

10/10/96
13
280



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN ENTRE HLA Y ABSCESO
HEPÁTICO AMIBIANO. ANÁLISIS
SEROLÓGICO Y MOLECULAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
(INMUNOLOGÍA)

P R E S E N T A :

MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: M.C. JORGE ARELLANO BLANCO.

CIUDAD UNIVERSITARIA.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del IMSS CMN-SXXI, bajo la dirección y tutoría del MC Jorge Arellano Blanco.

Durante el desarrollo de la Tesis la sustentante fue becada del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

De manera muy atenta y especial, dedico el presente trabajo a mi asesor quien con su atinada dirección, su apoyo invaluable y su gran comprensión me ha mostrado con su ejemplo lo que se logra con constancia, dedicación y empeño; para él, mi gratitud permanente y sincera que no alcanzaria expresarla a través de palabras. ¡Gracias!

Al Dr. Roberto Kretschmer S. Director de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología por su apoyo y cotutoría durante la realización de mis estudios y en el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Julio Granados Arriola del departamento de Inmunología y Reumatología del INN "Salvador Zubiran" por su invaluable ayuda y dirección durante la caracterización de complotipos y la adaptación de las técnicas moleculares de tipificación

A los Doctores: Dra. Nancy Justiniani Cedeño, Dr. Armando Madrazo y Dr. Jose Ignacio Santos mi agradecimiento por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Q. Oralia Ladrón de Guevara, Q.F.B. Patricia Padilla Cortés y Q.F.B. Laura García Rivera del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM., por su ayuda en la síntesis de oligonucleótidos usados en una parte de este trabajo.

A mi jurado por su aportación a este trabajo.

A todo el personal de la U.I.M. en Inmunología del IMSS y del
Departamento de Inmunología y Reumatología del INN

A mis padres, a mi familia y en especial a mi hijo por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado. ¡Muchas gracias!

A mis amistades, que en ocasiones era imposible verlas.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 SISTEMA HLA.....	4
Genes.....	4
Estructura.....	10
Localización.....	16
Función.....	17
2.2 TIPIFICACIÓN HLA.....	19
Tipificación serológica.....	19
a) clase I.....	19
b) clase II.....	20
Tipificación por electroforesis.....	20
a) clase III.....	20
Tipificación por métodos moleculares.....	21
2.3 HLA Y ENFERMEDAD.....	23
Estudios en población abierta.....	25
Estudios familiares.....	25
Evaluación estadística de la asociación.....	28
2.4 AMIBIASIS.....	30
Etiología.....	30
Clasificación de <i>E. histolytica</i>	31
a) ciclo de vida.....	31
Patogénesis.....	33
a) infección asintomática.....	34
b) infección sintomática no invasora.....	34
c) infección sintomática invasora.....	36
amibiasis cutánea.....	37
amibiasis cerebral.....	37
amibiasis pleuropulmonar.....	37
absceso hepático amibiano (AHA)....	38
Epidemiología.....	40
Relación huésped-parásito.....	42
2.5 PARASITOSIS Y HLA.....	46
<i>Trichinella spiralis</i> y <i>T. pseudospiralis</i>	46
<i>Leishmania donovani</i> y <i>L. major</i>	48
<i>Plasmodium sp.</i>	50
<i>Trypanosoma cruzi</i>	51

<i>Toxoplasma gondii</i> y Giardiasis.....	51
Amibiasis.....	52
3. OBJETIVOS.....	53
4. HIPÓTESIS.....	54
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
5.1 ESTUDIO SEROLÓGICO.....	55
Pacientes.....	55
Testigos.....	55
Obtención de las muestras.....	56
Obtención de linfocitos T y B.....	57
Tipificación serológica de HLA-ABC y HLA-DR..	58
Determinación de complotipos.....	58
5.2 ESTUDIO MOLECULAR.....	60
Pacientes.....	60
Testigos.....	60
Extracción del DNA.....	60
Amplificación del DNA.....	61
a) región DR-Beta.....	62
b) región DQ-Beta.....	62
c) primers específicos de grupo.....	63
d) primers específicos de alelo.....	63
Caracterización molecular de antígeno HLA....	64
5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
6. RESULTADOS.....	68
6.1 ESTUDIO SEROLÓGICO.....	68
Tabla 2.....	71
Tabla 3.....	72
Tabla 4.....	73
Tabla 5.....	74
6.2 ESTUDIO MOLECULAR.....	75
Tabla 6.....	78
Tabla 7.....	79
7. DISCUSIÓN.....	80

8. APÉNDICE 1.....	90
8.1 EQUIPO Y MATERIAL.....	90
9. APÉNDICE 2.....	92
9.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	92
Reactivos para tipificación serológica	
HLA-ABC y -DR.....	92
Reactivos para estudio electroforético.....	93
a) factor B.....	93
b) factor C4.....	93
c) factor C2.....	94
Reactivos para estudio molecular.....	94
a) extracción del DNA.....	94
b) PCR.....	96
c) marcaje de oligonucleótidos.....	97
d) hibridación.....	97
e) quimioluminiscencia.....	99
10. APÉNDICE 3.....	101
10.1 DETALLES TÉCNICOS.....	101
Obtención de células mononucleares en	
gradiente de Ficoll-Hypaque.....	101
Obtención de linfocitos B con Lympho-Kwik TM	101
Selección positiva de linfocitos B con	
perlas inmunomagnéticas y selección	
negativa de linfocitos T.....	102
Selección positiva de linfocitos T con	
perlas inmunomagnéticas y selección	
negativa de linfocitos B.....	102
Tipificación serológica ABC y DR con	
colorantes vitales.....	102
Tipificación serológica ABC y DR por	
inmunofluorescencia.....	103
Determinación de complotipos.....	103
Extracción del DNA a partir de 300 µl de	
sangre total.....	105
Extracción del DNA a partir de 20 ml de	
sangre total.....	106
Amplificación del DNA por PCR. Protocolo de	
Lifecodes.....	107
a) electroforesis.....	107
b) dot blot.....	107
c) hibridación y quimioluminiscencia.....	108
Amplificación del DNA por PCR. Protocolo de	
España.....	108
a) electroforesis.....	109
b) dot blot.....	109

c) marcaje de oligonucleótidos.....	109
d) hibridación y quimioluminiscencia.....	110
11. APÉNDICE 4.....	111
11.1 ABREVIATURAS.....	111
12. BIBLIOGRAFÍA.....	112

RESUMEN

ASOCIACIÓN ENTRE HLA Y ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO. ANÁLISIS SEROLÓGICO Y MOLECULAR

En un estudio previo encontramos una asociación posiblemente primaria de HLA-DR3 y SC01 con el absceso hepático amibiano (AHA) en mestizos mexicanos adultos. Dado que el AHA en niños difiere del AHA en adultos en que es menos frecuente, suele seguir un curso más severo, no tiene predilección sexual y coincide frecuentemente con amibiasis intestinal, decidimos explorar las frecuencias antigénicas HLA y de complotipos en niños mestizos mexicanos con AHA. Nuestro estudio serológico actual incluyó 50 niños (< de 13 años) con AHA y 70 niños testigos sanos, así como 33 adultos con rectocolitis amibiana (RCA). La tipificación de los antígenos HLA se efectuó mediante microcitotoxicidad en 2 pasos usando células mononucleares (para HLA-A y -B) y linfocitos B (para HLA-DR y -DQ) obtenidos de sangre periférica por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y enriquecimiento con Dynabeads B. La determinación de complotipos (Factor B, C2 y C4) se efectuó en plasma-EDTA mediante electroforesis en gel de agarosa e

inmunofijación con antisueros específicos. Las frecuencias antigénicas HLA y de complotipos obtenidas en estos grupos fueron comparadas entre sí, y con los 110 adultos sanos y 110 adultos con AHA de la publicación previa. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por χ^2 mediante p exacta de Fisher y los valores de p fueron corregidos multiplicando por el número de especificidades estudiadas (pc). Los pacientes pediátricos con AHA, al igual que los adultos con AHA, mostraron un aumento significativo y comparable en HLA-DR3 (38.0% (niños) y 35.5% (adultos) vs 12.7%, pc<0.01), HLA-A2,DR3 (24.0% (niños) y 21% (adultos) vs 4.5%, pc<0.01) y SC01 (47.1% (niños) y 31.1% (adultos) vs 6.7%, pc<0.01) cuando se compararon con testigos adultos sanos. Sin embargo, cuando estos valores fueron comparados con los obtenidos en testigos pediátricos sanos permanecen únicamente las diferencias significativas en HLA-DR3 (38.0% vs 12.9%, pc<0.05) y en SC01 (47.1% vs 12.0%, pc<0.01) y cuando fueron comparados con los obtenidos en testigos adultos con RCA sólo se observó una diferencia significativa en SC01 (47.1% vs 12.1%, pc<0.05). Al comparar las frecuencias obtenidas en niños y adultos con AHA no se encontraron diferencias en estos antígenos, sin embargo encontramos un aumento significativo en HLA-DR5 (60.0% vs 26.4%, pc<0.005) y la ausencia de HLA-DR6 (0.0% vs 20.0%, pc<0.05). Por otra parte, cuando comparamos las frecuencias

obtenidas en adultos con RCA y testigos sanos (adultos y niños) no se encontraron diferencias significativas.

El análisis molecular de la región HLA se efectuó en 41 de los 50 pacientes pediátricos con AHA y en 72 testigos pediátricos. La identificación de las especificidades para la región DR- β y DQ- β fue adecuada (excepto aquellas asociadas a DR52). El análisis estadístico de estos resultados no mostró diferencias significativas.

La susceptibilidad al absceso hepático amibiano en niños y adultos, es independiente del sexo de los pacientes y parece estar asociada primariamente con la presencia de HLA-DR3 y del complotipo SC01. El aumento en la frecuencia de HLA-DR5 (un antígeno frecuentemente asociado con respuesta autoinmune en enfermedades de tipo reumatoide) y la ausencia de HLA-DR6 (asociado con una mayor capacidad de rechazo de aloinjertos renales y protección contra cirrosis biliar primaria) observados en niños con AHA pudieran estar relacionados con las diferencias (clínicas y epidemiológicas) observadas en estos dos grupos de pacientes con absceso hepático amibiano. (Apoyado por CONACYT: DH3-903979 y F224-M).

ANTECEDENTES

SISTEMA HLA

Genes.

El genoma haploide humano contiene aproximadamente 70,000 genes diferentes en sus 3200 megabases de DNA cromosómico (Cooper 1994). El sistema HLA está constituido por 70 genes aproximadamente, expresados y no expresados, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 dentro de la banda 6p21.3 donde abarcan alrededor de 4 megabases (4000 kilobases (kb)) de DNA. Los genes HLA se encuentran distribuidos en 3 regiones (Fig. 1) en base a su localización, a su característica de ser unidades de recombinación y a las características estructurales y funcionales de las moléculas que codifican. HLA-DP representa el locus más centromérico y el HLA-F el más telomérico (Klein *et al.* 1993, Campbell *et al.* 1993).

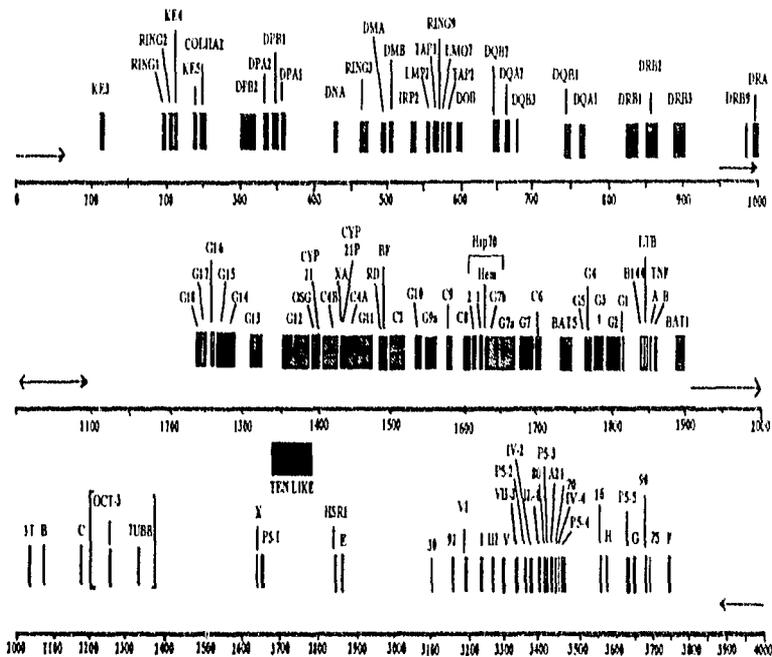


Fig. 1. Las regiones clases II, III y I son incluidas en las secuencias de 0-1000, 1000-2000 y 2000-4000 kb, respectivamente. Tomado de So A. (1994 a). In HLA and Disease, Academic Press.

La región clase I (Fig. 1) consta de cuando menos 17 genes distribuidos en 1800 kb de DNA localizados en el extremo telomérico del complejo HLA, 6 de estos genes se han asociado a productos de transcripción y los 11 restantes se han

considerado pseudogenes. Los genes clase I (A, B y C) codifican los antígenos clásicos de trasplante HLA-A, -B y -C; los genes E, F y G (identificados sólo por metodología para DNA) se han asociado con los antígenos no clásicos HLA-E, -F y -G que se expresan en algunas células inmaturas y en la interfase materno-fetal; y los genes H, J, K y L no codifican moléculas HLA y parecen actuar como pseudogenes (Bodmer et al. 1994).

Todos los genes HLA clase I presentan una organización similar, (Fig. 2) con un exón que codifica un péptido líder, tres exones que corresponden a los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y un exón que codifica los péptidos de la región transmembranal y parte de la cola citoplásmica (So 1994 a).

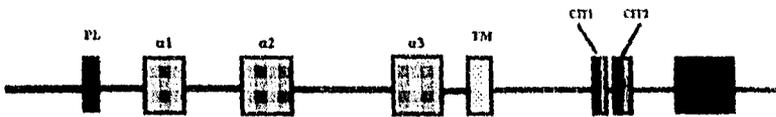


Fig. 2 Arreglo genético de las moléculas clase I. Tomado de So A. (1994 a). In HLA and Disease, Academic Press.

La región clase II (Fig. 1) posee al menos 23 genes, que se localizan en el extremo centromérico de la región HLA, abarca 1000 kb y codifica los antígenos HLA-DR, -DQ y -DP, los transportadores de péptidos (TAP1 y TAP2) y los proteosomas (IMP2 y IMP7).

La región clase II consta de cinco subregiones:

1) La subregión DP contiene los genes DPA y DPB, las moléculas HLA-DP son codificadas por el gen polimórfico DPB1 y por el gen no polimórfico DPA1, mientras que DPA2 y DPB2 son pseudogenes.

2) La subregión DN contiene un solo gen (DNA) el cual codifica para una cadena α .

3) La subregión DO, contiene el gen DOB, el más divergente de los genes para cadenas β . Dos genes adicionales DMA y DMB se han localizado entre HLA-DNA y DOB.

