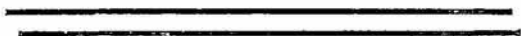


Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales IZTACALA



**DISTRIBUCION DE ANTIGENOS HLA-A, B, C y DR
EN PACIENTES CON LEPRO LEPROMATOSA Y LEPRO
TUBERCULOIDE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JOSEFINA FLORES GURROLA



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.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas de la S.S.A. bajo la Dirección de la DRA. CLARA GORODEZKY DE RAISBAUM.

La investigación contó con el apoyo financiero de CONACyT, PCSBNA 00519.

Á LA DOCTORA CLARA GORODEZKY DE RAISBAUM

Mi agradecimiento por su tiempo, enseñanza
y apoyo para la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a los Doctores:

América Silva, del Centro Médico La Raza, IMSS

Luis Ramírez, del Centro Médico La Raza, IMSS

**Obdulia Rodríguez, del Centro Dermatológico
"Dr. Ledislao Pascua", SSA**

**Fernando Latapí, del Centro Dermatológico
"Dr. Ledislao Pascua", SSA**

**Nelly Arévalo, del Centro Dermatológico
"Dr. Ledislao Pascua", SSA**

Yolanda Ortíz, del Hospital "Dr. Pedro López", SSA

**Patricia Escobar G., del Laboratorio de Investigaciones
Inmunológicas, SSA**

Teresa Loyo, del Centro Dermatológico "Dr. Gea González", SSA

Guillermo Castellanos, del Hospital de la Mujer, SSA

**Por su gran ayuda al haber proporcionado a todos los pa--
cientes y sujetos sanos que fueron integrados a este estudio. -
Sin su colaboración hubiese sido imposible la realización de es
te trabajo.**

A todo el personal del laboratorio,
especialmente a:

QFI Lilia E. Castro Escobar
Dra. Patricia Escobar Garaygordobil
QFB Carmen Mora Villalpando
Dra. Laya Hun de Friejman
QFB Gilberto Erosa de la Vega
QFB Héctor M. Debaz Vela

A MI ESPOSO

Por su apoyo y amor en esta etapa
tan importante en mi vida.

A MIS PADRES

Por la confianza y gran amor*
que me tienen.

A MIS HERMANOS

Por su ayuda que me brindaron
en todo momento.

A MARIA ELENA

Por la estimulación, cariño y
tiempo que me regala.

I N D I C E

	Pag.
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCION	3
1. El Sistema de Histocompatibilidad H-2 en el ratón .	3
2. El Sistema de Histocompatibilidad en el Humano. . .	4
3. Genética del Complejo Principal de Histocompatibilidad	6
4. Estructura de los antígenos HLA	9
5. Distribución de antígenos HLA en poblaciones. . . .	10
6. Los antígenos HLA y su relación con las enfermedades	14
7. Clasificación de la lepra	22
8. Aspectos epidemiológicos de la lepra en México. . .	24
9. Relación de los marcadores del Complejo Principal de Histocompatibilidad con la lepra	28
III. OBJETIVOS	32
IV. MATERIAL Y METODO	33
V. RESULTADOS	43
VI. DISCUSION	59
VII. CONCLUSIONES.	67
VIII. APENDICE	69
IX. BIBLIOGRAFIA.	75

1. RESUMEN

En el presente estudio se integraron 100 individuos sanos seleccionados al azar de la población mestiza mexicana y 76 pacientes de lepra (46 con lepra lepromatosa y 30 con lepra tuberculoides) con el objeto de estudiar si los antígenos de histocompatibilidad de los loci A, B, C y DR juegan algún papel como factores predisponentes a alguna de las formas de la enfermedad, -- dado que existen algunas evidencias de esta naturaleza en otras poblaciones.

La tipificación se realizó mediante la técnica de micro--linfocitotoxicidad sobre poblaciones purificadas de linfocitos T y B. Se utilizó un total de 303 antisueros, de los cuales 258 - fueron monoespecíficos y 45 biespecíficos, teniendo antisueros - por cuadruplicado.

Se encontraron dos antígenos incrementados en el grupo de pacientes tuberculoides, el A25 y el DR3 ($p = 0.020$ y $p = 0.006$) sin embargo el DR3 mostró un incremento mayor al igual que en el trabajo de Van Eden (1), sugiriendo que dentro de la región DR - existen genes que podrían conferir resistencia al desarrollo de la forma destructiva de lepra, una vez que un individuo es infectado por el bacilo de Hansen.

II. INTRODUCCION

1. El sistema de histocompatibilidad H-2 en el ratón.

El concepto de antígenos de histocompatibilidad o de ----
transplante, se introdujo cuando los estudios realizados con tu-
mores transplantables en el ratón, mostraron que el rechazo del
injerto se debía a las diferencias inmunogenéticas entre el dona
dor y el receptor. Gorer (1938) (2) llamó Sistema H-2 a la re-
gión genética que codifica para la síntesis de los productos res-
ponsables de dicho rechazo en el ratón y Snell (3) denominó a di-
chos productos, antígenos de histocompatibilidad, debido a que -
juegan un papel muy importante en el fenómeno de rechazo de trans-
plantes.

El sistema H-2 del ratón abarca un grupo de genes que se*
encuentran localizados en un pequeño segmento del cromosoma núme-
ro 17, y a esta región genética se le conoce actualmente con el
nombre de MHC (del inglés Major Histocompatibility Complex). El
complejo está dividido en seis regiones principales: K, I, S, G,
L y D (4). Los productos génicos de estas regiones son glicopro
teínas que se encuentran expresadas como aloantígenos sobre la -
membrana de prácticamente todas las células.

Los antígenos H2-K y H2-D, están involucrados en la elimi-
nación de células tumorales o infectadas por virus, ya que es ne-
cesaria la presencia de los mismos antígenos sobre los linfocitos
T citotóxicos y sobre la célula blanco. La identidad de estas -
moléculas entre un donador y un receptor en términos de un trans-
plante, también es necesaria para lograr una buena sobrevida del
injerto; dichas regiones forman los límites del complejo H-2 (5).

La región S controla la producción del componente C4 del sistema de complemento; los genes de la región G determinan la producción de antígenos de eritrocitos. Las moléculas sintetizadas por los genes de la región L también parecen participar importantemente en el reconocimiento de tejidos extraños; y por último la región I se subdivide en cinco regiones: I-A, I-B, I-J, I-E e I-C, cuyos productos son los antígenos Ia (asociados a la región I), cuyas funciones más importantes son a nivel inmunológico, ya que están involucradas en los fenómenos de reconocimiento antigénico, así como en los mecanismos de regulación mediada por los linfocitos T supresores y T cooperadores, los cuales a su vez mantienen en equilibrio tanto la producción de anticuerpos como a la respuesta efectora celular (5).

Los estudios en el ratón han sido un excelente modelo para los estudios en el humano, especialmente en relación de estos antígenos con una gran variedad de fenómenos biológicos como son: la naturaleza de las interacciones celulares, la presencia de genes Ir (respuesta inmunológica) específicos y la susceptibilidad o resistencia a diversas enfermedades (5).

2. El sistema de histocompatibilidad en el humano.

Los hallazgos en el humano se remontan a 1952 cuando Dausset, demostró que las transfusiones de sangre jugaban un papel muy importante en la producción de isoanticuerpos, y sobre esta base, en 1958, él mismo descubrió el primer antígeno de histocompatibilidad que llamó MAC y que corresponde actualmente al HLA-A2 (6). Casi simultáneamente a este descubrimiento, los estudios realizados con sueros de mujeres múltiparas, mostraron que la estimulación materno-fetal, provocan en la madre la formación de anticuerpos contra antígenos que ella no posee, y que están presentes en las células fetales por herencia paterna.

El desarrollo en los conocimientos de los antígenos de histocompatibilidad o antígenos HLA en el humano se estableció a través de una intensa colaboración mundial iniciada en 1964 en forma de Talleres Internacionales de Histocompatibilidad en donde hay - intercambio permanente de material biológico, técnicas e ideas - que han acelerado considerablemente el conocimiento del área.

Los resultados de la primera reunión organizada por Amos , no pudieron publicarse debido a la confusión de datos. En los --segundo y tercer Talleres Internacionales en 1965 (7) y en 1967 - (8) respectivamente, se definió el primer antígeno descrito por Dausset, se establecieron otras especificidades del locus A y se aclaró, por medio de análisis familiares, que los antígenos están codificados por un solo sistema de genes muy ligados entre sí. - Además se plantearon las primeras asociaciones con diversos padecimientos.

Los cuarto y quinto Talleres Internacionales, fueron organizados, en 1970 por Terasaki (9); y en 1972 por Dausset y Colom bani (10) respectivamente, dedicados al análisis de 300 familias que permitieron establecer firmemente la existencia de un sistema único con dos series principales de especificidades serológicas controladas por genes localizados en un par de regiones muy cercanas entre sí, denominados locus A y locus B; se analizaron diferentes grupos étnicos y se logró establecer que los antígenos se encuentran distribuidos en frecuencias diferentes de acuerdo con el origen de las poblaciones y se confirmó la existencia de una -tercera región, llamada locus C.

En 1975, Kissmeyer-Nielsen, dirigió el sexto Taller Internacional (11) en el que se propuso la existencia de un cuarto - locus denominado HLA-D, cuyos productos se identifican por medio de la reacción en cultivo de mezcla de linfocitos. El séptimo -

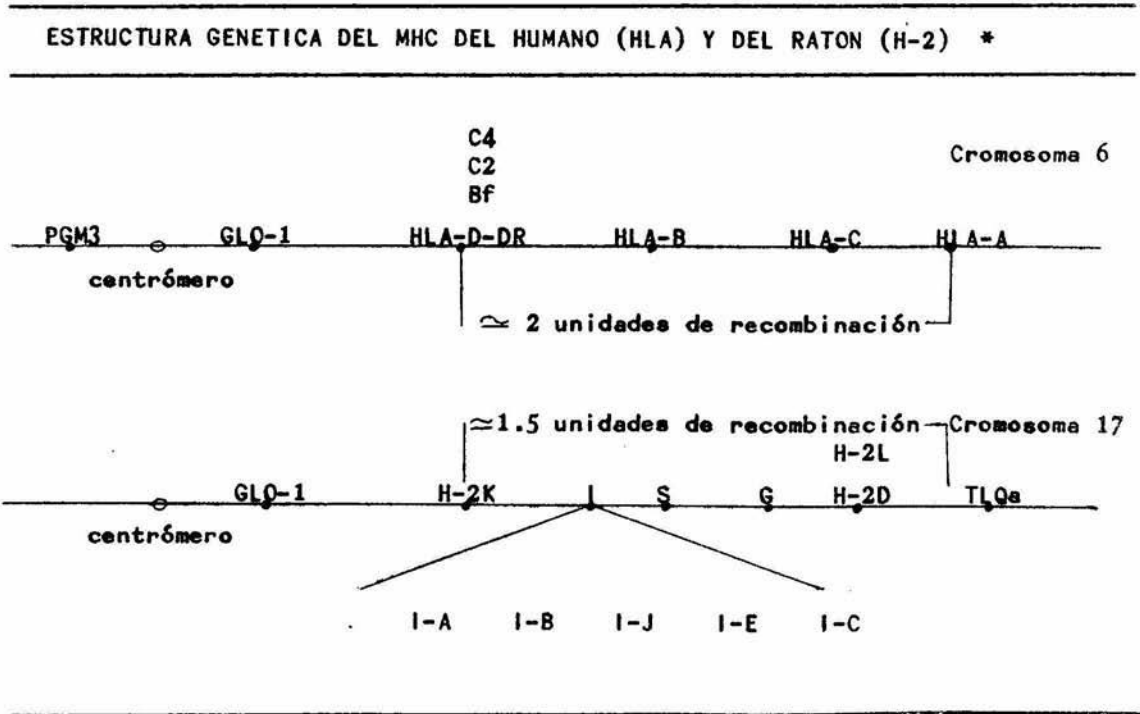
Taller Internacional fue organizado en 1977 por Bodmer (12), cuyo objetivo fue la definición serológica de un nuevo locus dentro del sistema, denominado HLA-DR, y cuyos antígenos se encuentran expresados sobre la membrana de los linfocitos B. En 1980 Terasaki organizó el octavo Taller Internacional de Histocompatibilidad, en el que se definieron nuevas especificidades de todos los loci, y se confirmaron asociaciones relevantes de antígenos HLA-DR con diversas enfermedades y surgió la primera etapa de producción y ensayo de anticuerpos monoclonales (13).

3. Genética del complejo principal de histocompatibilidad.

La región genética en el humano, se encuentra en el brazo corto del cromosoma número seis y se llama Complejo o Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC o MHS); los productos de sus genes son los Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) y existen cinco loci llamados HLA-A, -B, -C, -D y -DR. Dentro de la región genética del MHC (fig. 1) hay otros genes que codifican para la producción de los factores C2 y C4 de la vía clásica del complemento, la producción del factor B de la vía alterna y algunas enzimas como la 21-hidroxilasa. Cerca de esta región se encuentran localizados genes que codifican para la fosfoglucomutasa 3 (PGM3), el pepsinógeno urinario (Pg5), la glioxilasa I (GLO), la enzima mállica citoplásmica (ME-1) y la indol fenoloxidas tetramérica (IPoB); por estos motivos se llama complejo, ya que no sólo codifica para la producción de antígenos HLA (3).

El polimorfismo del sistema HLA, es extraordinario (cuadro 1), (13) pues actualmente se han descrito 20 antígenos pertenecientes al locus A; para el locus B, 40; para el locus C, 8; para el locus D, 12 y para el locus DR, 10.

FIGURA 1



* Tomado de Parham, P., 1982 (14).

