

12. 302827
24

UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con estudios Incorporados a la Universidad Nacional Autónoma de México



IDENTIFICACION DE MARCADORES HLA EN RELACION CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA (21-OH) EN POBLACION MEXICANA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
SOFIA CATALINA RIVERA VARGAS

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pags.
ABREVIATURAS.....	I
CAPITULO I. INTRODUCCION.....	1
1.1.- Planteamiento del Problema.....	5
1.2.- Hipótesis.....	5
CAPITULO II. INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	
2.1.- Antecedentes históricos de los antígenos de Histocompatibilidad.....	6
2.2.- Nomenclatura.....	9
2.3.- Hiperplasia Adrenal Congénita o Deficien cia de 21-OH (21-Hidroxilasa).....	12
2.4.- Localización.....	12
2.5.- Esteroidogénesis Suprarrenal.....	13
2.6.- Herencia Mendeliana.....	14
2.7.- Herencia de la Hiperplasia Suprarrenal - Congénita por Deficiencia de 21-OH.....	16
2.8.- Formas Clínicas de la Deficiencia de 21-OH.....	16
2.9.- Biología Molecular de la Deficiencia de 21-OH	20
2.10.- Diagnóstico Prenatal y tratamiento con Base a la Biología Molecular.....	27

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Diagrama Experimental.....	30
3.2.- Material, Reactivos y Equipo.....	31
3.2.1.- Material Biológico.....	31
3.2.2.- Material de Laboratorio.....	31
3.3.- Metodología.....	34
3.3.1.- Separación de Linfocitos Totales por Gradiente de Ficoll - Hyaque.....	34
3.3.2.- Purificación de Linfocitos T y B por Columna de Nylon.....	35
3.3.3.- Preparación de Microplacas y Tipificación de Antígenos Clase I y Clase II por Citotoxicidad	36
3.3.4.- Tipificación de Moléculas C4 por la Técnica de Electroforesis e Inmunofijación.....	39
3.3.5.- Tipificación de las Moléculas FB por la Técnica de Electroforesis e Inmunofijación.....	40
3.4.- Análisis Estadístico.....	41

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- Resultados.....	45
4.2.- Discusión.....	64

CAPITULO V. CONCLUSIONES..... 69

BIBLIOGRAFIA..... 71

ABREVIATURAS

21-OH:	21-HIDROXILASA
CAH:	HIPERPLASIA ADRENAL CONGENITA
MHC:	COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD
HLA :	ANTIGENO LEUCOCITARIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD
OMS:	ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
H-2:	GENES DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL RATON
CML:	CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS
Lads:	DETERMINANTES DE ACTIVACION LINFOCITARIA
ACTH:	CORTICOTROPINA
AMP:	ADENOSIN MONOFOSFATO
cADN:	ADN MONOFOSFATO
Ia:	MOLECULAS DE LA REGION I EN EL MHC DEL RATON
PS:	PERDEDORA DE SAL
VS:	VIRILIZANTE SIMPLE
P450sec:	COLESTEROL DESMOLASA
P450c21:	POSICION ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

ALELO: Formas alternas de un gene situado en un locus particular en cromosomas homólogos.

AUTOSOMICO RECESIVO: Problema que se localiza en los cromosomas autosómicos que se encuentra presente pero que no se manifiesta externamente.

FRACCION ETIOLOGICA: Conjunto de marcadores que identifican la enfermedad.

LOCUS: Lugar de un cromosoma ocupado por un gene determinado o por un gene de una serie de alelos multiples plural loci.

virilizante simple; Padecimiento que no presenta alteraciones en la síntesis de aldosterona.

INTRODUCCION

CAPITULO I

INTRODUCCION

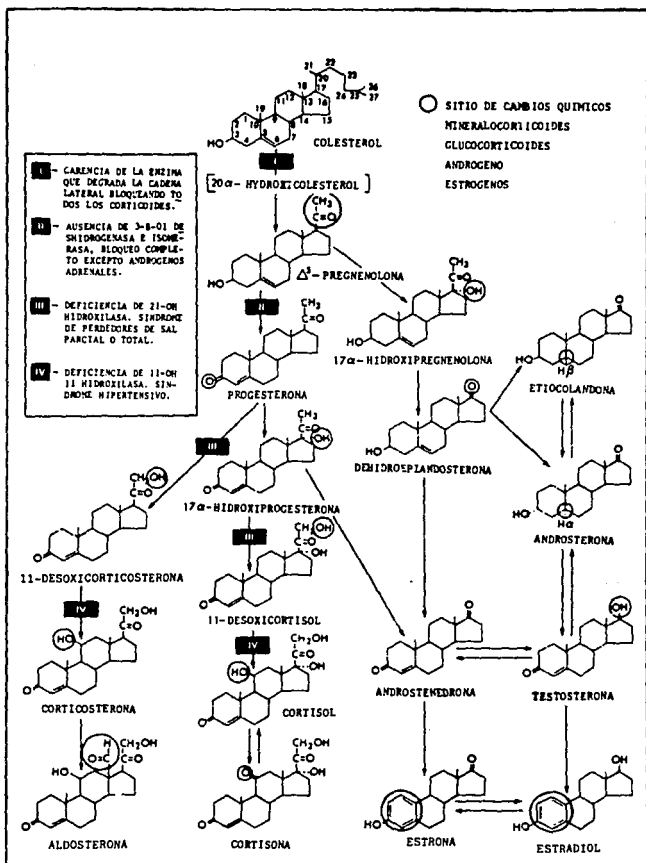
Los marcadores genéticos son factores hereditarios que se utilizan para caracterizar poblaciones sobre la base de la variabilidad de su frecuencia en distintos grupos humanos, y se pueden detectar utilizando pruebas inmunológicas.

La deficiencia de la enzima 21-Hidroxilasa (21-OH) ocurre en el 95% de los pacientes afectados por Hiperplasia Adrenal Congénita (CAH). Deficiencia que se encuentra estrechamente ligada al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Es un síndrome hereditario causado por la falla de alguno de los sistemas enzimáticos requeridos para la síntesis del cortisol y otras hormonas esteroides que se producen en la glándula suprarrenal a partir del colesterol. En la mayoría de los casos son de sexo femenino y alrededor de la mitad de los pacientes masculinos tienen genitales externos ambiguos. Defecto que se provoca por un paso inadecuado durante la síntesis del cortisol y otras hormonas esteroides que se producen en forma inadecuada, y también a que esteroides precursores próximos al sitio de bloqueo se acumulan y se dirigen a otra ruta metabólica; principalmente a la biosíntesis de andrógenos. (28) (Figuras 1 y 2).

Se ha definido perfectamente que los genes que codifican para la 21-Hidroxilasa se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 humano, intercalado entre los genes para los marcadores de histocompatibilidad (HLA). De ahí que es evidente la relación que existe en el desequilibrio de enlace con algunos alelos. En pacientes de origen caucasoide, la relación es con el B14, B47, B51 y con otras variantes específicas del componente C4 del complemento, (2, 23)

Los estudios de rastreo neonatal sugieren una incidencia de 1:5000 a 1:10,000 en la mayoría de las poblaciones blancas y de 1:500 en la población esquimal Yupik de Alaska (9,36,53) con deficiencia de 21-OH en forma clásica. Cifras que corresponden a la mitad de los casos con problema congénito, y dos veces más que los fenilcetonúricos, el más común de los errores metabólicos hereditarios, que tiene una incidencia de 1:15,000 (7,10). Razón por la cual se quiso determinar cuales eran o son los marcadores que se encuentran asociados en la deficiencia de 21-OH en forma clásica virilizante simple. En la población mexicana se desconoce esta incidencia, razón por la cual se quiso establecer el riesgo relativo y la fracción alterada para los alelos involucrados así como también establecer los orígenes étnicos y ancestrales y los mecanismos de origen del gen causante de la deficiencia de 21-OH en la población estudiada. Se tomaron 19 familias de origen mestizo mexicano en las cuales había desde uno hasta tres afectados por familia, con la forma virilizante, de un total de 68 pacientes, 43 resultaron sanos y 25 enfermos. Y a todos ellos se les diagnóstico previamente por CAH por deficiencia de 21-OH, variedad simple (excepto familia # 11 en la que el afectado era variedad perdedora de sal) mediante estudios familiares clínicos y hormonales. Estos estudios fueron hechos por endocrinólogos expertos en la enfermedad, que son jefes de los diversos departamentos de endocrinología de Institutos de donde provienen las familias estudiadas.

FIG. 1 SITIOS DE MAYOR BLOQUEO CAUSANTE DE SINDROMES ADRENOGENITALES



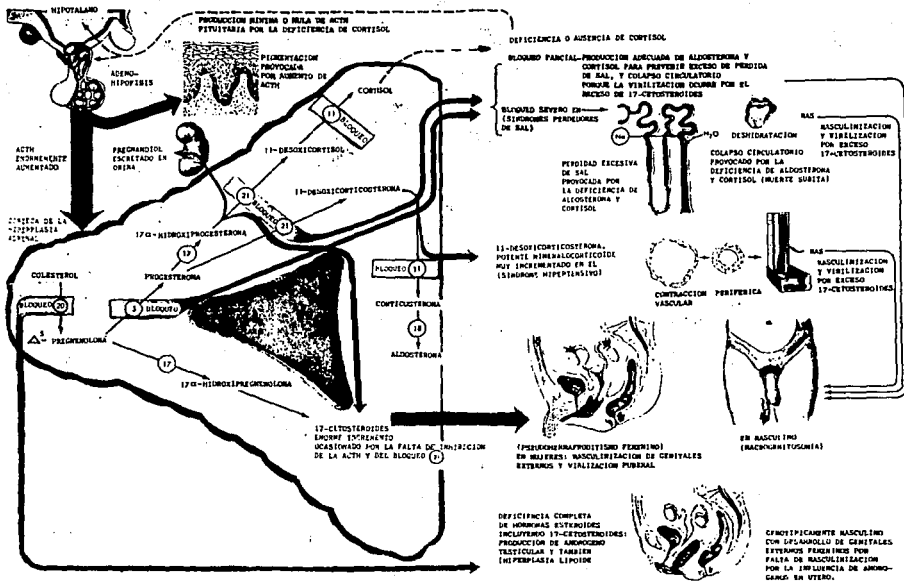


FIGURA 2: BIOSINTESIS Y BLOQUEO DE CORTICOIDES CORTICOADRENALES

1.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como consecuencia del número de casos crecientes en 1963, se hizo una revisión del síndrome y desde entonces la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis del cortisol, han sido purificadas y caracterizadas a partir de glándulas suprarrenales de animales, (9) y con el advenimiento de las nuevas técnicas de biología molecular (41,69,74), se han aislado y caracterizado los genes correspondientes a estas enzimas. Ya que se han encontrado mutaciones específicas causantes de algunos casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. Estos avances han aclarado la etiología del padecimiento y tienen repercusiones importantes en el diagnóstico prenatal temprano y posiblemente en el tratamiento prenatal de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita, y aproximadamente el 95% de los casos informados se deben a la deficiencia de 21-OH. (27)

1.2.- HIPOTESIS

Identificar los marcadores del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en población mexicana, debido a que en nuestro país se desconoce la incidencia de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita, ocasionada por la deficiencia de 21-OH, por desconocer los marcadores genéticos ligados y asociados a la enfermedad, ya que los genes que codifican esta enzima caen en desequilibrio de enlace con algunos de estos marcadores genéticos ligados y asociados a la enfermedad, y que pueden identificarse en algunas razas puras de otros países sirviendo como referencia para detectar esta deficiencia.

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

C A P I T U L O I I

2.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS DEL ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS DE
HISTOCOMPATIBILIDAD

JENSEN en 1903.- Inicia el estudio del sistema de histocompatibilidad creyendo en la existencia de relación entre susceptibilidad al trasplante tumoral y la raza, pensando en una forma de control genético.(47)

LITTLE en 1916.- Establece los principios básicos de trasplante demostrando mediante injertos cutáneos dentro de estirpes endogámicas teniendo éxito, sucediendo lo contrario con los aloinjertos que fracasaban.(28)

GORER Y SNELL en 1930.- Obtienen los principales conocimientos sobre la genética de los sistemas de histocompatibilidad en el ratón, aplicando las leyes de Snell que definen la herencia Mendeliana de los genes de histocompatibilidad y que son aplicables a todas las especies por tener - un alcance muy general.(28)

HALDANA en 1933.- Propone que la inmunidad se dirigía contra aloantígenos más que contra antígenos tumorales, prediciendo así diferencias antigénicas semejantes a los grupos sanguíneos, al observar que los tumores conservaban características aloantigénicas propias del donador que inducía el rechazo tumoral. (64)

GORER en 1936.- Investiga que la reacción ante aloinjerto en ratón se relacionaba con el grado de histocompatibilidad de los aloantígenos detectados por serología y descubre lo que creyó que era otro sistema sanguíneo en el ratón, genes que codifican al Ag II; determinante del éxito o fracaso de injertos tumorales, denominándolos como genes de histocompatibilidad

de otra cepa pura.(64)

MEDAWAR Y COL. en 1943.- Demuestran las bases inmunológicas del rechazo de trasplantes de tejido normal, compararon trasplantes de piel autóloga y alogénica a conejos y más tarde promueve tolerancia inmunológica en ratones recién nacidos, inyectando células linfoides del donador con tolerancia al injerto de piel aceptado posteriormente.(67)

GORER, LYMANN Y SNELL en 1948.- Demuestran que el gen para el antígeno II que se encuentra en el cromosoma 17, es el gen de la braquiuria (T) o anomalía en la cola; constatando Allen en 1955 que no sólo se trataba de un gen, sino de un sistema complejo alelomórfico H-2 diferenciado y detectado por recombinantes intra H-2 en trasplantes. (64)

AMOS en 1953.- Demuestra que los genes de la región H-2 podían encontrarse en los leucocitos del ratón por leucoaglutinación.(14)

MITCHISON en 1954.-Comprobó que la reacción al alotrasplante era un fenómeno mediado básicamente por inmunidad de tipo celular.(14)

DAUSSET en 1958.- Describe en individuos trasfundidos producción de anticuerpos aloespecíficos, reaccionando con individuos no relacionados para el primer antígeno leucocitario humano, antígeno de histocompatibilidad al cual denomino MAC y que hoy se conoce como HLA A2. (14)

VAN ROOD Y PAYNE en 1958.- Descubren independientemente anticuerpos antileucocitarios en sueros de mujeres múltiparas. (67)

PAYNE en 1964.- Describe dos especificidades de una primera serie o LA1 y LA2.(67)

MACDEVITT en 1968.- Demuestra que los genes I-r del ratón están asociados en la región I.(67)

BENACERRAFF en 1969.- Logra postular la teoría sobre la existencia de algunos genes para la respuesta inmune en los cobayos que respondían mediante la reacción de péptidos sintéticos en algunas cepas endogámicas de cobayos. (15, 14, 41)