4) La subregión DQ contiene un par de genes polimórficos (DQA1 y DQB1) ambos expresados en una molécula DQ heterodimérica y los genes (DQA2 y DQB2 y DQB3) que pudieran ser transcritos, sin embargo, no se han identificado productos asociados con estos últimos.

5) En la subregión HLA-DR, se han identificado 10 genes, de los cuales al menos cinco se expresan, un DR α (DRA) y cuatro DR β (DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5) y cinco son pseudogenes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9). La cadena α , no polimórfica,

codificada por DRA se asocia con la cadena polimórfica B codificada por DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 para formar las moléculas de la subregión HLA-DR (Bodmer *et al.* 1994).

Todos los genes clase II (Fig. 3) presentan una organización similar, el gen que codifica la cadena α consiste de cinco exones que codifican una secuencia líder, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, la región transmembranal y la cola citoplásmica. Por su parte, el gen que codifica para la cadena β consta de 6 exones (Monaco 1993, Duquesnoy 1991).

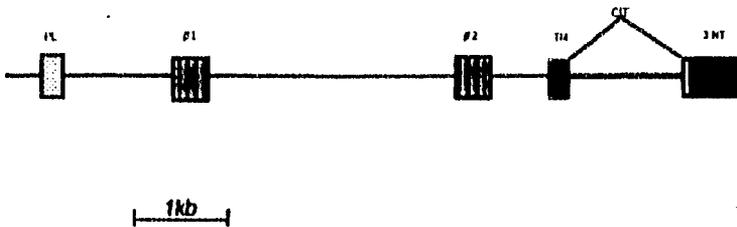


Fig. 3 Arreglo genético de las moléculas clase II. Tomado de So A. (1994 a). In HLA and Disease, Academic Press.

La región clase III (Figs. 1 y 4) contiene un grupo heterogéneo de al menos 26 genes, los cuales abarcan unas

1200 kb de DNA, localizadas entre las regiones clase I y clase II. Estos genes codifican para una gran variedad de proteínas importantes en la inmunidad como son los componentes del complemento (C2, C4A, C4B y Bf), los factores de necrosis tumoral (TNF α y TNF β), las proteínas de choque térmico (HSP-70 y GP), la enzima 21 hidroxilasa, 9 transcritos asociados a HLA-B (BATS) y 1 locus S1 (Spies et al. 1989).

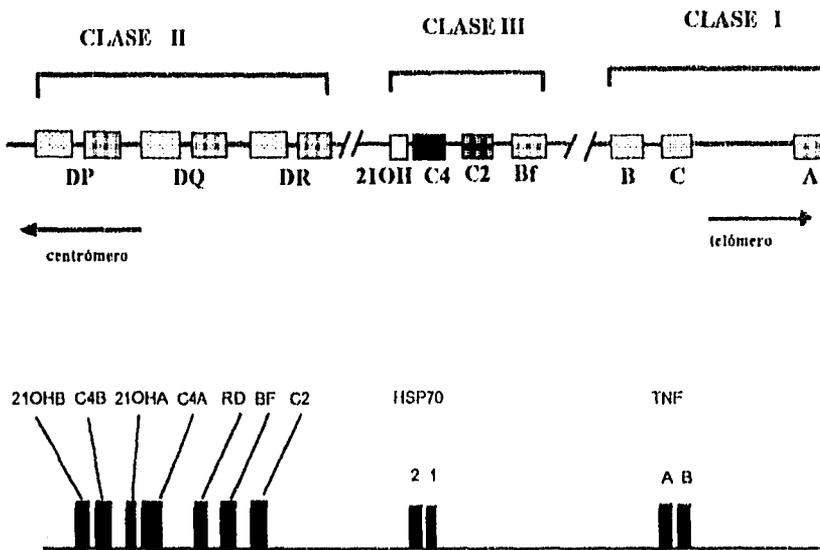


Fig. 4 La región clase III se localiza entre las regiones I y

II e incluye los genes que codifican complotipos, factor de necrosis tumoral y proteínas de choque térmico. Tomado de So A. (1994 a). In MIA and Disease, Academic Press.

Estructura.

Los antígenos clase I son moléculas compuestas de dos cadenas polipeptídicas diferentes (Fig. 5). La cadena α codificada en el cromosoma 6 es una cadena glicoproteica, polimórfica, transmembranal, con un peso molecular de 45 kDa, y un polipéptido codificado en el cromosoma 15, la beta 2-microglobulina ($\beta 2M$), con un peso molecular de 12 kDa. las dos cadenas deben de estar asociadas para poder expresarse en la membrana. La cadena α tiene tres dominios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), una región transmembranal y una región citoplásmica.

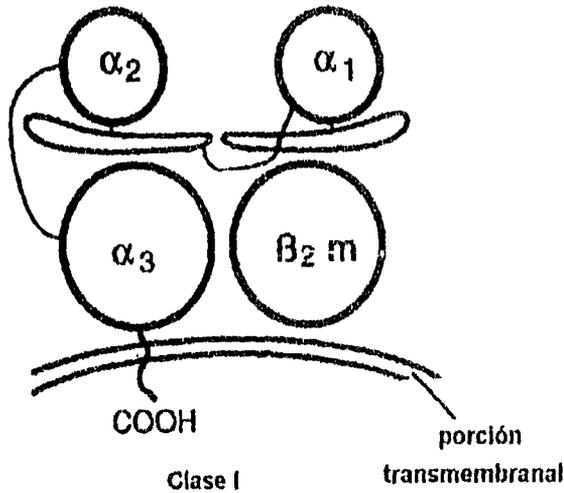


Fig. 5 Estructura de la molécula clase I. Tomado de So A. (1994 a). In HLA and Disease, Academic Press.

La estructura tridimensional de las moléculas HLA clase I (Fig. 6) fue obtenida por cristalografía de rayos X en las moléculas HLA-A2, Aw68 y B27 y muestra que los dominios α_1 y α_2 forman un nicho, de $10 \times 10 \times 20 \text{ \AA}$ integrado por dos alfa hélices paralelas dispuestas sobre una base de 8 bandas plegadas beta, formando el sitio de unión para péptidos de 8-11 aminoácidos que serán presentados a las células T CD8+. El nicho tiene dos sitios de unión (*pockets*), formados por las

cadenas laterales del MHC que son polimórficas, una interacciona con un motivo (*motif*) en la cadena principal del péptido y en el otro un segundo *motif* en el carbono C terminal. Por lo regular estos *pockets* se corresponden con las posiciones 2 y 9 (8, 10 u 11) del péptido dependiendo de su tamaño. La unión *motif-pocket* también induce cambios conformacionales en el MHC que dependen de la secuencia del péptido, estos cambios del MHC contribuyen directamente con la particularidad antigénica del sitio de unión del TCR (Bjorkman et al. 1987, Madden et al. 1991, Madden et al. 1993).

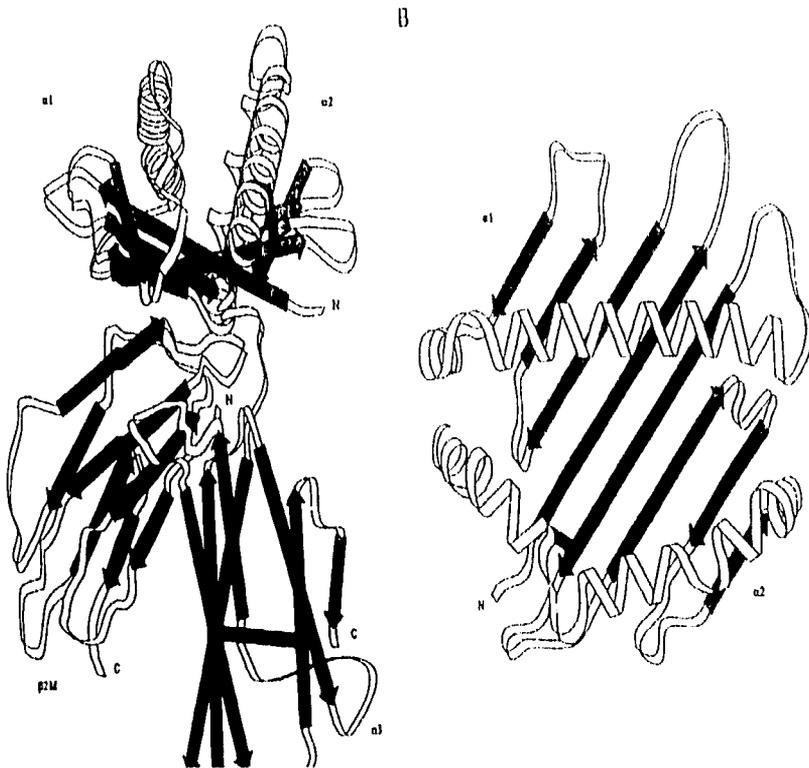


Fig. 6 Estructura tridimensional de las moléculas clase I.
Tomado de So A. (1994 b). In HLA and Disease, Academic Press.

Las moléculas HLA clase II son heterodímeros transmembranales (Fig. 7) constituidos por una cadena pesada α de 35 kDa y una cadena ligera β de 28 kDa, cada una con dos dominios

extracelulares, una región transmembranal y una región citoplásmica.

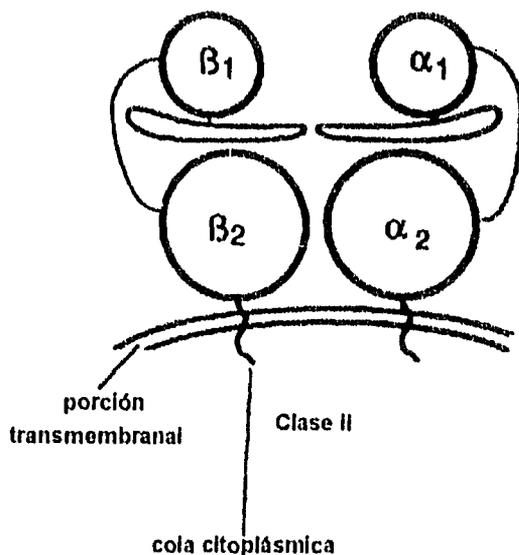


Fig. 7 Estructura de la molécula clase II. Tomado de So A. (1994 a). In HLA and Disease, Academic Press.

La estructura tridimensional de HLA-DR1 ha sido aclarada recientemente (Fig. 8) y en ella se confirma que los dominios α_1 y β_1 forman un nicho similar al encontrado en las moléculas de clase I aunque con una conformación más flexible

y abierta en ambos extremos lo que le permite aceptar péptidos entre 12 y 22 aminoácidos. El nicho está constituido lateralmente por dos α hélices antiparalelas y una base de 8 bandas plegadas β . Aproximadamente en la tercera posición del péptido se lleva a cabo la unión con el pocket, los otros son inferidos por la localización de los residuos polimórficos y la forma de la densidad electrónica. La mayoría de los polimorfismos de las moléculas clase II se encuentran en la secuencia de las hélices α del dominio B1, sin embargo en las moléculas HLA-DP y -DQ también se encuentran polimorfismos asociados a la cadena $\alpha 1$ (So 1994 b, Brown et al. 1993, Stern et al. 1994).

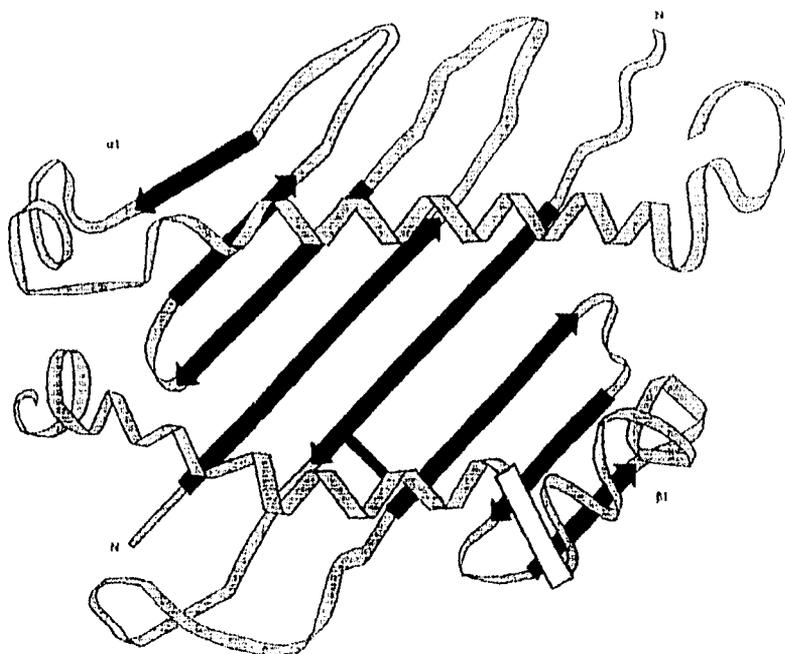


Fig. 8 Sitio de unión del péptido en las moléculas clase II.
Tomado de So A. (1994 b). In HLA and Disease, Academic Press.

Localización.

Los antígenos HLA clase I se expresan en la membrana citoplásmica de la mayoría de las células nucleadas del individuo, con excepción de neuronas, espermatoцитos, ovocitos, vellosidades trofoblásticas, células del epitelio

corneal y algunas células endo o exocrinas (Anderson et al. 1985).

Las moléculas clase II sólo se expresan en linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer y células endoteliales (Daar et al. 1984). Su expresión puede ser inducida por medio de interferón gama (IFN γ) o por citocinas aún en células que normalmente no las expresan, como en linfocitos T activados, células del endotelio y epitelio del riñón (Arenzana-Seisdedos et al. 1988).

Función.

La función principal del sistema HLA es la regulación de la respuesta inmune y la discriminación entre lo propio y lo no propio llevada a cabo por linfocitos T (selección negativa y positiva). El concepto de restricción mediada por MHC deriva de la observación de que las células T tienen especificidad para el antígeno y para las moléculas MHC. La interacción entre el HLA y el péptido (Fig. 9) juega un papel fundamental en el reconocimiento antigénico por células T específicas (Chien & Davis 1993).