C U A D R O 1

ANTIGENOS DE HLA DESCRITOS HASTA 1980 (OMS)

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR	
A1	B5	Bw46	Cw1	Dw1	DR1
A2	B7	Bw47	Cw2	Dw2	DR2
A3	B8	Bw48	Cw3	Dw3	DR3
A10	B12	Bw49 (21)	Cw4	Dw4	DR4
A11	B13	Bw50 (21)	Cw5	Dw5	DR5
Aw19	B14	Bw51 (5)	Cw6	Dw6	DRw6
Aw20 (9)	B15	Bw52 (5)	Cw7	Dw7	DR7
Aw21 (9)	Bw16	Bw53	Cw8	Dw8	DRw8
A25 (10)	B17	Bw54 (22)		Dw9	DRw9
A26 (10)	B18	Bw55 (22)		Dw10	DRw10
A28	Bw21	Bw56 (22)		Dw11	
A29	Bw22	Bw57 (17)		Dw12	
Aw30	B27	Bw58 (17)			
Aw31	Bw35	Bw59			
Aw32	B37	Bw60 (40)			
Aw33	Bw38 (16)	Bw61 (40)			
Aw34	Bw39 (16)	Bw62 (15)			
Aw35	B40	Bw63 (15)			
Aw42	Bw41				
	Bw42				
	Bw44 (12)	Bw4			
	Bw45 (12)	Bw6			

Tomado de Terasaki, P. I., 1980 (13)

Los antígenos de histocompatibilidad, al igual que los antígenos de grupos sanguíneos, se heredan siguiendo la primera ley de Mendel, en forma codominante y debido a su gran polimorfismo son marcadores de individualidad, a la vez que constituyen junto con el sistema ABO, la barrera más importante de histocompatibilidad, (15).

4. Estructura de los antígenos HLA.

Las moléculas de los antígenos HLA-A, B y C están constituidos por dos cadenas polipeptídicas, una pesada que es glicoproteína (PM 44 000) y que es portadora de la especificidad antigénica y una cadena ligera, la B₂ microglobulina (PM 12 000) cuya función se cree que es el mantener la configuración de la cadena pesada. Las moléculas HLA-DR están formadas por dos cadenas polipeptídicas, una ligera denominada beta (PM 29 000), responsable del polimorfismo alélico y una cadena pesada (PM 34 000) llamada alfa (16).

Desde el punto de vista bioquímico, los antígenos DR, son equivalentes a los de las subregiones IE e IC del sistema H-2 del ratón, pues su cadena pesada tiene una estructura similar y la posición N terminal de la cadena ligera es similar a los antígenos IA (17).

Los productos HLA se encuentran flotando en la bicapa de fosfolípidos de la superficie de la membrana de todas las células nucleadas maduras del organismo. Los antígenos HLA-A, B y C se encuentran localizados sobre todas ellas y su mayor concentración es en células linfoides, plaquetas, fibroblastos, monocitos, granulocitos, bazo, corazón, riñón, espermatozoides, en plasma y orina. En cambio las moléculas HLA-DR se hallan restringidas -

principalmente a los linfocitos B, macrófagos, células de Langherhans, células epiteliales y espermatozoides; se encuentran en algunas subpoblaciones de linfocitos T, que probablemente corresponden a la de T supresores y a los T activados; están ausentes en granulocitos, en otras células T, en fibroblastos y en plaquetas (3).

5. Distribución de antígenos HLA en poblaciones.

La distribución de los antígenos HLA en los diferentes grupos raciales expresadas en frecuencias génicas se muestran en el cuadro II (18, 19, 20, 21). Se puede observar una frecuencia relativamente alta del A2 en todas las poblaciones. En cambio en los japoneses no existen el A1, A3, A28, A29, Aw30 y Aw32; el A11 está ausente en negros y el Aw32 y el Aw36 en nahuas. Sin embargo el Aw43 y Bw42 son exclusivos de la población negra; el Aw31 de los mongoloides así como de los indígenas de América. Es importante señalar que la distribución de antígenos en la población mexicana (21) es diferente a la de los otros tres grupos del cuadro y refleja sin duda alguna el origen de los mestizos ya que los antígenos más frecuentes en el locus A son el A2, A24 y el A28; el Bw35, B40 y Bw51 en el B; el Cw1, Cw3 y Cw4, para el locus C y el DR2, DR5 y DR7 para el locus DR; cifras que en términos generales son cercanas a las de los japoneses reflejando así el fondo mongoloide que los indígenas mexicanos aportaron a la población mestiza. Además es notorio que los antígenos más frecuentes en caucásicos o negros, tienen cifras muy distintas o en algunos casos muestran la mezcla que hay en los mestizos mexicanos de genes provenientes tanto de españoles como de negros.

El conocimiento de la repartición geográfica de los antígenos HLA no sólo ha sido una herramienta de gran valor para la Antropología, sino que ha sido el fundamento para poder estudiar

C U A D R O II

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS GENICAS (%) DE ANTIGENOS HLA EN DIFERENTES GRUPOS RACIALES

Especificidad	Caucásicos europeos (18, 19)	Negros (19)	Japoneses (19)	Mestizos mexicanos (20, 21)
A1	14.9	3.3	0.5	6.1
A2	26.0	14.7	24.6	31.5
A3	11.6	7.4	0.5	7.5
Aw23 (9)	2.3	10.8	0.5	0
Aw24 (9)	9.6	2.9	35.6	19.5
A25 (10)	1.9	0.4	0.1	0.2
A26 (10)	3.7	3.8	9.8	6.4
A11	5.91	0.6	9.0	8.1
A28	4.0	8.7	0.5	7.8
A29	3.8	6.3	0.2	0.8
Aw30	2.4	15.4	0.2	2.0
Aw31	2.7	2.2	8.0	1.8
Aw32	4.5	1.5	0.1	0.8
Aw33	1.7	4.6	6.8	-
Aw34	0.6	6.5	1.0	-
Aw36	0.3	1.7	0.3	-
Aw40	0	1.0	0	-

C U A D R O II (CONTINUACION)

Bw51 (5)	7.2	1.4	8.3	1.8
Bw52 (5)	1.5	1.0	10.9	11.0
Bw53	0.9	6.5	0.1	-
B7	8.8	8.9	5.9	5.6
B8	8.2	2.9	0.1	5.9
Bw44 (12)	11.0	7.1	6.5	3.5
Bw45 (12)	1.1	3.9	0.2	-
B13	2.8	0.7	2.0	1.0
B14	3.0	4.1	0.1	4.1
B15	5.8	2.5	9.0	3.5
Bw38 (16)	2.5	0	0.2	3.8
Bw39 (16)	2.1	1.8	2.9	0
B17	4.1	14.6	0.9	4.6
B18	5.8	3.9	0	3.0
Bw21	3.5	3.2	0.3	3.3
Bw22	2.8	0.8	4.0	2.3
B27	3.9	1.5	0.4	2.5
Bw35	9.5	6.2	7.3	23.9
B37	1.5	0.4	0.5	1.0
B40	5.1	1.8	15.4	10.5
Bw42	0.3	7.7	0.6	2.0
Bw41	1.0	1.2	0.4	-
Bw54	0	0	7.3	-

C U A D R O II (CONTINUACION)

Cw1	4.1	0.1	17.6	11.7
Cw2	5.1	12.0	0.4	5.7
Cw3	10.1	9.2	26.9	26.9
Cw4	12.1	15.9	4.7	15.6
Cw5	6.0	2.9	0.1	4.5
Cw6	7.9	9.0	0.7	10.5
Cw7	2.3	2.4	1.1	5.7
DR1	6.9	4.9	6.3	6.7
DR2	13.4	15.4	20.0	18.7
DR3	10.8	17.3	1.6	5.6
DR4	9.6	4.9	23.5	8.4
DR5	10.3	13.3	2.2	16.9
DRw6	2.2	5.3	4.6	7.2
DR7	12.5	9.8	0.5	10.0
DR8	2.7	5.6	6.5	7.2
DRw9	1.1	2.7	12.2	9.4

- Ausente en la población.

Tomado de: Gorodezky, C. (22)

factores de susceptibilidad o resistencia genética en los diferentes grupos étnicos, tomando en cuenta siempre que cada grupo tiene sus propias características inmunogenéticas y por lo tanto de distribución de antígenos HLA y sólo se puede comparar un grupo de pacientes con sujetos sanos del mismo grupo racial.

Las aplicaciones del conocimiento del MHC son ya a muchos niveles: estudios genéticos (15), antropológicos (23), selección de donadores para trasplante de órganos, puesto que mientras mayor sea la identidad HLA entre donador y receptor, mayores probabilidades de sobrevida tendrá el injerto (24), así como en problemas de exclusión de paternidad (25). Sin embargo el campo donde los antígenos HLA parecen tener mayor relevancia es en cuanto a su participación en los mecanismos fisiológicos de regulación inmunológica y como consecuencia su participación en patología (5).

6. Los antígenos HLA y su relación con las enfermedades.

La asociación de estos antígenos con diversas enfermedades ha sido ampliamente estudiada. Así, la primera observación de una asociación entre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad y la susceptibilidad a enfermedad, fue hecha en 1965, cuando Lilly mostró algunas especies de ratones particularmente susceptibles al virus de la leucemia murina. En crías resistentes con especies de animales susceptibles, demostró que no solamente la susceptibilidad al virus de leucemia está bajo control genético, sino que uno de los genes de susceptibilidad a la enfermedad está ligado al MHC en el ratón (26). Otros ejemplos de genes ligados al sistema H-2 son los genes Ir para el virus de tumor mamario (27) virus de la coriomeningitis linfocítica y la tiroiditis autoinmune (28).

El primer estudio en humanos (1967) mostró que el antígeno 4s (ahora B5+81C.DW35) era más frecuente en pacientes con enfermedad de Hodgkin's que en sujetos sanos (29). Durante los siguientes 10 años han sido estudiadas un gran número de enfermedades y actualmente hay descritas cerca de 40 enfermedades asociadas con el sistema HLA. Los descubrimientos en 1972 por Russell y Falchuk, de que la psoriasis y la enfermedad celiaca están estrechamente asociadas con ciertos antígenos HLA sugirió la participación de estos genes en la etiopatogenia de diversas enfermedades (30).

Uno de los aspectos más fascinantes de estas investigaciones, es la búsqueda de los mecanismos a través de los cuales los genes del MHC confieren susceptibilidad o resistencia a la enfermedad (29).

En última instancia los productos génicos están implicados en todos los procesos patológicos y en todos los órganos de los sistemas, pero cuando se discute a fondo la genética de una enfermedad, sólo se puede considerar como aberración, aquellos desórdenes donde la variabilidad genética en la especie humana juega algún papel en la variabilidad y en las manifestaciones de este desorden (30). La mayoría de las enfermedades se encuentran en dos extremos, en uno de ellos están las que presentan alteraciones cromosómicas o enzimáticas y en donde el medio ambiente tiene un efecto pequeño. Sin embargo en el caso de otras, el medio ambiente o algunos genes de susceptibilidad pueden influir en el desarrollo de ella, tal es el caso de algunos padecimientos autoinmunes como la diabetes juvenil o la hepatitis crónica activa. En el otro lado del espectro, están las enfermedades que pueden afectar a todos los individuos expuestos a los factores ambientales, como la rabia o el sarampión. Por estos motivos es importante tomar en cuenta algunas consideraciones, para la evaluación de estudios de HLA y enfermedad:

1. Puesto que las frecuencias de antígenos HLA son diferentes en cada grupo étnico, tanto los sujetos sanos que se toman como testigos, como en los pacientes a estudiar, deben pertenecer a la misma población, para que la comparación tenga validez científica.

2. La clasificación empleada para el diagnóstico es crítica. Existen numerosas enfermedades que son heterogéneas y que están subdivididas en diferentes entidades clínicas de acuerdo con factores como: la edad de aparición, el sexo, las características inmunopatológicas etc., como la diabetes mellitus que se divide en cuatro tipos de los que sólo la diabetes juvenil insulino dependiente tiene ligamiento al sistema HLA, aparece predominantemente en la niñez y adolescencia y está asociada a alteraciones autoinmunes (31). Así pues, la selección de pacientes bajo un criterio universalmente establecido permite hacer un análisis más objetivo de la participación de factores genéticos, mientras que si se estudia indiscriminadamente sujetos agrupados bajo la consideración general de una enfermedad heterogénea, la interpretación de los resultados será inevitablemente errónea.

3. Debido al polimorfismo tan grande del sistema, es necesario siempre estudiar al mayor número de sujetos sanos y un número no menor de 50 pacientes, pues de otra forma una asociación puede resultar estadísticamente significativa por azar sin ser real. Por estos motivos se emplea una tabla de dos por dos (χ^2) y la probabilidad resultante debe corregirse multiplicando por el número de antígenos probados.

4. Debe distinguirse entre asociación y ligamiento. La asociación es una medida de la relación que hay en una población de individuos no relacionados, cuando dos características parti-

culares ocurren conjuntamente en una frecuencia diferente a la predicha (enfermedad y alelos HLA). En cambio el ligamiento sólo puede demostrarse en familias y se puede decir que existe susceptibilidad, cuando se observa que la enfermedad segrega en los hermanos enfermos con un mismo haplotipo HLA.

5. A partir de una asociación es posible calcular el riesgo relativo, que es una medida que indica cuantas veces más o menos frecuente puede ser una enfermedad en los individuos portadores del marcador HLA en relación a los individuos que no lo poseen.

Las enfermedades asociadas se pueden clasificar en cuatro grupos, de acuerdo al locus participante:

A). Enfermedades asociadas al locus A. La única confirmada es la hemocromatosis idiopática, que es una alteración del metabolismo del fierro y que ocurre en familias. En pacientes ingleses segrega con los haplotipos A3, B14 o A3, B7 en forma recesiva, y con frecuencia el otro cromosoma lleva el haplotipo A2, B12; lo que sugiere que participan dos genes distintos, ambos ubicados dentro del MHC (32).

B). Enfermedades asociadas al locus B. Dentro de esta categoría se hallan las espondiloartropatías seronegativas; la espondilitis anquilosante en la que del 90 al 95 % de los enfermos caucásicos son portadores del antígeno B27 (33). El síndrome de Reiter, la uveítis anterior aguda, la artritis reumatoide juvenil y la psoriasis artrítica con manifestaciones lumbares, también están asociadas a este antígeno. La participación del B27 en estos padecimientos prevalece en el mundo entero, lo cual indica que el antígeno o algo muy ligado a él están involucrados en el desarrollo de la lesión sacroiliaca. Además, la distribución geográfica tanto del antígeno como la de la enfermedad corren

paralelas. Es interesante señalar que en la población mexicana (21) el 68.7 % de los pacientes son B27 positivos frecuencia similar a la de los japoneses, lo que confirma una vez más la aportación genética mongoloide en nuestra población.

C). Enfermedades asociadas al locus C. La única confirmada es la psoriasis vulgar que es un padecimiento netamente familiar en el que la transmisión parece ser dominante y segrega con el antígeno Cw6 en todos los grupos humanos estudiados. Dicho antígeno está en fuerte desequilibrio de ligamiento con el B13, B17 o B39 dependiendo de los antecedentes clínicos (34).