YUNIS en 1970.- Describe al HLA-D como análogo a las moléculas de Ia murino en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de ratón. (5)

AMOS en 1971.- Asocia al Complejo Mayor de Histocompatibilidad con la proliferación linfoide en el cultivo mixto de linfocitos (CML).(14)

SHERED Y DONELLY en 1971.- Descubren por accidente los determinantes de activación linfocitaria (Lads) al mezclar linfocitos de 2 individuos diferentes, mostrando días después, en las células cultivadas una estimulación blastogénica, siendo esta muy fuerte en individuos no emparentados,- demostrando la existencia de antígenos, que promueven la reacción CML bajo control genético.(13)

EISVOGJEL Y COL. en 1972.- Por estudios familiares con un recombinante localizan al gen CML, fuera del loci HLA-B dado como consecuencia de entrecruzamiento y recombinaciones en familias.(14)

OLIVER Y FESTESTEIN en 1975.- Basados en asociaciones discrepantes postulan la existencia del locus HLA-C separado del HLA-B consecuencia de entrecruzamiento y recombinaciones en familias.(13)

TUSBERG Y COL. en 1976.- Describe polimorfismo del componente C4 y asociado al locus HLA-B, O'Neill y col. determinan dos loci para el mismo, cada uno con un alelo común silencioso. (2, 4, 40)

WHITE Y COL. en 1984.- Manifiestan que existen 2 genes que codifican enzimas citocromo-450 adrenal específica para 21-OH, cuya deficiencia se asocia a genes HLA.(15)

2.2 NOMENCLATURA

Para definir los antígenos de histocompatibilidad se reúne un comité de nomenclatura, compuesto por genetistas, inmunólogos y especialistas en tipificación de tejidos, bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud y contando con el informe de la Unión Internacional de la Sociedad de Inmunología que son los encargados de poner al día la nomenclatura de las especificidades antigénicas del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano, estableciendo nuevas especificidades por técnicas serológicas en células B. (11, 44), (cuadro 1)

De acuerdo al conocimiento genético del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano, los antígenos denominados HLA (Human Leukocyte group A, Leucocito Humano Grupo A), son controlados por un complejo de genes en varios loci íntimamente vinculados y localizados en el cromosoma 6, hasta la fecha se han identificado 4 loci genéticos (designados como locus A,B,C,D)

CUADRO # 1

LISTA COMPLETA DE ESPECIFICIDADES HLA
RECONOCIDAS INTERNACIONALMENTE EN LA FRACCION DEL BRAZO CORTO
DEL CROMOSOMA 6

LOCI A	LOCI B	LOCI C	LOCI D	LOCI DR	LOCI DQ	LOCI DP
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQw1	DPw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR2	DQw2	DPw2
A3	B8	Cw3	Dw3	DR3	DQw3	DPw3
A9	B12	Cw4	Dw4	DR4	DQw4	DPw4
A10	B13	Cw5	Dw5	DR5	DQw(w1)	DPw5
A11	B14	Cw6	Dw6	DRw6	DQw6(w3)	DPw6
Aw19	B15	Cw7	Dw7	DR7	DQw7(w3)	
Aw23(9)	B16	Cw8	Dw8	DRw8	DQw8(w3)	
Aw24(9)	B17	Cw9(w3)	Dw9	DR9	DQw9(3)	
Aw25(10)	B18	Cw10(w3)	Dw10	DRw10		
Aw26(10)	B21	Cw11	Dw11(w7)	DRw11(5)		
A28	Bw22		Dw12	DRw12(5)		
A29	B27		Dw13	DRw13(w6)		
A29(19)	B35		Dw14	DRw14(w6)		
A30(19)	B37		Dw15	DRw15(2)		
A31(19)	B38(16)		Dw16	DRw16(2)		
A32(w19)	B39(16)		Dw16(w7)	DRw17(3)		
Aw33(19)	B40		Dw18(w6)	DRw18(3)		
Aw34(10)	Bw41		Dw19(w6)			
Aw36	Bw42		Dw20	DRw52*		
Aw43	B44(12)		Dw21	DRw53*		
Aw66(10)	B45(12)		Dw22			
Aw68(28)	Bw46		Dw23			
Aw69(28)	Bw47		Dw24			
Aw74(19)	Bw48		Dw25			
	B49(21)		Dw26			
	Bw50(21)					
	B51(5)					
	Bw52(5)					
	Bw53					
	Bw54(w22)					
	Bw55(w22)					
	Bw56(w22)					
	Bw57(17)					
	Bw58(17)					
	Bw59					
	Bw60(40)					
	Bw61(40)					
	Bw62(15)					
	Bw63(15)					
	Bw64(14)					
	Bw65(14)					
	Bw67					
	Bw71(w70)					
	Bw70					
	Bw72(w70)					
	Bw73					
	Bw75(15); Bw76(15); Bw77(15); Bw*; Bw6*					

- 1.- A,B,C,D,DR,DQ,DP,= locus de la fracción del brazo corto del cromosoma 6 humano.
2.- Las columnas se refieren a los alelos de cada loci.

*= Alelos comunes que se encuentran en toda la población.

para estos genes. Los genes son alélicos es decir que en la población se encuentra cierto número de formas diferentes de cada gen. Hasta la fecha se han identificado 19 alelos para el locus D. Según las leyes MENDELIANAS cada persona tiene dos alelos para cada locus o desde luego un par de alelos idénticos. (Cuadro 1) (29)

Como los alelos fueron numerados de modo consecutivo aquellos alelos que son todavía provisionales se designan con "w". Las dificultades encontradas en la identificación y clasificación de este complejo sistema alélico, originaron gran confusión en la nomenclatura original. Este problema ha sido resuelto con una sencilla designación revisada del sistema HLA, que aparece en forma de lista en el (cuadro 1), junto con las designaciones previas más comunes. (29)

Los antígenos asociados con los loci A, B, y C, son identificados serológicamente, por lo que con frecuencia son designados como antígenos SD (serológicamente determinados). Los antígenos gobernados por el locus D como mejor se identifican es por una reacción de cultivo de linfocitos mezclados y con frecuencia se denominan RLM o LD (Lymphocytes determined - determinados por linfocitos): estos antígenos muestran importantes diferencias funcionales y estructurales frente a los antígenos A, B y C. (29)

Los antígenos que tienen una asociación estadística con diversos trastornos supuestamente autoinmunes y con neoplasias de células linfoides son primariamente antígenos de loci B y D. Además se ha visto que los componentes del complemento C2, C4 y C8 y el factor B-properdina están gobernados por genes íntimamente vinculados al locus D. (44)

En el Taller Internacional de 1975 se determinaron los primeros 6 alelos del locus HLA-D, que gobiernan la reacción de los linfocitos mixtos, y confirman la existencia del tercer locus HLA-C. (47)

En el VII Taller de Histocompatibilidad se definieron nuevas especificidades en linfocitos B de sangre periférica para tipificar el locus HLA demostrando ser el centro de defensa del organismo. (60)

En el VIII Taller de Histocompatibilidad se demostraron resultados semejantes al anterior considerando un beneficio patente en los segundos trasplantes debido a la igualación HLA-DR tanto del donador como el receptor. (60)

En el IX Taller Internacional de Histocompatibilidad de 1984, se establecen los loci HLA-DP. (60) (Cuadro 1)

2.3 HIPERPLASIA ADRENAL CONGENITA O DEFICIENCIA DE 21-OH (21-HIDROXILASA)
La Hiperplasia Adrenal Congénita (CAH) producida por la deficiencia de la enzima 21-Hidroxilasa, cuya predisposición genética se ve asociada principalmente a los genes HLA-Bw47 y HLA-B14; DRL. Y de acuerdo al grado de manifestación presenta variantes, mediadas por diferentes marcadores antropológicos y alélicos que traen como consecuencia, mutaciones genéticas y que también provocan Hiperplasia Adrenal Congénita como en el caso de la 17-Hidroxilasa y la 11-Hidroxilasa. (21)

2.4 LOCALIZACION

Todos estos marcadores HLA se ubican en el cromosoma 6 y constan de varios "loci" cercanos y portadores de genes con diversas funciones. En la actualidad se distinguen varios locus llamados A, B, C, DR, DQ, DP. (Cuadro 1); y los genes componentes del complemento se describen en cada variante que codifican para algunas enzimas entre las que se mencionan a la 3

fosfoglucomutasa (PGM3), Glioxalasa eritrocitaria y la 21-Hidroxilasa (21-OH). Enzimas que participan en la síntesis de diversas hormonas sexuales y que cuando existen alteraciones en la codificación genética de esta y por la cercanía en su localización estos genes se afectan simultáneamente, por lo que al conocer el HLA individualmente nos indica la enfermedad o asociación (HLA-enfermedad), que se presenta en cada caso. (Figura 2) (58)

2.5 ESTEROIDOGENESIS SUPRARRENAL

Para entender las manifestaciones clínicas de la CAH es necesario hacer una revisión de la fisiología, basándose en la síntesis de los esteroides suprarrenales la función del testículo fetal. (25)

El cortisol se sintetiza en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal bajo el control de la corticotropina (ACTH), hormona secretada por la parte anterior de la glándula pituitaria. (Figura 2)

La ACTH interactúa con un receptor de la superficie celular y activa a la adenilciclase, la cual a su vez activa a una proteína cinasa dependiente de AMP cíclico; esta fosforila a la colesterol-éster-hidrolasa, incrementando su actividad. Dicha hidrolasa moviliza al colesterol del citoplasma hacia la mitocondria ayudado por una proteína acarreadora de esteroides (8). El colesterol luego se metaboliza transformándose en pregnenolona gracias a la primera enzima, colesterol desmolasa (P450 sec), la cual rompe la cadena lateral. Esta reacción requiere de un factor peptídico lábil, cinasa dependiente. (8). La enzima P450 sec (desmolasa), es un citocromo mitocondrial específico que contiene HEME y tiene un peso molecular de 50,000 daltones; tiene tres actividades

diferentes; hidroliza el colesterol en la posición alfa y luego en posición 22 y por oxidación rompe el enlace C-C 20-22; funciona como una oxidasa terminal transportando un electrón y usa NADPH e incluye un adenosin reductasa que es una flavoproteína (átomo de hierro sin HEME). Cada reacción de hidroxilación requiere una molécula de oxígeno y dos equivalentes reductivos para este rompimiento de la cadena lateral.

(8) (Figura 1.)

El tratamiento para estos desordenes hormonales consiste principalmente en el suplemento de las hormonas esteroides deficientes. (69). Se administran dosis fisiológicas de hidrocortisona de (10 a 20 mg. por metro cuadrado de superficie corporal por día), con el objeto de disminuir la secreción de ACTH y causar así el decremento de 17 hidroxiprogesterona y andrógenos hasta proporciones normales. (75)

En pacientes con la forma perdedora de sal, lo anterior se acompaña con la administración oral de fluorocortisona, en dosis que suprimen la actividad plasmática de la renina sin causar hipertensión. A esta forma se ha llamado perdedora de sal debido a que los bajos niveles de aldostero na reducen la absorción de sodio en el túbulo renal dando como resultado hiponatremia e hipocalemia. (Fig. 2) (45)

2.6 HERENCIA MENDELIANA

INMUNOGENETICA.- Es la suma de conocimientos relativos a las interrelaciones de las reacciones inmunes y la constitución genética determinadas por alotipos capaces de actuar antigénicamente entre individuos de la misma especie. (44)

Las células humanas poseen 46 cromosomas de la madre, siendo 22 pares

autosómicos homólogos ya que los dos miembros de una pareja suelen ser idénticos de tamaño, forma y loci genético. Los genes están dispuestos a lo largo de los cromosomas en orden lineal cada gen tiene su propio locus específico. El número y la disposición de los loci homólogos se denominan alelos. Todo individuo tiene dos alelos por cada clase de gen, uno en un gen determinado, es un homocigoto; una persona con un par diferente de alelos es un heterocigoto. Cuando un gen ejerce su efecto está presente en solo un cromosoma, el gen dominante. Un gen recesivo se expresa sólo cuando se encuentra presente en los dos miembros de un par cromosómico (o en el X único de un varón normal o una hembra XO). El gen o su rasgo correspondiente es ligado a X si está localizado en el cromosoma X; en otro caso es autosómico. (44)

Se denomina Herencia Mendeliana cuando el padre o la madre heredan dos haplotipos HLA, siendo todos sus genes muy próximos y ligados entre sí polimórficos y codominantes; por lo que una familia, donde el padre presenta alelos M y N y la madre los alelos Q y R, se tiene para 4 de sus hijos las asociaciones posibles de alelos como son; MQ, MR, NQ, NR, donde existe el 25 % de probabilidad para que dos hermanos compartan los mismos haplotipos 50% de compartir un haplotipo y 25% de ser incompatibles totalmente en sus antígenos HLA. (12, 47, 51)

(Figura 3)

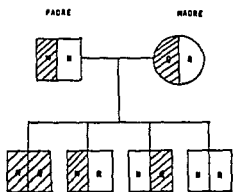


FIGURA 3: HERENCIA MENDELIANA

2.7. HERENCIA DE LA HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA POR DEFICIENCIA DE 21-OH.

Este es un padecimiento monogénico que se hereda en forma autosómica recesiva con igual riesgo para ambos sexos. Con pocas excepciones, las formas perdedora de sal y virilizante simple, se manifiestan consistentemente en una misma familia, ocurriendo la perdedora de sal en un 50 a un 80% en los pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita por 21-OH.