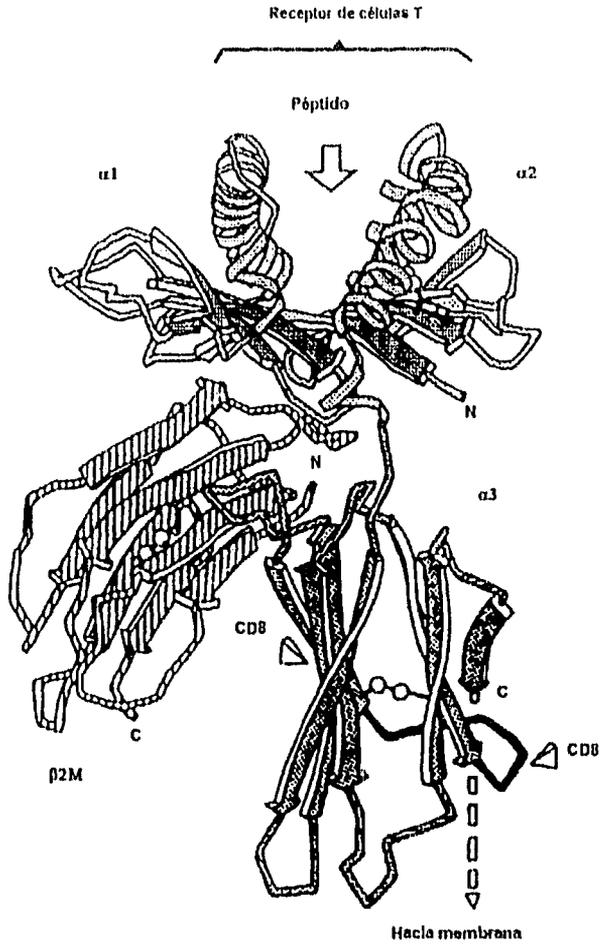


Fig. 9 Sitio de interacción entre la molécula clase I, péptido y el linfocito T. Tomado de Lechler R. (1994). HLA and Disease, Academic Press.

TIPIFICACIÓN HLA

Tipificación serológica.

Clase I

La definición serológica de antígenos HLA-A, -B y -C se efectúa usando la prueba de microlinfocitotoxicidad del NIH desarrollada por Terasaki, en la cual los linfocitos son obtenidos a partir de sangre periférica, ganglios linfáticos o bazo, ajustados a una concentración adecuada (1-2 millones/ml) y expuestos en microplacas a un conjunto de aloantisueros o anticuerpos monoclonales anti HLA y complemento antes de evaluar la viabilidad celular. Una reacción de citotoxicidad positiva nos indica la identificación de un antígeno sobre la membrana de los linfocitos tipificados. La linfocitotoxicidad es la prueba más rápida para determinar antígenos HLA, aunque se tiene como limitante la carencia de fuentes constantes de reactivos capaces de definir todos los polimorfismos HLA, además los sueros policlonales pueden no reaccionar contra un solo epítotope HLA y dificultar la definición serológica de los subtipos antigénicos.

Clase II

La definición serológica de antígenos clase II HLA-DR y DQ se efectúa también por microcitotoxicidad, usando como reactivos sueros de mujeres multíparas. La tipificación clase II requiere del enriquecimiento de la población de células B (ej. rosetación, separación en lana de nylon, uso de perlas magnéticas cubiertas con un anticuerpo monoclonal anti células B), o del uso de fluorocromacia de 2 colores que puede distinguir entre linfocitos T y B sin separación adicional. Los anticuerpos monoclonales contra HLA-DR y -DQ aunque son de uso más limitado, también son reactivos útiles para la tipificación de antígenos clase II (Dyer & Martin 1991).

Tipificación por electroforesis.**Clase III**

La determinación de C2 y del factor B se realiza en muestras de plasma por electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa de capa fina seguido por inmunofijación con su anticuerpo respectivo. Las principales variantes son F y S aunque existen variantes menos frecuentes como F1 y S1. Las frecuencias génicas varían en los diferentes grupos étnicos, así en la población caucásica el alelo S ocurre con una

frecuencia del 70%, mientras que el alelo F presenta una frecuencia del 28%.

La determinación de C4A y C4B requiere de la eliminación del ácido siálico del plasma antes de efectuar la electroforesis de alto voltaje en un gel de agarosa mantenido a pH 8.8 con buffer tris-glicina-EDTA, y visualizar las bandas mediante inmunofijación con anti-C4.

El complotipo está formado por un alelo de cada uno de los factores FB, C2, C4A y C4B en ese orden. La frecuencia de SC01 en una población caucásica es de 12.7% y la del complotipo SC31 de 38.9% (Campbell 1987, Carroll & Alper 1987).

Tipificación por métodos moleculares.

La clonación de genes HLA ha permitido el desarrollo de varias técnicas moleculares que definen polimorfismos genéticos HLA. La tipificación por RFLP identifica polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción, obtenidos como patrones de bandas después de digestión del DNA con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel de poliacrilamida. Estas bandas pueden ser hibridadas con sondas de DNA homólogas (PCR-RFLP) que identifican

polimorfismos HLA presentes en las cadenas α y β clase II (Nagy et al.1991).

El método más directo para estudiar polimorfismos HLA es determinar la secuencia de los nucleótidos en genes individuales. Conociendo la secuencia de DNA en un exón, es posible sintetizar sondas cortas de 20 a 30 nucleótidos capaces de reconocer regiones específicas HLA (oligotipificación). La oligotipificación se efectúa en dos pasos: 1) amplificación de segmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y 2) la aplicación del DNA amplificado a membranas de nylon y su caracterización con sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (SSO) para diferentes alelos HLA, las cuales para poder ser visualizadas deben llevar marcas radioactivas o enzimáticas.

La oligotipificación también se efectúa en dos niveles, el primero incluye la tipificación genérica que permite determinar los polimorfismos correspondientes a los antígenos definidos serológicamente y segundo la subtipificación con sondas SSO que proporciona información adicional de polimorfismos HLA no detectados por métodos serológicos (Chia et al. 1993, Olerup & Zetterquist 1993, Juan et al. 1992).

HLA Y ENFERMEDAD.

El sistema HLA es el sistema más complejo y polimórfico conocido en el hombre. Además de su reconocida importancia en la aceptación y rechazo de aloinjertos se ha demostrado que el sistema HLA juega un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades, particularmente aquellas con una base inmunológica o autoinmune. Algunas enfermedades ocurren más frecuentemente en individuos que llevan genes particulares del MHC. Lilly en 1964 fue el primero en descubrir que el MHC (H-2) en el ratón contiene los genes que confieren resistencia al virus de la leucemia murina de Gross (Rgv-1). Más tarde McDevitt, Sela y Benacerraf demostraron que la respuesta inmune estaba genéticamente controlada en el ratón y en el cobayo (de Vries 1994).

En el humano, el primer reporte de una asociación débil entre HLA y enfermedad de Hodgkin fue publicado por Amiel en 1967, sin embargo, fueron los estudios de Brewerton y Schlosstein en 1973, que revelaron una fuerte asociación entre la espondilitis anquilosante y el antígeno clase I HLA-B27 los que iniciaron una avalancha de estudios de asociación entre

el sistema HLA y la susceptibilidad a varios cientos de enfermedades (de Vries 1994). Desde entonces, diferentes estudios han demostrado que la asociación entre HLA y algunas enfermedades es más fuerte con los antígenos de clase II (DR), sin embargo, el descubrimiento del polimorfismo en los antígenos de clase II (DQ y DP) y en otros genes de ésta región HLA (TAP y LMP) han hecho necesario investigar su posible participación como genes responsables de la susceptibilidad (Batchelor & McMichael 1987, Svejgaard et al. 1983).

Las enfermedades asociadas al sistema HLA se han clasificado en dos formas. La primera se basa en los mecanismos de patogénesis e incluye a enfermedades de etiología autoinmune (artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino-dependiente, espondilitis anquilosante, etc.), no autoinmune (deficiencia de la 21-hidroxilasa) y de etiología desconocida (narcolepsia). La segunda se basa en las características de los antígenos HLA responsables de la asociación, así, se incluyen enfermedades asociadas con antígenos clase I (principalmente las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27), enfermedades asociadas con antígenos clase II (principalmente con el locus HLA-DR) que incluyen enfermedades de origen autoinmune como el lupus eritematoso, y enfermedades asociadas con antígenos clase III que

incluyen las deficiencias de C2, C4 y 21-OH (Lechler 1994, Vargas-Alarcón y Granados 1993).

Existen fundamentalmente dos métodos de estudio que son utilizados para investigar la relación entre HLA y enfermedad:

1. Estudios en población abierta. La mayoría de los estudios de asociación entre HLA y enfermedad son estudios de población en los cuales se comparan las frecuencias antigénicas HLA obtenidas en pacientes y testigos. Ambos grupos deben estar integrados por individuos pertenecientes al mismo grupo étnico, no consanguíneos, del mismo rango de edad, nivel socioeconómico y sexo.

2. Estudios familiares. Este tipo de estudios investiga si un gen de susceptibilidad se hereda dentro de la familia ligado a un haplotipo HLA (*linkage*). Los estudios familiares aunque son más informativos y permiten relacionar una enfermedad tanto con genes del sistema HLA como con genes no-HLA en desequilibrio de enlace con genes HLA, generalmente son más difíciles de realizar y sólo se realizan una vez que se ha encontrado una asociación por estudios de población abierta.

Resulta esencial en estos estudios establecer con exactitud los criterios de inclusión de pacientes y testigos. La prevalencia de la enfermedad usualmente determina el número de pacientes incluidos en el estudio. Para enfermedades comunes las muestras pueden obtenerse rápidamente, en enfermedades más raras resulta necesario incluir pacientes de diferentes regiones. Como regla general al menos 50 pacientes deben ser incluidos en un estudio, sin embargo, el número puede ser menor para enfermedades raras, particularmente si presentan una fuerte asociación con un antígeno HLA y sobre todo si existe la posibilidad de efectuar estudios familiares que suelen ser más informativos.

Las enfermedades asociadas con el sistema HLA generalmente presentan las siguientes características: son de etiología desconocida, tienen tendencia a la cronicidad y presentan alteración de procesos inmunológicos. Además de que pueden presentar un agrupamiento familiar y aparecer más de un caso entre los consanguíneos.

A la fecha se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar los mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad:

1) Similitud molecular entre antígenos HLA y antígenos de agentes infecciosos. Ebringer en 1979 encontró que la

Klebsiella sp. estaba presente en pacientes con espondilitis anquilosante, posteriormente Seager en Australia demostró que los anticuerpos dirigidos contra algunas cepas de *Klebsiella sp.* reaccionaban sólo con los linfocitos de los pacientes que tuvieran HLA-B27 y espondilitis anquilosante, demostrando claramente la existencia de determinantes antigénicos comunes entre el HLA-B27 y algunas cepas de *Klebsiella sp.* En base a estos resultados es posible explicar la susceptibilidad como debida a una reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno del sistema HLA (Lechler 1994, Heard 1994).

2) Modificación en la estructura de los antígenos HLA. Una infección o agente químico puede afectar a un individuo en su capacidad de producir una respuesta inmune. Por otra parte, dichos agentes pueden producir alteraciones en las moléculas HLA, capaces de ser detectadas por el sistema inmunológico, y conducir a una respuesta autoinmune capaz de generar una enfermedad (Heard 1994).

3) Antígenos HLA como receptores. Los antígenos HLA pueden actuar como receptores de agentes infecciosos o de sus productos antigénicos y en esta forma favorece el desarrollo de la enfermedad. Helenius ha mostrado que los antígenos HLA-

A y HLA-B sirven como receptores para el virus *Semliki forest* (Lechler 1994).

4) **Deficiencias en la respuesta inmune.** Los antígenos del sistema HLA participan en la regulación de la respuesta inmune, por lo tanto, cualquier trastorno que se manifieste como aumento o defecto en la respuesta inmune podría involucrar a los antígenos HLA y explicar así su asociación con una predisposición a la enfermedad (Anderson et al. 1985).

5) **Deficiencias de los antígenos HLA clase III.** Las deficiencias de antígenos clase III pueden estar en desequilibrio génico con otro antígeno HLA, por ejemplo: la deficiencia de C2 se ha encontrado asociada con DR3 en el lupus eritematoso sistémico y el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa se ha asociado con HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita (Thorsby 1995).

Evaluación estadística de la asociación.

La asociación de una enfermedad con un marcador genético perteneciente a un sistema altamente polimórfico como el sistema HLA, requiere del análisis de un gran número de

especificidades antigénicas, lo cual puede originar asociaciones significativas al azar, por este motivo Svejgaard sugirió reducir el número de inferencias incorrectas mediante la corrección de Bonferoni que consiste en multiplicar el nivel de significancia (p), obtenido por χ^2 , por el número de antígenos evaluados (pc) (Hawkins 1981).

AMIBIASIS

Etiología.

La amibiasis es una enfermedad infecciosa aguda o crónica en el hombre causada por *Entamoeba histolytica* la cual afecta principalmente al colon y secundariamente al hígado y otros órganos. Aunque otras amibas (*E. dispar*, *E. hartmani*, *E. coli*) pueden ser encontradas en el hombre generalmente no son patógenas. La amibiasis presenta una distribución mundial aunque ocurre con mayor frecuencia en regiones de clima cálido y húmedo, tropicales y subtropicales, con bajo nivel socioeconómico y mal saneamiento ambiental. En México la infección se presenta en forma endémica. En la Ciudad de México entre 2 y 10% de los casos de diarrea aguda infantil tienen a *E. histolytica* como agente causal (Pickering et al. 1978), en tanto que la mayor prevalencia (20.95% y 27.0%) se ha reportado en Corregidora, Querétaro y en un campamento de damnificados por la erupción del volcán Chinchonal en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (González-Galnares et al. 1986).

Clasificación.

E. histolytica se ha clasificado dentro del reino Protista, subreino Protozoa, phylum Sarcomastigophora, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopodea, clase Lobosea, orden Amoebina, suborden Tubulina y género Entamoeba. La posición de Entamoeba en el árbol filogenético obtenido mediante el análisis de RNAr sugiere que se origina a partir de flagelados que contienen mitocondrias citoplásmicas. Un análisis reciente, basado en la presencia de organelos membranosos citoplásmicos, coloca al género Entamoeba en una clase distinta: Entamoebae (Meza 1992).

Ciclo de vida.

Este parásito comprende dos estadios: la forma vegetativa y el quiste. La primera representada por el trofozoito, una célula extremadamente dinámica y pleomórfica que se mueve mediante la emisión de pseudópodos y se reproduce por fisión binaria. El trofozoito, es la forma responsable de la sintomatología propia de la enfermedad, sin embargo, no puede sobrevivir fuera del individuo y es destruido fácilmente por el jugo gástrico después de su ingestión, mientras que el quiste es la forma de resistencia e infectante causante de la transmisión y propagación de la amibiasis (Martínez-Palomo 1987).

E. histolytica carece de etapas sexuales y de hospederos intermediarios, su ciclo de vida comienza con la ingestión de quistes provenientes de las heces de algún individuo infectado. Estos quistes pueden transmitirse por contacto directo con manos contaminadas (infección ano-mano-boca), alimentos y agua contaminados o por vectores biológicos como la mosca y la cucaracha.

Una vez ingeridos los quistes pasan al estómago, la pared quística es resistente al jugo gástrico, posteriormente los quistes llegan al intestino delgado inferior en donde ocurre la exquistación y de cada uno surge una amiba que contiene los cuatro núcleos quísticos y de éstos por división citoplasmática surgen ocho trofozoitos, los cuales continúan por el intestino grueso, en donde se reproducen por fisión binaria transversa para dar un número de trofozoitos capaces de colonizar cualquier porción del intestino grueso (generalmente la porción cecal y el rectosigmoides). El trofozoito inicialmente vive en la luz del intestino grueso alimentándose de bacterias y secreciones intestinales donde se transforma en quiste durante el estado de comensal.

