PBS por 10 minutos; para ello quitar el gel de poliacrilamida quedándose con el gel de agarosa e introducir la placa en la sol. de glutaraldehído y dejar secar.

Glioxalasa I.

A.- Introducción.

La glioxalasa I es una enzima eritrocítica que cataliza la conver

sión de metilglioal y glutatión a S-lactoil glutatión; el polimorfismo de esta enzima se puede observar por medio de una electroforesis del lisado de G.R. y posterior tinción con metilglioal y añadiendo glutatión.

B.- Equipo.

El mismo que se usa para determinar el polimorfismo de FB.

C.- Material.

- 1.- Hojas de acetato de celulosa, conservadas en 30% de etanol a 4°C. Chemetron Milano, Italy
- 2.- Micropipeta de 10 microlitos.
- 3.- Tijeras.

D.- Reactivos.

- 1.- Amortiguador de corrimiento Tris/Barbital. pH 8.8 0.03M.
- 2.- Amortiguador para tinción No. 1. Amortiguador de fosfatos pH 6.5 0.1M.
- 3.- Amortiguador para tinción No. 2. Tris/Hcl pH 7.8.
- 4.- Metil glioal. Sigma Chemical Company St. Louis USA.
- 5.- Glutation reducido. Sigma Chemical Company St. Louis USA.

- 6.- Metiltetrazolio. Sigma Chemical Company St. Louis USA.
- 7.- Diclorofenol-indol. Sigma Chemical Company St. Louis USA.
- 8.- Mercaptoetanol. Sigma Chemical Company St. Louis USA.

E.- Material biológico.

- 1.- Lisado de G.R. proveniente de 5 ml de sangre completa.

F.- Técnica.

- 1.- Preparación de la hoja de acetato.

La hoja de acetato se sumerge 10 minutos en agua para quitar el metanol.

Llene los compartimientos de la cámara de electroforesis con 500 ml de amortiguador.

Coloque la hoja de acetato en la cámara de electroforesis y corra la durante 10 minutos a 200 V.

- 2.- Aplicación de muestras.

Aplice tres microlitros del lisado de G.R., en la hoja de acetato separada 0.5 cm una muestra de otra, de tal forma que las muestras queden en el extremo catódico.

- 3.- Electroforesis.

Corra las muestras a 300 V, durante dos horas a temperatura ambien

te. La electroforesis se ha completado cuando la hemoglobina ha migrado 3 cm del origen.

Corte la hoja de acetato a nivel del puente anódico y del extremo catódico justo atrás de la hemoglobina.

4.- Tinción.

Tiña la hoja de acetato sobre una placa de vidrio colocando la - porción absorbente boca abajo durante dos minutos con la tinción No. 1 (3.48 ml del amortiguador No. 1 con 0.2 ml de metil glicoxal, 24 mg de glutatión reducido y 0.32 ml de metiltetrazolio al 0.5%).

Transferir la hoja de acetato a la tinción No. 2 (3.6 ml de amortiguador No. 2 con 0.4 ml de diclorofenol-indofenol acuoso al 0.2%), durante 2 minutos.

Coloque la hoja de acetato en una cámara húmeda.

Leer la placa a los 30 minutos (deberá permanecer en la oscuridad hasta antes de la lectura).

Nota: Para mayores detalles de la técnica, consultar la referencia 64.

RESULTADOS

Del estudio realizado en una población Tzotzil del Edo. de Chiapas, resultaron 73 haplotipos, de los cuales únicamente 8 tuvieron una asociación diferente. El haplotipo más frecuentemente encontrado en este grupo étnico fue el SC31 (54%). De los alelos del FB, la única variante que presentaron fue la S. En cuanto a los alelos de C2, el de mayor frecuencia fue el C, (99%); como muestran las tablas V y VI.

De los estudios hechos en la población mestiza mexicana se obtuvieron 16 diferentes haplotipos de un total de 69. El haplotipo más frecuente de esta población fue el SC31 (39.1%). El alelo de mayor frecuencia del FB es el S (86.9%), de C2 el C (97.1%), de C4A es el 3 (65.2%), de C4B el 1 (60.8%) y GLO el 2 (79.7%), como se puede observar en las tablas VIII y IX.