La deficiencia de 21-OH en el humano está estrechamente ligada al Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), del inglés Major Histocompatibility Complex, cuyos genes se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6. Así, dos hermanos con deficiencia de 21-OH tendrán generalmente los mismos haplotipos HLA. Por lo tanto la tipificación HLA, puede utilizarse para identificar el estado de portador heterocigoto en cualquier miembro de una familia donde ya previamente se ha tipificado al sujeto afectado. (23, 73)

2.8 FORMAS CLINICAS DE LA DEFICIENCIA DE 21-OH

Aproximadamente el 95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita publicados, son debidos a la deficiencia de la enzima P450 c21 o (21-Hidroxilasa). En pacientes con esta deficiencia, no se sintetiza adecuadamente el cortisol debido a que la 17 hidroxiprogesterona no se convierte en el desoxicortisol. La consecuente carencia de retroalimentación negativa da como resultado niveles altos de adenocorticotropina (ACTH); estos llevan a sobreproducción y acumulación de los precursores esteróides

próximos al paso bloqueado. Estos son principalmente 17 hidroxiprogesterona, pregnenolona, 17 hidroxipregnenolona y progesterona. Los compuestos 17-hidroxi, son metabolizados a compuestos androgénicos, principalmente a un andrógeno moderadamente fuerte, el cual periféricamente se convierte en testosterona. (Figura. 1) (25)

Los niveles de andrógeno circulante anormalmente elevados afectan muchos estadios de la diferenciación y el desarrollo. (25)

El desarrollo de los genitales externos está controlado por los andrógenos, (25, 27, 35, 59); las mujeres por lo tanto nacen con el clítoris hipertrofiado, los labios fusionados, el seno urogenital que puede ser como la uretra fállica masculina. Sus órganos internos se desarrollan en forma normal, ya que ellos no son afectados por los andrógenos, y en el niño son inhibidos por el factor mulleriano secretado por el testículo. (26)

Una niña al nacer con este problema, puede ser erróneamente catalogada como niño, causando así problemas graves en su vida adulta. (24, 25)

El diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita en un recién nacido, debe tener en cuenta si hay criptorquidia bilateral e hipospadia. (27)

Postnatalmente, tanto mujeres como hombres no tratados, presentan crecimiento somático rápido con edad ósea avanzada y cierre temprano de las epífisis, lo que finalmente los deja de baja estatura. Otros síntomas del exceso de andrógenos son: la aparición temprana del vello sexual, acné y crecimiento continuo y excesivo del pene y del clítoris. Además las mujeres pueden tener ovarios poliquísticos. (28, 37, 63)

La función del plexo hipotálamo de la glándula pituitaria puede afectarse

en ambos sexos. En mujeres, los niveles altos de progesterona, pueden interferir con la actividad del estradiol para estimular a la hormona luteinizante causando menstruaciones irregulares o ausentes. En el hombre, los niveles altos de andrógenos suprarrenales podrían suprimir la secreción de gonadotropinas, y así, aunque los niveles totales de andrógeno circulante están elevados, los niveles de testosterona en testículo pueden estar bajos, dando como resultado una espermatogénesis deficiente. (26, 27, 35, 59)

La deficiencia de 21-OH se presenta básicamente en dos formas clínicas, cada una de ellas con dos subformas:

La forma clásica ocurre en dos formas: perdedora de sal (PS), y la forma virilizante simple (VS).(Cuadro 2) (26, 27)

La forma no clásica se presenta como de inicio tardío o adquirida, y como asintomática o críptica. (Cuadro 2) (26, 27)

Aproximadamente dos terceras partes de los casos con deficiencia de 21-OH clásica tienen afectada la biosíntesis de aldosterona (progesterona o desoxicorticosterona). (25)

La otra forma clásica, virilizante simple, no presenta alteraciones en la síntesis de aldosterona. los pacientes perdedores de sal pueden morir en las dos primeras semanas de vida si no son tratados adecuadamente, debido al shock hiponatrémico. Esto ocurre menos en mujeres que en hombres. (24)

Se diagnóstica como forma perdedora de sal a la deficiencia de 21-OH cuando se observa vómito, diarrea y deshidratación con anomalías electrolíticas características. (24)

CUADRO # 2

CARACTERISTICAS DE LA DEFICIENCIA DE 21-OH

VARIEDAD	AMBIGUEDAD GENITAL	VIRILIZACION POST-NATAL	METABOLISMO DE SAL	ESTEROIDES AUMENTADOS	ESTEROIDES DISMINUIDOS	FRECUENCIA
CLASICA PERDEDORA DE SAL	MUJERES	SI	PERDIDA	17-OHP ANDROSTEN- DIONA	ALDOSTERONA CORTISOL	CAUCASICOS 1:10,000
CLASICA VIRILIZANTE SIMPLE	MUJERES	SI	NORMAL	17-OHP ANDROSTEN- DIONA	CORTISOL	CAUCASICOS 1:20,000
NO CLASICA TARDIA	NO	SI	NORMAL	17-OHP ANDROSTEN- DIONA	---	CAUCASICOS 1-3 %
NO CLASICA CRIPTICA	NO	NO	NORMAL	---	---	CAUCASICA 1-3%

17- OHP: 17-HIDROXIPROGESTERONA (25,62,45)

* NO HAY DATOS EN NUMERO/100,000 HABITANTES

Los pacientes con las formas no clásicas de la deficiencia de 21-OH, nacen sin anomalías aparentes, pero adquieren síntomas de exceso de andrógenos en la niñez o en la pubertad. A esta forma se le ha llamado adquirida o de inicio tardío. (35)

Durante el estudio de familias con pacientes afectados con alguna de las formas clásicas, se han encontrado personas asintomáticas pero que, bajo la estimulación con ACTH, presentan las mismas anomalías bioquímicas que aquellos con la forma clásica de la enfermedad es extremadamente frecuente. Ocorre en 0.3% de la población blanca en general el 3% en población europea. Esto puede representar una causa importante de infertilidad en este grupo étnico. (8, 34, 51)

2.9 BIOLOGIA MOLECULAR DE LA DEFICIENCIA DE 21-OH

Se ha demostrado que la deficiencia de 21-OH asociada a la HLA involucra un gen estructural que codifica para el citocromo p450c21. Para esto, la técnica utilizada se explica a continuación:

Se aisló un CADN (ADN complementario) de una clona bovina, el cual codifica para esta enzima, es decir, un ADN complementario que corresponde al ARN mensajero para P450c21, unido a secuencias que permiten que este ADN se replique de manera autónoma dentro de las bacterias.(68) Se extrajo ADN a partir de leucocitos de personas sanas y de pacientes con deficiencia de 21-OH, cuyo haplotipo era A3, Bw47, DR7. Estas muestras se analizaron mediante hibridación del ADN usando la técnica del Southern Blot. (38, 66)

El ADN se dirigió con varias endonucleasas de restricción, (taqI, EcoRI, BamHI, BglI), enzimas bacterianas que cortan secuencias específicas de ADN. Tales secuencias específicas de reconocimiento están distribuidas al azar en el ADN y aunque la distancia de muchos de estos sitios de restricción es de unos 4000 pares bases, el número de los fragmentos resultantes varía al ser digerido el ADN. El ADN digerido se fraccionó en base a su tamaño mediante electroforesis. Se desnaturalizó mediante alcalinización y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa o de nylon. La membrana se incubó junto con la sonda cADN p450c21 (ADN complementario), la cual previamente se marcó radioactivamente con timidina tritiada y sus cadenas se abrieron mediante calor, para así tener secuencia complementaria. Las tiras complementarias de ADN se unieron una con otra bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, gracias a que los genes bovinos son bastante similares. La sonda radioactiva se unió al gen o genes correspondientes. Los fragmentos se identificaron mediante autoradiografía, utilizando siempre marcadores de peso molecular, para lo cual se utilizó el fago lambda. (26, 41, 41, 67)

Tras este análisis, las muestras de ADN de personas sanas, produjeron fragmentos de ADN que hibridaron con la sonda tras la digestión con cualquiera de las endonucleasas utilizadas. Uno de estos fragmentos no se encontró en los digeridos de ADN de un paciente homocigoto para HLA-Bw47, hallazgo consistente con la pérdida de uno de los genes P450c21.

(70)

Ya que un gen para 21-OH y un gen para C4 están afectados en el haplotipo HLA-Bw47, se consideró que dichos genes estaban localizados en el cromosoma 6, muy cerca uno de otro. El arreglo exacto de dichos genes se determinó examinando fragmentos largos de ADN humano clonado en plásmidos, los

cuales habían sido aislados con anterioridad por llevar el gen para C4. (71)

Así hoy se sabe que hay dos genes que codifican para la 21-OH que son el 21-OHA y el 21-OHB, y que están localizados junto a C4A y C4B respectivamente, y que se transcriben en la misma dirección. (Figura 4)

En estudios más recientes, donde se analizó mediante la técnica del southern blot, al cósmido de ADN después de la digestión con la enzima TaqI, se encontró que el gen 21OHB tiene un fragmento de 3.2 Kb, mientras que el gen 21OHA tiene un fragmento de 3.7 Kb. Esto corresponde a los dos fragmentos observados cuando se hibridiza ADN no clonado, humano, con una sonda cADN 21-OH. (28, 39)

El fragmento de 3.7 Kb asociado con el gen 21OHB se pierde cuando el haplotipo asociado a la deficiencia es la HLA-Bw47, sugiriendo que el gen del producto 21OHB se requiere para la actividad de 21-OH. Por el contrario, las personas hormonalmente normales cuyo haplotipo es el HLA-A1, B8, DR3, no tienen fragmento TaqI de 3.2 Kb asociado con el gen 21OHA, por lo que la ausencia de este gen no causa ningún daño, sugiriendo así que su producto no es activo en la esteroidogénesis. (28, 39)

Si todos los P450 se derivan de un ancestro común, los ontrones deben haber sido movidos durante la evolución de estos genes. La secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 28% de homología con otros genes P450, sugiriendo una relación evolutiva distante con otras enzimas P450. (28)

Aún cuando la secuencia que codifica en cADN y los genes de 21-OHB son idénticas, tiene muchas diferencias con las de 21-OHA. Tres de sus mutaciones evitan que se sintetice una proteína activa, lo cual indica que

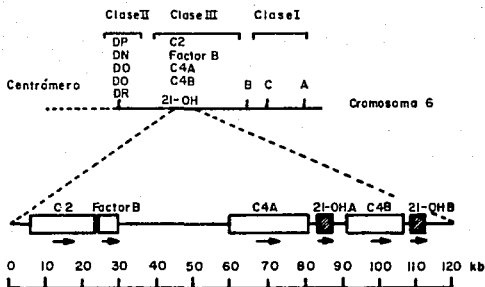


FIGURA 4: MAPA DEL CROMOSOMA 6 HUMANO, BRAZO CORTO, DONDE SE MUESTRA LA UBICACION DE LOS GENES 21-OHA Y 21-OHB INTERCALADOS ENTRE LOS GENES C4A Y C4B DEL COMPLEMENTO.

el gen 21-OHA es un pseudogen sin función evidente. (28,39)

Los dos pares de genes C4 y 21-OH, probablemente emergieron por duplicación de un sólo par de genes. Aún cuando los dos genes C4 han conservado su actividad en humanos, sólo un gen, 21OHB, es necesario para la esteroido génesis. El extragene entonces, acumula mutaciones sin ningún efecto sobre el organismo.

La duplicación secuencial de los genes C4 y 21-OH, crea la posibilidad de un desarreglo o desalineamiento durante la metafase meiótica y un entrecruzamiento desigual entre las cromátides hermanas dando como resultado cromosomas que contienen uno o tres juegos de genes de C4 y 21-OH.(28) Este mecanismo posiblemente genera los desarreglos observados en el haplotipo HLA-A1, B8, DR3 y A3,Bw47, Dr7, los cuales han perdido respectivamente los genes C4A 21OHA y C421OHB. (42, 53) (Figuras 5 y 6)

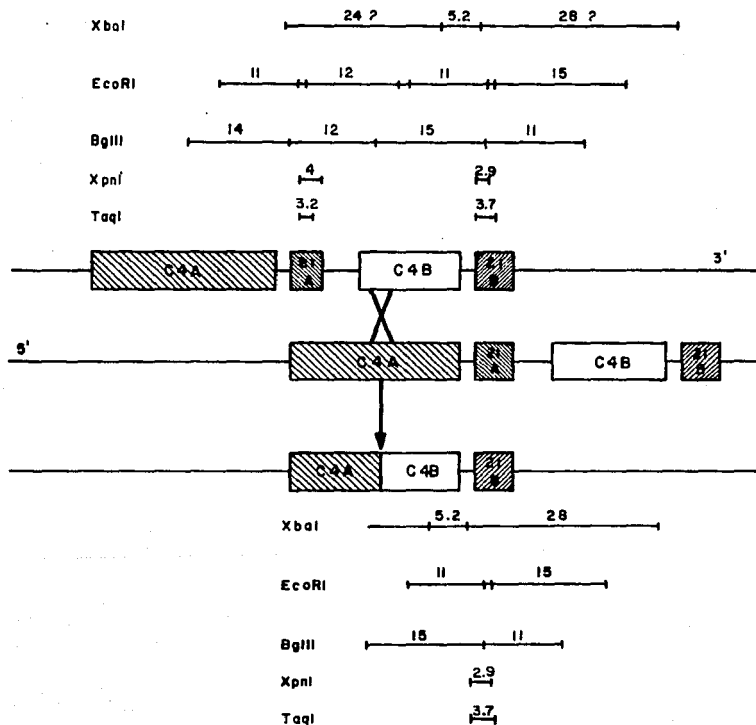
Aún cuando el haplotipo HLA-B14, DR1 y la deficiencia de 21-OH no clásica, son relativamente muy frecuentes, el HLA-A3, Bw47, DR7 es extremadamente raro en la población general, sin embargo comprende el 20% de los alelos para la deficiencia de 21-OH clásica. (59)

Otros pacientes con deficiencia Clásica que no tienen Bw47 han sido examinados por análisis de hibridación con sondas para 21-OH, C4, o ambos. (59)

Aproximadamente uno de los cuatro alelos, de estos pacientes tienen deleciones en el gen 21-OHB y la mayoría también en C4B. (59)

En el cromosoma 6, el gen 21OHA ha sido sustituido por un gen 21-OHB. Todos los pacientes con deleciones homocigotas del gen 21-OHB tienen la forma perdedora de sal. Las tres cuartas partes restantes de alelos clásicos no tienen fragmentos de restricción del polimorfismo asociados

FIGURA 5: MAPA DEL LOCUS PARA LOS GENES 21-OHA Y 21-OHB, SITIOS DONDE CORTAN LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN. MEDIO, GENES C4 Y 21-OH MOSTRANDO EL ENTRECruzAMIENTO DESIGUAL ENTRE C4B Y C4A. SITIOS DE CORTE DE LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DESPUES DEL ENTRECruzAMIENTO.