El establecimiento de la amiba en el epitelio intestinal depende tanto del parásito como del huésped. Los trofozoitos

en este punto pueden seguir dos caminos: 1) establecerse en el intestino o penetrar la mucosa y submucosa por acción mecánica y proteolítica o 2) ser arrastrados al exterior con la materia fecal, en este caso pueden pasar primero por un estado prequístico y aparecer en las heces como quistes viables por algunas semanas o hasta meses, dependiendo de las condiciones ambientales, completando así el ciclo biológico (Ravdín 1995).

Patogénesis.

La patogénesis puede ser definida como el conjunto de eventos celulares, reacciones y otros mecanismos que se llevan a cabo en el desarrollo de la enfermedad (Tortora & Anagnostakos 1977).

La amibiasis invasora humana intestinal o extraintestinal tiene las siguientes características:

- 1) Es altamente destructiva y causa necrosis rápida y extensa.
- 2) Produce poca inflamación tomando en cuenta el grado de destrucción tisular.
- 3) No logra estimular la eosinofilia tisular cuando se compara con otras enfermedades parasitarias.

4) En algunos tejidos humanos es posible encontrar en el mismo corte microscópico áreas necróticas con amibas muertas, áreas con amibas viables mezcladas con células inflamatorias y áreas con amibas viables con tejido no dañado y sin inflamación.

5) Las lesiones amibianas rara vez son hemorrágicas.

6) En el tratamiento adecuado las lesiones sanan con restitución casi completa y poca cicatrización (Kretschmer 1990).

Los síndromes que resultan de la infección por *E. histolytica* son: infección asintomática, infección sintomática no invasiva e infección sintomática invasiva (Treviño 1990).

Infección asintomática.

A los individuos que albergan al protozoo por tiempo prolongado, sin presentar manifestaciones clínicas, se les denomina portadores sanos o asintomáticos y representan aproximadamente el 90% de los individuos infectados.

Infección sintomática no invasora (amibiasis intestinal).

La enfermedad amibiana intestinal es más frecuente en los niños que en los adultos y son afectados por igual de un sexo

u otro. Los síndromes que se presentan son el diarreico y el disintérico. En el primero el paciente cursa con dolor cólico abdominal moderado sin tenesmo rectal, con diarrea sanguinolenta ligera y no presenta fiebre. En cambio, el síndrome disintérico se caracteriza por un promedio de cuatro a seis evacuaciones mucosanguinolentas por día, con dolor cólico abdominal de leve a moderado que precede a la evacuación, existe tenesmo rectal y no hay fiebre.

En el síndrome disintérico existen tres formas clínicas de amibiasis intestinal (colitis fulminante, ameboma y apendicitis) mucho más agresivas aunque raras, que por lo general ocurre más frecuentemente en adultos que en niños.

La colitis fulminante es una enfermedad amibiana grave y de curso rápido que se presenta en 6 a 10% de los pacientes con infección sintomática. Las lesiones abarcan zonas extensas, en algunas ocasiones comprende la totalidad del intestino grueso, son de tipo ulceronecrótico y llegan a afectar todas las capas del colon evolucionando a la perforación. En los niños es poco frecuente y cuando ocurre es en menores de dos años.

El ameboma ocurre como lesiones seudotumorales debidas al engrosamiento acentuado de la pared intestinal causada por

necrosis, inflamación, edema de la mucosa y submucosa del colon, ulceraciones y ausencia de fibrosis. Ocurren primordialmente en los segmentos verticales del colon, el ciego, el rectosigmoides y los ángulos hepático y esplénico. Por lo regular es de evolución aguda, llegándose a presentar algunos casos crónicos y asintomáticos que se descubren por palpación o estudio radiológico. En los niños es una enfermedad muy rara.

La apendicitis amibiana es un tipo de amibiasis invasora localizada en el apéndice ileocecal y se caracteriza por presentar inflamación, necrosis, eventualmente perforación y lesiones ulcerosas del ciego. Clínicamente es parecida a la apendicitis bacteriana pero un dato clínico útil es la presencia de numerosas evacuaciones sanguinolentas.

**Infeción sintomática invasora (amibiasis
extraintestinal).**

Cuando *E. histolytica* logra atravesar la barrera intestinal puede entrar en vénulas portales, en linfáticos o como resultado de las lesiones ulcerativas puede alcanzar los capilares transportándose por la circulación portal y llegar a otros órganos y tejidos como pulmón, cerebro, piel, órganos genitales y el hígado, produciéndose la amibiasis

extraintestinal (hepática, cerebral, pleuropulmonar y cutánea).

Amibiasis cutánea.- Resulta del contacto directo del parásito con la piel. Puede ser primaria cuando el parásito no se encuentra en otro lado y por lo regular se observa en la región genital, o secundaria cuando se presenta en la región perianal debido al contacto de los trofozoitos en las secreciones o por transmisión sexual (Treviño 1990).

Amibiasis cerebral.- Es un padecimiento muy raro que ocurre en menos del 1% de los pacientes con disentería amibiana y en menos del 3% con AHA. Puede presentarse a cualquier edad y es de tres veces más frecuente en hombres que en mujeres. La diseminación ocurre por vía hematógica a partir de un AHA, en raras ocasiones desde el intestino mediante los plexos venosos paravertebrales y con menos frecuencia a través de los pulmones sin que resulte afectado este órgano.

Amibiasis pleuropulmonar.- El AHA que se localiza en la cúpula del hígado puede producir reacción inflamatoria pleuropulmonar o pericárdica por contigüidad o apertura hacia las distintas estructuras intratorácicas. La complicación más frecuente por apertura es hacia los bronquios debido a las adherencias hepato y pleurodiafragmáticas. La canalización

del material necrótico a través de un bronquio puede causar la muerte por asfixia, a causa de la inundación masiva y brusca de las vías respiratorias, en especial a los niños.

Absceso hepático amibiano (AHA).- La infección hepática es la más frecuente y resulta de la llegada de los trofozoitos cuando migran desde el colon al hígado por vía de las venas mesentéricas y la vía portal. El AHA es una de las complicaciones más graves de la amibiasis, aunque esta forma se puede presentar a cualquier edad ocurre con mayor frecuencia en adultos entre los 20 y 40 años, es de tres a cuatro veces más frecuente en hombres que en mujeres y en 50-66% de los casos no se acompaña de historia previa de diarrea (Gutiérrez 1986, Treviño 1990, Muñoz 1990). El AHA es 10 a 30 veces más frecuente en adultos que en niños, sin embargo en éstos últimos es de evolución más aguda y predomina en menores de 5 años (Muñoz 1990). A diferencia de los adultos, los niños de un sexo u otro resultan afectados en proporción semejante y revisten una mayor gravedad (González-Galnares y Gutiérrez 1986), con una tasa de mortalidad del 26.9% hasta antes de 1970 (Gutiérrez et al. 1970) y una tasa actual del 2% (Basile et al. 1983). La reducción actual en la tasa de mortalidad por AHA es resultado de la mejoría en la atención médica, el diagnóstico temprano, el uso de metronidazol y la

reducción de punciones innecesarias (Gómez-Alcalá et al. 1995).

El inicio de la sintomatología se caracteriza por dolor intenso (que es uno de los síntomas más importantes) que se localiza por lo general en el cuadrante superior derecho. El dolor aumenta con la respiración profunda, con la tos, con la posición de decúbito lateral derecho y al apoyarse en la pierna derecha al caminar. Cuando el absceso se encuentra en el lado izquierdo el dolor se percibe en el epigastrio. La fiebre es otro síntoma de este padecimiento, la hepatomegalia suele ser de superficie lisa y dolorosa al tacto, los síntomas respiratorios se presentan cuando el crecimiento del hígado comprime el diafragma, también se llegan a presentar síntomas gastrointestinales (náusea, vómito, anorexia y colitis) y la necrosis hepática puede ocurrir debido a isquemia por obstrucción de los vasos de la vía portal. Los trofozoitos también llegan a invadir a los tejidos periféricos. La ruptura del AHA es la complicación más común y grave (Ravdin 1995, Rustgi & Richter 1989). Para el diagnóstico son importantes una leucocitosis entre 12,000 y 18,000 leucocitos/mm³, la presencia de anticuerpos antiambianos y la confirmación del absceso por gammagrafía, ultrasonido o tomografía axial computarizada (Treviño 1990).

Epidemiología.

La prevalencia mundial de la amibiasis se estima en alrededor de 500 millones de casos por año (excluyendo a la población de China). Un 10% de los individuos afectados (40-50 millones) presentan alguna forma (usualmente leve) de invasión tisular y de estos sólo una fracción no mayor del 1%, aproximadamente 500 mil, desarrolla absceso hepático amibiano (Walsh 1986).

A nivel mundial la amibiasis ocupa la tercera causa de muerte debida a enfermedades parasitarias, sólo después de la malaria y la esquistosomiasis. En México, la amibiasis constituye un problema prioritario de salud, debido al número de enfermos y de defunciones que ocasiona. Datos publicados en 1987 indican que de 16 millones de portadores 1,2 millones desarrollan la enfermedad y de éstos 10 mil padecen AHA (Gutiérrez 1987). La infección se encuentra extendida prácticamente en todo el país y en forma independiente de las condiciones climáticas se ha visto que esta enfermedad tiene relación estrecha con las condiciones sanitarias así como el bajo nivel socioeconómico de la población.

Las principales causas de muerte por amibiasis a nivel mundial son la colitis fulminante y el AHA. La mortalidad en

el AHA se encuentra entre el 2% y 10% y en la colitis fulminante es del 70%. La evaluación de 5000 necropsias efectuadas en el Hospital General "Bernardo Sepúlveda", CMN, IMSS mostró 271 casos de amibiasis en las primeras 3000 necropsias (5.4%) y 114 en las 2000 restantes (2.2%), 75.6% de los casos en el primer grupo y 81.5% en el segundo grupo correspondieron a AHA, en forma similar la afectación del colon mostró una frecuencia del 72.3% en el primero grupo y del 78% en el segundo grupo (Ramos-Martínez et al. 1986). Por otra parte de 278,425 enfermos hospitalizados en 1969 en 29 hospitales del IMSS 0.7% fueron casos de AHA, la frecuencia más elevada (2.1%) fue encontrada en hospitales para adultos (Alvarez-Alva et al. 1971). La letalidad por AHA en adultos se ha reducido del 2.0% a 0.2% y en niños del 26.9% a 1.1% en diferentes épocas (Gutiérrez 1986, González-Galnares et al. 1986).

Se han propuesto ciertos factores de riesgo para el desarrollo del AHA tales como la virulencia de la amiba o factores predisponentes del huésped (inmunocompetencia, sexo, estado nutricional y condiciones sanitarias) (Jiménez-Cardoso y Kumate 1982, Alvarez-Alva et al. 1971).

Relación huésped-parásito.

Tal vez la pregunta más frecuentemente hecha ha sido ¿porqué solamente el 10% de los portadores desarrollan amibiasis invasiva?, tres son las principales hipótesis que responden a esta pregunta:

1) *Entamoeba histolytica* es una sola especie patógena la cual en el huésped produce lesiones intestinales que pueden o no producir síntomas clínicos.

2) *Entamoeba histolytica* es normalmente un comensal que reside en el colon, el cual ocasionalmente se transforma en patógeno.

3) En los estudios previos de amibiasis no se había considerado la existencia de 2 especies de *Entamoeba* morfológicamente idénticas: *Entamoeba histolytica* una especie patógena y *Entamoeba dispar* no patógena (Diamond & Clark 1993).

En apoyo de la primera hipótesis se encuentra el reporte de que la axenización de *E. histolytica*, con un patrón isoenzimático (zimodemo) no patógeno, puede inducir el desarrollo de un zimodemo patógeno, en tanto que los trofozoitos patógenos adquieren zimodemo no patógeno al cocultivarse en presencia de flora bacteriana de cultivos

xenicos (Mirelman et al. 1986). Un mayor número de estudios apoyan a la tercera hipótesis (Gitler et al. 1985, Diamond & Clark 1993, Petri et al. 1994, Haque 1994). Brumpt en 1925 propuso la existencia de una *Entamoeba* no patógena morfológicamente idéntica a *E. histolytica* con sus cuatro núcleos en la forma quística y que también medía 10µm o más de diámetro a la cual llamó *E. dispar* (Diamond & Clark 1993)

Basándose en la tipificación isoenzimática Sargeaunt reportó dos grupos de *E. histolytica*, uno no patógeno que fue aislado de portadores asintomáticos y el otro patógeno proveniente de pacientes y mostraron que la identificación de *E. histolytica* usando únicamente el microscopio produce una sobreestimación hasta del 83.3% atribuible a la presencia de *E. dispar* (Sargeaunt 1992). Sólo recientemente se ha podido distinguir a *E. histolytica* de *E. dispar* mediante la realización del perfil isoenzimático (fosfoglucomutasa, peptidasa, hexocinasa, aldolasa y glucosafosfatoisomerasa), el uso de anticuerpos monoclonales contra algunas proteínas de *E. histolytica* (lectina Gal/GalNAc, Ag de 96 kDa, Ag de 30 kDa y Ag de 84 kDa) o contra el antígeno de 60 kDa presente en la membrana de cepas no patógenas (Mirelman et al. 1992) y los productos del RNA ribosomal al ser expuestos con enzimas de restricción (Clark & Diamond 1992).

Estudios in vivo e in vitro han demostrado que la patogénesis causada por *E. histolytica* requiere primero la colonización intestinal, destrucción o disolución de la mucosa del colon, adherencia amibiana y la lisis de las células epiteliales de la mucosa (Chadee et al. 1988). La adherencia a la mucosa intestinal y la subsecuente destrucción de las barreras son mecanismos importantes por los cuales *E. histolytica* causa invasión. Los trofozoitos penetran en el revestimiento mucoso de las vellosidades adhiriéndose a las células subyacentes del intestino a través de las lectinas de 260 kDa (Gal/GalNAc) y 220 kDa (GlcNAc) y requieren de la participación de receptores de componentes de la matriz extracelular, colágena y fibronectina, como es el caso del receptor de la fibronectina (140kDa). La interacción de las células es seguida por la degradación de estos componentes mediante la secreción de la colagenasa al medio externo, proteasas selectivas a fibronectina y laminina, la formación del amebaporo (canal iónico) originando una entrada excesiva de Ca^{2+} en la célula provocando la lisis y muerte de ésta. Los trofozoitos además de ponerse en contacto con las células de la mucosa lo hacen con la sangre y el sistema inmune (Talamás-Rohana et al. 1992, Vázquez-Prado et al. 1992).