TABLA V

FRECUENCIA DE ALELOS EN INDIGENAS MEXICANOS

LOCUS	ALELOS	FRECUENCIA	LOCUS	ALELOS	FRECUENCIA
FB	S*	*1.000	C4A	0	0.191
	F	--		1	--
	F1	--		2	0.054
	S1	--		3	0.712
				4	0.041
C2	C	0.986	C4B	5	--
	B	0.013		6	--
	A	--		7	--
	O	--		0	0.136
GLO				1	0.780
				2	0.082
	1	0.260	otros		--
	2	0.739			

* La población indígena Tzotzil es homogénea para el FBS.

TABLA VI

FRECUENCIA DE COMLOTIPOS EN UNA POBLACION DE INDIGENAS
MEXICANOS

COMLOTIPOS	No.	FRECUENCIA
SC31	40	0.547
SC01	13	0.178
SC30	10	0.136
SC21	4	0.054
SC42	2	0.027
SC32	2	0.027
SC02	1	0.013
SB42	1	0.013
	73	

Frecuencia = No. de casos de un complotipo diferente
entre el No. total de complotipos.

TABLA VII

FRECUENCIA DE LA ASOCIACION ENTRE COMLOTIPOS Y GLIOXALASA EN UNA
POBLACION DE INDIGENAS MEXICANOS

HAPLOTIPOS	No.	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA
SC31:2	33	0.452	0.404
SC31:1	7	0.095	0.142
SC01:2	7	0.095	0.131
SC01:1	6	0.082	0.046
SC30:2	8	0.109	0.100
SC30:1	2	0.027	0.035
SC21:2	1	0.013	0.009
*SC21:1	3	0.041	0.014
SC42:2	2	0.027	0.019
SC32:2	1	0.013	0.009
SC32:1	1	0.013	0.003
SB42:2	1	0.013	0.009
SC02:2	1	0.013	0.009
73			

Frecuencia esperada = Frecuencia del complotipo x frecuencia del -
alelo de GLO.

*De 4 casos que tuvieron el Complotipo SC21 tres se asociaron a GLO-I
(la menos frecuente); y uno a GLO-2.

TABLA VIII

FRECUENCIA DE ALELOS EN MESTIZOS MEXICANOS.

LOCUS	ALELO	FRECUENCIA	LOCUS	ALELO	FRECUENCIA
FB	S	0.869	C4A	0	0.130
	F	0.130		1	0.014
	Fl	--		2	0.028
	Sl	--		3	0.652
				4	0.173
C2				5	--
	C	0.971		6	0.014
	B	0.028		7	--
	A	--	C4B	0	0.101
	O	--		1	0.608
		2		0.260	
GLO	1	0.202		3	--
	2	0.797		4	0.173
				otros	-----

TABLA IX

FRECUENCIA DE COMPLOTIPOS EN MESTIZOS MEXICANOS

COMPLOTIPOS	No.	FRECUENCIA
SC31	27	0.391
SC42	9	0.130
SC01	6	0.086
SC32	6	0.086
FC30	4	0.057
SC30	3	0.043
SC21	2	0.028
FC01	2	0.028
FC31	2	0.028
SB42	2	0.028
SC34	1	0.014
SC41	1	0.014
FC34	1	0.014
SC61	1	0.014
SC02	1	0.014
SC11	1	0.014
69		

Frecuencia = No. de casos de un complotipo diferente entre el No. total de complotipos.