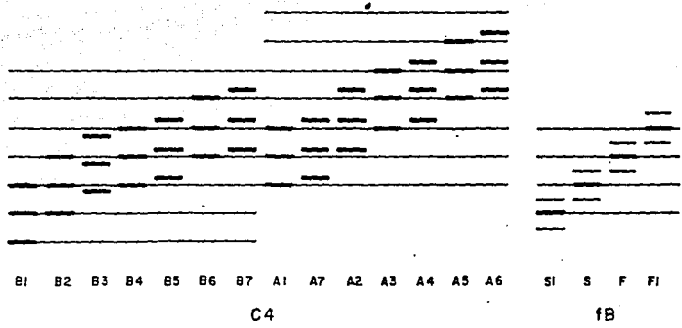


FIGURA 6: VARIANTES ELECTROFORETICAS DE C4 y FB.

y no pueden ser generados por intercambios pequeños de secuencias entre genes homólogos, fenómeno denominado "Conversión génica", transfiriendo algunas de las mutaciones nocivas del pseudogen 21-OHA al 21-OHB. Hasta ahora se tienen 21-OHB, y se han demostrado algunas otras conversiones en otros genes P450. (42, 46)

Otros alelos pueden acarrear mutaciones puntuales que afecten la transcripción del gen o el procesamiento del ARNm, o resultar en sustituciones de aminoácidos que alteren la actividad de la enzima. Estas alteraciones pueden ser relativamente débiles dando como resultado formas virilizantes simple o no clásicas, o ser severas causando formas perdedoras de sal. Debe señalarse que la distinción entre estas categorías diagnósticas no es totalmente absoluta. (28, 42, 46). Algunos pacientes masculinos que han sido clasificados como formas virilizantes simples después de pruebas hormonales, en realidad tienen alelo asociado con la forma no clásica, B14, DR1. Por el contrario en algunos pacientes con episodios de pérdida de sal en su niñez, desarrollan la capacidad de producir cantidades adecuadas de aldosterona en su vida adulta, esto puede ser como resultado del incremento de niveles de una enzima 21-OH poco activa, como P450c21, o en algunas personas, como resultado de otro P450 distinta a la P450c21, pero por alguna actividad de 21-OH. (79)

2.10 DIAGNOSTICO PRENATAL Y TRATAMIENTO CON BASE A LA BIOLOGIA MOLECULAR

Aún cuando las anormalidades hormonales en pacientes con deficiencia de 21-OH pueden ser tratadas fácilmente, los genitales ambiguos en las mujeres, pueden causar problemas psicológicos enormes, y pueden requerir de varios procedimientos quirúrgicos para corregir de manera adecuada

los daños; por ello la terapia preventiva para esta enfermedad es de gran interés. (10, 43). Si se administra a la madre gestante, dexamatasona a partir de la décima semana de gestación, cuando se inicia la diferenciación de los genitales externos, el medicamento atraviesa la placenta y suprime la secreción de ACTH de la pituitaria fetal, previniendo así la sobreproducción de andrógenos por la glándula suprarrenal fetal. (10, 15) Se supone que si ambos padres son portadores heterocigotos de la deficiencia de 21-OH, el feto tiene 25% de probabilidades de tener el desorden y el 50% si es mujer. Así, sin diagnóstico prenatal, 7 de cada 8 fetos estarán expuestos innecesariamente a hormonas glucocorticoides exógenas. Por estas razones es importante el diagnóstico prenatal temprano. (52)

Hasta hace poco se contaba con dos métodos para el diagnóstico prenatal, en padres con un hijo afectado:

- 1.- Medida de 17 hidroxiprogesterona en líquido amniótico, y
- 2.- Tipificación de HLA en células de líquido amniótico.

Con el primero, puede haber problemas en pacientes con la forma virilizante simple, y el segundo, pueden surgir problemas en caso de ocurrir una recombinación intra-HLA, porque las dos pruebas son complementarias, pero, los dos tienen una alta eficacia. Desafortunadamente ambos deben hacerse alrededor de las 16 primeras semanas de vida fetal, tiempo en el que ocurrió la virilización. (51)

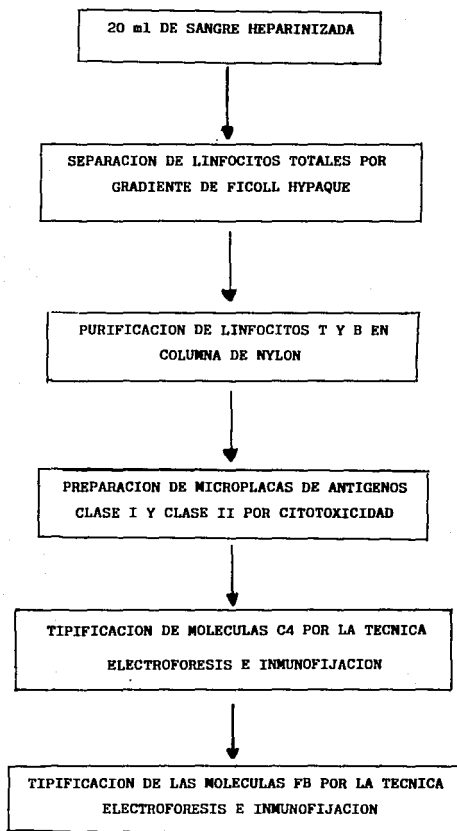
Por el contrario, el vello coriónico puede obtenerse antes de la décima semana de gestación, y de él se pueden obtener ADN y hacer hibridación por southern blot. Aún cuando sería más directo usar una sonda de hibridación normales. Y deleciones en C4B 21-OHB, producen patrones idénticos de hibridación cuando son digeridas con determinadas enzimas de restric-

ción. (47) Quizá cuando se hayan sometido genes mutantes a secuenciación de ADN pueden utilizarse para diagnóstico prenatal, sondas de oligonucleótidos que corresponden directamente a cada mutación. (16) Otra alternativa que ha sido empleada con éxito, es el uso de sondas correspondientes a los genes cercanos clase I y clase II. Ya que estos genes son altamente polimórficos, los cromosomas parentales de los alelos para la deficiencia de 21-OH pueden ser fácilmente identificados mediante el examen de hibridación en el sujeto prueba. Debido a que los genes clase I y clase II rodean a los genes de 21-OH, el uso de dos de tales sondas, debe evitar la falla de acierto debido a eventos de recombinación (49) (Figura 4)

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO III

3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



3.2.- MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre Periférica: De todos y de cada uno de los miembros, de las familias estudiadas, que presentaron la deficiencia de 21-OH.

Suero AB: Mezcla de sueros humanos de sujetos masculinos sin historia de transfusión sanguínea previa. Descomplementar a -56°C durante 45 minutos.

Trombina bovina: Preparar una solución que contenga 100 ul/ml a partir de la trombina bovina que tiene 1000 ul/ml, diluyendo con agua destilada. Distribuir en alícuotas de 0.1 ml y - conservar en congelación a -20°C hasta su uso.

Complemento: Suero de conejo normal como fuente de complemento. Sangrar los animales y dejar coagular la sangre a 4°C. Separar el suero y mezclar con volumen igual de eritrocitos-Tipo A (obtenido de 3 o más donadores). Incubar durante una - hora y centrifugar a 1,500 rpm 15 minutos a temperatura ambiente. Distribuir en alícuotas y conservar a -70°C hasta su uso. El complemento así obtenido se utiliza para la tipificación de los loci A, B, C. Para tipificación de los productos- de los loci A, DR utilizar complemento especial, comercial - proveniente de Pel Freeze.

3.2.2.- MATERIAL DE LABORATORIO

Pipetas Ependorf 5-50 ul, 100 ul

Jeringas Hamilton 50 ul

Tubos Fisher

Fibra de nylon

Puntas para micropipeta, Pipettens pitzen 3102

Marcos de acrílico de 21.5 por 15.5 cm de largo y 1 mm de grosor.

Microplacas para linfocitotoxicidad (microtest 3034)

Centrífuga refrigerada marca Fisher (modelo PR-2)

Centrífuga Fisher (modelo 59)

Microscopio óptico (Leitz W # 532147)

Microscopio invertido ID O2 MT (Carl Zeiss)

Baño de enfriamiento de 0 a 5°C. (Gibco)

Equipo de electroforesis horizontal (Gibco)

Cámara de enfriamiento para electroforesis (Gibco)

Negatoscopio (Phillips)

3.2.3.- REACTIVOS

Heparina: Como anticoagulante, (1000 u/ml) un volumen de 0.1- ul por ml de sangre.

Solución Hanks 10X

Solución A: Disolver en 250 ml de agua destilada 3.5g de NaHCO_3 distribuir en frascos de 50 ml, esterilizar a 15 libras por pulgada cuadrada.

Solución B: Disolver en 80 ml de agua destilada los siguientes reactivos:

NaCl (Bayer)	80	g
HCl (Merck)	4	g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Baker)	0.6	g
Glucosa (Baker)	10	g
KH_2PO_4 (Baker)	0.6	g

Solución de FICOLL HYPAQUE

Ficoll 9% en agua destilada 12 partes

Hypaque 34% en agua destilada 5 partes

El hypaque es una solución de diatrizoato de sodio 3,5 diacetamida 2,4,6, triyodo benzoato 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 caso, 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 a 1.078.

MEDIO R P M I 1 6 4 0

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) es un medio que consta de 51 componentes de los cuales, contiene:

Sales Inorgánicas	8
Aminoácidos	20
Vitaminas	11
Diversos	12

Contiene L-glutamina y 25 mM Hepes, no contiene Bicarbonato de sodio, ni rojo de fenol. pH a 25°C de 6.7 ± 0.3 , Osmolaridad $\text{mOsm/KgH}_2\text{O} = 260 \pm 5\%$.

Para un litro solución pesar 16.4 gramos del medio. Medir 950 ml de agua bidestilada y desionizada en un matraz Erlenmeyer. Añadir el contenido de un sobre del medio al agua que esté a una temperatura de 15 a 30°C. Agitar suavemente hasta que se disuelva el polvo por completo. Enjuagar el sobre varias veces. Añadir 2 g de bicarbonato de sodio, diluir al volumen deseado (1000 ml). Ajustar el pH 0.2, 0.3 unidades por debajo del pH de-

seado. El pH aumenta de 0.1 a 0.3 unidades después de su filtración. Usar NaOH o KCl 1N para ajustar. El medio se pondra claro. Mantener perfectamente tapado el matraz hasta que se filtre. Esterilizar por millipore de 0.22 u y distribuir en frascos estériles de 100 ml sellar con tapón de hule y retapa metálica. Guardar hasta su uso a 4°C.

Neuraminidasa Tipo VI

Diluir 10 u en 280 ul de solución de EDTA 0.2 M guardar en alicuotas a -70°C.

3.2.4.- PREPARACION DE LA COLUMNA

Pesar 50 a 70 mg de fibra de nylon, peinar y sumergir en 5 ml de solución Hanks normal. Cortar un popote común a una altura de 10 cm y cerrar uno de los extremos formando un ángulo de 45°. Empacar la fibra en el popote en una forma laxa y uniforme, ocupando una altura de 5 cm, cuidando que no llegue al extremo cerrado, lavar una vez con solución de medio precalentado a 37° C (con suero AB al 5%) e incubar durante 5 minutos en forma horizontal. Hacer una oradación en el extremo cerrado para permitir la salida del líquido. Secar la columna de la estufa, eliminar el medio y proceder a colocar la suspensión de células HLA.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1.- SEPARACION DE LINFOCITOS TOTALES POR GRADIENTE DE FICOLL HYPAQUE.

a.- Tomar 20 ml de sangre venosa heparinizada.

- b.- Diluir la sangre con un volumen igual de solución balanceada con Hanks normal.
- c.- Distribuir en 4 tubos de 13 X 100. 2.5 ml de Ficoll Hypaque a cada tubo.
- d.- Estratificar cuidadosamente la sangre diluida sobre el Ficoll.
- e.- Centrifugar a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- f.- Aspirar con pipeta pasteur la interfase formada por la capa de linfocitos y pasar a 2 tubos de 13 X 100 mm.
- g.- Diluir el paquete de linfocitos con Hanks normal y centrifugar a 1000 rpm durante 10 min. para eliminar plaquetas.
- h.- Descartar el sobrenadante y resuspender el paquete en 4 ml de Hanks, distribuir por partes iguales en 4 tubos Fisher.
- i.- Centrifugar a 3,500 rpm 1 min.
- j.- Descartar el sobrenadante y lavar por centrifugación 4 veces a 1000 rpm un minuto.
- k.- Verificar que no haya plaquetas.
- l.- Hacer un lavado con medio RPMI resuspender en 1 ml de este adicionado con suero humano, AB al 5%.

3.3.2.- PURIFICACION DE LINFOCITOS DE T Y B POR COLUMNA DE NYLON.

- a.- Colocar los linfocitos previamente purificados por gradiente de Ficoll Hypaque en la columna de nylon, inmediatamente después colocar la columna en posición horizontal y agregar medio para evitar evaporación.
- b.- Colocar la columna sobre un tubo marcado como linfocito T y dejar escurrir el contenido.

- c.- Lavar de 3 a 5 veces con alicuotas de 5 ml de medio RPMI que contenga 0.5% de suero AB previamente como linfocitos B, presionando y exprimiendo el nylon con los dedos.
- d.- Repetir el procedimiento 2 o 3 veces. Lavando con alicuotas de 5 ml de medio al 0.5% de suero AB hasta que el medio salga totalmente transparente.
- e.- Centrifugar las células T y B a 1500 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante y ajustar las células T a 2.5×10^6 /ml.

3.3.3.- PREPARACION DE MICROPLACAS Y TIPIFICACION DE ANTIGENOS CLASE I Y CLASE II POR CITOTOXICIDAD.

- a.- En cada uno de los pozos de las cajas con antisueros colocar 1 ul de la suspensión de células T o B.
- b.- Las cajas con los antisueros para clase I, se incuban durante 30 minutos y las cajas con antisueros para clase II, se incuban una hora a 37°C, o a temperatura ambiente.
- c.- Agregar 5 ul de complemento de conejo a cada pozo.
- d.- Las cajas con antisueros para clase I se incuban durante una hora y las cajas con antisueros para clase II, durante 2 horas a 37°C.
- e.- Agregar 5 ul de solución de eosina a cada pozo, agitar en vortex y dejar reposar de 3 a 5 minutos.
- f.- Agregar 5 ul de formalina.
- g.- Leer en un microscopio invertido de 250 aumentos y bajo la

luz de contraste de fases. Calcular el número de células vivas y muertas, estas últimas se ven opacas grandes y planas, al haber sido dañadas por la acción del complemento y penetradas por el colorante, mientras que las vivas, se ven pequeñas y convexas. (figura 7)

h.- RESULTADOS:

% DE MORTALIDAD	CALIFICACION
0 al 20	1 (-)
21 al 30	2 (-/+)
31 al 40	4 (+/-)
41 al 74	6 (++)
75 al 100	8 (+++)

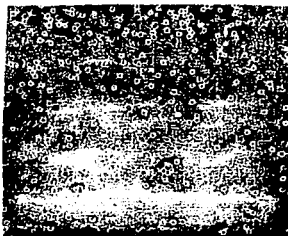
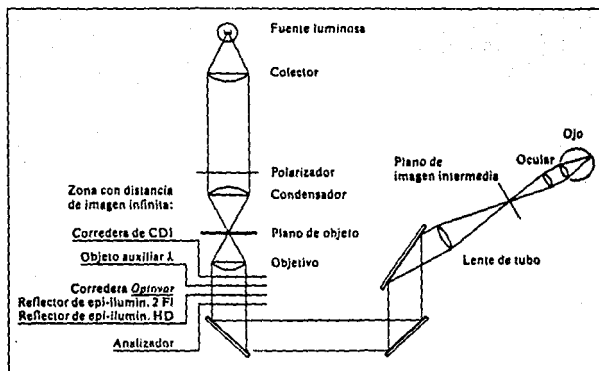


Figura 7.- DETERMINACION DEL TIPO DE HLA EN PLAQUITAS DE
MICROTEST.