D). Enfermedades asociadas al locus D/DR. En este grupo se incluyen por lo menos cuatro subgrupos diferentes de padecimientos de acuerdo a los antígenos D y DR que participan (DR2, DR3, DR4 y DR5).

1. En estos padecimientos se manifiesta el haplotipo B8, Dw3 y DR3; el rasgo común de ellos son las manifestaciones autoinmunes, como la enfermedad de Addison, el síndrome de Sjögren, hepatitis crónica activa (35), lupus eritematoso diseminado, síndrome de Guillan-Barré (36), enfermedad celíaca (37) y otras. La asociación en la mayoría de los casos es más intensa con el DR3, que con el Dw3 y por supuesto que con el B8.

2. Otro subgrupo de enfermedades, son las relacionadas con el haplotipo A3, B7, Dw2, DR2 en pacientes caucasoides con esclerosis múltiple; es este caso los estudios familiares han sido más difíciles debido a que no es muy común encontrar a varios pacientes en una misma familia. Curiosamente, también la distribución geográfica del haplotipo corre paralela con la distribución geográfica de la enfermedad, siendo ambos más comunes en el norte de Europa.

3. En este grupo se incluye la artritis reumatoide del adulto, asociada a los antígenos Dw4 y más intensamente al DR4 en casi todas las razas (38) incluyendo a nuestra población mexicana que además presenta una elevación de dos alelos, el Bw54 y el Aw31, ambos marcadores mongoloides, lo cual enfatiza la presencia de estos marcadores en los mestizos.

4. La tiroiditis de Hashimoto y la anemia perniciosa (39) dos enfermedades clásicamente autoinmunes y órgano específicas - han sido asociadas al sistema HLA, con los antígenos Dw5/DR5 y - sin relación al DR3, lo que las separa del otro grupo de enfermedades con patología autoinmune.

Se han postulado varios mecanismos para explicar la asociación de marcadores HLA con la enfermedad. Sin embargo la interpretación de dichas asociaciones no puede enfocarse de una forma simplista, ya que la naturaleza de los padecimientos y sus asociaciones son heterogéneas. Los mecanismos propuestos son:

1. Hipótesis de receptores. Los antígenos HLA pueden funcionar como receptores de la superficie celular de agentes patógenos particulares. Un ejemplo podría ser la enteropatía por - sensibilidad a gluten en la que los enfermos tienen un receptor para la gliadina y los antisueros anti-B8 son capaces de bloquear la unión del antígeno (40) sugiriendo que el antígeno B8 pudiera funcionar como receptor provocando así la formación de autoanticuerpos contra células del epitelio gástrico.

2. Mimetismo molecular. Es posible que haya similitud entre las estructuras propias de algunos agentes infecciosos con - algunas partes de la secuencia estructural de una molécula HLA; ésto se conoce como mimetismo molecular y puede conducir a que el aparato inmunocompetente se vea imposibilitado a desarrollar

una respuesta inmune contra el agente infeccioso, debido a la semejanza con el antígeno propio, lo que permite que el patógeno se instale en el organismo, promoviendo un estado de tolerancia hacia él; tal parece ser el caso de Klebsiella en sujetos con espondilitis anquilosante que son portadores del HLA-B27 (41).

3. Modificación de antígenos propios. Los productos de genes de los loci A y B permiten el reconocimiento a través de las células T citotóxicas, de células propias infectadas por virus o de células tumorales. Dichos antígenos pueden ser modificados por los virus, en su estructura tridimensional, y así las células efectoras las reconocen como extrañas y las eliminan. Hay evidencias en el humano de que este tipo de restricción existe por lo menos para el virus de influenza tipo 2 (42).

4. Genes de respuesta inmunológica. La capacidad de producir anticuerpos contra diversos antígenos de la naturaleza parecen estar determinados por los genes Ir. Sus funciones están fundamentalmente mediadas por algunas subpoblaciones de linfocitos T y por los macrófagos, por lo que se considera que existe una estrecha relación entre los productos de estos genes y la aparición o no de diversos estados patológicos. También se ha sugerido que existe un control genético de la respuesta inmunológica, debido a la presencia de las células T supresoras, mediada por genes de supresión inmunológica (Is) (43).

5. En las deficiencias de factores B, C2 o C4 del complemento, la enfermedad es familiar y segrega con haplotipos HLA particulares (A5, B18, DR2, Dw2) debido a que los genes que codifican para la producción de factores de complemento se encuentran dentro del MHC. Lo mismo ocurre con la deficiencia de la 21-hidroxilasa (44). Este ligamiento es porque los antígenos HLA están cerca de los verdaderos genes de susceptibilidad. Por lo -

tanto, la tipificación HLA resulta una herramienta de gran utilidad para señalar a los sujetos en riesgo cuando dicho haplotipo está presente.

Es pues, indudable que los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad están participando importantemente en procesos fisiológicos de regulación inmunológica y por lo tanto su alteración puede conducir a diversas patologías, y aunque no se sabe exactamente cual es el papel preciso de los antígenos HLA en los mecanismos de defensa, es indudable que existe una relación relevante entre su presencia y los diferentes mecanismos dirigidos a proporcionar ventajas selectivas para la supervivencia de la especie y posiblemente los antígenos asociados que se observan con diversas enfermedades confieren ventajas contra otros padecimientos que podrían conducir a la muerte, como es el caso de las infecciones. Un ejemplo de esto es que los sujetos A1, B8, DR3 tienen más riesgo de desarrollar diabetes, pero también son capaces de tener respuestas humorales intensas que posiblemente los protege más contra los microorganismos.

Los hallazgos en el campo de la asociación con la enfermedad, han sido sorprendentes (44) y han llevado a postular que algunos de los genes ubicados en el MHC pueden ser marcadores de susceptibilidad o de resistencia a la enfermedad. Las enfermedades infecciosas que constituyen un serio problema de salud pública en los países en proceso de desarrollo, deben ser un modelo de estudio a este nivel. Aunque es bien sabido que los factores socioeconómicos y culturales son decisivos en la incidencia y prevalencia de dichas enfermedades, surge la pregunta, de si existen factores genéticos de susceptibilidad a ellas, que ante estímulos externos adecuados permitan que se desencadene el padecimiento. Mas aun, cuando una enfermedad es hetero

génea e incluye dos o más manifestaciones, es posible considerar que algunos individuos son portadores de los genes responsables de que la enfermedad se exprese de una u otra forma.

Tal es el ejemplo de la lepra, la cual constituye un importante problema en salud pública en nuestro país, y afecta aproximadamente a 15 millones de individuos en el mundo y en México aproximadamente a 16 000 individuos (45).

7. Clasificación de la lepra.

La palabra "lepra" viene del griego "leŕis" que significa escama. En hebreo se designaba con la palabra "tsará at" derivado de "tsará" que significa "ser castigado por Dios" ya que se decía que Dios la enviaba para castigar a los pecadores pues privaba al hombre de la compañía de sus semejantes, haciéndolos repugnantes a la vista. Los enfermos que se creía padecían -- "lepra", eran aislados y cuando estaban fuera de su casa, tenían que manifestar su condición de "leprosos" portando una pata de ganso o haciendo sonar una campanilla (46).

Características de Mycobacterium leprae. El bacilo de lepra, pertenece a la familia de los Mycobacteriaceae, mide de 0.3 a 0.5 por 1.0 a 1.2 μm y es una bacteria ácido-alcohol-resistente posee actividad de citocromo oxidasa, fosfatasa alcalina y fenol oxidasa; tiene un tiempo de multiplicación de 20 a 30 días después de inoculado en el cojinete plantar del ratón, la cual puede ser inhibida con 4,4'-diaminodifenilsulfona (DDS), isoniazida, ácido para-amino salicílico o cicloserina.

Hasta el momento no se ha logrado cultivar el bacilo -- in vitro y la infección experimental solamente se ha podido inducir en ratón y más efectivamente en el armadillo.

Las investigaciones hechas hasta ahora señalan que no hay cepas genéticamente diferentes entre las *Mycobacterias* de la especie leprae, por lo que se piensa que la respuesta a la invasión del bacilo en las diferentes formas de lepra se debe en gran parte al estado inmunológico del paciente (47).

Según la clasificación de Ridley y Jopling (48) la lepra se divide en seis grupos: TT = polo tuberculoide; BT = tuberculoide indefinido; BB = indefinido; BL = lepromatoso indefinido; LLs = lepromatoso subpolar (antes llamado LI) y LLp = polo lepromatoso. Los grupos interpolares son: BT, BB y BL. El polo lepromatoso se subdivide a su vez en LLn = lepra lepromatosa nodular y LLd = lepra lepromatosa difusa (más grave) (49).

La lepra tuberculoide tiene una evolución benigna y en ella la respuesta inmunológica celular (RIC) funciona en forma normal por lo que el organismo se defiende adecuadamente en contra del bacilo de Hansen. Las lesiones cutáneas, son de color eritematoso, de bordes netos delimitados y bien localizados, los pacientes presentan trastornos de la sensibilidad, y el bacilo está ausente. Histológicamente se observa una estructura folicular. Los folículos están rodeados por células epiteloideas, que a su vez están circundadas por linfocitos. A menudo los nervios son atacados y se producen anestecias completas y a veces trastornos tróficos. La baciloscopía es casi siempre negativa; inmunológicamente se caracteriza por la positividad de la reacción de Mitsuda, indicando que la respuesta celular está intacta (50).

La lepra lepromatosa invade no solo a la piel en cualquier región y a los nervios que se engrosan, sino a todos los órganos y sistemas del organismo. La reacción inflamatoria es escasa o nula. La presencia de cuerpos bacilares circundantes provocan la formación de anticuerpos, los cuales se unen a ellos, fijan -

complemento y atraen a polimorfonucleares, que son muy abundantes en las lesiones cutáneas. Cuando los polimorfonucleares fagocitan a los complejos inmunes, liberan enzimas lisosómicas (hidrolasas) que atacan a los vasos provocando la formación del eritema nodoso, polimorfo o necrosante. En resumen, parece tratarse de un fenómeno de Arthus ya que el depósito de esos complejos además de lesionar los vasos cutáneos, también se depositan en órganos como el riñón, produciendo glomerulonefritis crónica que no pocas veces es causa de la muerte en pacientes que han tenido repetidos brotes de reacción leprosa (51). Bacteriológicamente, se caracteriza por la abundancia de bacilos a nivel de lesiones cutáneas, ganglionares o mucosas. Histopatológicamente se observan células de Virchow o células de espumadera, casi siempre cargadas de bacilos de Hansen. Desde el punto de vista inmunológico, hay una negatividad persistente a la reacción de Mitsuda y a la leprominorreacción. En los lepromatosos, hay un evidente deterioro de la inmunidad celular (mediada por linfocitos T) que es la defensa esencial contra patógenos intracelulares; en cambio se conserva muy bien la inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) (52).

8. Aspectos epidemiológicos de la lepra en México.

La mayoría de los autores están de acuerdo en considerar que la lepra no existía en América sino hasta la llegada de los conquistadores tanto españoles como portugueses (siglo XVI). Además, por el intenso comercio de la Nueva España con el Archipiélago de las Filipinas, donde existió un foco grande de lepra y la inmigración de chinos a través de los Puertos de San Blas, Manzanillo y Acapulco, se constituyeron tres focos endémicos en la República Mexicana: el occidental que va desde Sonora a Oaxaca, incluyendo a Guanajuato, Michoacán, Querétaro y México; el peninsular en Campeche y Yucatán y por último el Nororiental en Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas (53).

Al finalizar el año de 1979 había en el país 15 237 enfermos de lepra en registro activo, lo que representa una tasa de prevalencia de 0.22 por 1 000 habitantes. Durante 1980 se notificaron 621 casos nuevos, o sea 36 menos de los descubiertos en 1979; ésto confirma que la incidencia de la lepra en México muestra una tendencia descendente. En todas las entidades federativas, con excepción de Hidalgo, Puebla, Tabasco y Quintana Roo, se descubrieron casos nuevos de la enfermedad. Los estados que más notificaron fueron Sinaloa, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Sonora y Colima; de manera que incluyen el 67.9 % de los casos registrados en todo el país (cuadro III) (53).

Actualmente el problema es cada vez más urbano, ya que el hallazgo de casos nuevos, el 52 % de los enfermos residen en las ciudades. El 43 % de los pacientes se han descubierto a través de la consulta dermatológica y el 34 % fue localizado mediante la notificación, lo cual arroja un coeficiente de ataque de 1.8 por mil; a través de los contactos se identificaron un 21 % y un 2 % por otras causas. En términos generales, la detección no fue oportuna, y es importante señalar que una proporción del 72% de los pacientes no habían recibido tratamiento alguno (53).

La distribución en cuanto a las formas de lepra en México, se señalan en el cuadro IV resalta que las formas más frecuentes son la lepra lepromatosa y la forma lepromatosa indefinida (62%) mientras que sólo el 15 % son afectados por la forma tuberculoide. Cuando se analiza la población de la India por ejemplo, se observa en cambio que el mayor porcentaje de pecientes con lepra es de la forma tuberculoide (70 %) mientras que los pacientes con lepra lepromatosa es más bajo (17 %). La diferencia de la distribución geográfica de las dos formas de lepra, sugiere el predominio de éstas, de acuerdo a la raza, ya que no existen datos que señalen a que se deban las características propias del bacilo (47).