TABLA X

FRECUENCIA DE LA ASOCIACION ENTRE COMLOTIPOS Y GLIOXALASA
EN MESTIZOS MEXICANOS

HAPLOTIPO	No.	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA
SC31:2	22	0.318	0.311
SC31:1	5	0.072	0.078
SC42:2	8	0.133	0.103
SC42:1	1	0.014	0.026
SC01:2	4	0.057	0.068
SC01:1	2	0.028	0.017
*SC32:2	6	0.086	0.068
FC30:2	2	0.028	0.045
FC30:1	2	0.028	0.011
SC30:2	3	0.043	0.034
SC21:2	2	0.028	0.022
FC01:2	1	0.014	0.022
FC01:1	1	0.014	0.005
FC31:2	1	0.014	0.022
FC31:1	1	0.014	0.005
SB42:2	1	0.014	0.022
SB42:1	1	0.014	0.005
SC34:2	1	0.014	0.011
FC34:1	1	0.014	0.002
SC41:2	1	0.014	0.011
SC61:2	1	0.014	0.011
SC02:2	1	0.014	0.011
SC11:2	1	0.014	0.011

69

Frecuencia esperada = Frecuencia del complotipo x frecuencia del alelo de la GLO.

* 6 casos que tuvieron el complotipo SC32, todos se asociaron con GLO-2 y ninguno con GLO-1.

DISCUSION

ANALISIS DE LA FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DEL COMPLEMENTO EN UNA POBLACION DE INDIGENAS MEXICANOS.

Analizando la frecuencia de alelos de los loci del complemento en la población indígena Tzotzil, es notorio que aún cuando el FB tiene varios alelos, el único que aparece es la variante S. El hecho de que todos estos indígenas tengan FBS puede ser característico de la población, ya que comparando la frecuencia de los alelos del FB de este grupo étnico como las otras razas, observamos que ninguna es homogénea para el FB.

En el caso del polimorfismo de C2, encontramos en estos indígenas mexicanos una frecuencia muy elevada de C2C (98%), es decir, que casi toda esta población es homogénea para C2C. Comparando estos datos con los de los caucásicos observamos que no hay mucha diferencia en las frecuencias de los alelos de C2 (no se pudo comparar con otras razas porque no existen reportes).

Siguiendo con nuestros análisis, el alelo más frecuente de C4A es C4A3 (74%), y otro menos frecuente es C4A0 (18%). Y para C4B la frecuencia mayor corresponde a la variante C4B1 (81%). Las frecuencias de los alelos de C4A y C4B en este grupo indígena es parecida a la de los caucásicos, porque la frecuencia mayor de C4A también corresponde a C4A3 (63%), aunque con un valor un poco más bajo, y la frecuencia de C4A0 se encuentra un poco más elevada en los caucásicos. Lo mismo que ocurre con C4A ocurre con C4B, es decir, las frecuencias son parecidas.

Como ya se dijo el gen estructural de GLO está situado a 5 centimorgans (5 unidades de recombinación) de los haplotipos del complemento hacia el centrómero. Como recordamos el gen tiene dos alelos (GLO-1 y GLO-2). En la población indígena el gen de GLO-2 tiene una frecuencia de 78% y GLO-1, 22%, lo cual es diferente de otras poblaciones en otras partes del mundo; por ejemplo, en caucásicos cada uno de los alelos tiene una frecuencia cercana al 50%, en tanto que otras poblaciones (los orientales) tienen una frecuencia similar a la población indígena que estudiamos.

En la tabla VI se muestran todos los haplotipos del complemento presentes en la población indígena; son un total de 8. Cinco de ellos existen en su variante con GLO-1, GLO-2, y los últimos tres sólo existen con GLO-2; esto puede deberse a que en la población normal de este grupo étnico no existe la variante con GLO-1, o a que debido a su rareza no hayamos tenido oportunidad de detectarla.

Se presenta además otra tabla (VII) en la que se incluyen los datos de la frecuencia observada y la frecuencia esperada para cada uno de los haplotipos (la frecuencia esperada se obtuvo usando la fórmula que se anota al pie de la tabla).

No existen diferencias notorias entre las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas. Sin embargo, llama la atención que del haplotipo SC21 existen más casos con la GLO menos frecuente (GLO-1).

ANALISIS DE LA FRECUENCIA DE COMLOTIPOS EN MESTIZOS MEXICANOS.

Al analizar estudios en familias de mestizos mexicanos, encontramos que en el caso del FB; se obtuvieron dos variantes: el FBS y el FBF, siendo el primero el de mayor frecuencia (87%) y el segundo menos frecuente (13%). - Ahora bien, comparando estos datos con los de otras poblaciones, notamos que la frecuencia del FB en mestizos mexicanos es muy parecida a la de los orientales, y también podemos afirmar que la frecuencia del FB en esta población es diferente a la del grupo étnico Tzotzil, puesto que ellos presentan únicamente el FBS.