ESCALA DEL ORIGINAL: 160:1

SISTEMA OPTICO MICROSCOPIO INVERTIDO



- * Corredera Optovar para variar los aumentos
- * Analizador
- * Objetos auxiliares
- * Correderas de CDI (contraste diferencial de interferencias)
- * Reflector de epi-iluminación 2FI para epi-fluorescencia
- * Reflector de epi-iluminación HD para contraste de epi-reflexión

D = campo oscuro

H = campo claro

3.3.4.- TIPIFICACION DE MOLECULAS C4 POR LA TECNICA DE ELECTROFORESIS
E INMUNOFIJACION.

- a.- Tomar 5 tubos vacutainer que contengan EDTA, y colocar 5 ml de sangre venosa en cada tubo.
- b.- Centrifugar a 2,500 rpm durante 15 minutos.
- c.- Aspirar el plasma con pipeta pasteur.
- d.- Dividir en alícuotas y congelar a -70°C hasta su uso.
- e.- Diluir 10 U de enzima Neuraminidasa Tipo VI en 280 ul de solución EDTA 0.2 molar, distribuir en alícuotas hasta su uso.
- f.- Una vez descongelados plasma y enzima adicionar 12 ul del primero a 3.5 ul de la segunda, mezclar bien y colocar sobre un sistema de diálisis horizontal, durante 18 horas a 4°C tapados para que no se sequen.
- g.- Preparar el gel de agarosa de la siguiente manera. Colocar el marco de acrílico de 1 mm de grosor entre 2 vidrios y fijar con clips, verter dentro de la solución de agarosa, para obtener un gel de 1 mm de espesor, y guardar en refrigeración hasta su uso.
- h.- Retirar el vidrio superior y secar el gel con papel filtro # 1, en el área donde se van a aplicar las muestras.
- i.- Colocar con aplicador una plantilla de mica con unas ranuras donde se deposita la muestra.
- j.- Colocar en cada marquilla aproximadamente 15 ul de las muestras dializadas y dejar que estas penetren el gel de agarosa hasta que se sequen.
- k.- Colocar como marcador visual Hemoglobina S, lentamente.
- l.- Correr la electroforesis a un amperaje de 65 miliamperios

constante durante 5 a 6 horas, en un sistema de enfriamiento para evitar que el gel se deshidrate. Terminada la electroforesis retirar el gel y proceder a la inmunofijación.

- m.- Diluir 300 ul de antisuero Anti C4 Humano, en 1.7 ml de solución-salina. Aplicar esta solución sobre el gel a una distancia de 0.5 cm por debajo de la marca de hemoglobina. Dejar el gel en cámara-humeda durante 2 horas.
- n.- Colocar sobre el papel filtro humedecido en solución salina, encima diez toallas de papel, un vidrio y un peso de 5 kilos. Dejar - preservar durante 10 minutos.
- o.- Retirar el peso y los absorbentes, para obtener una fina película de gel adherida al vidrio.
- p.- Lavar en solución salina durante tres días o más cambios si se requiere menor tiempo.
- q.- A la semana siguiente lavar durante 15 minutos con agua corriente de la llave.
- r.- Secar con secadora de pelo.
- s.- Teñir con colorante azul de Coomassie durante 30 minutos.
- t.- Desteñir con mezcla de metanol, ácido acético y agua hasta obtener el mejor contraste.
- u.- Dejar secar el exceso de metanol a temperatura ambiente.
- v.- Interpretar las bandas de precipitación teniendo como referencia- una muestra previamente tipificada por algún Laboratorio de referencia. Ver modelo representado en la (Figura 6).

3.3.5.- TIPIFICACION DE LAS MOLECULAS FB POR LA TECNICA DE ELECTROFORESIS E INMUNOFIJACION.

- a.- Tomar 5 ml de sangre venosa y colocar en un tubo vacutainer que -

contiene EDTA 3K.

- b.- Centrifugar a 2,500 rpm durante 15 minutos.
- c.- Obtener el plasma mediante aspiración con pipeta pasteur.
- d.- Guardar en alicuotas a -70°C .
- e.- Preparar el gel de agarosa, de la misma manera que se describe para C4, sólo que usando vidrios más chicos, de 20.5 cm x 15 cm.
- f.- Seguir los pasos 8 y 9 para C4.
- g.- Colocar aproximadamente 20 ul de muestra y dejar penetrar en el gel durante 15 minutos y después secar el exceso.
- h.- Colocar como marcador visual hemoglobina normal.
- i.- Correr la electroforesis a un voltaje de 350 voltios, constante durante 3 horas.
- j.- Terminar la electroforesis y proceder con la inmunofijación, utilizando anti FB.
- k.- Proceder con los pasos 13 a 21 descritos para C4.
- l.- Interpretar las bandas de polimorfismo teniendo como referencia una muestra previamente tipificada por algún laboratorio de referencia. (FIGURA 6)

3.4. ANALISIS ESTADISTICO

En un estudio como este, el análisis estadístico es muy importante, porque con él se pueden evaluar las diferencias entre las dos poblaciones estudiadas; en este caso, los antígenos en los haplotipos sanos.

La prueba estadística empleada es el análisis de probabilidad llamado Chi^2 que esta dado por la siguiente fórmula: (67)

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

donde:

a: número de haplotipos afectados, positivos para el marcador

b: número de haplotipos negativos para el marcador

c: número de haplotipos sanos, negativos para el marcador

d: número de haplotipos sanos, positivos para el marcador

Ejemplo.

χ^2 para el antígeno B39 en haplotipos afectados y en haplotipos sanos, de familias estudiadas.

Afectadas con deficiencia de 21-OH:

a:7, b:41, c:1, d:44

$$\chi^2 = \frac{(308-41)^2 (93)}{(8) (85) (48) (45)}$$

$$\chi^2 = 4.513$$

$$\chi^2 = \chi^2$$

$$P = 0.0033$$

P = Probabilidad

Tomar en cuenta las χ^2 3.8 y las P 0.05

Calcular el riesgo relativo para cada antígeno estadísticamente significativo, utilizando las siguientes fórmulas:

RR = Riesgo Relativo

$$RR = \frac{(a) \times (c)}{(b) \times (d)}$$

- donde a: No. de haplotipos afectados con el marcador
 b: No. de haplotipos afectados sin el marcador
 c: No. de haplotipos sanos sin el marcador
 d: No. de haplotipos sanos con el marcador

En el ejemplo anterior $RR=7.5$ considerándose significativo por encima de 1.

Para la fracción etiológica utilizar la fórmula:

$$FE = \frac{RR - 1X}{RR} \quad (a)$$

FE = Factor de enfermedad

En ejemplo anterior la $FE = 0.1262$ considerándose significativo entre más se acerque a 1.

Para comprobar el carácter recesivo de la enfermedad y la segregación de haplotipos en hermanos afectados y sanos se utilizó la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg, la cual prueba:

- a) Que independientemente de que tan raro sea el homocigoto para un gen, la proporción de los heterocigotos es sorprendentemente elevada.
- b) Que la frecuencia de los genes permanece inmutable a través del tiempo. (39)

Se establece cuántos hermanos afectados comparten 2, 1 o ningún haplotipo y cuantos hermanos comparten 2, 1 o ningún haplotipo con el hermano afectado, y luego se calcula χ^2 utilizando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Una vez obtenida la Chi^2 . Buscar en las tablas la probabilidad, considerándose significativas las $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO IV

4.1.- RESULTADOS

Se estudiaron 19 familias de origen mestizo mexicano en las cuales había - desde uno hasta tres afectados por familia, con la forma virilizante simple de la enfermedad, un total de 68: 43 asintomáticos y 25 enfermos. (Cuadro XXIII) A todos ellos se les diagnosticó previamente como afectados de Hiperplasia suprarrenal Congénita por deficiencia de 21-OH, variedad virilizante simple, (excepto una familia, la No.11 en la que el afectado era variedad perdedora de sal) mediante estudios familiares, clínicos y hormonales, en los que se incluyen las mediciones de 17 hidroxiprogesterona, cortisol circulante en sangre, y 17 cetoesteróides en orina, además de mediciones de todas las hormonas androgénicas. Estos estudios fueron hechos por endocrinólogos expertos en la enfermedad, jefes de los respectivos departamentos de endocrinología de los Institutos de donde provinieron las familias estudiadas. La edad de los pacientes osciló entre los 8 meses y los 43 años. Como grupo testigo, se tomaron los datos de un estudio previo realizado en población abierta mexicana. (20, 13, 53).

Las instituciones de donde provinieron las familias fueron:

Instituto Nacional de Pediatría de S.S.A. (10 familias)

Hospital Regional 20 de Noviembre del I.S.S.S.T.E. (4 familias, una de ellas Perdedora de sal). (Cuadro 4)

Hospital Francisco del Paso y Troncoso del I.M.S.S. (4 familias)

Y de cada una de estas familias se realizó un árbol genealógico, en donde las letras a y b corresponden a los haplotipos paternos, y c, d, a los haplotipos maternos. Estos haplotipos fueron asignados en base a las tipificaciones de todos los miembros de la familia. (Cuadros II a XX)

En el cuadro # XXI, se muestran los haplotipos correspondientes a los

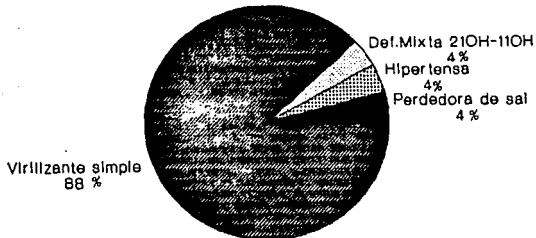
afectados, organizados de acuerdo al antígeno B y en orden creciente del número del antígeno B. Así mismo, en el (Cuadro # XXII), se muestran los haplotipos sanos ordenados de la misma manera.

En el (Cuadro XXIII), se muestran los resultados del análisis de Chi^2 , probabilidad, riesgo relativo y fracción etiológica, para los alelos que fueron estadísticamente significativos.

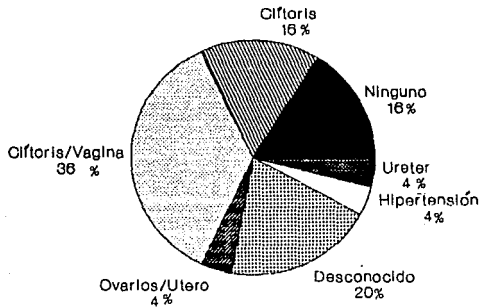
En el (Cuadro # XXIV), se muestran los resultados del análisis para el equilibrio de Hardy-Weinberg y se señalan los valores de P que fueron significativos.

CUADRO # I

DISTRIBUCION POR VARIEDAD CLINICA Y RASGOS
CLINICOS EN LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

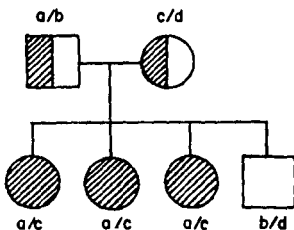


VARIEDAD CLINICA



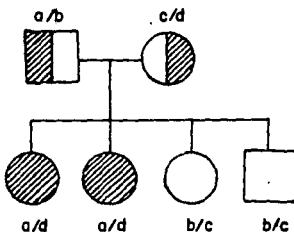
RASGOS CLINICOS

CUADRO # II FAMILIA # 1
HOSPITAL FRANCISCO DEL PASO Y TRONCOSO



a.	A28	B60	Bw6	Cw-	DR4	DRw53	DQw3	S	3	0
b.	A25	B52	Bw4	Cw3	DR2	DRw-	DQw-	F	3	1
c.	A28	B62	Bw6	Cw3	DR8	DRw52	DQw-	S	4	2
d.	A24	B35	Bw6	Cw4	DR5	DRw52	DQw-	F	0	1

CUADRO # III FAMILIA # 2
HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE

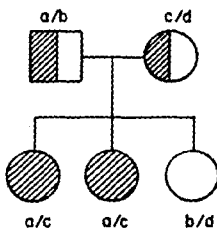


a.	A2	B51	Bw4	Cw4	DR4	DRw53	DQw3	FB	C4A	C4B
								F	3	0
b.	A31	B58	Bw8	Cw2	DR-	*	DQw1	S	3	0

* NO PRESENTO ESE MARCADOR

NOTA: Se tiene certeza de los antígenos mas no de los haplotipos

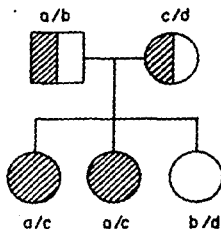
CUADRO # IV FAMILIA # 3
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



							FB	C4A	C4B	
a.	A24	B-	Bw-	Cw-	DR1	*	DQw1	S	3	1
b.	A-	B13	Bw4	Cw-	DR9	DRw53	DQw3	S	0	1
c.	A2	B39	Bw6	Cw-	DR2	DRw52	DQw-	S	0	1
d.	A28	B60	Bw6	Cw3	DR4	DRw53	DQw3	S	3	1

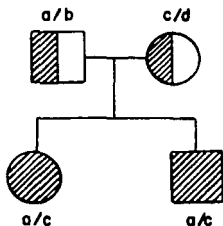
* NO SE PRESENTO ESE MARCADOR

CUADRO # V FAMILIA # 4
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



								FB	C4A	C4B
a.	A32	B39	Bw6	Cw-	DR7	DRw53	DQw3	S	3	1
b.	A24	B62	Bw6	Cw1	DR8	DRw52	DQw-	S	0	1
c.	A24	B57	Bw4	Cw3	DR2	*	DQw1	S	0	1
d.	A2	B60	Bw6	Cw-	DR4	DEw53	DQw3	S	3	1

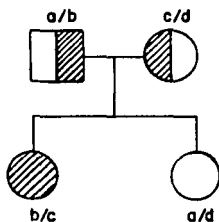
CUADRO # VI FAMILIA # 5
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



a.	A28	B61	Bw6	Cw-	DR5	DRw52	DQw-	FB S	C4A 0	C4B 1
b.	Se desconoce									
c.	A24	B35	Bw6	Cw3	DR7	DRw53	DQw1	S	3	1
d.	A32	B13	Bw4	Cw2	DR1	*	DQw1	F1	3	1

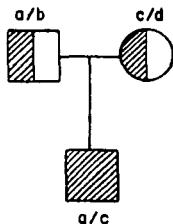
* NO SE PRESENTO ESE MARCADOR

CUADRO # VII FAMILIA # 6
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



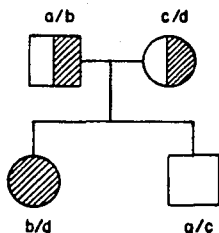
a.	A2	B27	Bw4	Cw1	DR3	DRw52	DQw3	FB S	C4A 4	C4B 2
b.	A-	B18	Bw6	Cw7	DRw6	DRw52	DQw1	S	3	2
c.	A26	B38	Bw4	Cw-	DR4	DRw53	DQw3	S	4	2
d.	A28	B52	Bw4	Cw-	DR-	DRw52	DQw-	F1	3	2