C U A D R O III

MORBILIDAD DE LEPRO EN LA REPUBLICA MEXICANA DURANTE 1980

Entidades	Número de casos	Tasa por 100 000 habitantes	Porcentaje del total nacional
1. Sinaloa	150	7.45	24.2
2. Colima	18	4.81	2.9
3. Jalisco	105	2.21	16.9
4. Guanajuato	66	2.08	10.6
5. Michoacán	57	1.82	9.2
6. Sonora	26	1.60	4.2
7. Morelos	16	1.56	2.6
8. Nayarit	11	1.35	1.8
9. Yucatán	13	1.29	2.1
10. Zacatecas	14	1.17	2.2
11. Guerrero	23	1.00	3.7
12. Oaxaca	25	0.98	4.0
13. Baja California Sur	2	0.93	0.3
14. Aguascalientes	4	0.81	0.6
15. Querétaro	5	0.71	0.8
16. Tamaulipas	15	0.68	2.4
17. Baja California Norte	5	0.33	0.8
18. Distrito Federal	32	0.32	5.1
19. San Luis Potosí	5	0.33	0.8
20. Campeche	1	0.25	0.2
21. Tlaxcala	1	0.25	0.2
22. México	12	0.15	1.9
23. Coahuila	2	0.13	0.3
24. Veracruz	6	0.11	1.0
25. Nuevo León	3	0.11	0.5
26. Chiapas	2	0.09	0.3
27. Durango	1	0.08	0.2
28. Chihuahua	1	0.04	0.2
T O T A L	921	0.86	100.0

Tomado de: Boletín de Epidemiología, 1981

C U A D R O IV

VARIETADES CLINICAS DE LEPRO NOTIFICADAS
EN LA REPUBLICA MEXICANA EN 1980

Forma clínica	Número de casos	%
Lepromatosa	350	56.84
Lepromatosa indefinida	36	5.80
Tuberculoide	93	15.00
Indefinido	142	22.80
T O T A L	621	100.00

Tomado de: Boletín de Epidemiología, 1981

Por edades, la mayor afección se encuentra a partir del segundo decenio de vida. Durante el año de 1980, 94.4 % de los pacientes tenían 15 años o más de edad y el 5.6 % eran menores. En cuanto al sexo 59.9 % pertenecían al masculino y 40.1 % al femenino, lo cual indica que no hay ligamiento al sexo pues la enfermedad se distribuye más o menos igual en ambos sexos. Sin embargo la frecuencia de casos de lepra tuberculoide es mayor entre el sexo femenino (58 % contra 42 %) y la lepra lepromatosa en el masculino (64 % contra 36 %) sugiriendo que cuando se analizan los casos en cuanto a las formas de lepra parece haber una mayor resistencia a la forma lepromatosa en las mujeres (54).

Por otro lado, hasta el 31 de diciembre de 1980 quedaron en registro activo 15 472 personas, ya que se registraron 684 casos nuevos y fueron eliminados 449 de los que la mayoría fueron por defunción (222), seguidos de 114 que alcanzaron la curación y los 113 restantes se perdieron, por causas desconocidas o porque emigraron a los Estados Unidos.

9. Relación de los marcadores del Complejo Principal de Histocompatibilidad con la lepra.

Debido a todo lo anterior, es decir, al hecho de ser infecciosa las seis formas diferentes en que se presenta, su diferencia aparente en la frecuencia en cuanto al sexo y la prevalencia de una forma determinada de acuerdo al grupo humano que afecte, el interés en la búsqueda de factores genéticos ha sido enorme y se han realizado varios estudios con el fin de comprobar si existe susceptibilidad o no y si el tipo de respuesta a la infección de Mycobacterium leprae pudiera estar determinada por un factor genético vinculado al sistema HLA en el hombre (55).

Los estudios inicialmente hechos se muestran en los cuadros V y VI. En el primero se indican los realizados con antígenos - de los loci HLA-A, -B y algunos aun con el -C; y en el segundo - los enfocados en relación a la región DR.

Los resultados muestran una gran diferencia en relación a los antígenos HLA-A, B y C. Sin embargo los estudios posteriores enfocados a los productos DR parecen señalar que existe una predisposición dada al menos en parte por estos antígenos o genes - ligados a ellos. Por estos motivos y dado que los trabajos previos en mexicanos (56, 57) sólo fueron realizados en pacientes - lepromatosos y no se exploraron los marcadores DR, se consideró importante ver la relación en pacientes mexicanos tanto tuberculoideos como lepromatosos, incluyendo los productos HLA-A, B, C y DR.

C U A D R O V

ASOCIACION DE LOS ANTIGENOS HLA-A, B y C EN LA LEPRO

Autores	Antígenos asociados	Grupo étnico	Número de pacientes	Número de testigos
Escobar y col. 1973 (56)	A2 ↓ A3 ↓	Mestizos-mexicanos	50	150
Thorsby y col. 1973 (58)	Bw21 LL	Etiopíes	39	26
Kreisler y col. 1974 (59)	B14 LL	Españoles	30	149
Reis y col. 1974 (60)	B5 ↑ LT (NS)	Brasileños	26	32
Smith y col. 1975 (61)	A10 ↑ B5 ↑ LT (NS)	Filipinos	82	50
Dasgupta y col. ~ 1975 (62)	A9	Indúes	70	40
Smith y col. 1975 (63)	B5 ↑ LT	Filipinos	82	50
Gorodezky y col. 1976 (57)	-----	Mestizos-mexicanos	50	90
Rea y col. 1976 (64)	-----	Mexicanos	92	315
Youngchaiyud y col. 1977 (65)	B40 ↑	Filipinos	36	150
Storner y col. 1978 (66)	-----	Familias africanas	23	27

LL Lepra lepromatosa
 LT Lepra tuberculoide
 NS No significativo
 --- Sin asociación

C U A D R O VI

ASOCIACION DE LOS ANTIGENOS HLA-DR EN LA LEPRO

Autores	Antígenos asociados	Grupo étnico	Número de pacientes	Número de testigos
Van Eden y col. 1979 (67)	DR2 LT	Indúes	-	-
Sujiyama y col. 1980 (68)	DR2 LT	Japoneses	408	111
Rea y col. 1980 (69)	DR2 LT (NS)	México-americanos	57	174
De Vries y col. 1980 (70)	DR2 LT	Familias indúes	13	-
Van Eden y col. 1981 (71)	DR2 LT (NS)	Indúes	78	129
Van Eden y col. 1982 (1)	DR3 LT	Negros caucasoides surianos	73	92

LT Lepra tuberculoide

NS No significativo

--- No especificado

III. OBJETIVOS

1. Determinar la distribución de los antígenos HLA y grupos sanguíneos ABO y Rh en un grupo de sujetos sanos y uno de pacientes que incluye las dos formas polares de lepra (lepromatosa y tuberculoide). Todos ellos pertenecientes a la población mestiza mexicana.

2. Comparación de los resultados obtenidos en las frecuencias de los antígenos HLA y grupos sanguíneos entre los pacientes y los testigos, mediante las pruebas estadísticas de χ^2 corregida por Yates y del riesgo relativo.

3. Análisis comparativo de las diferentes formas de lepra y su correlación con los marcadores genéticos. Así mismo, se comparan los resultados obtenidos en la población sana contra los de cada subgrupo de pacientes con lepra.

4. Establecer, si existe asociación con algún antígeno HLA que pueda sugerir la presencia de un factor genético de susceptibilidad o resistencia a nivel del sistema HLA en alguna de las formas de lepra, para la población mexicana. En caso afirmativo, determinar el riesgo que tienen los portadores del antígeno de desarrollar el padecimiento.

5. Investigar la presencia de genes de respuesta inmune (Ir) al correlacionar los antígenos de HLA en cada paciente con su respuesta "in vivo" a los antígenos de Mycobacterium leprae.

IV. MATERIAL Y METODO

1. Poblaciones de estudio:

a) Grupo de testigos. En este grupo se incluyeron 100 personas aparentemente sanas tomadas al azar, provenientes del personal y de estudiantes de los cursos impartidos en el Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas, SSA y del Banco de Sangre del Hospital de la Mujer, SSA; todos ellos formaron parte de la población mestiza mexicana. Las edades de esta población oscilaron entre los 13 y los 65 años con un promedio de 30.2. Se estudiaron 48 mujeres y 52 hombres.

b) Grupo de pacientes. Se integraron 76 pacientes con lepra, de los cuales 30 presentaron la forma tuberculoide y 46 la forma lepromatosa. Todos eran mestizos mexicanos, la edad del grupo total de pacientes oscilaba entre 11 y 84 años con un promedio de 47.3; se incluyeron 52 hombres y 24 mujeres. En el subgrupo de lepra lepromatosa la edad osciló entre los 28 y 72 años con una media de 46.6 y estaba constituido por 36 hombres y 10 mujeres. Las edades de los pacientes con lepra tuberculoide variaron entre los 11 y 84 años con un promedio de 48.4; 16 pacientes eran del sexo masculino y 14 del sexo femenino.

En cuanto al lugar de origen de los pacientes, el 70 % eran procedentes del Antiplano Central (Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal y Jalisco); un 10 % del sureste de la República (Yucatán) y un 15 % del Pacífico (Guerrero).

Las instituciones de donde provinieron los pacientes fueron: Centro Dermatológico "Dr. Ledislao Pacua", SSA; Unidad de Especialidades, Departamento de Dermatología del Centro Médico La Raza, IMSS; Hospital "Dr. Pedro López", SSA, Zoquiapan, Edo. de México; Centro Dermatológico "Dr. Gea González", SSA.

El diagnóstico de la enfermedad se hizo siguiendo los criterios de clasificación de Ridley y Jopling (48) y se incluyeron - los siguientes parámetros: historia clínica completa; la prueba cutánea (reacción de Mitsuda); análisis histopatológico y pruebas bacteriológicas (técnica de Say Arako).

a) Toma de muestras. Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica, utilizando como anticoagulante heparina 1 000 UI/ml (0.2 ml). De cada muestra se separaron los linfocitos y se procedió como se describe posteriormente.

b) Tipificación de grupos sanguíneos. Esta determinación se realizó por el método descrito más adelante, sobre una gota de sangre heparinizada.

c) Tipificación de antígenos HLA. Se utilizó el método estándar de microlinfocitotoxicidad usando antisueros anti-HLA específicos. La respuesta se midió por el porcentaje de muerte celular debido a la interacción de los antígenos en la membrana con los antisueros específicos y el complemento. Después de obtener los resultados (ver técnica de microlinfocitotoxicidad) se determinó el fenotipo de cada sujeto estudiado.

d) Determinación de frecuencias y análisis estadístico de los resultados. Se calcularon las frecuencias antigénicas y genéticas (ver análisis estadístico) de los antígenos de cada uno de los locus del sistema HLA, con el fin de hacer las comparaciones necesarias y analizar los resultados empleando la prueba de χ^2 corregida por Yates. Si el valor de la probabilidad era significativo, se calculó el riesgo relativo que presentaban los pacientes de desarrollar la enfermedad frente al antígeno que haya resultado incrementado.

Antisueros anti-HLA

Se utilizaron sueros humanos que contienen anticuerpos citotóxicos anti-HLA, provenientes de los Séptimo y Octavo Talleres - Internacionales de Histocompatibilidad (12, 13) y del Segundo Taller Latinoamericano de Histocompatibilidad, IVIC, Caracas, Venezuela, 21-25 de febrero, 1982; de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y antisueros de origen mexicano obtenidos en el Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas de la SSA. Se empleó un total de 303 reactivos, de los cuales 258 fueron monoespecíficos y 45 biespecíficos, con un promedio de 4 antisueros que definen a una misma especificidad. Los sueros empleados identifican a los siguientes antígenos:

Locus HLA-A. 1, 2, 3, 9, 10, 11, 19, w23 (9), w24 (9), 25 (10), 26 (10), 28, 29, w30, w31, w32, w33, w34, w36 y w43.

Locus HLA-B. 5, 7, 8, 12, 13, 14, 15, w16, w17, 18, w21, - w22, 27, w35, 37, w38 (16), w39 (16), 40, w41, w42, w44 (12), w45 (12), w46, w47, w48, w49 (21), w50 (21), w51 (5), w52 (5), w53, - w54 (22), w4 y w6.

Locus HLA-C. w1, w2, w3, w4, w5, w6 y w7.

Locus HLA-DR. 1, 2, 3, 4, 5, w6, 7, w8 y w9.

METODOS

SEPARACION DE LINFOCITOS TOTALES POR GRADIENTE DE FICOLL-HYPaque (72)

1. Se toman 20 ml de sangre venosa heparinizada.
2. Se diluye la sangre con un volumen igual de solución de Hanks normal.
3. En dos tubos de plástico de 13 x 100 mm se colocan 2 ml de ficoll-hypaque (en cada tubo).
4. Se estratifica la sangre diluída cuidadosamente, sobre la solución de ficoll-hypaque.
5. Se centrifuga a 1 500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Después de la centrifugación, se aspiran con una pipeta Pasteur los linfocitos que forman un anillo blanco sobre la interfase y se colocan en otro tubo.
7. El paquete de linfocitos, se diluye con un volumen igual de Hanks normal y se centrifuga a 1 000 rpm durante 10 minutos, con el fin de eliminar plaquetas.
8. Se tira el sobrenadante y el paquete se resuspende en 5 ml de solución de Hanks y se distribuye en tubos Fisher.
9. Se centrifuga a 4 000 g un minuto.
10. Se tira el sobrenadante y se hacen 4 lavados más, con solución de Hanks a 1 000 g durante 1 minuto.
11. Se verifica que no haya plaquetas.
12. Se hace un último lavado con medio TC 199. Se resuspende en 0.5 ml de medio TC 199 con 5 % de STF.

PURIFICACION DE LINFOCITOS T y B POR COLUMNA DE NYLON (73)

1. Los linfocitos purificados por gradiente (ver técnica - de separación de linfocitos totales) se pasan por la columna (ver preparación de columna) hasta que todo el líquido penetre a la la na. Inmediatamente después, se coloca la columna en forma hori-- zontal y se le agrega medio TC 199 en el extremo abierto, para e- vitar la evaporación.

2. Se incuba horizontalmente durante 30 minutos a 37° C.

3. Se coloca la columna sobre un tubo marcado como linfoci- tos T y se deja escurrir el contenido.

4. Se lava de 3 a 5 veces con alícuotas de 5 ml de medio - TC 199 que contiene STF al 5 %, previamente calentado durante 30 minutos a 37° C.

5. Los linfocitos B que se han adherido al nylon, se recu- peran en otro tubo marcado como linfocitos B, presionando y expri- miendo el nylon con los dedos.

6. Se repite el procedimiento 2 o 3 veces con alícuotas de 5 ml de medio TC 199 al 0.5 % de STF frío, hasta que el medio sal- ga totalmente transparente.

7. Se centrifugan las células T y B a 1 500 rpm durante 5 minutos. Se tira el sobrenadante y se ajustan las células T a 2×10^6 /ml.

8. Los linfocitos B se resuspenden en 1 ml de medio y se - les agrega 1 gota de trombina. Se agita durante 1 minuto manual- mente y se centrifuga a 1 000 g durante 3 segundos.

9. Se recupera el sobrenadante. Se lavan con medio TC 199 y se ajustan a 2×10^6 /ml.

TIPIFICACION DE GRUPOS SANGUINEOS (74).