El huésped evade la colonización intestinal al destruir a la adhesina (específica para galactosa) mediante proteasas

pancreáticas, sales biliares y glicosidasas bacterianas. En tanto que la subunidad de 170 kDa es la que protege a la amiba contra el ataque del complemento impidiendo la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) C5b6-9, al poseer un dominio de cisteínas que tienen reacción cruzada con CD59 que es un inhibidor del ensamble de C8 y C9. (Braga et al. 1992).

PARASITOSIS Y HLA

La susceptibilidad o resistencia del huésped a diferentes infecciones parasitarias parecen estar reguladas genéticamente. Debido a que las moléculas del MHC están involucradas en la regulación de la respuesta inmune, varios estudios han tratado de evaluar su participación en la susceptibilidad o resistencia a las enfermedades parasitarias. La mayoría de los estudios que se han realizado a la fecha han sido efectuados en helmintos como *Trichinella* y protozoarios como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* y *Leishmania*.

***Trichinella spiralis* y *T. pseudospiralis*.**

Los grupos de Wassom y Wakelin fueron los pioneros en investigar en varias cepas de ratones la asociación entre los genes H-2 y la susceptibilidad a la infección con *T. spiralis*. Wassom encontró en ratones B10 una asociación entre H-2 y la susceptibilidad o resistencia a *Trichinella* (Wassom & Kelly 1990). Wakelin en 1980 observó también que los ratones B10 con alelos H-2^{b,q,k,d,m,y2}, presentaban una

respuesta inmune baja contra *T. spiralis* la cual eliminaban sólo 20 días después de la inoculación, mientras que los ratones NIH, SWR y DBA con alelo H-2^d presentaban una respuesta inmune fuerte y eliminaban *T. spiralis* entre los días 8 y 12 postinoculación (Wakelin 1980). Posteriormente el mismo grupo después de realizar transferencias homólogas y heterólogas de células linfoides en ratones, concluyó que la expulsión de *T. spiralis* se asocia tanto con genes H-2 como con genes fuera del MHC (genes *background*) (Wakelin & Donachie 1980, 1983) e identificaron los genes Ts-1 en la región I-A y Ts-2 entre el loci S y D, además de que demostraron una asociación negativa entre la molécula I-E^k y la resistencia a la infección, así como una asociación positiva de la misma I-E^k y la susceptibilidad a la infección por *T. spiralis*. Kennedy en 1991 también estudió el comportamiento de la respuesta humoral hacia los antígenos de *T. spiralis* y encontró que la resistencia o susceptibilidad estaba asociada a la región I-A aunque no pudo correlacionar a un antígeno en particular (Kennedy et al. 1991). Pond et al. (1988) reportaron que en los ratones susceptibles, B10.BR H-2^k, había aumento de IgG₁ e IgE, mientras que en los ratones resistentes, AKR también H-2^k, IgE e IgG₁ estaban disminuidas y la IgG_{2a} aumentada. Wakelin en 1994 también observó un aumento de IgG₁ o IgG_{2a} en ratones NIH infectados con *T. pseudospiralis* y *T. spiralis*, respectivamente

(Wakelin et al. 1994). En el cerdo Madden y su grupo también mostraron una asociación del MHC con la eliminación de *T. spiralis* (Madden et al. 1990).

***Leishmania donovani* y *L. major*.**

Plant et al. en 1982 mostraron que en la fase temprana de la leishmaniasis visceral o Kala-azar causada por *L. donovani*, la respuesta inmune es inespecífica y es controlada por el gen *Lsh* que se encuentra en el cromosoma 1, un gen homólogo al gen *Ity* que participa en la infección con *Salmonella typhimurium* y al gen *Bcg* que interviene en la infección con *Mycobacterium bovis*, *M. lepraemurium* y *M. intracellulare* (Plant et al. 1982). En cambio, en la fase tardía la resistencia a la infección sí es controlada por los genes H-2, así, en los experimentos realizados en ratones B10 que expresan los alelos H-2^S o H-2^F, se observa que la eliminación de *L. donovani* ocurre en 50-85 días después de haber sido inoculados, por otra parte, aquellos que expresan el alelo H-2^b la eliminan a los 130 días y los ratones que tienen H-2^{d, q, f} no pueden eliminar al parásito. Posteriormente Blackwell observó susceptibilidad a *L. donovani* en los ratones I-E^k positivos y resistencia en los ratones I-A^k, estos resultados fueron también confirmados in

vivo usando anticuerpos monoclonales dirigidos a estas moléculas (Blackwell & Roberts 1987).

Wassom en 1990 propone tres hipótesis en base a la participación de la molécula I-E^k en la susceptibilidad a la infección parasitaria: 1) La expresión de la molécula I-E^k puede influir en la composición del repertorio de la célula T. 2) Durante la generación de la respuesta inmune específica al antígeno puede producirse células T autoreactivas que identifiquen moléculas parecidas a clase II. 3) Cuando el antígeno es presentado a las células T por la molécula I-E^k puede activar células las cuales suprimen una respuesta I-A restringida al mismo antígeno (Wassom & Kelly 1990)

En la infección por *L. major*, por el contrario, no se presentan las dos fases, no participa la molécula I-E ni el gen *Lsh* y el gen asociado a la susceptibilidad (*Scl*) se encuentra en el cromosoma 8, sin embargo, los experimentos en los ratones B10 han mostrado que los ratones con los alelos H-2^{d,q} son resistentes mientras que los ratones BALB/c (H-2^{d,b,q}) y SWR (H-2^q) son susceptibles a *L. major* (Howard et al. 1980, De Tolla et al. 1981).

Plasmodium sp.

Weiss al intentar desarrollar una vacuna contra la malaria utilizando como antígeno una secuencia repetitiva de aminoácidos, asparagina, alanina, asparagina, prolina (NANP), observó que sólo los ratones con el haplotipo H-2^b producían anticuerpos contra el NANP. Mientras que al realizar sus experimentos con *P. yoelii* encontró que los ratones BALB/c H-2^d y B10 H-2^q inmunizados con los esporozoitos desarrollaban protección, lo cual no ocurría en los ratones con los alelos H-2^b o H-2^k (Weiss et al. 1989).

Mendis et al. en 1990 consideraron que en humanos los genes HLA podían influenciar la respuesta del anticuerpo hacia los antígenos de la malaria, pero no realizó un estudio inmunogenético. Por su parte, Hill et al. en 1991 encontraron una asociación del antígeno HLA-B53 con la resistencia a la malaria en los niños africanos. Posteriormente, Hill et al. en 1992 reportaron la participación de otros antígenos clase I, HLA-B35, HLA-A2, HLA-B8, HLA-B7 y HLA-B58. En forma similar, Dieye et al. en 1993 utilizando merozoitos como antígenos encontraron que los individuos con HLA-B51 reconocían al antígeno MSPI(42), mientras que los HLA-DR1 positivos reconocían al antígeno MSPI(19).

Trypanosoma cruzi.

Powell y Wasson observaron que los ratones B10 con el mismo fondo genético y diferente H-2 (d, q, ó y²) mostraban resistencia a *T. cruzi* y que los ratones con el alelo H-2^k eran susceptibles. A su vez en ratones del mismo haplotipo H-2^q, pero diferente fondo genético, observaron que las cepas B10 y DBA eran resistentes mientras que la cepa C3H era susceptible a la infección, por lo que concluyeron que sólo los ratones que presentaban ambos genes de resistencia, MHC y *background*, eran capaces de superar una infección aguda. (Powell & Wasson 1993).

Toxoplasma gondii y Giardiasis.

Los ratones BALB/c con haplotipo (d) son capaces de regular el desarrollo de quistes cerebrales y encefalitis toxoplásmica causada por *Toxoplasma gondii* (Blackwell et al. 1993).

En los ratones con diferentes haplotipos (H-2^{b,d,k}) la infección por *Giardia muris* ha revelado que los genes MHC determinan el curso de la infección en los ratones BALB/c pero no así en los ratones C57BL y que los genes *background* participan en el control de la infección prevaleciendo su

efecto sobre la influencia del MHC (Venkatesan *et al.* 1993). En humanos se ha mostrado una asociación entre giardiasis crónica o sintomática y los antígenos HLA-A1, HLA-A2, HLA-B8, HLA-B12 y HLA-DR5 (Mantovani *et al.* 1990, Abaza *et al.* 1988).

Amibiasis.

Los estudios de asociación entre los genes MHC y la amibiasis en animales de experimentación son escasos y frecuentemente contradictorios. La susceptibilidad a la amibiasis intestinal en ratones parece estar regulada por un gen dominante *Enh* fuera del complejo H-2 (Ghadirian & Kongshavn 1984). En el hombre la susceptibilidad al absceso hepático amibiano ha sido asociado con la presencia del antígeno HLA-DR3 y el complotipo SC01, codificados dentro de la región MHC, aparentemente no integrados como un solo haplotipo de riesgo (Arellano *et al.* 1991), sin embargo, la participación de estos genes u otros dentro o fuera de la región MHC asociados con la susceptibilidad a la amibiasis en otros grupos étnicos, no ha sido investigada.

OBJETIVOS

1.- Evaluar las frecuencias de antígenos HLA-A, HLA-B, HLA-DR y complotipos en una población de 50 pacientes pediátricos con AHA que permita una mejor comparación estadística, con la población de pacientes adultos con AHA.

2.- Investigar si las características clínicas del AHA en niños se asocian con una mayor frecuencia en los antígenos de riesgo HLA-DR3 y SC01 o si existen otros antígenos asociados al AHA en niños.

3.- Analizar mediante técnicas moleculares la región HLA-D (DR, DQ) en los pacientes pediátricos con AHA y sus testigos para investigar si existe una asociación más fuerte con ciertos polimorfismos del HLA-DR.

4.- Analizar el DNA de los pacientes HLA-DR3+ para tratar de identificar la posible asociación entre la susceptibilidad al AHA y algún subtipo especial de HLA-DR3.

HIPÓTESIS

La mayor incidencia de absceso hepático amibiano (AHA) en México está relacionado con un gen de susceptibilidad asociado con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Las características clínicas especiales del absceso hepático amibiano en niños están asociadas con una mayor frecuencia antigénica HLA-DR3 y de complotipo SC01.

El análisis molecular de la región HLA-D y complotipos confirmará la existencia de un haplotipo de riesgo (DR, DQ, C') asociado con la susceptibilidad al AHA.

MATERIAL Y MÉTODOS

ESTUDIO SEROLÓGICO

Pacientes.

Se revisaron los expedientes de pacientes pediátricos con diagnóstico de absceso hepático amibiano (AHA) el cual fue confirmado antes de los 13 años de edad clínicamente, por serología, imagenología y por respuesta al tratamiento en el Hospital General de México de los años 1983-1990 y del Hospital Infantil de México los expedientes de 1981-1990, obteniéndose 50 pacientes pediátricos, 27 niños y 23 niñas, con AHA.

Testigos.

Se incluyeron como testigos 70 niños sanos (\leq de 13 años de edad), 40 niños y 30 niñas, todos ellos asistentes al Hospital de Pediatría por razones quirúrgicas y con el consentimiento paterno; un grupo de 33 pacientes adultos con disentería amibiana y títulos elevados de anticuerpos

anti-amiba, 15 hombres y 18 mujeres; así como 110 pacientes adultos con AHA, 95 hombres y 15 mujeres; y 110 testigos adultos sanos, 55 hombres y 55 mujeres, estudiados previamente (Arellano et al. 1991). Todos los testigos fueron de similar condición étnica y socioeconómica.

Obtención de las muestras de sangre.

A cada uno de los pacientes y testigos, excepto en testigos neonatos, se les tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica, 15 ml fueron desfibrinados con perlas de vidrio de 5 mm de diámetro (Corning, NY, USA), en una relación de 1 perla/ml de sangre, y se usaron para la determinación serológica de los antígenos HLA ABC y DR y los restantes 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA) se usaron para la tipificación molecular del sistema HLA y el plasma EDTA se guardó a -70°C hasta su uso en la evaluación de complotipos. Para el estudio serológico y molecular en los neonatos se tomó una muestra de 10-20 ml de sangre placentaria obtenida de cordón umbilical, usando EDTA como anticoagulante.

Obtención de linfocitos T y B.

Los linfocitos T y B se aislaron a partir de una suspensión de células mononucleares (linfocitos y monocitos) obtenidas por centrifugación de la sangre, desfibrinada o anticoagulada, diluida 1:1 con medio RPMI 1640 sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma, St. Louis MO, USA). Los linfocitos T se obtuvieron por selección negativa usando perlas inmunomagnéticas (Dynabeads M450, Pan B) cubiertas con un anticuerpo monoclonal anti CD19 (DynaI Inc., NY, USA) el cual retiene linfocitos B al ser atraídos por el concentrador de partículas magnéticas Dynal MPC1 (DynaI Inc., NY, USA) y deja libres a los linfocitos T, o por selección positiva usando perlas cubiertas con un anticuerpo monoclonal anti CD2 (Dynabeads M-450 Pan-T, Dynal Inc., NY, USA), en ambos casos se obtuvieron linfocitos T útiles para la tipificación serológica HLA-ABC. Los linfocitos B también se obtuvieron a partir de una suspensión de células mononucleares usando selección positiva con perlas inmunomagnéticas cubiertas con anti CD19 o mediante la eliminación selectiva de células no B (linfocitos T y monocitos) usando anticuerpos monoclonales y complemento (Lymphokwik-B, One Lambda Inc., Los Angeles, CA, USA), en ambos casos se obtuvieron linfocitos adecuados para la tipificación serológica de HLA-DR y HLA-DQ.

Tipificación serológica de HLA ABC y DR.

La determinación serológica de los antígenos HLA se realizó en linfocitos T o B, según la tipificación HLA-ABC ó HLA-DR respectivamente, por el método de microcitotoxicidad en dos pasos de uso estándar en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH). En dicho método, los sueros anti-HLA primero reconocen un antígeno específico sobre la membrana de los linfocitos T o B y posteriormente fijan el complemento, lo cual resulta en la alteración de la permeabilidad celular que permite evaluar la reacción de lisis celular y viabilidad usando colorantes vitales como la eosina y/o azul tripano (Sigma, St. Louis, MO, USA).

La tipificación HLA-ABC y HLA-DR se efectuó en placas comerciales (Pel-Freez, Brown Deer, WI, USA) las cuales contienen 140 antisueros contra antígenos HLA-A,-B,-C y 50 antisueros contra HLA-DR y DQ. Se usó como fuente de complemento suero total de conejo (Pel-Freez, Brown Deer, WI, USA).

Determinación de complotipos.

Tipificación de C2. Las variantes polimórficas de C2 fueron identificadas por isoelectroenfoque, de muestras de plasma,

en un gel de acrilamida (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguido de un ensayo de su función hemolítica, en la zona de migración de C2, usando eritrocitos de carnero sensibilizados con un anticuerpo específico y complemento deficiente en C2.

Tipificación de C4. Las variantes polimórficas de C4A y C4B fueron identificadas por electroforesis de muestras de plasma, desializadas con neuraminidasa de *Clostridium perfringens* tipo VI (Sigma, St. Louis, MO, USA) en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguida de inmunoprecipitación con un suero específico anti C4 (Atlantic Antibodies, Scarborough, MN, USA).