CUADRO # VIII FAMILIA # 7
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



	A3	B7	Bw6	Cw7	DR4	DRw53	DQw-	FB S	C4A 0	C4B 1
a.	A3	B7	Bw6	Cw7	DR4	DRw53	DQw-	S	0	1
b.	A2	B35	Bw4	Cw4	DRw8	DRw52	DQw1	S	3	0
c.	A2	B13	Bw4	Cw2	DRw14	DRw52	DQw-	S	3	1
d.	A-	B7	Bw6	Cw4	DR9	DRw53	DQw3	S	0	1

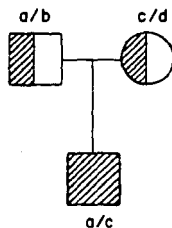
CUADRO # IX FAMILIA # 8
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



	A23	B49	Bw4	Cw-	DR2	*	DQw1	FB NP	C4A NP	C4B NP
a.	A23	B49	Bw4	Cw-	DR2	*	DQw1	NP	NP	NP
b.	A2	B48	Bw6	Cw-	DRw8	DRw52	DQw1	S	3	1
c.	A3	B44	Bw4	Cw-	DR4	DRw53	DQw-	S	3	1
d.	A23	B51	Bw4	Cw2	DR7	DRw53	DQw3	F	3	0

* NO SE PRESENTO ESE MARCADOR

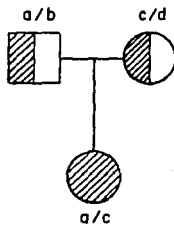
CUADRO # X FAMILIA # 9
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



	A24	B35	Bw6	Cw4	DR4	DRw53	DQw-	FB	C4A	C4B
a.	A24	B35	Bw6	Cw4	DR4	DRw53	DQw-	S	0	1
b.	A2	B42	Bw6	Cw1	DRw14	DRw52	DQw1	S	3	1
c.	A2	B44	Bw4	Cw3	DRw8	DRw52	DQw1	S	3	1
d.	A3	B13	Bw4	Cw-	DR2	*	DQw3	F	3	1

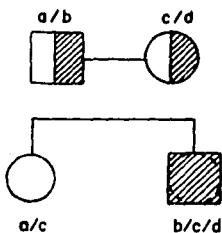
* NO SE PRESENTO

CUADRO # XI FAMILIA # 10
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



	A31	B62	Bw6	Cw1	DR7	DRw53	DQw2	FB	C4A	C4B
a.	A31	B62	Bw6	Cw1	DR7	DRw53	DQw2	S	3	1
b.	Se desconoce									
c.	A24	B35	Bw6	Cw4	DR2	*	DQw2	S	3	1
d.	A-	B39	Bw6	Cw7	DR-	DRw-	DQw2	S	3	1

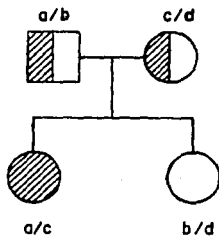
CUADRO # XII FAMILIA # 11
HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE



a.	A25	B13	Bw4	Cw2	DR4	DRw53	DQw-	FB S	C4A 3	C4B 1
b.	A24	B49	Bw4	Cw-	DR1		DQw1	S	0	2
c.	A3	B8	Bw6	Cw7	DRw8	DRw52	DQw3	S	0	3
d.	A25	B51	Bw4	Cw3	DR2	DRw-	DQw1	S	4	2

UNICA FAMILIA PERDEDORA DE SAL

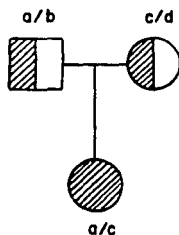
CUADRO # XIII FAMILIA # 12
HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE



a.	A24	B35	Bw6	Cw4	DRw8	DRw52	DQw1
b.	A28	B57	Bw4	Cw6	DR3	DRw52	DQw2
c.	A36	B39	Bw6	Cw7	DR4	DRw53	DQw3
d.	A28	B35	Bw6	Cw6	DR2	.	DQw1

* NO SE PRESENTO ESE MARCADOR

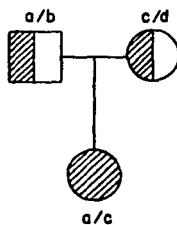
CUADRO # XIV FAMILIA # 13
HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE



							FB	C4A	C4B	
a.	A23B51	*	Bw4	Cw2	DR1	*	DQw1	F	3	1
b.	A-	B44	Bw4	Cw4	DR7	DRw53	DQw3	F	4	2
c.	A1	B62	Bw6	Cw6	DR4	DRw53	DQw3	F	0	1
d.	A2	B51	Bw4	Cw4	DR1	*	DQw1	S	4	2

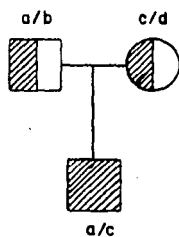
* NO SE PRESENTO ESE MARCADOR

CUADRO # XV FAMILIA # 14
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



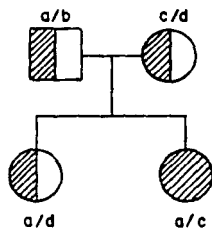
							FB	C4A	C4B	
a.	A26	B7	Bw6	Cw7	DR4	DRw53	DQw1	F	0	1
b.	Se desconoce									
c.	A28	B60	Bw6	Cw-	DR3	DRw52	DQw3	F	3	1
d.	A23	B57	Bw4	Cw3	DR2	*	DQw1	NP	4	2

CUADRO # XVI FAMILIA # 15
HOSPITAL FRANCISCO DEL PASO Y TRONCOSO



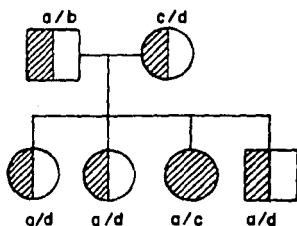
a.	A24	B60	Bw6	Cw-	DR4	DRw53	DQw-	FB S	C4A 3	C4B 1
b.	A2	B50	Bw-	Cw-	DRw6	DRw52	DQw3	S	0	1
c.	A24	B47	Bw4	Cw-	DR1	*	*	S	0	1
d.	A28	B45	Bw6	Cw-	DR4	DRw53	DQw3	S	3	1

CUADRO # XVII FAMILIA # 16
HOSPITAL FRANCISCO DEL PASO Y TRONCOSO



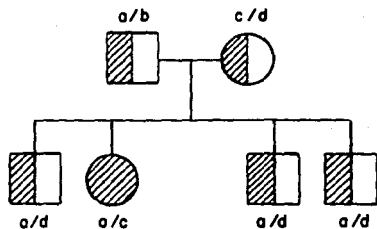
a.	A24	B61	Bw6	Cw3	DR2	*	DQw1	FB S	C4A 2	C4B 1
b.	Se desconoce									
c.	A2	B44	Bw4	Cw5	DR1	*	DQw1	S	3	1
d.	A3	B63	Bw4	Cw6	DR7	DRw53	DQw3	F	2	1

CUADRO # XVIII FAMILIA # 17
HOSPITAL FRANCISCO DEL PASO Y TRONCOSO



a.	A1	B62	Bw6	Cw3	DR9	DRw53	DQw3	FB S	C4A 3	C4B 1
b.	A9	B44	Bw4	Cw-	DR7	DRw53	DQw-	S1	3	1
c.	A28	B62	Bw6	Cw1	DR4	DRw53	DQw3	S	3	1
d.	A11	B35	Bw6	Cw4	DR1	*	DQw1	S	3	1

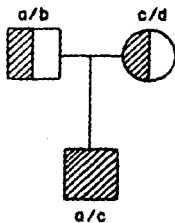
CUADRO # XIX FAMILIA # 18
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



a.	A-	B39	Bw6	Cw1	DR1	*	DQw1	FB S	C4A 3	C4B 1
b.	A36	B58	Bw4	Cw-	DR7	DRw53	DQw3	S	3	1
c.	A2	B40	Bw6	Cw3	DR-	DRw-	DQw3	S	3	1
d.	A-	B44	Bw4	Cw4	DRw8	DRw52	DQw3	S	4	2

CUADRO # XX FAMILIA # 19

HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE



- a. A23 B39 DR3
- b. A2 B5 DR8
- c. A28 B8 DR4
- d. A- B8 DR4

NOTA: Los demás antígenos no se tipificaron

CUADRO # XXI

HAPLOTIPOS AFECTADOS

(Ordenados según locus B)

ANTIGENOS

FAM	A	B	Bw	Cw	DR	DQw	FB	C4A	C4B	Hermanos afectados
14	A26	B7	Bw6	Cw3	DR4	DQw1	F	0	1	
7	A3	B7	Bw6	Cw7	DR4	Dqw1	S	0	1	
7	A2	B13	Bw4	Cw2	DR4	DQw1	S	3	1	
6	A-	B18	Bw6	CW7	DR6	DQw1	S	3	2	
12	A24	B35	Bw6	Cw4	DRw8	DQw1	NP	NP	NP	
19	A28	B35	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
9	A24	B35	Bw6	Cw4	DR4	DQw-	S	0	1	
10	A24	B35	Bw6	Cw4	DR2	DQW3	S	3	1	
5	A24	B35	Bw6	Cw3	DR7	DQw3	S	3	1	
6	A26	B38	Bw4	Cw-	DR4	DQw3	S	4	2	(2)
19	A23	B39	NP	NP	DR3	NP	NP	NP	NP	
4	A32	B39	Bw6	Cw-	DR7	DQw3	S	3	1	(2)
3	A2	B39	Bw6	Cw-	DR2	DQw-	S	0	1	(2)
18	A-	B39	Bw6	Cw-	DR1	DQw-	S	3	1	
12	A36	B39	Bw6	Cw7	DR4	DQw3	NP	NP	NP	
18	A2	B40	Bw6	Cw3	DR-	DQw3	S	3	1	
9	A2	B44	Bw4	Cw3	DRw8	DQw1	S	3	1	
16	A2	B44	Bw4	Cw5	DR1	DQw-	S	3	1	
15	A24	B47	Bw6	Cw-	DR1	DQw-	S	0	1	
8	A2	B48	Bw6-	Cw-	DRw8	DQw-	S	3	1	
13	A23	B51	Bw4	Cw2	DR1	DQw1	F	3	1	
8	A23	B51	Bw4	Cw2	DR7	DQw3	F	3	0	
2	A2	B51	Bw4	Cw4	DR4	DQw3	S	3	0	(2)
4	A24	B57	Bw4	Cw3	DR2	DQw1	S	0	1	(2)
2	A31	B58	Bw4	Cw2	DR-	DQw-	S	3	0	(2)
1	A28	B60	Bw6	Cw-	DR4	DQw3	F	3	0	(3)
14	A28	B60	Bw6	Cw-	DR3	DQw3	S	3	1	
15	A24	B60	Bw6	Cw-	DR4	DQw-	S	3	1	
5	A28	B61	Bw6	Cw-	DR5	DQw-	S	0	1	(2)
16	A24	B61	Bw6	Cw3	DR2	DQw1	S	2	1	
1	A28	B62	Bw6	Cw3	DRw8	DQw-	S	4	2	(3)
10	A31	B62	Bw6	Cw1	DR7	DQw3	S	3	1	
17	A28	B62	Bw6	Cw1	DR4	DQw3	S	3	1	
17	A1	B62	Bw6	Cw3	DR9	DQw3	S	3	1	
13	A1	B62	Bw6	Cw6	DR4	DQw3	F	0	1	
3	A24	B-	Bw-	Cw-	DR1	DQw1	S	3	1	(2)

CUADRO # XXII

HAPLOTIPOS SANOS

(Ordenados según Locus B)

ANTIGENOS

FAM	A	B	Bw	Cw	DR	DQ	FB	C4A	C4B	Hermanos afectados
19	A2	B5	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
7	A-	B7	Bw6	Cw4	DR9	DQw3	S	0	1	
19	A-	Bw8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
15	A28	B45	Bw-	Cw-	DR4	DQw3	S	3	1	
3	A-	B13	Bw4	Cw-	DR9	DQw3	S	0	1	(2)
9	A3	B13	Bw4	Cw-	DR2	DQw3	F	3	1	
5	A32	B13	Bw4	Cw-	DR1	DQw1	F	3	1	
15	A2	B50	Bw-	Cw-	DR6	DQw3	S	0	1	
6	A2	B27	Bw4	Cw1	DR3	DQw3	S	4	2	
1	A24	B35	Bw6	Cw4	DR5	DQw-	F	0	1	(2)
12	A28	B35	Bw6	Cw6	DR2	DQw1	NP	NP	NP	(2)
17	A11	B35	Bw6	Cw4	DR1	DQw1	S	3	1	
7	A2	B35	Bw6	Cw4	DRw8	DQw1	S	3	1	
10	A-	B39	Bw6	Cw7	DR-	DQw-	S	-3	1	
9	A2	B42	Bw6	Cw1	DR14	DQw1	S	3	1	
8	A3	B44	Bw4	Cw-	DR4	DQw1	S	3	1	(2)
13	A-	B44	Bw4	Cw4	DR7	DQw3	F	4	2	
17	A9	B44	Bw4	Cw-	DR7	DQw-	S1	3	1	
8	A23	B49	Bw4	Cw-	DR2	DQw1	NP	NP	NP	(2)
13	A2	B51	Bw4	Cw4	DR1	DQw1	D	4	2	
1	A25	B52	Bw4	Cw3	DR2	DQw-	F	3	1	(2)
6	A28	B52	Bw4	Cw-	DR-	DQw-	F1	3	2	
12	A28	B57	Bw4	Cw5	DR3	DQw3	NP	NP	NP	(2)
14	A23	B57	Bw4	Cw3	DR2	DQw1	NP	4	2	
18	A36	B58	Bw4	Cw-	DR7	Dq3	S	3	1	
4	A2	B60	Bw6	Cw-	DR4	DQw3	S	3	1	(2)
4	A24	B62	Bw6	Cw1	DRw8	DQw-	S	0	1	(2)
3	A28	B60	Bw6	Cw3	DR4	DQw3	S	3	1	(2)
16	A3	B63	Bw4	Cw6	DR7	DQw3	F	2	1	(2)
18	A-	B44	Bw4	Cw4	DRw8	DQw3	S	4	2	(2)

CUADRO # XXIII

DISTRIBUCION DE ALELOS Y HAPLOTIPOS EN CROMOSOMAS AFECTADOS Y SANOS DE
PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA, VIRILIZANTE SIMPLE