1. En un portaobjetos, se colocan 3 gotas separadas de sangre.
2. Sobre cada una de las gotas de sangre, se agrega 1 gota de cada uno de los antisueros específicos para los grupos A y B; y una gota de anti Rh.
3. Con un aplicador se mezcla cada uno de los antisueros con su gota de sangre.
4. Se mueve lentamente durante 1 minuto. Si hay aglutinación, ese antígeno está presente.

PREPARACION DE MICROPLACAS PARA CITOTOXICIDAD

1. Se marcan las cajas que se utilizaron para el estudio - como 06, 07, 08, 09 y 10, las 4 primeras se utilizaron para los antisueros de los loci A, B y C y la última para los antisueros del locus DR.
2. Se agrega 1 gota de aceite mineral (Nujol), en cada una de las excavaciones de las microplacas.
3. Se agrega 1 ul de antisuero específico para los loci A, B, C y DR en cada uno de los pocitos de las cajas para citotoxicidad
4. Se confirma la relación de los antisueros de trabajo en hojas que servirán para anotar las lecturas, cuando se trabajen las poblaciones de estudio. Una vez montados los antisueros en cada uno de los 60 pocitos de las microplacas, se guardan a -70° C hasta su uso.

TIPIFICACION DE ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD POR LA TECNICA -
DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD (72)

1. En cada uno de los pocitos de las cajas con antisueros específicos para los loci A, B y C se coloca 1 ul de la suspensión de linfocitos T y en las cajas con antisueros específicos para el locus DR se coloca 1 ul de linfocitos B.

2. Las cajas con antisueros para los loci A, B y C se incuban durante 30 minutos a 37° C y las cajas con antisueros para el locus DR se incuban a 37° C por 60 minutos.

3. Se agregan 5 ul de complemento a cada excavación. A las placas para A, B y C se les agrega el complemento preparado localmente y a las placas DR, el complemento especial para DR.

4. Las cajas con antisueros A, B y C se incuban a 37° C durante 60 minutos. Las cajas para el locus DR, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 2 horas.

5. Se agregan 5 ul de solución de eosina a cada pocito, se agita en vortex y se deja reposar de 3 a 5 minutos.

6. Se agregan 5 ul de formol.

7. Se lee en un microscopio invertido a 250 aumentos y bajo la luz de contraste de fases. Se calcula el número de células vivas y muertas. Estas últimas se ven opacas, grandes y planas - por haber sido dañadas por la acción del complemento y haber penetrado el colorante; mientras que las vivas se ven pequeñas, refringentes y convexas.

8. Los resultados se informan de la siguiente manera:

<u>% de mortalidad</u>	<u>Calificación</u>
0 al 20	1
21 al 30	2
31 al 40	4
41 al 74	6
75 al 100	8

2. Análisis estadístico.

Se calcula la frecuencia antigénica y la frecuencia génica para cada antígeno HLA en cada uno de los grupos. Para evaluar si había asociación con algún antígeno, se compararon las frecuencias de testigos contra pacientes para cada antígeno mediante el uso de la χ^2 corregida por Yates (75).

Posteriormente se determinó la probabilidad (p) para cada comparación y las que dan un valor menor de 0.05 se consideran estadísticamente significativas.

Para estar seguros de que la diferencia no es debida al azar, se corrige el valor p multiplicándolo por el número de antígenos estudiados, en este caso 57.

La frecuencia antigénica es el número de veces con que se presenta un determinado antígeno en una población, o sea el producto de un gene dado.

La frecuencia génica, es el número de veces con que se presenta un determinado cromosoma con su información genética correspondiente en una población y como esta información es diploide la frecuencia génica es generalmente la mitad del valor de la frecuencia antigénica.

La frecuencia antigénica se obtiene tomando el número total de casos observados como el 100 % y por medio de una regla de tres se obtiene la de cada antígeno; por ejemplo:

Sujetos positivos al antígeno = 13

Total de sujetos = 76

$$\begin{array}{r} 76 \text{ - - - - } 100 \\ 13 \text{ - - - - } \lambda \end{array} \quad \lambda = 17.105$$

Por lo tanto, la frecuencia antigénica es 17.105 %.

La frecuencia génica se obtiene con la ecuación de Halden (76)

Frecuencia génica = $1 - \sqrt{1 - \lambda}$ donde: λ = frecuencia antigénica en números absolutos.

Ejemplo: si la frecuencia antigénica es = 17.105

$$\lambda = 0.17105$$

Sustituyendo la fórmula: $1 - \sqrt{1 - 0.17105}$

La frecuencia génica es igual a 0.088

La χ^2 corregida por Yates (76), se determina por medio de la siguiente fórmula:

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

Donde:

a = Número de testigos positivos para el antígeno tratado.

b = Número de pacientes positivos para el antígeno tratado.

c = Número de testigos negativos para el antígeno tratado.

d = Número de pacientes negativos para el antígeno tratado.

n = Suma total de casos estudiados (testigos + pacientes)

Ejemplo:

$$a = 2$$

$$b = 8$$

$$c = 44$$

$$d = 22$$

$$n = 76$$

$$\chi^2 = \frac{[(44 - 352) - 38]^2 \times 76}{46 \times 30 \times 10 \times 66} = \frac{9098416}{910800} = 9.989$$

Por último se calcula el riesgo relativo (RR) que es una medida que permite decir que tan probable es que un sujeto portador del actígeno, que se halló incrementado en los pacientes, pueda desarrollar el padecimiento.

La fórmula es:

$$RR = \frac{(p+) (t-)}{(p-) (t+)}$$

Donde:

p+ = Número de pacientes positivos para el antígeno tratado

p- = Número de pacientes negativos para el antígeno tratado

t+ = Número de testigos positivos para el antígeno tratado

t- = Número de testigos negativos para el antígeno tratado

Ejemplo: RR para el antígeno HLA-B5

$$p+ = 10$$

$$p- = 30$$

$$t+ = 10$$

$$t- = 90$$

$$RR = \frac{10 \times 90}{30 \times 10} = \frac{900}{300} = 3$$

V. RESULTADOS

La distribución de edades y sexo en cada una de las poblaciones de estudio, está expresada en el cuadro VII, observándose que el sexo masculino predomina en todas las poblaciones, principalmente en la lepra lepromatosa (78.3 %). En cuanto a la distribución de grupos sanguíneos que se señalan en el cuadro VIII, el tipo O positivo es el más frecuente en todas las poblaciones estudiadas. La respuesta de los pacientes a la prueba de intradermorreacción de Mitsuda (cuadro IX) resultó positiva en todos los pacientes tuberculoides presentándose induración después de los 21 días con un diámetro mínimo de 5 mm, concordando con lo esperado.

Las frecuencias antigénicas y génicas para todos los antígenos HLA fueron determinados en las poblaciones de testigos, pacientes y en los subgrupos de pacientes (lepromatosos y tuberculoides). Los resultados obtenidos para el locus A, se muestran en los cuadros X y XI y al comparar las diferentes poblaciones entre sí, se observa que la frecuencia génica del antígeno A25 en los testigos y en los pacientes de lepra tuberculoides presentan una importante diferencia (2.02 y 6.90 respectivamente). Así como una disminución en los mismos grupos de los antígenos A11 (1.68) y Aw31 (3.39) al compararlos con los testigos (6.19 y 8.35 respectivamente).

Las frecuencias para antígenos del locus B se expresan en los cuadros XII y XIII, observándose una disminución en el antígeno Bw44 en las frecuencias génicas de los pacientes con lepra tuberculoides (1.68) al compararla con los testigos (7.80). Las del locus C (cuadros XIV y XV) no mostraron ninguna diferencia. Finalmente los datos para el locus DR se encuentran en los cuadros XVI y XVII observándose una diferencia importante en los pacientes de lepra tuberculoides para el antígeno DR3 (16.33) al compararlo con los testigos (5.48), así como para el locus DR2 (24.72) para los pacientes y un valor génico de 16.73 para los testigos.

Es necesario hacer notar que en cada locus se encuentra incluida una columna llamada Blancos. Esta designación se emplea cuando no se logra asignar los dos antígenos de la región que debe poseer cada individuo.

Los resultados del análisis estadístico se muestran en el cuadro XVIII. De acuerdo a los valores de la χ^2 , los antígenos A25 y DR3 se encontraron significativamente incrementados en los pacientes tuberculoideos ($p = 0.02$ para el A25 y $p = 0.006$ para el DR3) Sin embargo, al corregir los valores de la probabilidad por el número de comparaciones hechas, se perdió el significado estadístico en ambos casos. No obstante es interesante señalar que los valores del riesgo relativo para los dos antígenos fue un poco mayor de tres.

C U A D R O VII

EADES Y SEXO EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

	Testigos	Lepra lepomatosa	Lepra tuberculoide	Pacientes totales
Número total	100	46	30	76
Sexo				
Masculino	52 (52)*	36 (78.3)	16 (53.3)	52 (68.4)
Femenino	48 (48)	10 (21.7)	14 (46.7)	24 (31.6)
\bar{x} de edad	30.2 \pm 5	46.4 \pm 5	48.4 \pm 5	47.3 \pm 5

* % en paréntesis.

C U A D R O VIII

DISTRIBUCION DE GRUPOS SANGUINEOS

Grupo sanguíneo	Testigos	Lepra lepromatosa	Lepra tuberculoide	Pacientes totales
A	23 (23)*	9 (19.6)	9 (30)	18 (23.7)
B	7 (7)	4 (8.7)	3 (10)	7 (9.2)
AB	1 (1)	1 (2.1)	0 (0)	1 (1.3)
O	69 (69)	32 (69.6)	18 (60)	50 (65.8)
Rh+	98 (98)	46 (100.0)	30 (100.0)	76 (100.0)

* % en paréntesis.

C U A D R O IX

INTRADERMORREACCION DE MITSUDA EN LOS SUJETOS CON LEPPRA

Intradermorreacción	Lepra lepromatosa	Lepra tuberculoide	Pacientes totales
Positiva*	0	30	30
Negativa	46	0	46

* Cuando hay eritema y la induración después de 21 días es mayor de 0.5 mm de diámetro.

C U A D R O X

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL LOCUS A EN LAS POBLACIONES DE 100 TESTIGOS Y 76 PACIENTES CON LEPRO

Especificidad	T E S T I G O S			PACIENTES TOTALES		
	Casos (N=100)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Casos (N=76)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
A1	17	17.0	8.89	13	17.10	8.95
A2	33	33.0	18.15	17	22.36	11.84
A3	9	9.0	4.60	13	17.10	8.95
A9	41	41.0	22.33	33	43.42	23.6
A10	17	17.0	8.71	14	18.41	9.47
A11	12	12.0	6.19	8	10.52	5.41
Aw19	57	57.0	29.37	25	32.87	16.75
Aw20 (9)	2	2.0	1.01	7	9.21	4.72
Aw24 (9)	34	34.0	18.76	26	34.21	18.88
A25 (10)	4	4.0	2.02	10	13.15	6.81
A26 (10)	12	12.0	6.19	4	5.26	2.66
A28	13	13.0	6.72	12	15.78	8.23
A29 (19)	6	6.0	3.05	2	2.63	1.32
Aw30 (19)	5	5.0	2.53	3	3.94	1.99
Aw31 (19)	16	16.0	8.35	8	10.52	5.41
Aw32 (19)	6	6.0	3.05	7	9.21	4.72

C U A D R O X (Continuación)

Aw33 (19)	3	3.0	1.51	2	2.63	1.32
Aw34 (19)	5	5.0	2.53	3	3.94	1.99
Aw36	0	0	0	0	0	0
Aw43	0	0	0	0	0	0
Blancos	17	17.0	8.89	17	22.36	11.89

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

() = Los antígenos amplios a los cuales pertenecen cada uno de los subtipos señalados;
Ejemplo: Los antígenos A25 y A26 forman parte del A10.

C U A D R O X I

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL LOCUS A, EN 46 PACIENTES CON LEPRO LEPROMATOSA
Y 30 PACIENTES CON LEPRO TUBERCULOIDE

Especificidad	Casos (N=46)	LEPRO LEPROMATOSA		Casos (N=30)	LEPRO TUBERCULOIDE	
		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
A1	8	17.39	9.11	5	16.66	8.71
A2	9	19.56	10.31	8	26.67	14.38
A3	7	15.21	7.92	6	20.0	10.29
A9	19	41.13	22.35	14	46.70	25.57
A10	6	13.05	6.65	6	20.0	10.29
A11	7	15.21	7.92	1	3.33	1.68
A19	20	43.46	22.31	7	23.33	11.88
Aw23 (9)	4	8.70	4.45	3	10.0	5.13
Aw24 (9)	15	32.60	17.90	11	36.70	20.44
Aw25 (10)	2	4.35	2.20	4	13.33	6.90
Aw28 (10)	4	8.70	4.45	0	0	0
Aw28	6	13.04	6.75	5	16.66	8.71
Aw29 (19)	1	2.17	1.09	1	3.33	1.68
Aw30 (19)	2	4.35	2.20	1	3.33	1.68
Aw31 (19)	7	15.21	7.92	2	6.67	3.39
Aw32 (19)	5	10.86	5.59	3	10.0	5.13
Aw33 (19)	2	4.35	2.20	0	0	0

C U A D R O X I (Continuación)

Aw34 (19)	3	6.52	3.31	0	0	0
Aw36	0	0	0	0	0	0
Aw43	0	0	0	0	0	0
Blancos	10	21.73	11.53	7	23.30	12.44

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

() = Los antígenos amplios a los cuales pertenecen cada uno de los subtipos señalados.