En cuanto a los alelos de C2 encontramos que existe una frecuencia del 97% para C2C y del 2.8% para C2B. Dichos valores son más parecidos a los de los indígenas mexicanos (98% para C2C), que al de los caucásicos (95% para C2C).

Con respecto a los alelos de C4A y C4B, el alelo más frecuente de C4A es C4A3 (65.2%), y este valor es más parecido al encontrado en los caucásicos (63%) que al valor encontrado en los indígenas mexicanos (71.2%). Otro alelo de C4A es C4A4, cuya frecuencia es mayor en los mestizos mexicanos (17.3%) que en los caucásicos (7.5%) y que en los indígenas mexicanos (4.1%). En cuanto a los alelos de C4B, el que tuvo un valor más elevado fue el C4B1 (60.8%); dicho valor es un poco más bajo que el de las poblaciones con las que hemos estado comparando (caucásicos e indígenas mexicanos). Otro alelo de C4B es el C4B2, cuya frecuencia es elevada en nuestra población mestiza -

(26%) en relación a la población blanca (11.8%) y a la de los indígenas mexicanos (8.2%). Ahora bien, en donde sí encontramos similitud en las frecuencias de C4B0 fue en caucásicos y en los mestizos mexicanos, con un valor de 10.4% y 10.1% respectivamente.

El valor de las frecuencias de los alelos de la GLO fueron del 79.7% para GLO-2 y del 20.2% para GLO-1, los cuales se encuentran intermedios entre los valores de las frecuencias encontradas en los caucásicos y en los indígenas mexicanos.

La asociación entre los alelos ocurre con una frecuencia parecida o igual a la esperada. Sin embargo, algunas veces es diferente a la que se espera dada la frecuencia de los alelos individuales (desequilibrio de unión). Por ejemplo, la asociación entre alelos del FB y alelos de C2 ocurre con una frecuencia igual a la esperada, y lo mismo sucede con los alelos de C4A3 y C4B1. Por lo contrario, de 7 casos en que aparece C4A0, los 7 se encuentran asociados con C4B3. También observamos que siempre que aparece la pareja de alelos C4A3 y C4B2 están asociados con el FBS.

En la tabla IX se muestran todos los haplotipos del complemento presentes en la población mestiza mexicana. Fueron un total de 16; 9 de ellos sólo existen en una de las formas de GLO y los 7 restantes tienen tanto la forma de GLO-1 como la de GLO-2.

También se anotan las frecuencias esperadas para cada uno de los tipos, las cuales no difieren según la fórmula de las frecuencias observadas.

Sin embargo, cabe hacer notar que en el haplotipo FC34 el único caso - que existe es con GLO-1 y que los otros 8 haplotipos individuales son de - GLO-2. En el haplotipo SC32 los 6 casos de esta población son de GLO-2, sugiriendo que probablemente la variante con GLO-1 no existe en la población normal o es extremadamente rara.

CONCLUSIONES

El grupo étnico Tzotzil mexicano es una población poco polimórfica para los alelos de los genes del complemento; ésto probablemente se debe a que son núcleos pequeños de gente y no suelen cruzarse con otras poblaciones. Es decir, no ha habido introducción de nuevos genes en la población, y esto quizá lo confirme el hecho de que este grupo indígena es homogéneo para el FBS, ya que hasta este momento ninguna población muestra una frecuencia del 100% para el FBS, además de que presentan un desequilibrio de unión entre el complotipo SC21 y GLO-1. Estas dos características de esta población indígena (frecuencia del 100% de FBS y desequilibrio de unión entre SC21 y GLO-1), pueden representar una ventaja selectiva para que esta población pueda resistir cambios ambientales y el ataque de agentes infecciosos.