MARCADOR MHC	HAPLOTIPOS ENFERMOS	HAPLOTIPOS SANOS	χ^2	P	RR	FE
A24	12/48	4/45	4.232	0.04	3.41	0.17
B39	7/48	1/45	4.513	0.03	7.5	0.12
B61	3/48	9/45	2.906	0.08*	3.0	0.04
B62	7.48	2/45	2.906	0.08*	3.65	0.10
DR4	13/48	8/45	1.572	0.20*	1.60	0.11
FBS	39/44	26/36	3.50	0.05	3.00	0.59
C4B0	8/44	0/37	7.46	0.006	NC	NC
C4A3B0	8/44	0/37	7.46	0.006	NC	NC
S30	7/44	0/36	6.27	0.012	NC	NC

Significado : χ^2 = CHI^2 Ley de Equilibrio de Hardy-Weinberg

P = Probabilidad

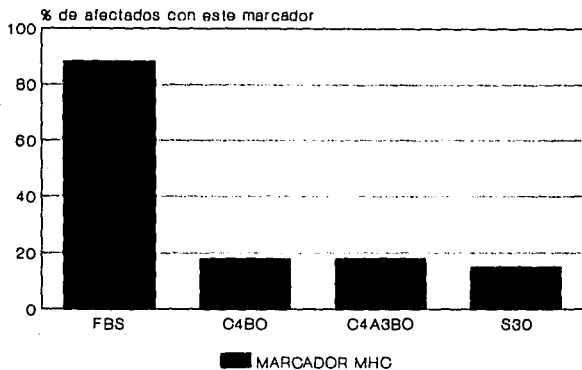
RR = Riesgo Relativo

FE = Fracción Etiológica

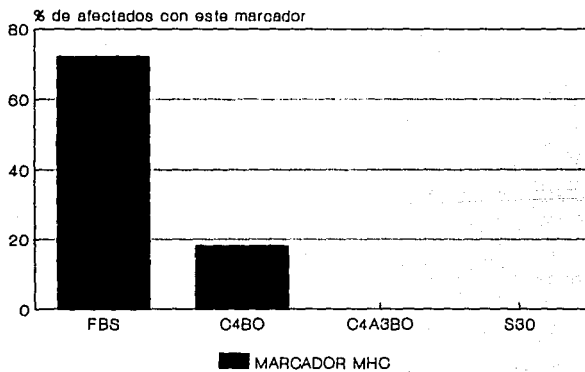
NC = No Calculable

* = Probabilidades más altas

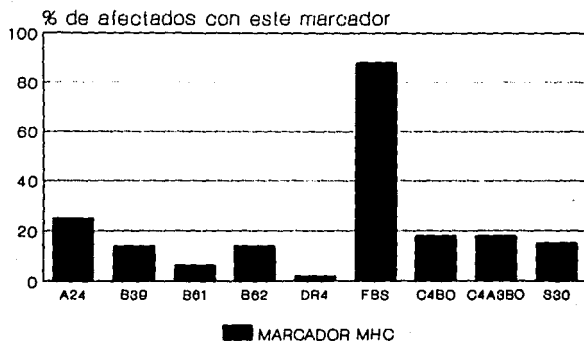
HAPLOTIPOS ENFERMOS DE 44 AFECTADOS



HAPLOTIPOS SANOS DE 36 AFECTADOS



Haplotipos enfermos de afectados con el marcador MHC.



CUADRO # XXIV

HAPLOTIPOS COMPARTIDOS ENTRE HERMANOS SANOS

LEY DE EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG

TIPO DE HERMANOS	HAPLOTIPOS COMPARTIDOS		
	2	1	0
AFECTADOS 11	N (%)		
	Obs. 11(100)	0.0 (0)	0.0 (0)
	Esp. 2.75 (25)	5.5 (50)	2.75 (25)
SANOS 13	Obs. 0.0 (0)	6.0 (46.15)	7.0 (53.84)
	Esp. 3.25 (25)	6.5 (50)	3.25 (25)
χ^2	24.75	0.038	4.326
P	0.00002	NS	0.038

NS: No significativa

4.2 DISCUSION

Este es el primer estudio donde se investigan los productos del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la deficiencia de 21-OH en población mexicana. Por este motivo, inicialmente la idea era realizarlo solamente en pacientes afectados por la forma perdedora de sal, ya que esta es la forma más severa de la enfermedad, y sobre la cual se cuenta con información caucásica en general, se han llevado a cabo en esta forma de la deficiencia. (9, 23, 28, 34, 38, 42, 58)

Desafortunadamente sólo se encontró una familia afectada con esta forma clínica, y por ello se decidió continuar el estudio en familias de pacientes afectados con la forma clásica virilizante simple. Cabe mencionar que se desconoce tanto la incidencia como la prevalencia de la deficiencia en la población mexicana y el hecho de que todos excepto una familia eran de la variedad virilizante simple, sugiere que ésta debe ser la forma prevalente en México. Además el 52% de las familias provienen del servicio de endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría. Es interesante señalar que el número de casos nuevos por año ahí es de 6 a 8 y que aproximadamente el 40% de los pacientes son de la forma perdedora de sal, cifra que concuerda con lo informado en todo el mundo. De las 18 familias estudiadas, con la forma virilizante simple, se obtuvieron 36 haplotipos afectados y 30 haplotipos sanos, los cuales se organizaron de acuerdo a los antígenos del locus B, por ser estos genes, los más cercanos a los genes para la 21-OH, además de ser los que tradicionalmente se han asociado a la enfermedad en otras poblaciones, por su cercanía con el verdadero gen de la deficiencia.

Los antígenos B39, B61 y B62, se encontraron en una alta frecuencia en los haplotipos afectados comparativamente con los haplotipos sanos

sin embargo, al aplicar el análisis estadístico de evaluación con la prueba de probabilidad χ^2 , para comparar los haplotipos afectados contra los sanos de las mismas familias, el único que resultó ser estadísticamente significativo fue el B39. Esto contrasta con lo encontrado en la población caucásica en general, donde el antígeno asociado a esta forma de la enfermedad es el Bw51. (22) Más aún, en diversos estudios se ha encontrado que el B47 y B60 se hallan en la variedad virilizante simple y en la perdedora de sal mientras que B51 y B14 se hallan elevados en la virilizante simple en caucasoides de Estados Unidos y de Yugoslavia, mientras que el B27 se encuentra en pacientes de origen italiano. (1, 23)

Por el contrario, el B8 está asociado negativamente con la enfermedad. (20, 22) Los resultados de este estudio concuerdan con los hallazgos en mestizos venezolanos, (37), en los que a pesar de haber sido hecho con perdedores de sal, los antígenos B39 y B62 fueron prevalentes. Comparando los resultados de este estudio con los resultados del estudio mencionado y realizado en población venezolana, (37), se ve que el antígeno que para nosotros está asociado con la forma virilizante simple de la enfermedad, el B39, es el que para ellos está asociado a la forma perdedora de sal. (37)

Sin embargo, en la misma población y en la variante virilizante simple, se encuentran con cierta frecuencia los mismos antígenos encontrados en este estudio y son: B39, B44, B48, B62. Esto muestra que es indispensable determinar el ligamiento de cada grupo étnico pues no es válido extender resultados de un grupo racial a otro. Por otro lado también es interesante mencionar que el Bw8 como indica el (Cuadro XXII), no está presente en ninguno de los pacientes, pero sí existe en uno de los sanos. Esto sugiere también una asociación negativa con B8 y la enfermedad

en los mestizos mexicanos, aunque no debe olvidarse que la frecuencia del B8 en esta población es menor que en otras poblaciones de origen caucasoides.(13)

La frecuencia significativamente alta del B39, C4B0, C4A3B0, y S30 demuestra que estos son los alelos más ligados a la enfermedad en la población mexicana. Marcando así el riesgo relativo elevado para B39, B61, B62, FBS (7.5, 3.0, 3.65 y 3.00) y la ausencia total de C4B0, C4A3B0 y S30 en los sanos, aunque el RR (riesgo relativo) no pudo ser calculado por los ceros presentes, indica que estos alelos o combinaciones son los que más segregan con la HSC (VS) y por lo tanto son los marcadores de riesgo más probables en mexicanos, no obstante, la fracción etiológica baja para cada uno de ellos (0.12, 0.04, 1.10 y 0.59) confirma que estos no son los marcadores de la susceptibilidad responsables, ya que mientras la fracción etiológica más se acerque a 1, significa que la enfermedad se debe al marcador. En este caso ya está demostrado que el marcador es de 21-OH y los cálculos de este trabajo lo muestran claramente.

No se encontró ninguna asociación entre los antígenos del locus B y el locus DR, pero sí entre los loci FB y C4, pues el complotipo S30 se halla significativamente elevado ($P=0.012$). (Cuadro XXIII)

La frecuencia de alelos nulos en C4B dentro de los haplotipos afectados - comparada con los haplotipos sanos de las mismas familias resultó ser elevada, con una P de 0.006, siendo esto consistente con lo reportado en población caucásica, y confirmando el hecho de que posiblemente se pierde el fragmento completo del cromosoma, donde se encuentran los genes C4B y 21-OH. (58) aunque algunos autores han reportado recientemente que no necesariamente es una delección, sino que el gen de C4A, (42, 46, 29). Aún más, ninguno de los sujetos sanos es portador del alelo

nulo C4B como se observa en el (Cuadro XXII), en cambio el C4A0 está presente en 5 haplotipos sanos y en 8 haplotipos afectados, lo que también confirma que el C4A no tiene ninguna relevancia, pues la delección de éste probablemente junto con la 21-OH, no implican la funcionalidad como se sabe bien para el gen A de 21-OH. (29)

Hay que señalar que la mutación europea de los genes 21-OH que llevan los alelos B51 y B14 no parecen haber sido introducidas en mestizos mexicanos pues ninguno de los afectados es portador del B14 y no es extraña la frecuencia de B51 tanto en enfermos como en sanos ya que es un antígeno frecuente en mexicanos (FA=17.0). (13, 54)

El hecho de que se hayan encontrado con cierta frecuencia varios antígenos del locus B dentro de los haplotipos afectados no es extraño, dado que el responsable de la deficiencia es en realidad el gen 21-OH por sí mismo, fenómeno que ha sido informado en estudios realizados en población italiana y japonesa (1, 28), en donde no sólo se plantea el hecho de que la enfermedad no tiene necesariamente ligada a un antígeno B determinado, sino también puede deberse a la pérdida del gen 21-OHB o a múltiples recombinaciones, conversiones génicas, y quizá también en mutaciones puntuales que hagan que la enzima se exprese y que sea poco funcional. La desviación significativa del equilibrio genético en cuanto a la ley de Hardy-Weinberg, (Cuadro XXIV) indica sin duda alguna que la enfermedad es recesiva. Así mismo es importante señalar que los hermanos sanos también comparten 2 haplotipos menos de lo esperado, y no comparten ningún haplotipo más ni uno menos de lo esperado con lo que se confirma que los diversos alelos están implicados en la falta de ligamiento al gen 21-OHB deficiente.

Es importante enfatizar que en las familias 16, 17 y 18 (ver árboles

genealógicos) se encontraron 7 hermanos sanos, portadores heterocigotos. No se encontró un número mayor, el cual era de esperarse, debido a que hubo algunas familias con hermanos sanos a los cuales fué imposible tipificar. Esto posiblemente habría hecho que el número de portadores heterocigotos fuera mayor. Esto es relevante ya que significa que si por azar, dichos individuos tienen descendientes con una pareja que también sea heterocigota para el gen de la deficiencia, 21-OHB, las probabilidades de tener hijos afectados se incrementan enormemente. En estos casos es importante el diagnóstico prenatal de la enfermedad, para evitar que estos nazcan con la deficiencia se les aconseja que recurran a Consejo genético.

CONCLUSIONES

CAPITULO V

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- 1.- Este ha sido el primer trabajo que estudia la asociación y ligamiento HLA con la deficiencia de 21-OH en población mexicana.
- 2.- De las 18 familias estudiadas, afectadas con la forma virilizante de la enfermedad, se obtuvieron 36 haplotipos afectados y 30 haplotipos sanos.
- 3.- Los antígenos que dentro de los haplotipos afectados se encontraron con mayor frecuencia fueron: A24, B39, B51, B61, B62, DR4, FBS, C4A3, C4B0, siendo estadísticamente significativos únicamente: A24, B39, FBS, C4A3, C4B0.
- 4.- No se encontraron combinaciones en desequilibrio de enlace de antígenos del locus B y los del locus DR que fueran estadísticamente significativos.
- 5.- Los únicos antígenos que se encontraron asociados entre si como haplotipos fueron: FBS, C4A3C4B0.
- 6.- De acuerdo a los puntos 3 y 5 se puede concluir que los alelos comprometidos con la enfermedad en esta población son: B39, FBS, C4A3, C4B0.
- 7.- Se confirmó el carácter autosómico recesivo de la enfermedad, mediante el cálculo con la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg, La cual mostró que todos los hermanos afectados, (11 de 11), comparten

los dos haplotipos ($P=0.0002$), 13 hermanos sanos, 7 no comparten ningún haplotipo con los afectados, (P de 0.038) lo que indica que hay marcadores que se asocian negativamente con la enfermedad.

8.- El factor de riesgo para esta enfermedad es muy elevado para las personas con el antígeno B39, ($RR=7.5$) y FBSC4A3C4B0, el ($RR=7.68$) y C4B0, ($RR=9$).

9.- El caso afectado con la forma perdedora de sal resultó ser una recombinación y la porción del haplotipo que lleva su hermana no afectada contiene al BB, (antígeno que nunca aparece en enfermos).

10.- Los del locus B involucrados son semejantes a los de mestizos venezolanos pero probablemente prevalecen por derivación genética y las mutaciones del gen deficiente deben haber sido cercanamente a lo esperado.