C U A D R O X I I

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL LOCUS B EN LAS POBLACIONES DE 100 TESTIGOS Y 76 PACIENTES CON LEPRO

Especificidad	T E S T I G O S			PACIENTES TOTALES		
	Casos (N=100)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Casos (N=76)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
B5	23	23.0	11.84	19	24.99	12.81
B7	9	9.0	4.61	13	17.10	8.95
B8	4	4.0	2.02	4	5.26	2.67
B12	19	19.0	9.82	18	23.68	12.22
B13	6	6.0	3.04	7	9.21	4.72
B14	8	8.0	4.08	5	6.57	3.34
B15	14	14.0	7.26	10	13.15	6.81
Bw16	19	19.0	9.73	4	5.26	2.67
B17	10	10.0	5.04	8	10.52	5.41
B18	7	7.0	3.56	5	6.57	3.34
Bw21	3	3.0	1.51	1	1.31	0.66
Bw22	2	2.0	1.01	4	5.26	2.67
B27	6	6.0	3.05	6	7.89	4.03
Bw35	7	7.0	3.56	12	15.78	8.23
B37	3	3.0	1.51	3	3.94	1.99
Bw38 (16)	10	10.0	5.13	4	5.26	2.67
B-39 (16)	9	9.0	4.61	3	3.94	1.99
B40	21	21.0	10.73	14	18.42	9.68

C U A D R O XII (Continuación)

Bw41	0	0	0	1	1.31	0.66
Bw42	4	4.0	2.02	1	1.31	6.66
Bw44 (12)	15	15.0	7.80	9	11.84	6.11
Bw45 (12)	4	4.0	2.02	9	11.84	6.11
Bw47	1	1.0	0.50	1	1.31	0.66
Bw49 (21)	3	3.0	1.51	1	1.31	0.66
Bw51	13	13.0	6.73	9	11.84	6.11
Bw52	9	9.0	4.61	6	7.89	4.03
Bw53	2	2.0	1.01	1	1.31	0.66
Bw54	0	0	0	0	0	0
Blancos	19	19.0	10.0	12	15.78	8.23

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

() = Los antígenos amplios a los cuales pertenecen cada uno de los subtipos señalados; ejemplo: los antígenos Bw38 y Bw39 forman parte del Bw16.

C U A D R O XIII

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL LOCUS B, EN 46 PACIENTES CON LEPRO LEPROMATOSA
Y 30 PACIENTES CON LEPRO TUBERCULOIDE

Especificidad	Casos (N=46)	LEPRO LEPROMATOSA		Casos (N=30)	LEPRO TUBERCULOIDE	
		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
B5	9	19.57	9.96	10	33.33	17.46
B7	7	15.21	7.92	6	20.0	10.56
B8	2	4.35	2.20	2	6.67	3.39
B12	15	32.60	17.03	3	10.0	5.13
B13	4	8.70	4.45	4	13.33	6.90
B14	4	8.70	4.45	1	3.33	1.68
B15	4	8.70	4.45	6	20.0	10.56
Bw16	4	8.70	4.45	3	10.0	5.13
B17	4	8.70	4.45	4	13.33	6.90
B18	5	10.86	5.59	0	0	0
Bw21	0	0	0	0	0	0
Bw22	2	4.35	2.20	2	6.67	3.39
B27	3	6.52	3.31	3	10.0	5.13
Bw35	8	17.39	9.11	4	13.33	6.90
B37	3	6.52	3.31	0	0	0
Bw38 (16)	2	4.35	2.20	2	6.67	3.39

C U A D R O XIII (Continuación)

Bw39 (16)	2	4.35	2.20	1	3.33	1.68
340	8	17.39	9.11	6	20.0	10.56
Bw41	1	2.17	1.09	0	0	0
Bw42	0	0	0	1	3.33	1.68
Bw44 (12)	8	17.39	9.11	1	3.33	1.68
Bw45 (12)	7	15.21	7.92	2	6.67	3.39
Bw47	1	2.17	1.09	0	0	0
Bw49 (21)	0	0	0	1	3.33	1.68
Bw51	3	6.52	3.31	6	20.0	10.56
Bw52	2	4.35	2.20	4	13.33	6.90
Bw53	1	2.17	1.09	0	0	0
Bw54	0	0	0	0	0	0
Blancos	7	15.21	7.92	4	13.33	6.90

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

() = Los antígenos amplios a los cuales pertenecen cada uno de los subtipos señalados.

C U A D R O XIV

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL LOCUS C EN LAS POBLACIONES DE 100 TESTIGOS Y 76 PACIENTES CON LEPRO

Especificidad	T E S T I G O S			PACIENTES TOTALES		
	Casos (N=100)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Casos (N=76)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
Cw1	17	17.0	8.89	16	21.05	11.15
Cw2	23	23.0	12.25	20	26.31	14.16
Cw3	47	47.0	27.20	34	44.73	25.66
Cw4	32	32.0	17.54	21	27.63	14.93
Cw5	4	4.0	2.02	3	3.94	1.99
Cw6	6	6.0	3.05	1	1.31	0.66
Cw7	6	6.0	3.05	4	5.26	2.67
Blancos	65	65.0	40.8	53	69.74	44.99

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

C U A D R O X V

FRECUENCIA DE ANTIGENOS DEL LOCUS C, EN 46 PACIENTES CON LEPROMA LEPROMATOSA
Y 30 PACIENTES CON LEPROMA TUBERCULOIDE

Especificidad	Casos (N=46)	LEPROMA LEPROMATOSA		Casos (N=30)	LEPROMA TUBERCULOIDE	
		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
Cw1	14	30.43	16.59	3	10.00	5.13
Cw2	10	21.74	11.54	10	33.33	18.35
Cw3	18	39.13	21.98	15	50.0	29.28
Cw4	16	34.78	19.24	5	16.67	8.71
Cw5	2	4.35	2.20	1	3.33	1.68
Cw6	1	2.17	1.09	0	0	0
Cw7	4	8.70	4.44	0	0	0
Diferencia	27	58.69	35.73	26	86.66	63.48

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

C U A D R O XVI

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL LOCUS DR EN LAS POBLACIONES DE 100 TESTIGOS Y 76 PACIENTES CON LEPRO

Especificidad	T E S T I G O S			PACIENTES TOTALES		
	Casos (N=100)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Casos (N=76)	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
DR1	9	9.0	6.19	17	22.36	11.88
DR2	23	23.0	16.73	24	31.58	17.28
DR3	8	8.0	5.48	17	22.36	11.88
DR4	18	18.0	12.82	28	36.84	20.52
DR5	14	14.0	9.82	17	22.36	11.88
DRw6	-	-	-	6	7.89	4.02
DR7	25	25.0	18.35	18	23.68	12.64
DR8	18	18.0	12.82	9	11.84	6.11
DRw9	-	-	-	2	2.63	1.32
Biancos	35	35.0	26.97	14	18.42	9.68

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

- = No trabajado.

C U A D R O XVII

FRECUENCIA DE ANTIGENOS DEL LOCUS DR, EN 46 PACIENTES CON LEPROMATOSA
Y 30 PACIENTES CON LEPRO TUBERCULOIDE

Especificidad	Casos (N=46)	LEPRO MATOSA		Casos (N=30)	LEPRO TUBERCULOIDE	
		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica		Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
DR1	13	28.26	15.30	4	13.33	6.90
DR2	11	23.91	12.77	13	43.33	24.72
DR3	8	17.39	9.11	9	30.0	16.33
DR4	21	45.65	26.28	7	23.33	12.44
DR5	11	23.91	12.77	6	20.0	10.56
DRw6	4	8.70	4.44	2	6.67	3.39
DR7	9	19.57	10.31	9	30.0	16.33
DR8	6	13.04	6.74	3	10.0	5.13
DRw9	0	0	0	2	6.67	3.39
Blancos	9	19.57	10.32	5	16.67	8.71

N = Total de casos estudiados.

Las frecuencias antigénicas y génicas están expresadas en porcentaje.

C U A D R O XVIII

SIGNIFICADO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS EN LOS
PACIENTES TUBERCULOIDES COMPARADOS CONTROS LOS SUJETOS SANOS

Especificidad	χ^2	Yates ¹	p ²	p _c ³	RR ⁴
HLA-A25	5.284		0.02	1.14	3.69
HLA-DR3	7.413		0.006	0.3	3 58

1. Prueba estadística de χ^2 corregida por Yates.
2. Probabilidad.
3. Probabilidad corregida.
4. Riesgo relativo.

VI. DISCUSION

Los resultados del presente estudio, muestran que en relación a la edad la distribución entre el grupo total de pacientes y los testigos es prácticamente igual y la diferencia se hace menor al comparar los subgrupos de pacientes entre sí. Estos hallazgos señalan que no hay predominio de edad para desarrollar alguna de las formas polares de lepra y que el bacilo es capaz de infectar a los individuos en cualquier etapa de la vida, aunque los pacientes más jóvenes no eran menores de 11 años.

Por lo que se refiere al sexo, cabe señalar que la enfermedad aparece con mayor frecuencia en el sexo masculino que en el femenino (68.4 contra 31.6 %) y curiosamente la preferencia por el primero se hace aun más notoria en los afectados con la forma lepromatosa, ya que el 78.3 % eran hombres, mientras que en la forma tuberculoide el 53.3 % pertenecían a dicho sexo. Estos datos podrían sugerir que hay un ligamiento al sexo, sin embargo es posible que uno de los factores determinantes en cuanto a la mayor incidencia en hombres sea debido a la función de las glándulas endócrinas (54). Por otro lado sólo el 21.7 % de los lepromatosos eran mujeres y es bien sabido que durante la pubertad, ellas presentan resistencia a la infección por el bacilo de Hansen y entre los 20 y 29 años época durante la cual en general la mujer presenta su actividad sexual más intensa hay menor probabilidad de contraer la enfermedad, mientras que en la menopausia hay mayores posibilidades de que sea infectada (54).

En relación a la distribución de grupos eritrocitarios, no se encontró ninguna asociación ni al tomar al grupo de pacientes global, ni al fraccionar a los pacientes en los dos subgrupos, como se puede ver en el cuadro VIII. Estos datos señalan que no hay ninguna participación de estos marcadores, codificados genéti

camente en la predisposición o no a la lepra o a la expresión de cualquiera de sus formas.

Como ya se mencionó anteriormente, los pacientes con lepra tuberculoide presentan su respuesta inmunológica celular intacta, por lo que era de esperarse que la prueba de Mitsuda fuera positiva, y en efecto, el 100 % de los casos presentó una reacción inflamatoria. En cambio los 46 pacientes con diagnóstico de lepra lepromatosa fueron incapaces de responder a la prueba cutánea, lo cual confirma que la respuesta inmunológica celular se encuentra francamente abatida (ver cuadro IX).

La distribución de antígenos tanto A, B, C como DR en las diferentes poblaciones raciales que se muestran en el cuadro II, indican cuan importante es hacer estudios de asociación con enfermedad en grupos raciales iguales. El fondo genético HLA en la población mexicana es diferente al de otros grupos. Así, los antígenos de mayor frecuencia son el A2, Aw24, B5, Bw35, B40, Cw1, Cw3 y Cw4 para las regiones A, B y C. Indudablemente el patrón es muy propio de mexicanos aunque es claro el aporte de genes provenientes de otros grupos. Los antígenos más frecuentes son el DR2, DR5 y DR7. La frecuencia del DR2 es similar a la de los japoneses mientras que la del DR7 se acerca más a la de la población caucásica. En cambio los antígenos DR1 y DR3 se encuentran en una baja proporción al igual que en los japoneses.

Al analizar los resultados de los antígenos de histocompatibilidad, se encontró que el antígeno A25 está significativamente incrementado en los pacientes con lepra tuberculoide (frecuencia génica = 6.90, cuadro XI), comparativamente con la población sana (frecuencia génica = 2.02, cuadro X) pues el valor de χ^2 fue de 5.2845 con una $p = 0.02$ (cuadro XVIII). Sin embargo al corregir el valor de la probabilidad por el número total de com-

paraciones hechas (57) la diferencia perdió su significado ($p_c = 1.14$), lo que no permite confirmar la participación de dicho antígeno en el desarrollo de la forma tuberculoide.

En ningún otro caso se encontró desviación para ninguno de los subgrupos, en relación a los loci A, B o C. Las frecuencias de tres antígenos, el A11, el Aw31 y el Bw44 se encontraron disminuidas en los pacientes con lepra tuberculoide (frecuencia génica: A11 = 1.68, Aw31 = 3.39 y Bw44 = 1.68) comparativamente con los testigos en los que las frecuencias fueron de 6.19, 8.35 y 7.80 respectivamente. No obstante, las diferencias no alcanzan significado estadístico y estas disminuciones pueden deberse simplemente a un mecanismo de compensación al incremento del antígeno A25.

Si se observa lo que se ha informado en la literatura en relación a los productos A, B y C los resultados son muy discordantes, pues como se señala en el cuadro número V, de 11 estudios hechos, algunos obtuvieron elevado el B5 (61, 63) en pacientes tuberculoideos, pero llama la atención que Smith y col. (61) observó también un incremento del A10 lo cual coincide con el presente estudio ya que el A25 es un subtipo de dicho antígeno, sobre todo porque el grupo de pacientes estudiado por ellos son filipinos los cuales contienen también genes mongoloideos. Otros autores encontraron un incremento en el B14 (59) o Bw21 (58) en la forma lepromatosa y otros ninguna asociación.

En los dos trabajos previos, hechos en México, con población mestiza (56, 57) en el primero se encontraron desviaciones en los antígenos A2 y A3, pero en el segundo realizado con un número mayor de antisueros y mejor definidos que incluían más especificidades no se encontró asociación alguna. Es importante señalar que estos estudios incluyeron sólo pacientes lepromatosos

lo que hace una diferencia importante con este trabajo, además de que aquí se integraron un número mayor de especificidades y de reactivos, pues actualmente hay descritos muchos antígenos que aun no se descubrían en 1976 y mucho menos en 1973 cuando fueron realizados los dos estudios mencionados.

Los resultados obtenidos tanto en la literatura como en el presente trabajo sugieren que es muy probable que los genes del MHC estén participando en la predisposición, pero puesto que se trata de un agente infectante muy complejo con determinantes antigénicos múltiples, tal vez se hallan también múltiples genes involucrados y las observaciones hechas en los loci A, B y C pueden ser un reflejo de que los verdaderos genes están en otra región del MHC; tal vez cerca del locus DR, ya que es aquí donde parecen residir dichos genes Ir.

En este sentido, al analizar el locus DR, se encontró que en los pacientes con lepra tuberculoide el antígeno DR3 presenta una frecuencia génica de 16.33 (cuadro XVII), bastante alta al compararla con la de los testigos (frecuencia génica = 5.48 cuadro XVI); el valor de la χ^2 fue de 7.4135 con una probabilidad menor de 0.006 que es significativa. No obstante, al corregir el valor de p se perdió el significado estadístico ($p_c = 0.3$, cuadro XVIII).