En cuanto a la población mestiza mexicana, observamos un mayor polimorfismo de los alelos de los genes del complemento que el que muestra el grupo indígena Tzotzil, esto era de esperarse debido a que en los mestizos existe una mezcla de genes provenientes de la raza negra, de caucásicos (sobre todo españoles y franceses), de orientales y por supuesto de indígenas mexicanos. Por ejemplo, podemos decir que la variante F del FB que presentan los mestizos provino quizá de la raza negra, o de los caucásicos, o de los orientales pero no de los indígenas mexicanos. Ahora bien, es importante señalar el desequilibrio de unión entre el complotipo SC32 y GLO-2, el cual tiene una frecuencia alta en los mestizos mexicanos, cosa que no ocurre en los caucá--

sicos ni en el grupo indígena estudiado, y quizá este desequilibrio de unión sea característico de la población mestiza mexicana.

Es importante determinar la frecuencia de los alelos de los *complotipos* en la población normal (en este caso mestizos e indígenas mexicanos), para - que posteriormente se tipifiquen pacientes con enfermedades que se cree son hereditarias, sobre todo enfermedades autoinmunes, y tomar la frecuencia de los normales como controles para ver si existe asociación de la enfermedad - con algún alelo de los *complotipos*, o de algún gen susceptible a enfermedad que se localice entre los *loci* de los *complotipos* y el *locus* de la GLO. - Esto último debido a que en la región HLA-DR, la cual se piensa que en el humano corresponde al área de la respuesta inmune (en el ratón Ia), se encuentra la región de los genes que codifican para las proteínas del complemento y los genes de la enzima eritrocítica glicoxalasa, por lo que los *complotipos*, junto con el HLA-D/DR, el HLA-B y GLO, pueden darnos información de los genes susceptibles a enfermedades.

Concluimos que es importante la tipificación de los haplotipos del complemento (*complotipos*), dada su localización dentro del Complejo Mayor de - Histocompatibilidad (CMH). Además, las técnicas usadas para la tipificación de los *complotipos* no son muy difíciles ni costosas comparadas con las de - tipificación de los antígenos del HLA, ya que la tipificación del FB, C2, C4 y GLO se realizan con equipo y material que tiene un laboratorio común, y - se pueden detectar todos los alelos de los *complotipos*, mientras que para la tipificación del HLA se requieren reactivos específicos para detectar cada -

alelo. Además, en el sistema HLA se detectan varios blancos, que pueden deberse a un gen nulo o simplemente puede ser que no se tenga el antisuero para detectar el producto de este gen, cosa que ocurre con frecuencia en México, ya que la tipificación se realiza con anticueros de caucásicos o de otras razas (no de mexicanos) debido a que en este país la producción de antisueros es casi nula (por lo que la tipificación del HLA en México es un gran problema). En tanto que los genes nulos para C4A ó C4B pueden ser detectados por inmunoelectroforesis cruzada, los alelos nulos para FB son muy raros; el gen nulo para C2 se puede detectar por medio de la electroforesis y comprobarse por medición de la concentración del suero de C2.

Otra ventaja que tiene la tipificación de los complotipos es que se lleva a poco tiempo, comparando con el que se requiere para la tipificación del HLA, además de que se pueden correr varias muestras a la vez, por lo que los complotipos pueden ser determinados por una pequeña fracción del costo de los haplotipos del HLA. Finalmente, los complotipos pueden ser determinados con 1 ml de plasma, mientras que para la tipificación del HLA se requieren 10 ml. o más.

Todos los factores mencionados anteriormente hacen que los complotipos sean importantes para determinar el donador de un miembro de una familia para el transplante de órganos. Obviamente que se recomienda determinar todos los marcadores del CMH para identificar el donador ideal, y de esta manera poder identificar los recombinantes, con lo cual se puede tener seguridad al asignar el haplotipo correspondiente.