11.- Se encontraron 7 portadores sanos en 3 familias. Por lo que es conveniente que sus parejas sean estudiadas en el momento oportuno para evitar el riesgo de gestar descendientes con la misma deficiencia.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Abbal., M., Cuccia Belvedere, M., Livieri, C., De Paoli, F., Martineti, M., Severi, F., Cambon-Thomson, A. Italian Extended HLA Haplotypes in Congenital Hyperplasia. Tissue Antigens. 32: 17-23. 1988
2. Alper, C.A., Boenisch, T. and Watson, L. Genetic polymorphism in human Glycine-rich Beta-glycoprotein. J. Exp. Med. 135:68. 1976
3. Alper, C.A., Fleischinch, E., Awdeh, Z., Raum, D., Crigler, J.F., Gerald, P.K. and Yunis, E.J. Extended MHC Haplotypes in Salt-losing 21-Hydroxylase Deficiency. Ann. N.Y. Acad. Sci. 458: 28-35. 1985
4. Awdeh, Z.L. Inherited Structural Polimorphism of the Fourth Component of Human Complement. Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 77: 3576-80. 1980
5. Benacerraf, B., Rock, K.L. 1985. The Biological Significance of the Antigens of the Major Histocompatibility Complex. In Cell Biology of the MHC. ed. Academic Press.Co. 1985
6. Berhman Vaughan Nelson Textbook of Pediatrics W.B. Saunders Co. pag. 268, 1482, 1487. 1983
7. Bodmer, W.F. HLA Today. Human Immunology. 17:490-503. 1986
8. Brumbach, E., Conte, F.A. Disorders of Sexual Differentiation. Wilson, J.D., Foster, D.W., ed. Williams Textbook of Endocrinology. 7th ed. Philadelphia: W.E. 1985
9. Cacciari, E., Balsamo, A., Cassio, A., Pazzi, S., Berardi, F.,

- Salardi, S., Cicognani, A., Pirazzoli, P., Zapulla, F. Capelli, M., Paolini, M. and Cordero, C.I. Neonatal Creening Program for Genital Adrenal Hyperplasia. Ann. Rev. N.Y. Acad. Sci. 458:85-89. 1985
10. Callaway, C., Falcon, C., Grant., G., Maurer, D.H., Auerbach, A.D., - Rosenwaks, Z. and Pallack, M.S, HLA Typing with Cultured Amniotic and Chorionic Villus Cells for Early Prenatal Diagnosis or Parental Testing without One Parent's Availability. Hum. Immunol. 16:200-205. 1986
 11. Campbell, R.D. The Molecular Genetics and Polymorphism of C2 and factor B. Brit. Med. Bull. 43: 37-49. 1987
 12. Carroll, M.C., Alper, C.A. Polimorphism and Molecular Genetics of Human C4. Brit. Med. Bull. 43: 50-65. 1987
 13. Castro, L.E. , Flores., J., Rangel, B.E., Debaz, Eroza, G., Granados,- G. Hernández. O., Gorodezky. Frecuencias Antigénicas Clase I y Clase II del MHC en la población Mestiza Mexicana. Resúmenes VI Congreso Nacional de Inmunología. México, p:145. 1985
 14. Chaplin, D.D., Galbraith, L.J., Seidman, J.C. White. P.C. and Parker K.H., Nucleotide Sequence Analysis of Murine 2i-OH Genes: Mutations - Affecting Gene Expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9601-05. 1986
 15. Chrousos, T.J., Evans, M.S., Louriaux, D. L., Mc Clusky., J. Fletcher, J.C. Atempted prevention of Abbormal External Genital Masculinization by Pharmacologic Supression of Fetal Adrenal Gland in Utero. Ann. N.Y. Acad. Sci. 458: 156-164. 1985

16. Conner, B.J., Reyes, A.A., Morin, C., Itakura, K., Tepliz, R.L. Wallace, R.B. Detection of Sickle Cell beta globine Allele by Hybridization with Synthetic Oligonucleotides. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 80: 278-82. 1983
17. Coullin, P., Rappaport, R., Kutten, F., Hors, J., Feingold, J., Boué, A. HLA Associations in 21-OH deficiency (Congenital an Late-Onset Adrenal Hyperplasia) in France Ann. N.Y. Acad. Sci. 458: 41-45. 1985
18. Danilovs, J., Terasaki, P.I. Park, M.S. and Ayoub, g.b. Lymphocyte Isolation By Thrombin-nylon wool. Histocompatibility testing. Ed. Munksgarard, Copenhagen, pag. 287-288. 1980
19. Dausset, J. Leucoaglutinins and Blood Transfusion. Vox Sang 4:190-198. 1954
20. De Crecchi, J. Sopra un Caso de Apparenzi Virili in una Donna. Morgani. 7: 154-188. 1965
21. Dupont, B. Immunology of HLA Nomenclature comitte. Dupont B. Ed. Dupont., ed.Springer Verlag. N.Y. pag: 1-10. 1987
22. Dupont, B., Oberfield, S.E. Smithwick, E.M., Lee, T.D. Levine, L.S. Close Genetic Linkage Between HLA and Congenital Adrenal Hyperplasia. 21-OH Deficiency. Lancet. 2: 1309-11. 1977
23. Dupont, B. , Pollack, M.S., Levine, L.S., O'neill, G.J., Hawkins, B.R., New, M.I. Congenital Adrenal Hyperplasia Histocompatibility Testing, Terasaky, P.I., ED. Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory. pag. 693-706. 1980

24. Fleischnich, E., Awdeh, Z.L., Rumm, D., Granados, J., Alosco, S.M., Crigler, J.F. Gerald, P.S., Yunis, E.J. Extended MHC Haplotypes in 21-OH Deficiency, Congenital Adrenal Hyperplasia: Shared Genotypes in Unrelated Patients. Lancet. 1:152-156. 1983
25. Frank H. Netter. M.D., Endocrine System and Metabolic Diseases The Ciba Collection of Medical Illustrations Vol. 4 Published by Ciba Published by Ciba Pharmaceutical Co. p:91-93. 1974
26. Gorodezky, C., Castro, Le., Flores, J., Granados. G., Hernández, O., Rodríguez, L., Trejo, V., Casares. G. Séptimo Curso Teórico Práctico de Actualización en Histocompatibilidad. Manual de Prácticas. 1988
27. Hall, P.H. Cytocrome: Physiology of Steroidogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 458:203-215. 1985
28. Higashi, P.F. Tanae.A., Inoue, H., and Fuji-Kuriyama, Y. Evidence for Frequent Gene Conversion in the Steroid 21-OH P450 Gene: Implications for Steroids 21-OH Deficiency. Am. J. Hum. Genet. 42:17-25. 1988
29. Jean Francoise Bach Inmunología. Antígenos Definidos por los Anticuerpos séricos. Ed. Ciencia y Técnica, S.A., Tomo III pag. 581-607. 1989
30. Karger, S, Human Gene Mapping: Eight International Workshop on Human Gene Mapping. Helsinki, Finland. 1985
31. Kastelan, A., Berljacik-Surkalovic, Lj. Dumie, M. The HLA Associations in Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-OH Deficiency in Yugoslav Population. Ann. N.Y. Acad. Sci. 458:36-40. 1985

32. Kuhnle, U. Bohm, M., Wolf, G. Mayerova, A., Dorr, H.G. Bidligermaier, F., Knorr, D. Virilization without Adrenal Hyperplasia in 21-OH Deficiency During Fetal Life. J. of Clin. and Metab. 58: 574-77. 1984
33. Kuhnle, U., Chow, D. The 21-OH Activity in the Glomerulosa and Fasciculata of the Adrenal Hyperplasia. J.Clin. Endoc. Metab. 52:534-44. 1981
34. Lamm, L.U., Petersen, G.B. The HLA Genetics Linkage Group. Transp. Procc. 4:1992-96. 1979
35. Laron, Z., Roitman, A., Pertzalan, A., Kaufman, H. and Zamir, R. Associations in Late-Onset 21-OH Deficiency in Israel. Ann. N.Y. Acad. Sci. 458:52-56. 1985
36. Larrea, F., Ulloa-Aguirre, A. Pérez Palacios, G. Hiperplasi Suprarrenal Congenita como causa de Pseudhermafroditismo Femenino. Rev. Invest. Clin. Mex. 38:209-217. 1986
37. Layrisse, Z., White, C., Gunezler, P., Gafaro Varela, L., Arias, S., Yunis, E.J., Alper, C.A. and Awedh, Z.L. Sharin of MHC Haplotypes Among Apparently Unrelated Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-OH Deficiency. Inmunogenetics. 25:2-6. 1986
38. Levine, L.S., Dupont, B., Lorenzen, F., Pang, S., Polack, M., Oberfield, E., Kohn, Lerner, A., Acciari, M., Mantero, F., Cassio A., Scaroni, K., Chiumello, G., Rondanini, G.F. Gionanelli, Virdis, R., Bartolota. E. Migliori, C., Pintor C., Tato, L., Bardoni, F. and New, M.I. Genetic and Hormonal Characterization of Cryptic 21-OH Deficiency. J. Clin. Endoc. Metab. 53:1193-98. 1981

39. Lisker, R. Estructura Genética de la Población Mexicana. Salvat Mexicana, Editores. p:1-6. 1981
40. Longo, A., Ferrara, G.B. Human B Cell. Separation and typing. Histo-compatibility Testing. Terasaki, P.I. Ed. Munksgard, Copenhagen. p:283. 1980
41. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y. . 1982
42. Matesson, K., P450 21-OH Gene Deletions are not found in Family Studies of Congenital Adrenal Hyperplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:5858-62. 1987
43. Maurer, D.J., Pollack, M.S.. The Use of Gamma Interferon to Increase HLA Antigens Expression on Cultured Amniotic Cells Used for Prenatal Diagnosis of 21-OH Deficiency. Ann. N.Y. Acad. Sci. 458:148-155. 1985
44. Merck, Manual de Diagnóstica y Terapéutica, Merck Sharp & Dome, Co. Inc. Rahway., p:267-269. 1978
45. Miller, J., and Germain, R.N. Efficient Cell Surface Expression of Class II Molecules in the Absence of Associated Invariant Chain. J. Exp. Med. 164:1478-89. 1986
47. Mornet, E., Boue, J. Raux-Demay, M, First Trimester Prenatal Diagnosis of 21-OH Deficiency by Linkage Analysis to HLA-DNA Probes and by 17-hidroxyprogesterone Determination, Hum. Genet. 73:358-64. 1986
48. Mornet, E., Coullin P., Kutten, F. Associations Between Restriction Fragment Length Polimorphism Detected with a Probe for Human 21-OH and two Clinical forms of 21-OH Deficiency. Hum. Genet. 74:402-8. 1986

49. New, M.I. Clinical and Endocrinological Aspects on 21-OH Deficiency.
Ann. N.Y. Acad. of Sci. 458:1-27. 1985
50. O'Neill, G.F., Dupont, B. Serum C4 Levels, Chido, Rodgers, and allotypes of C4 Component of Complement. Transp. Proc. 11:1102-06. 1979
51. O'Neill, G.F., Pang, S.Y., Dupont, B. Two HLA Linked loci Controlling the Fourth Component of Human Complement. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:5165-69. 1978
52. Pang, S., Pollack, M.S., Loo, M., Green, O., Nussbaum, R., Clayton, G., Dupont, B. and New, M.I. Pitfalls of Prenatal Diagnosis of 21-OH Deficiency. Congenital Adrenal Hyperplasia. Ann. N.Y. Acad. of Sci. 458:111-130. 1985
53. Pang, S., Spence, D.A. and New, M.I. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia with Special Reference to Screening in Alaska. Ann. N.Y. Acad. of Sci. 458:90-102. 1985
54. Park, A.C., Gorodezky, C., Terasaky, P.I. Population of Mexican. HLA in Asia-Oceania. Ed. Aizawa Hokkadio. University Press. Sapporo. Japan. p:291-94. 1986
55. Pollack, M.S., Kennan, B., Christiansen, F.T., Cobain, T.J., Dawkins, R., Clayton, G. The Immunological Detection of a 21-OH Deficiency Mutation HLA Supratype. Am. J. Hum. Genet. 38:688-98. 1986
56. Raum, D., Awedh, S.V., Yunis, E.J., Alper, C.A. Major Histocompatibility Marker in Disease. Clin. Immunol. Allergy. 1:305-360. 1978
57. Raum, D., Stux, Awedh, Z., Yunis, E.J., Alper, C.A. Recent Advances

in Immunogenetis of Leukocytes, Plasma Proteins, and Blood Transfusion en Fairbank V.F. Ed. Haematology. John Willey and Sons N.Y. 1982

58. Rodey, G.E. History and nomenclature of HLA System. Dawson, R.B. Ed. HLA Typing: a Technical Workshop. American Associations of Blood Banks. San Francisco. Cal. 1976
59. Rumsby, G., Carroll, M.C., Porter, R.R., Grant B.D. and Hulelm, M. Deletion of the 21-OH and Complement C4 Genes in Congenital Adrenal Hyperplasia. J. Med. Genet. 23:204-209. 1986
60. Salmeron de Diedo, J., Sánchez-García, P., Mora, V.T., Pato Castel I. Hiperplasia Suprarrenal Congénita. Endocrinología y Metabolismo III. Madrid. 1986
61. Shaw, S., Biddison, W.E. HLA Restriction of Human Influenza Virus Immune Cytotoxic T Cells. Transp. Proc. 11:1845-48. 1979
62. Shehy, M.J. Primed Lymphocyte Test. Celular Immunology. American Association for Clinical Histocompatibility Testing. Ed. p:45-48. 1983
63. Sigma, Cell Cultured Reagent., Sigma, Chemical Co. p:224-225. 1990
64. Snell, G., Dausset, J. and Matteson, S. The HLA Complex: Serology and Genetics. Histocompatibility. Ac. Press. Ed. N.Y. 182-237. 1978
65. Speicer, P.W., New, M.I. Genotype and Hormonal Phenotype in Non-Classical 21-OH Deficiency. J. Clin. Endoc. Metab. 64:86-91. 1987
66. Svenjard, A., Ryder, L.P. Disease Associations, Histocompatibility Technics, Ed. H.M. Dick and F. Kissmeyer Nielsen., Elsevier/North Holland, Biomedical Press., Amsterdam, New York, Oxford. p:185-205. --

1979

67. Terasaky, P.I. Histocompatibility testing. UCLA. L.A. Calif. U.S.A. P:34-36. 1980
68. Van Rood, J.J., Van Leewen, A., Earnise, J.G. Leucocyte Antibodies in Sera of Pregnant Women. Vox Sanguinis. 4:431-44. 1959
69. Watson, J.D., Tooze, J., Kurtz, D.T. Recombinant DNA: a Short Course. N.Y. Scientific American Books. 1983
70. Werkmeister, J.W., New, M.I., Dupont, B., White, P.C. Frequent Deletion and Duplication of the Steroid 21-OH Genes. Am. J. Hum Genet. 34:461-469. 1986
71. White, P.C. New, M.I., Dupont, B. Cloning and Expression of cDNA Encoding a Bovine Adrenal Cytochrome P450 Specific for Steroid 21-Hydroxilation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:1986-90. 1984
72. White, P.C., Grossberg, D., Onufer, B.J. Two Genes Encoding Steroid 21-OH are located Near the Genes Encoding the Fourth Component of Complement in Man. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 1089-93. 1985
73. White, P.C., Werkmeister, J., New, M.I. and Dupont, B. Steroid 21-OH Deficiency and the Major Histocompatibility Complex. Hum. Immunol. 15:404-415. 1986
74. White, R. and Lalouel, J.M. Chromosome Mapping with DNA Markers. Scientific American. 258:28-28. 1988
75. Winter, J.S.D., Couch, R.M. 1985. Modern Medical Therapy of Congenital Adrenal Hyperplasia. Ann. N.Y. Acad. of Sci. 458: 165-173. 1985
76. Yanagibashi, K., Haniu, M., Shively, J.E., Shen, W.H., Hall, P. The Synthesis of aldosterone by the Adrenal Cortex: Two zones