Tipificación de factor B. Las variantes del factor B fueron identificadas por electroforesis de plasma en gel de agarosa usando un buffer veronal alcalino, seguido de inmunoprecipitación con un suero específico anti factor B humano (Atlantic Antibodies, Scarborough, MN, USA).

ESTUDIO MOLECULAR

Pacientes.

Para el análisis molecular se incluyeron 41/50 pacientes pediátricos, 21 niños y 20 niñas con AHA, estudiados en el análisis serológico.

Testigos.

Se incluyeron 103 testigos sanos (53 masculinos y 50 femeninos) de 0 meses a 45 años.

Extracción del DNA.

La extracción del DNA genómico en los adultos se efectuó, usando una macrotécnica, a partir de 20 ml de sangre periférica total la cual se trató con proteinasa K y solventes orgánicos (fenol-cloroformo) en cuyo proceso las proteínas y contaminantes celulares son desnaturalizados y mantenidos en la fase orgánica, mientras que el DNA que permanece en solución en la fase acuosa se precipita con etanol para eliminar sales y otros solutos contaminantes que

permanecen en solución. Mediante este procedimiento se obtiene un alto rendimiento de DNA de buena calidad (DNA de alto peso molecular) favorable para el análisis molecular.

La extracción del DNA genómico en los pacientes pediátricos se efectuó por triplicado mediante una microtécnica, a partir de 300 µl de sangre periférica anticoagulada con EDTA, usando una sola extracción con cloroformo. El DNA obtenido de tres extracciones fue suficiente para efectuar el análisis molecular.

La concentración del DNA obtenido por ambos métodos de extracción fue evaluada mediante el corrimiento electroforético de una alícuota de cada muestra y su cuantificación espectrofotométrica. En base a esta evaluación se confirmó que la extracción del DNA fue exitosa en 41/41 muestras de pacientes pediátricos y en 103/103 testigos.

Amplificación del DNA.

La amplificación del DNA se efectuó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como iniciadores (*primers*) DR-Beta y DQ-Beta genéricos así como *primers* específicos de grupo (DR52) y/o de alelo. La

amplificación en todos los casos fue comprobada mediante el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1%.

Amplificación de la región DR-Beta.

Inicialmente el DNA de 41/41 pacientes pediátricos y 72/103 testigos se amplificó para la región DR-beta genérico usando los *primers* específicos para esta región de acuerdo a los protocolos del onceavo taller internacional de histocompatibilidad (Yokohama, Japón, 1991), sintetizados en Madrid, España o en el Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, México D.F. y/o utilizando un kit comercial (Lifecodes, Stamford, CT, USA). Tabla 1.

Amplificación de la región DQ-Beta.

Para esta región también se usaron *primers* específicos de acuerdo a los protocolos mencionados anteriormente. Se amplificaron 39/41 muestras de pacientes pediátricos y 41/103 testigos. Tabla 1.

Amplificación con primers específicos de grupo.

Para la región DR-Beta se reevaluaron los antígenos asociados con HLA-DR52. Se amplificó con primers de baja resolución específicos del grupo e hibridación con las sondas específicas para asignar con certeza los antígenos HLA-DR3, HLA-DR5 (DR11, DR12), HLA-DR6 (DR13, DR14) y HLA-DR8 (Tabla 1) (Mercier et al. 1994, Chia et al. 1993).

T A B L A 1

No.	REGION	SECUENCIA 5'	SECUENCIA 3'
1	DR- β genérico	CCCCACAGCACGTTTCTTG	CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT
2	DQ- β genérico	CATGTGCTACTTCACCAACGG	CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC
3	DR- β 1*03	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	TGCAGTAGTTGTCCACCCG
4	DR- β 1*08	CGTTTCTTGGAGTACTCTACGGG	CTGCAGTAGGTGTCCACCAG
5	DR- β 1*11	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	TCAGGCTGTTCCAGTACTCCT
6	DR- β 1*12	AGTACTCTCTACGGGTGAGTGT	AATAGGTGTCCACCGCGCG
7	DR- β 1*13	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	CCCCTCGTCTCCAGGAT
8	DR- β 1*1303	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	CCGCTTGTCTCCAGGAT
9	DR- β 1*1305	GTTCTGGACAGATACTTCC	CCGCCTGTCTCCAGGAA
10	DR- β 1*1306	GTTCTGGACAGATACTTCC	CCGCCTGTCTCCAGGAT
11	DR- β 1*14	GTTCTGGACAGATACTTCC	TGCAATAGGTGTCCACCTC
12	DR- β 3	CCCAGCACGTTTCTTGGAGCT	CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT

Amplificación con primers específicos de alelo.

Algunas especificidades antigénicas asociadas a HLA-DR52 también fueron evaluadas por amplificación específica de alelo, en cuyo caso la amplificación sola sin necesidad de

usar sondas específicas de alelo es suficiente para asignar la especificidad antigénica.

Caracterización molecular de antígenos HLA.

El DNA amplificado se depositó, 2 μ l de cada muestra, en una membrana de nylon cargada positivamente (*dot blot*). Enseguida se fijó el DNA a la membrana exponiéndola al *crosslinker* UV (Stratagene), 120,000 microjoules/25 seg, o en su caso horneando la membrana durante 1 hr a 80°C.

La hibridación se realizó con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) y dependiendo de la obtención de dichas sondas, el kit de Lifecodes o las sondas sintetizadas ya sea en Madrid, España o en México D.F., se realizaron dos protocolos diferentes. Posterior a la fijación del DNA a las membranas de nylon se desnaturalizó con NaOH 0.4M y tris-HCl 0.2M o con NaCl 0.5M, NaOH 0.5M, NaCl 2.5 M y tris 0.5M pH 7.4 cuando se utilizó el protocolo de Lifecodes.

Las sondas de oligonucleótidos que se usaron en la etapa de hibridación fueron marcadas con fosfatasa alcalina para poder ser detectadas mediante quimioluminiscencia usando como substrato AMPPD o Lumi-phos dependiendo del protocolo utilizado.

En total se probaron 48 sondas para la región DR- β y DQ- β mas el control positivo correspondiente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias antigénicas HLA y de complotipos evaluadas por métodos serológicos y moleculares en los diferentes grupos de pacientes y testigos fueron comparadas usando la prueba de chi cuadrada empleando tablas de contingencia de 2 X 2 y los valores de P se obtuvieron mediante la prueba de p exacta de Fisher. El valor de P obtenido se corrigió por el número de especificidades estudiadas (pc), y la fuerza de la asociación, del marcador con la enfermedad, se determinó calculando el riesgo relativo (RR), o como relación de momios (OR) para evitar la complicación cuando una de las entradas en la tabla es igual a 0. Convencionalmente si RR es mayor de 1 corresponde a una asociación positiva, entre el marcador genético en cuestión y la enfermedad. Inversamente si RR es menor a 1 corresponde a una asociación negativa (Svejgaard & Ryder 1994, Green 1982, Matthews & Farewell 1985).

Todos los cálculos fueron realizados de acuerdo a las fórmulas anexas:

Tabla de contingencia.

	+	-	TOTALES
ATA	a	b	a+b
TESTIGOS	c	d	c+d
TOTALES	a+c	b+d	N

Chi cuadrada.

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

P exacta de Fisher.

$$p = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! N!}$$

Riesgo relativo.

$$RR = \frac{ad}{cb}$$

RESULTADOS

ESTUDIO SEROLÓGICO

Ninguna diferencia significativa en los antígenos HLA (A, B, DR y DQ) fue encontrada al comparar las poblaciones de testigos mestizos mexicanos adultos (Arellano et al. 1991) y pediátricos, integrándose de esta forma un grupo testigo de 180 mestizos mexicanos de todas las edades (Tablas 2 y 5).

Los 50 pacientes pediátricos mestizos mexicanos con AHA mostraron un aumento significativo de HLA-DR3 (38% vs. 12.8%, rr 3.0, pc < 0.005) y sus haplotipos HLA-A2, DR3 (24% vs 5%, rr 4.8, pc < 0.005) y HLA-B16, DR3 (18% vs 2.2%, rr 8.1, pc < 0.005) cuando se compararon con el grupo testigo mestizo mexicano compuesto (n=180, adultos mas niños) (Tabla 2). HLA-DR3, pero no los haplotipos antes mencionados, permanece significativo (pc < 0.05) cuando se comparó con los testigos mestizos mexicanos pediátricos (38% vs 12.9, rr 3.0). La disminución en los niveles de significancia probablemente resulta del número reducido de casos comparados, dado que las frecuencias son similares (Tabla 2). Estas cifras no fueron afectadas si se dividen los pacientes pediátricos con AHA por sexos. (Tabla 3).

Por otra parte, de un total de seis complotipos diferentes encontrados en los niños mestizos mexicanos con AHA sólo SC01 (47.1% vs. 9.5%, rr 7.1) estuvo significativamente aumentado ($p < 0.005$) cuando se comparó con el grupo testigo compuesto. Esta diferencia también fue significativa (47.1% vs. 12%, rr 3.9, $p < 0.01$) cuando las cifras de complotipos de los casos pediátricos de AHA se compararon con las de los niños testigos sanos (Tabla 2). Cuando la población mestiza mexicana pediátrica y adulta con AHA se comparó con el grupo testigo compuesto, HLA-DR3, HLA-A2-DR3, HLA-B16-DR3 y SC01 fueron significativos (Tabla 5).

Ninguna otra asociación significativa, por aumento o disminución, de HLA (A, B, DR y DQ) o de complotipo se encontró en este estudio de AHA en los niños cuando se comparó con la población testigo compuesta o sólo con los testigos pediátricos. Varias diferencias que fueron significativas a nivel de p pero no de pc son mostradas en la Tabla 4. Como en el estudio en adultos con AHA (Arellano et al. 1991), tres de las 10 asociaciones haplotípicas marginales (*borderline*) incluyeron DR3, un evento que confirma la asociación primaria de HLA-DR3 (Tabla 4).

No se encontró un desequilibrio de ligamiento entre HLA-DR3 y SC01, ni de estos antígenos con HLA-A2, HLA-B16 y HLA-DR4, o de otros antígenos HLA y complotipos incluidos en nuestro estudio.

Aunque no fue un grupo grande, los pacientes mestizos mexicanos con RCA no mostraron diferencias en HLA o complotipos cuando se compararon a las del grupo testigo compuesto, o en forma separada con los adultos (Arellano et al. 1991) o con los testigos pediátricos mestizos mexicanos.

Finalmente, cuando el perfil de HLA o complotipos de los pacientes pediátricos se comparó con el de los pacientes adultos mestizos mexicanos con AHA, los aumentos en HLA-DR3, HLA-A2-DR3, HLA-B16-DR3, el complotipo SC01 y DR4-SC01 fueron comparables; aunque HLA-B16-DR3 y DR4-SC01 (no mostrado en la Tabla) presentaron un aumento significativo sólo en niños y adultos respectivamente (Tabla 2). Sin embargo, una comparación de los antígenos HLA entre los dos grupos de pacientes mestizos mexicanos con AHA, mostró que HLA-DR5 está significativamente aumentado (60% vs 26.4%, rr 2.3, pc < 0.005) y HLA-DR6 ausente (0% vs 20%, rr, ND, pc < 0.05) en los pacientes pediátricos, de nuevo independientemente del sexo, cuando se comparó con su contraparte de adultos (no mostrado en tablas).

T A B L A 2

ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS EN HLA Y COMLOTIPOS EN NIÑOS CON AHA

HLA	AHA ^a Niños n = 50		TESTIGOS Adultos + niños n = 180		TESTIGOS Niños n = 70		RCA ^d Adultos + niños n = 33		AHA Adultos n = 110	
	No	f ^f	No	f	No	f	No	f	No	f
DR3	19	0.380	23	0.128	9	0.129	3	0.091	39	0.355
A2, DR3	12	0.240	9	0.050	4	0.057	2	0.061	23	0.209
B16, DR3	9	0.180	4	0.022	3	0.043	1	0.030	10	0.091
COMLOTIPOS										
	n = 34		n = 95		n = 50		n = 33		n = 45	
SCO1	10	0.471	9	0.095	6	0.120	4	0.121	14	0.311

a = absceso hepático amibiano

d = rectocolitis amibiana

f = frecuencia fenotípica

T A B L A 3
HLA Y COMLOTIPOS EN NIÑOS CON AHA ^a

HLA	FEMENINOS n = 23		MASCULINOS n = 27		X ²	pc ^c	rr
	No	f ^b	No	f			
DR3	8	0.348	11	0.407	0.02	NS ^d	1.17
A2, DR3	6	0.261	6	0.222	0.08	NS	0.85
B16, DR3	5	0.217	4	0.148	0.17	NS	0.68
COMLOTIPOS							
	n = 17		n = 17				
SC01	8	0.470	8	0.470	0.120	NS	1.0

a = absceso hepático amibiano
b = frecuencia fenotípica
c = p corregida
d = no significativo

T A B L A 4

ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS *BORDERLINE* (p^a) HLA Y AHA ^b EN NIÑOS

HLA	AHA (n = 50)		TESTIGOS (n = 180)		p^a
	No.	f ^c	No.	f	
B14	0	0.000	17	0.094	< 0.050
DR8	0	0.000	14	0.078	< 0.050
A2, B16	14	0.280	22	0.122	< 0.050
B17, DR3	9	0.180	5	0.027	< 0.005
A2, B16, DR1	3	0.060	1	0.006	< 0.050
A2, B16, DR3	9	0.180	2	0.033	< 0.010
A9, B7, DR7	3	0.060	0	0.000	< 0.010
A28, B35, DR4	3	0.060	1	0.006	< 0.050
Ax, B16, DR3	3	0.060	0	0.000	< 0.010

a = p no corregida

b = absceso hepático amibiano

c = frecuencia fenotípica

T A B L A 5

ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS EN HLA Y COMLOTIPOS
EN MESTIZOS MEXICANOS CON AHA^a

HLA	AHA n = 160 ^b		TESTIGOS n = 180 ^b		X ²	pc	rr
	No	f	No	f			
DR3	8	0.363	23	0.128	24.4	< 0.00001	2.9
A2, DR3	35	0.219	9	0.050	15.5	< 0.00010	4.4
B16, DR3	19	0.119	4	0.022	11.0	< 0.01000	5.3
COMLOTIPOS							
	n = 79		n = 95				
SC01	30	0.380	9	0.095	18.5	< 0.0005	4.0

a = absceso hepático amibiano

b = adultos + niños

Estudio molecular

La extracción del DNA genómico usando solventes orgánicos en una macrotécnica con 20 ml de sangre, resultó en un alto rendimiento del DNA de buena calidad (DNA de alto peso molecular) favorable para el análisis molecular. Por su parte, la extracción del DNA obtenido de tres extracciones, usando una microtécnica a partir de 300 μ l de sangre, fue suficiente para efectuar el análisis molecular.