En resumen tenemos que la tipificación del complotipo es de gran utilidad en genética de población, en programas de transplante y por su asociación con enfermedades, sobre todo enfermedades autoinmunes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- David J. MD., and Douglas F. MD., (1985): The Complement System. Sci. Am. med. 6-VII; 1-11.
- 2.- Lepow I.H., Naff G.B., Todd W.E., Pensky L., Hinz C.F. (1963): Chromatographic Resolution of the First Component of Human Complement into three Activities. J. Exp. Med. 117:983-1008.
- 3.- Müller-Eberhard H.J., Hunkel H.G. (1961): Isolation of Thermolabile Serum Protein Which Precipitates Gamma Globulin Aggregates and Participates in Immune Hemolysis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106: 291-295.
- 4.- Naff G.B., Ratnoff O.D. (1968): The Enzymatic Nature of C₃ Conversion of C₃s to C₃ Esterose and Digestion of Amin Acid Esters by C₃. J. Exp. Med. 125:571-793.
- 5.- Müller-Eberhard H.J., Polley M.J., Calcott M.A. (1967): Formation and Functional Significance of a Molecular Complex Derived from the Second and Fourth Component of Human Complement. J. Exp. Med. 125:359-380.
- 6.- Müller-Eberhard H.J. (1975): Complement Annu Rev. Biochem. 44:697-724.
- 7.- Pillemer L., Blum L., Lepow I.H., Ross O.A., Todd E.W., Wordlaw A.C. (1954): The Properdin System and Immunity. Demonstration and Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and its Role in Immune Phenomena. Science 120:279-285.

- 8.- Pensky J., Levy L.R., Lepow I.H. (1961): Partial Purification of a Serum Inhibitor of CL-esterase. *J. Biol. Chem.* 236:1674-1679.
- 9.- Weiler J.M., Daha MD. Austen K.F., Fearon D.T. (1976): Control of the Amplification Convertase of Complement by the Plasma Protein BIH Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 73:3268-3272.
- 10.- Waley K., Ruddy S. (1976): Modulation of the Alternative Pathway by BIH Globulin. *J. Exp. Med.* 144:1147-1163.
- 11.- Raum Donald, and Cols. (1980): Genetic of Complement. *Current Topics in Hematology* 3:111-174.
- 12.- Lachmann P.J. (1979): An Evolutionary View of the Complement System. *Behring Inst. Mitt.* 63:23-27. Fig. 2.
- 13.- Schunter G., Wernet P., Kömpf L., Bisobort S. and Göhler F. (1978): Mapping of the Linkage Group. GLO-BC1-HLA-B,C,A-PGM3. *Hum. Genet.* 44:321-1331.
- 14.- Alper A., Chester; Rauw D., Karp S., Awdeh L., Yunis E.J., Serum Complement 'Supergenes' of the Mayor Histocompatibility Complex in Man (Complotypes) *Vox Snguinis* 45:62-67. (1983).
- 15.- Yunis E.J., Awdeh Z., Raum D., Alper C.A. (1983): The MHC in Human Bone Marrow Allotransplantation. *Clinics in Hematology* 12:641-680.
- 16.- Kleein, J. (1981). Demystifying. Tha Mayor Histocompatibility Complex. *Immunology Today*, 2:166.
- 17.- Carpenter C.B. & Yunis E.J. *Tissue Typing: Recent Advances.*

Immunobiology of Transplantation, Cancer and Pregnancy. Ray. Ed. Pergamon. Press, Elmsford, N.Y. (1983).

- 18.- Morimoto C., Reinhertz E.L., Scholossman S.F., et al. (1980). Alteration in Immunoregulatory T Cell Subset in Active Systemic Lupus Erythematosus. J. of Clinical Investigation. 66:1171.
- 19.- Kornfeld H., Vande S.R.A., Lange M., et al. (1982) T Lymphocyte Subpopulations in Homosexual Man. New England Journal of Medicine
- 20.- Kostyu D. Donna., Amos D. Bernad. The Histocompatibility Complex. In the Metabolic Bases of Inherited Disease. E.D. Mc. Graw-Hill Book Company 3:77-79. (1983).
- 21.- Falconer D.S. (1980). "Introduction to Quantitative Genetics", Olivier and Boyd, Edinburgh.
- 22.- Dubinin N.P., and Tiniakov G.G., (1946a). Genetics. 31:537-545.
- 23.- Dubinin N.P., and Tiniakov G.G., (1946a). Amer. Natl. 79:570-572.
- 24.- Baker C.M.A., and Hanson H.C. (1966). Comp. Biochem. Physiol., 17: 997-1006.
- 25.- Haldane J.B.S., and Jayakar S.D. (1963). J. of Genet., 58:318-323.
- 26.- Lehmann H., and Huntsman A.G. (1966). Man's Hemoglobins, Blackwells, Oxford.
- 27.- Lewis R.A., Kay R.W., and Hathorn M. (1966). Acta Heamat., 35:399-411.
- 28.- Brewer G.J. (1967a). Biochem. Genetics. 1:25:34.