También se obtuvo un valor elevado en la frecuencia génica del antígeno DR2 que no era estadísticamente significativo al compararlo con la población sana. En relación con los trabajos realizados anteriormente con respecto al locus DR (cuadro VI), Van Eden en 1982 (1), encontró también una alta frecuencia del antígeno DR3 en pacientes de lepra tuberculoide. Es interesante señalar que los pacientes incluidos eran una mezcla negro-caucasoides de Surinam y el aumento de DR3 no sólo se halló significativamente incrementado en los tuberculoideos, sino que se encontraba disminuído en los lepromatosos sugiriendo que algún factor asociado al DR3

controla el tipo de enfermedad que se desarrolla después de la infección por Mycobacterium leprae.

En cuanto al antígeno DR2, hay cinco trabajos que señalan una alta frecuencia de este antígeno en los tuberculoideos, pero en tres de ellos (69, 70, 71), el dato no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, fueron realizados en población abierta, al igual que en este trabajo. A este respecto, ha sido de una gran importancia la evaluación de estudios familiares, pues éstos muestran realmente si hay segregación conjunta de haplotipos y enfermedad, y por lo tanto si existe ligamiento genético.

Los trabajos de Van Eden y col. y Sujiyama y col. (67, 68) fueron hechos con familias en los que había miembros afectados con ambas formas de lepra. En estos casos, la segregación de la forma tuberculoide corría paralela con la presencia de haplotipos que contenían al antígeno DR2. Además la frecuencia de homocigotos para el antígeno era mayor de lo esperado en los sujetos afectados (p. 0.03).

Esto sugiere por un lado, que si la forma lepromatosa depende de algún factor genético, éste no parece tener relación con el MHC y por otro lado que por lo menos algunos de los elementos determinantes de la expresión tuberculoide están codificados en el cromosoma número 6. En este sentido, nuestros pacientes tuberculoideos no sólo tenían esa frecuencia incrementada del DR3 sino un incremento del DR2 aun cuando este último no alcanzó validez estadística; y aunque es más difícil postular resistencia que susceptibilidad, estos resultados parecerían señalar que cerca de la región DR se encuentran incluidos genes involucrados en la resistencia a padecer el padecimiento en su forma grave, pues la asociación es en este estudio y los demás que se han mencionado es con los pacientes tuberculoideos.

Por último el riesgo relativo de 3.58 (cuadro XVIII) es un índice de que una vez infectado un sujeto por el bacilo, si su fenotipo HLA contiene al antígeno DR3, tiene tres veces más posibilidades de evolucionar hacia la forma benigna del padecimiento, - lo cual le proporciona una ventaja sobre los sujetos DR3 negativos.

En última instancia, para confirmar estos hallazgos es indispensable analizar familias mestizas mexicanas en las que haya por lo menos dos hermanos afectados con la misma forma. Volviendo al estudio de Van Eden (1) es el hallazgo de la participación del antígeno DR3, lo cual coincide con los resultados de este estudio.

En cuanto al trabajo realizado in vitro para la asociación de HLA y enfermedad (5), los resultados del presente trabajo los confirman pero in vivo.

En cuanto a los Blancos, se trata de antígenos no identificados, debido a varias causas: la primera es porque dentro de la región hay un número mayor de antígenos de los hasta ahora conocidos, y es el caso del locus DR, éste es cierto pues siguen identificándose nuevos productos y por eso la frecuencia de blancos es tan alta (26.97 %). La segunda es debido a la posible homocigocidad. El que un antígeno aparezca como información diploide, sólo se puede saber, a través de estudios familiares, en donde se identifica tanto el haplotipo materno, como el paterno, y por supuesto en estudios como éste donde se integran sujetos de población abierta tomada al azar, no es posible saber si la ausencia de un antígeno se debe a que tiene una doble dosis de él o se trata de un producto aun no descrito.

En cuanto a la distribución de los pacientes de la República Mexicana considero que las zonas endémicas (Guanejuato, Michoacán, Jalisco y Estado de México) deben estudiarse más con la fina

lidad de controlar los focos de infección y conocer que factores determinan la resistencia de las personas no afectadas en dichas zonas.

En conclusión, la relación encontrada entre el sistema HLA y la lepra es de considerable importancia ya que es una herramienta de gran valor para los estudios de herencia, clasificación y patogenia de la enfermedad en cuestión. Así mismo, puede ser de gran utilidad como ayuda en el diagnóstico. Otro aspecto importante de este estudio, es el haber analizado a los enfermos en términos de los subgrupos polares de la enfermedad, lo cual permitió sugerir que posiblemente existen genes de resistencia incluidos dentro del MHC.

Considero que la implicación más importante de la relación entre los antígenos HLA y la lepra es que se pueden tener mejores criterios para evaluar la patogenia de la enfermedad. Posiblemente, las asociaciones de los antígenos HLA-DR están más relacionados con los genes de respuesta inmunológica (I_r) específica o con los genes de supresión inmunológica (I_s), los cuales pueden tener un papel importante en la interacción de los determinantes de Mycobacterium leprae con las células del aparato inmunocompetente.

El tipo lepromatoso podría estar controlado más específicamente por otros factores, como las posibles reacciones cruzadas entre partes de la estructura de algún antígeno HLA y alguna secuencia estructural de Mycobacterium leprae; o por la constitución bioquímica de las células de Schwan que le podría conferir o no capacidad al organismo de responder contra esta bacteria (51).

Finalmente, puesto que no hay duda de la participación que tienen los genes HLA del MHC en diversos mecanismos inmunológicos el adentrarse en las enfermedades infecciosas podrá establecer a los sujetos en riesgo, lo que redundará en un beneficio enorme en la prevención, diagnóstico y tratamiento oportuno de los pacientes y los resultados obtenidos en este trabajo abren una gran perspectiva en el campo de la lepra.

VII. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que al buscar asociaciones HLA con lepra, es necesario trabajar con un número considerable (mínimo 50) tanto de pacientes como de sujetos sanos (grupo testigo) - para comparación con el objeto de obtener resultados confiables - ya que al analizar tantos parámetros (67 antígenos) fácilmente podría surgir una asociación al azar que no fuera real. Por estos motivos se consideró fundamental darle un tratamiento estadístico muy estricto que incluyó tanto la corrección de la X^2 por Yates - como la multiplicación de la probabilidad por el número de comparaciones hechas.

Otro de los aspectos metodológicos importantes, es que es indispensable trabajar con antisueros de muy alta calidad que abarcan siempre a varios sueros conteniendo a una misma especificidad, pues ésto nos dio una mayor seguridad en cuanto a la definición de los antígenos correctos de cada individuo.

Sobre esta base, los resultados del presente estudio mostraron un incremento de los antígenos A25 y DR3 en la población de enfermos tuberculoides al compararlos con el grupo testigo. No obstante, la elevación del antígeno A25 ($p = 0.02$) fue menor y se perdió al corregir la probabilidad ($p_c = 1.14$). En el locus DR, el alelo DR2 se halló con una frecuencia del doble en los mismos tuberculoides, pero además el DR3 surgió con un incremento significativo ($p = 0.006$); y aunque este último también se perdió con la corrección estadística ($p_c = 0.3$) fue mucho mayor que el aumento del A25. Estudios recientes ya mencionados, también han mostrado asociación con los mismos antígenos DR.

Los resultados de este trabajo y los ya señalados, se inclinan hacia la hipótesis de que cerca de la región DR existen genes de resistencia, puesto que la asociación se halló en la forma be-

nigna de la lepra, sugiriendo que los sujetos que portan el antígeno DR2 o DR3, aunque sean infectados con el bacilo tienen un mayor número de probabilidades de quedar protegidos contra la forma destructiva de la enfermedad.

Por último se intentó ver la presencia de genes Ir (de respuesta inmunológica), en base a la correlación entre la presencia de algún antígeno HLA y la respuesta cutánea a la prueba de Mitsuda cuya positividad demuestra que la respuesta inmunológica celular a los antígenos de Mycobacterium leprae está intacta. No se encontró ninguna relación lo que muestra que no existen genes capaces de hacer a un individuo respondedor o no respondedor a dichos antígenos incluidos dentro del MHC. Sin embargo esto no excluye la posibilidad de su localización en otros cromosomas.

El incremento del antígeno DR3 encontrado en este estudio en los pacientes tuberculoides constituye una fuerte base para explorar familias en las que haya enfermos con lepra para determinar en forma definitiva si la enfermedad segrega paralelamente con un haplotipo HLA particular.

Finalmente, es importante señalar, en base a estos resultados, que la tipificación HLA sería una herramienta de gran utilidad en nuestro país, pues podrían detectarse a los sujetos en riesgo de desarrollar la forma lepromatosa en base a la ausencia de los antígenos DR2 o DR3 y enfocar los esfuerzos clínicos de tratamientos tempranos y tal vez buscar las condiciones ambientales apropiadas en una forma científicamente dirigidas.

VIII. APENDICE

1. Material y equipo:

Jeringas estériles
Agujas estériles
Pipetas Pasteur
Jeringas Hamilton 50 ul
Pipetas Eppendorf 5 ul
Pipetas graduadas (1, 5 y 10 ml)
Tubos de vidrio 13 x 150
Tubos Fisher, Robbins Scientific Corporation
Cajas de petri
Portaobjetos, Clay Adams, Gold Seal, No. 3021
Popotes de plástico
Fibra de nylon, Fenwall Laboratories
Puntas de micropipeta, Pipettens pitzen 3102
Cámara cuenta glóbulos
Estufa a 37° C, V.I.P. CO2 Incubator 417-10
Balanza analítica, E. Mettler Zurich, type H6T
Balanza granataria, Harvard trip
Filtros de fibra de vidrio, type HA
Microplacas para citotoxicidad, Microtest 3034
Contador de células Coulter, modelo MHR
Vórtex, Mixer 60085
Centrífuga refrigerada, modelo PR-2
Centrífuga Fisher, modelo 59
Microscopio invertido, American Optical, Bio Star
Microscopio óptico, E. Leitz W. Nr. 532147
Potenciómetro, Orion Research mod. 601/digital

2. Reactivos

Solución de Hank's 10X

	Reactivo	Cantidad	Preparación
Unidad 1	NaHCO_3 (Baker)	3.5 g	Disolver en 250 ml de agua destilada, distribuir en frascos de 50 ml, esterilizar a 15 lbs. por pulgada cuadrada.
Unidad 2	NaCl (Baker)	80.0 g	Disolver en 800 ml de agua destilada.
	KCl (Marck)	4.0 g	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Baker)	0.6 g	
	Glucosa (Baker)	10.0 g	
	KH_2PO_4 (Baker)	0.6 g	
Unidad 3	Rojo de fenol (Carlo ERBA)	0.4 g	Mezclar el rojo de fenol en una pequeña cantidad de agua hasta formar una pasta homogénea. Diluir en 150 ml de agua destilada, titular con NaOH 0.2 m. Llevar a un volumen final de 200 ml, añadir de 1 - 2 ml de cloroformo como conservador.

Añadir 100 ml de la Unidad 3 a la Unidad 2, llevar a un volumen de 1 000 ml. Esterilizar la solución por medio de filtros Millipore 0.22 y distribuirlo en frascos estériles de 100 ml sellados con tapa de hule y retapa de aluminio.

Para usar el reactivo, diluir la solución madre 1:10 con agua destilada. Añadir 2.5 ml de la Unidad 1 a la solución normal para ajustar el pH, que debe quedar en 7.2 - 7.4.

Hepes pH 7.2 1M

Disolver 23 g en 70 ml de agua destilado
 Ajustar a pH 7.2 con NaOH 5N
 Completar a 100 ml con agua destilada
 Esterilizar en autoclave

Medio TC 199

Pasar 10 ml de medio concentrado a un frasco estéril de 100 ml, agregar 4 ml de hepes, 0.4 ml de antibióticos y completar a 100 ml con agua destilada estéril.

Antibióticos

Penicilina G sódica (ampolleta de 1 000 000 UI/ml)
 Estreptomina (ampolleta de 1 g)

Suspender el contenido de cada ampolleta en 5 ml de agua estéril. Mezclar ambos antibióticos y distribuir en alícuotas de 2 ml en frascos estériles.

Almacenar en congelación hasta su uso.

Solución de ficoll-hypaque

Ficoll 9 % en agua destilada	12 partes
Hypaque 34 % en agua destilada	5 partes

El hypaque (Winthrop products) es una solución de diatrizoato de sodio (3.5 diacetamida-2, 4, 6 triyodobenzoato de sodio) - en presentaciones al 50 y 75 %. En el primer caso se diluye 1:1.47 (10 ml de hypaque al 50 % y 4.7 ml de agua destilada), y en el segundo se diluye 1:2.1 (10 ml de hypaque al 75 % y - 11 ml de agua destilada). La densidad de la mezcla deberá ser de 1.076 - 1.078.

Suero de ternera fetal

Descomplementar a 56° C durante 45 minutos.

Trombina bovina

Se prepara una solución que contenga 100 UI/ml a partir de la trombina bovina que tiene 1 000 UI/ml diluyendo con agua destilada. Se distribuye en alícuotas de 0.1 ml y se conserva en congelación a -20° C hasta su uso.

Nujol

Colocar una gota de aceite, en cada excavación de las microplacas de citotoxicidad. Guardarlas hasta su uso.

Eosina-formol al 5 %

Pesar 5 g de eosina amatillenta y disolverla en 100 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7.0

Se utiliza una solución saturada de formol (reactivo al 34 ‰)

Se ajusta a pH 7.4

Fibra de nylon

Se utiliza nylon marca Fenwall. Si no se cuenta con este material, se emplea fibra de nylon de tapicería y se trata de la siguiente manera:

Se lava la fibra de nylon con HCl 1N 3 veces, cuidando de que toda la lana quede sumergida en el ácido. Se elimina el HCl y se lava 3 veces con NaOH 1N. Se lava el exceso de álcali con agua destilada las veces necesarias hasta que el pH del último lavado sea igual al del agua. Se pone a secar extendida en la estufa a 37° C, hasta que seque totalmente.

Preparación de la columna

Se pesan de 50 a 70 mg de fibra de nylon Fenwall o de nylon previamente tratado y se sumerge en 5 ml de Hanks normal. Se corta un popote común a una altura de 10 cm y se cierra a la flama en ángulo de 45°.

La lana bien peinada, se empaca en el popote uniformemente y en forma laxa, ocupando una altura aproximada de 5 cm. Cuidar que no llegue al extremo cerrado. Se lava una vez con solución de medio TC precalentado a 37° C (con suero de ternera fetal al 5 %) y se incuba durante 30 minutos en forma horizontal. Se hace una horadación en el extremo cerrado del popote para permitir la salida del líquido. Se saca la columna y se elimina el medio.