La extracción del DNA para el análisis molecular de la región HLA se efectuó en 41 de los 50 pacientes pediátricos con ANA incluidos en el estudio serológico. En los 9 casos restantes no se obtuvo una muestra suficiente para la determinación y/o los pacientes no aceptaron la toma de una segunda muestra. Por otra parte, la extracción del DNA fue posible en 103 testigos pediátricos del mismo grupo étnico y similar condición socioeconómica. En todos los casos la extracción del DNA se evaluó mediante corrimiento electroforético de la muestra, en presencia de bromuro de etidio, y su espectro fue revelado en un transiluminador de UV. La concentración del DNA obtenido en las muestras varió entre 80-800 μ g de DNA/ml dependiendo de la técnica de extracción usada.

Todas las muestras de DNA (41/41) de los pacientes pediátricos se amplificaron mediante PCR usando *primers*

específicos para la región DR- β . La amplificación adecuada de las muestras dependió inicialmente de la Taq polimerasa usada, si embargo, pudo lograrse una buena amplificación (comprobada también mediante corrimiento electroforético) después de efectuar la amplificación usando una curva de concentración de la Taq polimerasa nacional.

Las muestras de pacientes amplificadas para la región DR- β fueron hibridadas con sondas específicas (Lifecodes y otras) y se reveló su presencia mediante quimioluminiscencia. La identificación de las especificidades HLA fue adecuada (excepto aquellas asociadas a DR52 y DR8) y no fue necesario hacer una segunda amplificación de grupo (Tabla 6). Para la identificación de las especificidades asociadas a DR52 (HLA-DR3, -DR5 y -DR6) se efectuó una nueva amplificación usando *primers* específicos de grupo. A pesar de esta segunda amplificación y de la hibridación exitosa con el panel de sondas disponibles, nuestros resultados mostraron una diferencia substancial con la tipificación serológica, por lo que se consideró efectuar una segunda amplificación con *primers* específicos de alelo. Hasta el momento, ya se efectuó la amplificación alelo específica de HLA-DR8, lo cual nos permitió la identificación precisa de sus subtipos, sin embargo, este tipo de análisis no ha sido posible para los subtipos asociados con HLA-DR3, -DR5 y -DR6.

En el grupo testigo, por falta de reactivos, únicamente se amplificaron 72 de las 103 muestras de DNA usando *primers* DR- β genéricos, por lo que después de hibridar con nuestro panel de sondas de oligonucleótidos, sólo fue posible determinar con mayor precisión las especificidades no asociadas con DR-52, DR4 y DR8 (Tabla 6). La amplificación con *primers* de grupo y de alelo se está realizando actualmente.

La amplificación con los *primers* específicos para DQ- β fueron satisfactorios en todos los pacientes (39) y en 41 de los 72 testigos. En ambos grupos se pudo llegar a establecer el alelo específico. El análisis estadístico de estos resultados no mostró diferencias significativas (Tabla 7).

T A B L A 6

FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS HLA-DR OBTENIDAS POR OLIGOTIPIFICACIÓN EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON AHA

DR-β1	AHA NIÑOS n = 41/41	FRECUENCIA FENOTÍPICA %	TESTIGOS NIÑOS n = 72/103	FRECUENCIA FENOTÍPICA %
0101	1	2.4	3	4.2
0102	1	2.4	5	7.0
0103	1	2.4	0	0.0
04	7	17.0	20	27.8
0402	1	2.4	1	1.4
0404	2	4.8	4	5.5
0407	9	22.0	9	12.5
0413	2	4.8	1	1.4
0415	0	0.0	2	2.7
07	4	9.8	6	8.3
08	2	4.8	28	38.8
0802	11	26.8	0	0.0
0804	0	0.0	3	4.2
08042	1	2.4	0	0.0
0901	0	0.0	2	2.7
09012	2	4.8	0	0.0
1001	1	2.4	2	2.7
15	0	0.0	2	2.7
1501	1	2.4	8	11.1
1502	3	7.3	1	1.4
1503	1	2.4	0	0.0
1602	2	4.8	0	0.0

T A B L A 7

FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS HLA-DQ OBTENIDAS POR OLIGOTIPIFICACIÓN EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
CON AHA

DQ-β1	AHA NIÑOS n = 39/41	FRECUENCIA FENOTÍPICA %	TESTIGOS NIÑOS n = 41/103	FRECUENCIA FENOTÍPICA %
0201	6	15.3	5	12.2
0301	16	41.0	14	34.1
0302	17	43.6	20	48.8
0303	2	5.1	1	2.4
0304	1	2.5	0	0.0
0402	14	35.9	22	53.7
0501	6	15.3	6	14.6
0502	1	2.5	0	0.0
05031	1	2.5	3	7.3
0602	3	7.7	0	0.0
0603	0	0.0	1	2.4
0604	1	2.5	0	0.0
06	0	0.0	2	4.9

DISCUSIÓN

Los pacientes pediátricos con AHA mostraron, sin importar el sexo, un aumento significativo e independiente de HLA-DR3 y SC01, cuando se compararon tanto con testigos pediátricos como con un grupo testigo compuesto por individuos de todas las edades y del mismo grupo étnico (Arellano et al. 1991, más la serie actual). Mas aún, los mestizos mexicanos con RCA no mostraron diferencias significativas en el perfil de HLA o complotipos cuando se compararon con testigos sanos del mismo grupo étnico. En concordancia con esto está nuestra observación reciente de que los portadores crónicos sanos de *E. histolytica* no difieren en su perfil HLA de los testigos sanos del mismo grupo étnico (Martínez et al. 1996). Así el estudio serológico actual añade y confirma las observaciones hechas previamente en mestizos mexicanos adultos con AHA (Arellano et al. 1991) y nos permite concluir que -al menos en mestizos mexicanos- HLA-DR3 y SC01 pudieran representar factores independientes de riesgo en el huésped, no para cualquier forma de invasión (RCA), sino específicamente para el desarrollo de AHA independientemente de edad y sexo (Tabla 5).

Las asociaciones independientes de HLA-DR3 y SC01 (Reveille et al. 1995), en el AHA en mestizos mexicanos pueden ser asociaciones primarias, ya que no encontramos desequilibrio de enlace entre ellos o con otros componentes de la región clase I, II y III incluidos en nuestro estudio. Sin embargo, un desequilibrio de enlace de HLA-DR3 y/o SC01 con otros genes dentro o en vecindad al MHC, no puede descartarse, especialmente asociaciones con TNF α , TNF β y HSP70 (Campbell & Trowsdale 1993), que pueden desempeñar un papel importante en la fase efectora temprana de la respuesta inmune en contra de parásitos (Wassom & Kelly 1990, Kaufmann 1994).

El polimorfismo de los loci TNF ha sido descrito recientemente (Webb & Chaplin 1990, Wilson et al. 1992), incluyendo la amibiasis invasora (Wang et al. 1994)

Una correlación entre las formas alélicas del complemento y su función es todavía un campo por estudiar (Campbell 1987). Como sea, la acción de la proteinasa de *E. histolytica* en la cascada del complemento ocurre a nivel de C3 o después de él (y también del factor B, C2 y C4) (Reed et al 1995).

La existencia de un antígeno HLA o de un complotipo en particular para pacientes pediátricos con AHA no pudo demostrarse en nuestro estudio, ya que la incidencia de los marcadores fenotípicos HLA-DR3 y SC01 en éstos pacientes

resultó similar cuando se comparó con la de los pacientes adultos con esta enfermedad. Las diferencias clínicas entre adultos y niños con AHA (frecuencia, severidad, predominio sexual y amibiasis intestinal concurrente) (Muñoz 1990) no parecen estar relacionadas a HLA-DR3 o SC01, ni aún cuando se analizan separadamente por sexos. Por otra parte, cuando los pacientes pediátricos y adultos con AHA se compararon con respecto a otros determinantes HLA o complotipos, encontramos un aumento en HLA-DR5 y una ausencia de HLA-DR6 en niños con AHA en comparación con sus contrapartes en adultos, nuevamente independiente del sexo; sin embargo, el estudio molecular podría mostrar resultados diferentes, debido a que no presenta las limitaciones impuestas por las reacciones cruzadas observadas en el análisis serológico como ocurre con los antígenos pertenecientes al grupo HLA-DR52 (HLA-DR3, HLA-DR5, HLA-DR6) y HLA-DR8 (Balboni et al. 1992).

La tipificación serológica de los antígenos HLA clase II identifica alrededor de 14 moléculas DRB y tres DQB, sin embargo, es incapaz de identificar los subtipos importantes de ciertos alelos DRB1 y usualmente conduce a errores en la asignación hasta en un 25% de los casos, particularmente de los antígenos asociados con DR52 el cual agrupa a una familia de alelos que comparten secuencias en la primera región hipervariable del segundo exón (Horne & Keown 1993).

Dado que el polimorfismo en el segundo exón de DRB1 consiste de un arreglo en parches generado por conversión intralocus, los *primers* no son específicos para un alelo o grupo de alelos asociados con una misma especificidad serológica y se hace necesario el uso de *primers* específicos derecho e izquierdo para reducir la amplificación cruzada y obtener una tipificación molecular específica. La principal fuente de error en este tipo de tipificación es no asignar un alelo por la falta de amplificación resultante de fallas en la extracción de DNA, en la Taq polimerasa usada y en la preparación de buffers, aunque la mayoría de las veces la falta de amplificación se asocia con ineficiencia de los *primers* (Mercier et al. 1994).

Actualmente la tipificación molecular del sistema HLA se efectúa por varios métodos basados en la tipificación del DNA (RFLP, PCR-RFLP, PCR-SSP y PCR-SSO), en general los resultados obtenidos por estos métodos de tipificación correlacionan bien, sin embargo varios autores reportan resultados discordantes en especial con los genes DRB1 asociados con DRB3 (DR52). En esta forma, se ha reportado que las muestras que poseen los antígenos DR1/DR103, 7/9, 17/6 (DR3 (17)/DR6 (13, 14)) y 11/13 (DR5 (11)/DR6 (13)) fueron indistinguibles mediante análisis por RFLP y su asignación

requiere del uso adicional de PCR-SSO y PCR-SSP (Jordan et al. 1995).

Por otra parte, aunque la oligotipificación de baja resolución (nivel I) concuerda con la tipificación serológica para los antígenos DR 2, 3, 11, 12, 7, 8 y 9 se considera que la mayoría de discrepancias con estos métodos involucran a DR6 y resulta indispensable la tipificación molecular de alta resolución (nivel II) para la identificación adecuada sobre todo de los antígenos DR4 y DR6 (Mickelson et al. 1993).

Una complicación adicional en la oligotipificación resulta de la existencia de mutaciones silenciosas que impiden una amplificación adecuada con los primers DRB genéricos, como ocurre con el antígeno DR3(BRI-3) presente en 5-10% de los individuos HLA-DR3 positivos por serología, así como de la posible existencia de variantes alélicas pobremente caracterizadas propias de los diferentes grupos étnicos (Eberle & Baxter-Lowe 1992).

HLA-DR3 se ha asociado con enfermedades hepáticas autoinmunes (Svejgaard et al. 1983), respuesta inmune débil contra aloinjertos débil (Cicciarelli et al. 1982), resistencia al desarrollo de diabetes mellitus insulino-dependiente (Todd et al. 1987) y con otros desórdenes inmunes (Reveille et al.

1995). El complotipo SC01, por otra parte, se ha asociado con lupus eritematoso diseminado y con otras enfermedades autoinmunes (Fielder *et al.* 1983). El haplotipo HLA-B8-SC01-DR3 se ha asociado con diabetes mellitus insulino-dependiente, enteropatía sensible al gluten, deficiencia de IgA, inmunodeficiencia común y variable, una rápida progresión en la infección por HIV (Alper *et al.* 1989) y con una hiporespuesta a la vacuna contra la hepatitis B. Falta por aclarar en qué forma precisa HLA-DR3 y el complotipo SC01 pudieran contribuir a un riesgo mayor para el desarrollo de AHA en mestizos mexicanos de cualquier edad, aunque existen evidencias de disfunción inmune asociada con estos marcadores (HLA-DR3, SC01), las cuales pueden abrir avenidas atractivas para la investigación futura.

Tanto los genes MHC como genes fuera del MHC (genes *background*) pueden influir sobre la resistencia o susceptibilidad a una variedad de infecciones parasitarias experimentales en ratones (Wakelin 1980, Wakelin & Donachie 1980, 1983, Blackwell *et al.* 1993, Kauffmann 1994). Los estudios realizados en ratones de cepas puras infectados con protozoarios (*Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* y *Leishmania*) son ejemplos de resistencia o susceptibilidad (Blackwell *et al.* 1982, Wassom & Kelly 1990, Weiss *et al.* 1989, Powell & Wassom 1993, Blackwell *et al.* 1993). Estos

estudios han revelado una respuesta fuertemente polarizada de células T CD4⁺ (Th1/Th2), con efectos opuestos sobre el parásito y que resulta tanto en patrones de curación (C57/BL6) o de no curación (BALB/C). El patron de curación fue el resultado de una fuerte respuesta Th1 (IL2, INF γ , TNF α , efectores proinflamatorios, hipersensibilidad retarda (DTH) y pobre de producción de anticuerpos) mientras que los patrones de no curación revelan una respuesta predominantemente Th2 (IL4, IL5, IL10, eosinofilia, no DTH y producción de anticuerpos IgE) (Heinzel et al. 1989). *E. histolytica* un protozooario extracelular único puede seguir sus propias reglas para la dicotomía Th1/Th2 (Talamás-Rohana et al. 1995). En el caso de los protozoarios *Leishmania* y *Plasmodium* y del helminto *Trichinella*, una fuerte respuesta inmune humoral se ha asociado con una mayor susceptibilidad (Pond et al. 1988), mientras que la inmunidad celular parece estar relacionada con la resistencia (Howard 1986). En amibiasis en humanos (y experimental) la reinfección e invasión ocurre también frecuentemente en presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-amiba, mientras que la inmunidad protectora se correlaciona con la respuesta inmune llevada a cabo por células (Pérez-Montfort & Kretschmer 1990). Estudios en ratones KO (Kaufmann 1994) han mostrado que genes no-MHC regulan factores importantes (TNF-R1, INF γ , NO, etc.) en la

fase efectora de la respuesta inmune. Como una consecuencia de estos genes no-MHC pueden encubrir, al menos en ratones, los posibles efectos controlados por el MHC (Wassom & Kelly 1990). Interesantemente, la predisposición genética (no resistencia) de ratones a la amibiasis intestinal experimental es codificada fuera del MHC (Ghadirian & Kongshavn 1984).