- 29.- Manwell C., and Baker C.M. Molecular Biology and the Origin of Species University of Washington Press, (1970). pp 22-24; 28-31.
- 30.- Alper C.A., Johnson A.M. (1969): Immunofixation Electrophoresis: A: Technique the Study of Protein Polymorphism. Vox Sang. 17:445-452.
- 31.- Alper C.A., Boenisch T, Watson L. (1972a): Genetic Polymorphism in Human Glycine-rich Beta-Glycoprotein. J. Exp. Med. 135:68-80.
- 32.- Mauff G. (1977): "Untersuchungen zum Komplement-system des Menschen. Genetik und Biochemie der Dritten und Vierten Komponente de Komplement System Sowie des Propoerdin-Factor B" Köln, West Germany: Habilitation Schrift, pp 205.
- 33.- Ziegler J.B. Watson L, Alper C.A. (1975d): Genetic Phymorphism of Properdin Factor B in the Rhesus. Evidence for Single Subunit Structure in Primates. J. Immunol. 114:1649-1653.
- 34.- Bitter-Suermann D., Krönke M., Brade V., Hidding U. (1977): Inherited Polymorphism of Guinea pig Factor B and C4: Evidence for Genetic Linkage Between C4 and BF Loci. Immunology 118:1822-1826.
- 35.- Rubinstein P., Rosenfield-Steele P., Day N.K. (1977) Murine Factor B: Electrophoretic Polymorphism. Immunogenetics 5:363-366.
- 36.- Raum D., Balner H., Petersen B.H., Alper C.A. (1980b): Genetic Polymorphism of Serum Complement Components in the Chimpanzee. Immunogenetics. 10:455-468.

- 37.- Teisberg P., Olaisen B., Gedde-Dahl T. Jr., Thorsby E. (1975): On the localization of the Gb locus within the MHC region of chromosome No.6 Tissue Antigens. 5:257-261.
- 38.- Alper A., Chester. Complement and the MHC. In the Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. Dorf, M.E., ED. Garland Pub. N.Y. 5:173-220. (1981).
- 39.- Rosenfeld S.I., Ruddy S., Austen K.F. (1969): Structural Polymorphism of the Fourth Component of Human Complement. J. Clin. Invest. 48:2283-2292.
- 40.- O'Neill G.J., Yang S.Y., Tegoli J., Berger R., Dupont B. (1978b): Chido and Rodgers Blood Groups are Distinct Antigenic Components of Human C4. Nature 273:668-670.
- 41.- O'Neill G.J., Yang S.Y., Dupont B. (1978a). Two HLA-linked Loci Controlling the Fourth Component of Human Complement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:5165-5169.
- 42.- Audeh Z.L., Raum D., Alper C.A. (1979): Genetic Polymorphism of the Fourth Component of Human Complement: Detection of Heterozygotes. Nature 282:205-207.
- 43.- Mauff G., Alper C.A., Audeh Z.L., Batchelor J.R., Bertrams J., Braum Peterson G., Daukins R.L., Demant P., Edwardas J., Grosse-Wilde H., Hauptmann G., Klouda P., Staementson the Nomenclature of Human C4 Allotypes. Immunobiology. 164:184-191. (1983).