Complemento

Se usa suero normal de conejo como fuente de complemento. - Los animales se sangran y la sangre se deja coagular a 4° C. Se separa el suero y se mezcla con un volumen igual de glóbulos rojos tipo A (obtenido de 3 o más donadores). Se incuba durante 1 hora y se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este se distribuye en alícuotas y se conserva a -70° C hasta su uso. El complemento así obtenido se utiliza para la tipificación de los loci A, B y C. - Para la tipificación de los productos del locus DR se usa un complemento especial, comercial, proveniente de Pel-Freeze.

Heparina

Se utiliza como anticoagulante (1 000 UI/ml), en una concentración de 0.1 ml por cada 10 ml de sangre.

Antisueros para grupos sanguíneos

Se emplean antisueros comerciales para la determinación de -
los grupos sanguíneos: anti-A, anti-B y anti-Rh.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Van Eden, W., De Vries, R. R. P., D'Amato, J., Schreuder, I., Leiker, D. L. y Van Rood, J. J. (1982). HLA-DR associated genetic control of the type of Leprosy in a population from Surinam. *Human Immunol.* 4: 343-350
2. Gorer, P. A. (1936). The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br. J. Exp. Pathol.* 17: 42-50
3. Snell, G., Dausset, J. y Matlenson, S. (1976). The HLA complex: serology and genetics. *Histocompatibility*. Academic Press. Nueva York, p. 182-237
4. Vaiman, N. (1978). Le complexe majeur d'histocompatibilité chez animaux (homme et souris exceptés). En: *Le complexe principal d'histocompatibilité*. J. Dausset (ed), INSERM, Paris, Francia p. 27-28
5. McDevitt, H. O., Bodmer, W. F. (1974) HLA immune-response genes and disease. *Lancet* 1260-1275
6. Dausset, J. (1954). Leucoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sang.* 4: 190-198
7. Balner, H., Cleton, F. J. y Eernisse, J. G. (eds), (1965). *Histocompatibility Testing 1965*, Munkgaard, Copenhagen.
8. Curtioni, E. S., Mattuiz, P. L. y Tossi, R. M. (eds), (1967). *Histocompatibility Testing 1967*, Munkgaard, Copenhagen.
9. Terasaki, P. I., Cepellini, R., Van Rood, J. J. y Amos, D. B. (eds). (1970). *Histocompatibility Testing 1970*, Munkgaard, Copenhagen.

10. Dausset, J. y Colombani, J. (eds), (1973). *Histocompatibility Testing 1972*, Munksgaard, Copenhagen.
11. Kissmeyer-Nielsen, F., Svejgaard, A., Thorsby, E., Dausset, J., Amos, D. B., Van Rood, J. J., Cepellini, R. y Terasaki, P. (1975). *VI International Histocompatibility Workshop and Conference*. Munksgaard, Copenhagen.
12. Bodmer, W. (1977). *Histocompatibility Testing 1977*. Munksgaard, Copenhagen.
13. Terasaki, P. I. (ed) (1980). *Eighth International Workshop on Histocompatibility Testing*. UCLA Tissue Typing Laboratory. Los Angeles, California.
14. Parham, P. y Strominger, J. (1982). *Histocompatibility antigens structure and function*. Chapman and hall. Serie B. 14: 4
15. Payne, R. (1964). A new leukocyte isoantigen system in man. Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 29: 285
16. Strominger, J. L. (1980). Structure of products of the Major Histocompatibility Complex in man and mouse. *Prog. Immunol.* IV: 541
17. Ploegh, H. L., Crf, H. T. y Strominger, J. L. (1981). Major Histocompatibility Antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) Class I molecules. *Cell.* 24: 287-299
18. D'Amero, J. (1975). W4 (4a) and W6 (4b) in diverse human populations. *Tissue Antigens* 5: 386-394
19. Albert, E. D., Mickey, H. R. y Terasaki, P. I. (1972). Genetics of the HLA System in four populations: American Caucasians, Japanese Americans, American Negroes and Mexican Americans. En: *Histocompatibility Testing 1972*, Munksgaard, Copenhagen p.233-240

20. Gorodezky, C., Castro, L., Aguirre, G. y Escobar-Gutiérrez, A. Distribution of C and DR antigens in Mexicans (En prensa).
21. Gorodezky, C., Terán, L. y Escobar-Gutiérrez, A. (1979). HLA frecuencias in a Mexican Mestizo population. *Tissue Antigens* 14: 347-352
22. Gorodezky, C. El complejo principal de Histocompatibilidad en el humano y su importancia en fisiología y patología. (En prensa)
23. Mourant, A. E. (1972). Biochemical polymorphism in Anthropology. En: *Histocompatibility Testing 1972*, Munksgaard, Copenhagen p. 31-37
24. Heather, M. D. y Kissmeyer-Nielsen, F. (1979). HLA and transplantation. Elsevier-North-Holland Biomedical Press Amsterdam. Nueva York p. 163
25. Carpenter, Ch. B. (1977). HLA and other genetics markers in disputed paternity. En: *Clinical Histocompatibility Testing*, Grune and Stratton London 1 p. 233-240
26. Lilly, F. (1971). The influence of H-2 type on gross virus leukomogenesis in mice. *Transplant Proc.* 3: 1239-1241
27. Nandi, S. S., Hadam y Holmich, C. (1971). Inheritance of susceptibility to erythrocyte-borne Bettner virus in mice. *Transplant Proc.* 3: 1251-1257
28. Vladutiu, A. O. y Rose, N. R. (1971). Autoimmune murine thyroiditis relation to histocompatibility (H2) type. *Science* 174: 1137-1139
29. McDevitt, H. O. y Landy, M. (ed) (1972). Relation to disease susceptibility testing. En: *Genetic control of the immune response*. Nueva York. p. 124-128

30. Carpenter, Ch. B. (1977). Genetic linkage, gene-locus assignment and the association of alleles with disease. En: Clinical Histocompatibility Testing. Grune and Stratton, London 11 p. 167-172
31. Curie-Cohen, M. (1981). HLA antigens and susceptibility to juvenile diabetes. *Tissue Antigens* 17: 136-148
32. Kravitz, K., Skolnick, M., Cannings, C., Carmelli, D., Baty, B., Amos, B., Johnson, A. y Mendell, N. (1979). Genetic linkage between hereditary hemochromatosis and HLA. *Am. J. Hum. Genetic* 31: 601-619
33. Seager, K., Bashir, H. V., Geezy, A., Edmonds, J. y De Vere-Tyndall, A. (1979). Evidence for a specific B-27 associated cell surface marker on lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis. *Nature* 277: 63-70
34. Jirsch, D. W. (1978). Immunological engineering. HLA complex-associations with disease. University Park Press Baltimore p. 270
35. Jirsch, D. W. (1978). Immunological engineering. HLA complex-associations with disease. University Park Press Baltimore p. 271
36. Gorodezky, C., Varela, B., Castro-Escobar, L. E., Chávez, A., Escobar-Gutiérrez, A. y Martínez-Mata, J. HLA-DR antigens in Mexican patients with Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunology* (En prensa)
37. Keuning, J. J., Peña, A. S., Van Leeuwen, A., Van Hoof, J. P. y Van Rood, J. J. (1976). HLA-Dw3 associated with celiac disease *Lancet* i: 506-508

38. Khan , M. A., Kushner, I., Braun, W. E., DeJelo, C. L. y Bellow, S. P. (1981). Clinical and HLA studies in multiple case families with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 18: 136-138
39. Ungar, B., Mathews, J. D., Tait, B. D. y Cowling, D. C. (1981). HLA-DR patterns in pernicious anaemia. *Brit. Med. J.* 282: 768
40. Peña, A. S. ,Mann, D. L., Hague, N. E., Heck, J. A., Van Rood, J. J. y Strober, W. (1978). Genetics basis of gluten sensitive enteropathy. *Gastroenterology* 75: 230-235
41. Druery, C., Bashir, H., Geczy, A. F., Alexander, K. y Edmond, J. (1980). Search for Klebsiella cell wall components cross-reactive with lymphocytes of B27+ AS+ individuals. *Humm. Immunol.* 1: 151-160
42. Tejani ,A., Mahadevan ,R., Dobias, B., Bhim, N. y Weiner, M. (1981). Ocurrence of HLA types in H influence type B disease. *Tissue Antigens* 17: 205- 211
43. McDevitt, H. O., Bodmer, W. F. (1974). HLA, immune-response genes, and disease. *Lancet* ii: 1269-1275
44. Dick, H. M. (1978). HLA and disease. *Brit. Med. Bull.* 34: 271-274
45. Latapi, F. (1963). Lepra. Breve informe para el médico general. *Dermatología Clínica. Unión Gráfica S. A. México* p. 317-340
46. Castañeda, C. L. (1976). Inmunología de la lepra. Trabajo final de estancia. Centro Dermatológico "Dr. Ledislao Pascua" Diciembre.
47. Buchnan, R. E. y Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Eight edition. The Williams Wilkins Company. Baltimore p 651-701

48. Ridley, D. S. y Jopling, W. H. (1966). Clasificación of leprosy according to immunity. *Int. J. Lepr.* 34: 225-273
49. Godal, T. (1978). Immunological aspects of leprosy - Present status. *Prog. Allergy* 25: 211-242
50. Carranza, A. A. (1960). Nueva clasificación de las formas clínicas de la lepra. *Archivos de Leprología* XX: 1-2
51. Saul, A. (1971). Inmunología de la lepra. *Medicina. Rev. Méx.* 51: 65-70
52. Saul, A. (1971). Lepra. *Tribuna Médica Mexicana* XIX: 1
53. Boletín de Epidemiología (1981). Dirección General de Epidemiología, Subsecretaría de Salubridad, Año 1, No. 13.
54. Chaussinand, R. (1950). La lépre. *Scientifique Franccese*, p 37-43
55. De Vries, R. R. P., Lai, A., Nijenhuis, L. E., Van Rood, J. J. (1976). HLA-linked genetic control of host respons to Mycobacterium leprae. *Lancet* ii: 1328
56. Escobar-Gutiérrez, A., Gorodezky, C. y Salazar-Mallén, M. (1973). Distribution of some of the HLA system lymphocyte antigens in Mexicans. *Vox Sang.* 25: 151-155
57. Gorodezky, C., Escobar-Gutiérrez, A., Latapi, F., Castro E., L., Rodríguez, C., Castañeda, L., Franco, R. y Estrada-Parra, S. (1976). Antígenos HLA en pacientes con lepra. Resúmenes del I Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, Mor.
58. Thorsby, F., Godal, T., Myrvang, B. (1973). HLA antigens and susceptibility to disease leprosy. *Tissue Antigens* 3: 373-376

59. Kreisler, M., Arnaiz, A., Pérez, B., Cruz, E. F. y Botello, A. (1974). HL-A antigens in leprosy. *Tissue Antigens* 4: 197-201
60. Reis, A. P., Maia, F., Reis, V. F., Andrade, I. M. y Campos, A. A. (1974). HL-A antigens in leprosy. *Lancet* ii: 1384
61. Smith, C. S., Walford, R. I., Shepard, C. C., Payne, R. y Procanska, G. J. (1975). Histocompatibility antigens in leprosy. *Vox Sang.* 28: 42-49
62. Dasgupta, A., Mehra, N. K., Ghei, S. K. y Vaidya, M. C. (1975). Histocompatibility antigens in leprosy. *Tissue Antigens* 5: 85-87
63. Smith, G. S., Walford, R. L., Shephard, Ch. C., Payne, R. y Prochancza, G. J. (1975). Histocompatibility antigens in leprosy. *Vox Sang.* 28: 42-49
64. Rea, T. H., Levan, N. E. y Terasaki, P. I. (1976). Histocompatibility antigens in patients with leprosy. *J. Inf. Disease* 154: 615-618
65. Youngchaiyud, U. , Chandanayingyong, D. y Vibhatavanija, T. (1977). The incidence of HLA antigens in leprosy. *Vox Sang.* 32: 342-345
66. Storner, G. L., Touw, J., Belehu, A. (1978). In vitro lymphoproliferative response to Mycobacterium leprae of HLA-DR identical siblings of lepromatous - leprosy patients. *Lancet* i: 543-547
67. Van Eden, W., De Vries, R. R. P. y Mehra, N. K. (1979). HLA-DRw2 and tuberculoid leprosy. *Lepr. India* 11-13
68. Sujiyama, K., Izumi, S., Matsumoto, Y., Chkawa, S., Matsumoto, H., Miyasaki, T., Juji, T. y Maeda, H. (1980). Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by HLa and serum protein aotypes. *Int. J. Lepr.* 48: 502-504

69. Rea, T. H. y Terasaki, P. I. (1980). HLA-DR antigens in tuberculoid and lepromatous leprosy. *Lepr. Rev.* 51: 117-123
70. De Vries, R. R. P., Mehra, N. K., Vaidya, M. C., Grupte, M. D., Meera, K. P., Van Rood, J. J. (1980). HLA linked control of susceptibility of tuberculoid leprosy and association of HLA-DR types. *Tissue Antigens* 16: 294-304
71. Van Eden, W., Mehra, M. C., Vaidya, M. C., Amaro, J. D. y Van Rood, J. J. (1981). HLA and sporadic tuberculoid leprosy. A population study in Maharashtra, India. *Tissue Antigens* 18: 189-193
72. Longo, A., y Ferrara, G. B. (1980). Human B cells. Separation and typing. En: *Histocompatibility Testing 1980*, Munksgaard, Copenhagen, p. 283
73. Danilovs, J., Terasaki, P. I., Park, M. S. y Ayoub, G. (1980). B lymphocyte isolation by thrombin - nylon wool. En: *Histocompatibility Testing 1980*, Munksgaard, Copenhagen p. 287-288
74. Race, R. R. y Sanger, R. (1958). *Blood groups in man*. Blackwell Scientific Publ., Oxford p. 17-26
75. Yates, F., Svejgaard, A. y Ryder, L. P. (1979). Disease association. En: *Histocompatibility Techniques*, ed. M. Dick y F. Kissmeyer-Nielsen, Elsevier North-Holland, Amsterdam, p. 185-205
76. Haldane, J. B. S. (1964). Natural selection in man. En: *Progee in medial genetics*. I. Greene and straton, Nueva York, p. 112-117