- 44.- Meo T., Krasteff T., Schereffler D.C. (1975): Immunochemical Characterization of Murine H-2 Controlled Ss (serum substance) Protein Through Identification of its Human Homologue as the Fourth Component.
- 45.- Alper C.A. (1976): Inherited Structural Polymorphism in Human C2: Evidence for Genetic Linkage Between C2 and B.F. J. Exp. Med. 144: 1111-1115.
- 46.- Olaisen B., Teisberg P., Gedde-Dahl T. Jr., Thrsby E., (1978): Genetic Polymorphism of the Second Component of Human Complement (C2). Hum. Genet. 42:301-305.
- 47.- Littman B.H., Ruddy S. (1977): Production of the Second Component of Complement by Human Monocytes. Stimulation by Antigen-Activated Lymphocytes or Lymphokines, J. Exp. Med. 145:1344-1352.
- 48.- Colten H.R., Borsos T., Rapp H.J. (1970): Isoelectric Focusing of Human and Guinea Pig C2: Polymorphism of Guinea Pig C2. Immunology 18:467-472.
- 49.- Meo T., Atkinson J., Bernoco D., Ceppellini R. (1977a): Structural Heterogeneity of C2 Complement Protein and Its Genetics Variants in Man: A New Polymorphism of the HLA Region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:1672-1975.
- 50.- Klein J., Flaherty L., Van de Berg J.L., Shreffler D.C. (1978): H-2 Haplotypes, Genes, Regions and Antigens: First Listing Immunogenetics. 6:489-512.

- 51.- Kömpf J., Bessobort S., Gussmann S., Rittner M. (1975a): Polymorphism of Red Cell Glyoxalase-I. A New Genetic Marker in Man. Investigation of 169 Mother Child Combinations. *Human. Genet.* 27:141-143.
- 52.- Meo T., Douglas T., Rijnbeek A. (1977): Glyoxalase-I Polymorphism in the Mouse a New Genetic Marker Linked to H-2. *Science.* 198:311-313.
- 53.- Giblett E.R., Lewis M. (1976): Gene Linkage Studies on Glyoxalase I., In Bergsman Human Gene Mapping 3 National Foundation-March of Dimes Karger Basel p 313.
- 54.- Weitkamp L.R. (1976): Linkage of GLO with HLA and BF. Effect of Population and Sex on Recombination Frequency. *Tissue Antigens.* 7: 273-281.
- 55.- Dausset J., Legrand L., Lepage V., Contu L., Marcelli-Barge A., Wildloecher I., Benajam A., Meo T., Degos L. (1978): A Haplotype Study of HLA Complex with Special Deference to the HLA-DR Series and to BF, C2 and Glyoxalase I Polymorphism. *Tissue Antigens.* 12:207-307.
- 56.- Amos O.B., Ward F.F. (1977): Theroretical Consideration in the Association Between HLA and Disease. In: Dausset J., Svejgoord A. (eds): HLA and Disease, Munksggaard, Copenhagen. P 250.
- 57.- Host B., Suys J., Mathy M.R. (1984). Glyoxalase I Polymorphism in Belgium. *Hum. Hered.* 34:192-193.
- 58.- Hovokins B.R., Hoy A., Choi E.K.K., Osmond I.F. (1984). HLA Antigens, Glyoxalase-I, and Esterase in Hong Chinese. *Human. Genet.* 66:371.

- 59.- Blake N.M. and Radford P.R. (1984). Detection of Chromosome 6 non-HLA Gene Products. Detection of Immune-Associated Genetic Markers of Human Disease 7:52-64.
- 60.- Mickelson E.M., Fefer A., Thomas E.D. (1976). Aplastic Anemia: Failure of Patients Leukocytes to Stimulate Allogenic Cells in Mixed Leukocytes Culture. Blood. 47:793-799.
- 61.- Hansen J., Thomas E.D., HLA Typing: Methodological and Clinical Aspects, Ferrone S., Salheem B. (eds) pp 157-181. Boca Raton: CRC Press 1983.
- 62.- David J. MD., and Charles B.C. MD. Histocompatibility Antigens and Immune Response Genes, Sci. Am Med. 6:XVI 1-7. 1985.
- 63.- Bazua Silvia. Los Tzotziles de los Altos. En "Grupos Etnicos de México", Ediciones del INI: 1982.
- 64.- Lachmann PJ, Hobart MJ. (1978) Complement Technology. In: Weir D.M. (ed) Handbook of Experimental Immunology, 3d ed. Blackwell Scientific, Oxford Vol. I.