Por otra parte, la expresión de I-E^k en ratones se ha relacionado con mayor susceptibilidad a diferentes parásitos no relacionados, antigénicamente distintos y con marcadas diferencias en sus estilos de vida (*Nematospiroddes dubious*, *Trichuris muris*, *T. spiralis*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium chabaudi*). Los ratones que no expresan moléculas I-E^k son más capaces de resistir tales infecciones parasitarias. Esta susceptibilidad no específica aumentada a infecciones parasitarias en animales que expresan moléculas I-E^k puede resultar de una respuesta inmune celular antiparasitaria subóptima (Wassom & Kelly 1990). Sin embargo, los animales experimentales (frecuentemente ratones singénicos) son expuestos a dosis fijas y uniformes de gran número de parásitos, una estrategia muy diferente a la que ocurre en la invasión ambiana al hígado en los hospederos humanos (Kretschmer 1986). La existencia de un efecto equivalente ("I-E^k like") asociado a HLA-DR3 en humanos puede ser una mera especulación, pero hay evidencias de que la

respuesta inmune mediada por células es transitoriamente y no específicamente deprimida (*down-regulated*) durante la invasión amibiana. Los genes MHC pueden así influir en los niveles de susceptibilidad a parásitos no sólo en animales (Skamene & Pietrangeli 1991) sino también en el hombre (Hill *et al.* 1991, Del Brutto *et al.* 1991, Gottstein & Bettens 1994). Aunque no se conoce exactamente cómo los genes MHC median estos efectos una proposición plausible parece ser su influencia sobre la dicotomía funcional Th1/Th2, así como una predisposición genética para la regulación descendente cuando los antígenos parasitarios son presentados a las células T que expresan ciertas moléculas MHC clase II (I-E^b) (Wassom & Kelly 1990).

Con la reciente introducción de la genotipificación HLA, se han encontrado diferencias con los fenotipos determinados serológicamente (Mytilineos *et al.* 1993). Aunque en nuestros resultados pudieran surgir algunas discrepancias en el análisis de HLA-DR, éstas deberían afectar a todos los grupos al azar (AHA y testigos), permitiendo así que nuestras observaciones básicas permanezcan, con el eventual surgimiento de algunas diferencias en subtipos. Finalmente, la validez de comparar datos HLA obtenidos en grupos de diferentes edades dentro de los mismos grupos étnicos pudiera ser cuestionada, aunque ni otros grupos (Blackwelder *et al.*

1982) ni nosotros hemos encontrado diferencias en la distribución de antígenos HLA relacionados con la edad, excepto en gente de edad avanzada (nonagenarios con HLA-Cw7) (Proust et al.1982), los cuales no fueron incluidos en nuestras series.

El AHA es un evento multifactorial complejo. La asociación de HLA-DR3 y SC01 (y sus fracciones haplotípicas) con AHA en mestizos mexicanos debe comprometer a un estudio más preciso de las sutilezas de la presentación del antígeno ambiental y la respuesta inmune resultante en los pocos seres humanos desafortunados que adquieren el AHA, en comparación a los muchos individuos infectados por *E. histolytica* y a los invadidos intestinalmente que escapan a esta complicación.

APÉNDICE 1

EQUIPO Y MATERIAL

Equipo

Agitador orbital (Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ)
 Balanza analítica (Mettler)
 Balanza granataria (Mettler P1000)
 Cámara para electroforesis horizontal (Stratagene, Inc., La Jolla, CA)
 Campana de extracción (Farsam S.A., México, D.F.)
 Centrifuga de mesa (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
 Microcentrifuga (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)
 Centrifuga de vacío (Heto-Holtén A/S, Gydevang)
 Congelador a -70°C (Revco Scientific, Asheville, NC)
 Congelador a -20°C (American Refrigeration, México, D.F.)
 Congelador a -35°C (Revco)
 Crosslinker (Stratagene)
 Fuente de poder para electroforesis (Stratagene)
 Fuente de poder para electroforesis de alto voltaje (Stratagene)
 Horno de microondas (Panasonic)
 Incubadora a 37°C (Revco)
 Incubadora para hibridación (Robbins Scientific, San Aleso, CA)
 Mesa con fuente de luz (Sin marca)
 Microscopio de fluorescencia invertido (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
 Potenciómetro (Corning, New York, NY)
 Refrigerador (American Refrigeration, México, D.F.)
 Sellador para folder (Sin marca)
 Termociclador (Stratagene)
 Transiluminador (Stratagene)

Material

Cámaras de Neubauer (Hausser Scientific, USA)
 Cassette para película de rayos X de 8 X 10 (Requena, Korea)
 Criotubos de 2 ml (Nunc, Roskilde, Denmark)
 Folders de acetatos (Lifecodes Co., Stamford, CT)
 Gradilla para criotubos (Nalgene)
 Gradilla para microtubos (Fisher)

Magneto MPC-1 (Dynal Inc., New York, NY)
Marcos de acrílico de 10 X 20 cm.
Matraz elermeyer aforado, varios tamaños (Pyrex)
Micropipeta de 1-20 μ l (Costar Co., Cambridge, MA)
Micropipeta de 20-100 μ l (Costar)
Micropipeta de 100-1000 μ l (Costar)
Microtubos (Fisher)
Multipipeta de 100 μ l (Hamilton Co., Reno, Nev)
Multipipeta de 200 μ l (Hamilton)
Papel filtro (Watman No.3MM, Whatman, Inc.)
Película para rayos X-OMAT AR (Kodak, USA)
Perlas de vidrio de 5 mm (Corning)
Pinzas (Millipore, Inc., Bedford, MA)
Pipeta de 50 μ l (Hamilton)
Pipetas pasteur 5'' (Intramedic)
Placas de vidrio de 10 X 20 cm
Probetas de vidrio de 1000 ml (Pyrex)
Probetas de vidrio de 500 ml (Pyrex)
Probetas de vidrio de 100 ml (Pyrex)
Puntas para pipetas de 20 μ l con filtro (Robbins)
Puntas p/pipetas de 100 μ l con filtro (Robbins)
Puntas p/pipetas de 1000 μ l con filtro (Robbins)
Puntas para pipetas de 20 μ l (Robbins)
Puntas para pipetas de 100 μ l (Robbins)
Puntas para pipetas de 1000 μ l (Robbins)
Recipientes de plástico (Rubbermaid)
Rectángulos de acrílico de 10 X 20 cm
Sujetadores o broches
Tubos de 2.0 ml (Eppendorf Gerätebau Netheler and Hinz GmbH,
Hamburg, Germany)
Tubos de 0.5 ml (Eppendorf)
Tubos de vidrio con tapón de rosca (Corning)
Tubos de 50 ml (Falcon Labware, Franklin Lakes, NJ)
Tubos de vidrio de 13 x 100 (Pyrex)

APÉNDICE 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

REACTIVOS PARA TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA HLA-ABC Y DR.

Ficoll-Hypaque

Ficoll tipo 400 (Sigma)	9.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml
Hypaque al 50% (Winthrop)	28.0 ml
H ₂ O dest.	13.0 ml
densidad 1.077	

Medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

Reactivo comercial. Seguir las instrucciones del proveedor.

Eosina al 5%

Eosina (Sigma)	1.25 gr
H ₂ O dest. o PBS	25.0 ml

Formalina

A la cantidad deseada de formaldehído al 40% (Merck), se agregan unas gotas de rojo de fenol y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 1N.

Dynabeads (Dynal).

Placas para tipificación HLA AB y DR (Pel Freez)

PBS pH 7.4

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (Merck)	0.157 gr
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Merck)	1.98 gr
NaCl (Merck)	8.1 gr
H ₂ O dest.	1000.0 ml

PBS/EDTA 8.0% a pH 7.4

EDTA (Sigma)	8.0 gr
PBS	100.0 ml

Naranja de acridina/Bromuro de etidio (Solución stock)

Naranja de acridina (Sigma)	15.0 mg
Bromuro de etidio (Sigma)	50.0 mg
Etol. 95% (Merck)	1.0 ml
PBS	49.0 ml

Tinta india

Diluir la tinta india a 2.5% v/v en PBS/EDTA 8.0%

REACTIVOS PARA ESTUDIO ELECTROFORÉTICO**Factor B****Amortiguador de Barbital, pH 8.6**

Barbiturato de sodio (Merck)	70.1 gr
Ac. barbitúrico (Merck)	11.0 gr
Lactato de calcio (Sigma)	4.6 gr
H ₂ O dest.	8.0 l

Agarosa al 1%

Agarosa (Sea-Kem) Maine, USA	1.0 gr
Amortiguador de barbital	100.0 ml

Solución salina al 0.85%

NaCl (Merck)	0.85 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

Solución de azul de Coomassie al 2.5%

Metanol (Merck)	45.0 ml
Ac. acético (Merck)	10.0 ml
Azul de coomassie (Sigma)	2.5 gr
Aforar a 100 ml con H ₂ O dest.	

Solución decolorante

Metanol (Merck)	50.0 ml
Ac. acético (Merck)	20.0 ml
Aforar a 100 ml con H ₂ O dest.	

Hemoglobina hemolizada

Paquete globular	1.0 ml
H ₂ O dest.	0.5 ml
Cloroformo o Tolueno (Merck)	0.25 ml

Anti-Factor B (Atlantic Antibodies)**Factor C4****Buffer de diálisis 10X**

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (Merck)	525.0 gr
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	564.0 gr
EDTA (Sigma)	150.0 gr
H ₂ O dest.	8.0 l

Amortiguador de C4	
Tris (Sigma)	180.8 gr
Glicina (Sigma)	224.8 gr
Barbiturato de sodio (Merck)	52.4 gr
Ac barbitúrico (Merck)	8.28 gr
H ₂ O dest.	8.0 l

EDTA 0.2 M	
EDTA (Sigma)	7.44 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

Agarosa al 0.75%	
Agarosa tipo II Medium EEO (Sea Kem)	0.75 gr
H ₂ O dest.	60.0 ml
Buffer C4	35.0 ml
EDTA 0.2 M	5.0 ml

Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma)

Factor C2

Solución stock de yodo	
Yoduro de potasio (Sigma)	8.3 gr
Yodo (Sigma)	0.25 gr
Buffer de fosfatos 0.5 M pH=6.0	40.0 ml
H ₂ O dest.	100.0 ml

Solución Stock de acrilamida	
Acrilamida (Sigma)	33.35 gr
N-N-metilen bis-acrilamida (Sigma)	0.9 gr
Taurina (Sigma)	16.68 gr
H ₂ O dest.	500.0 ml

Solución para preparar gel de acrilamida	
Acrilamida (sol. stock)	26.5 ml
Anfolina (LKB, pH=5.7)	1.5 ml
Solución de riboflavina	7.0 ml

REACTIVOS PARA ESTUDIO MOLECULAR

Extracción del DNA

AKC (solución de lisis)	
NH ₄ Cl 0.155 M (Sigma)	8.29 gr

K ₂ CO ₃ 0.01M (Sigma)	1.34 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

RCB

NaCl 10 mM (Sigma)	0.5844 gr
Tris-base pH 7.4 10 mM (Sigma)	1.211 gr
EDTA 25 mM (Sigma)	9.3 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
pH 7.4 con HCl 6N	

Buffer Tris-EDTA

Tris-HCl 10 mM (Sigma)	1.576 gr
EDTA 1 mM (Sigma)	0.3222 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
pH 8.0 con NaOH 10 N	

Tris 0.5 M

Tris (Sigma)	60.55 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

NaCl 5 M

NaCl (Sigma)	292.2 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

S.D.S. al 10%

SDS (Sigma)	10.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

PBS

NaCl (Sigma)	15.3 gr
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	7.6 gr
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.125 gr
H ₂ O dest.	2.0 l
pH 7.4 con HCl 6 N	

Proteinasa K (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), concentración final de 10 mg/ml

Fenol (Sigma)

Cloroformo (Sigma)

Etanol (Sigma)

Buffer de lisis

DTAB al 8% en una solución de tri-base 10 mM a pH 8.6, NaCl 1.5 M y EDTA 50mM. (Sigma)

CTAB

CTAB al 5% en una solución de NaCl 0.4 M. (Sigma)

NaCl 1.2 M	
NaCl (Sigma)	70.0 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

Naranja G	
Picoll al 20% (Sigma)	10.0 ml
Tris (Sigma)	2.0 gr
Naranja G (Sigma) suficiente para dar color	

Buffer TAE 50X	
Tris 2 M (Sigma)	121.14 gr
EDTA 100 mM (Sigma)	18.6 gr
Ac. Acético glacial (Sigma)	30.0 ml

Agarosa al 1%	
Agarosa (Sigma)	1.0 gr
Buffer TAE 1X	100.0 ml

Bromuro de etidio 2 µg/ml (Sigma)

Reactivos para PCR

Tris-HCl 1 M pH 8.4	
Tris-HCl (sigma)	15.76 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

KCl 2 M	
KCl (Sigma)	14.91 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

MgCl₂ 1 M	
MgCl ₂ (Sigma)	9.521 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

NP40 al 5%	
NP40 (Sigma)	5.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml

Gelatina 20 mg/ml (Sigma)

Buffer PCR 10X	
Tris-HCl pH 8.4	100.0 mM
KCl	500.0 mM
MgCl ₂	15.0 mM
Gelatina	1.0 mg/ml
NP40	0.2 %
H ₂ O dest. cbp	1.0 l

dNTPs 10X

2 mM de cada uno de los dNTPs. (Stratagene)

Primers DR-β, DQ-β y de alelo específico, izquierdo y derecho, a una concentración final de 5 pmoles/μl (sintetizados en Madrid, España, en México, D.F. o en Stamford, CT, USA)

Primers DR-β, DQ-β y DR-52, izquierdo y derecho, a una concentración 10X 5 μM de cada uno. (lifecodes)

Taq polimerasa (Gibco BRL, Stratagene o Biotecnologías Universitarias).

Reactivos para marcaje de oligonucleótidos

CoCl₂ a una concentración de 25 mM (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)

Digoxigenina (DIG-11-ddUTP) a una concentración de 1 nmol/μl (Boehringer)

Terminal transferasa (Boehringer)

Glicógeno (Boehringer)

EDTA 0.2M pH 8.0

EDTA (Sigma)	74.44 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

LiCl 4M

LiCl (Sigma)	169.66 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

Reactivos para hibridación

Membranas de nylon (Lifecodes)

NaOH 0.5M

NaOH (Sigma)	20.0 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

NaCl 1.5 M

NaCl (Sigma)	87.66 gr
--------------	----------

H ₂ O dest.	1.0 l
Solución de hibridación	
SSPE	6X
Magic Denhardt	5X
Lauril-sarcosina-Na	0.1 %
SDS	0.02 %
SSPE 30X	
NaCl (Sigma)	4.5 M
NaH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.3 M
EDTA (Sigma)	30.0 mM
pH 7.4 con NaOH	
NaCl 4.5M	
NaCl	262.98 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
NaH₂PO₄ 0.3M	
NaH ₂ PO ₄	36.0 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
EDTA 30.0 mM	
EDTA	11.166 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
Magic Denhardt 50X	
Solución A:	
PVP 40	2.0 gr
Ficoll 400	2.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml
Solución B:	
BSA (albúmina sérica bovina)	2.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml
pH a 7.5 con NaOH 2N	
Mezclar bien ambas soluciones.	
Lauril-sarcosina-Na al 10%	
Lauril-sarcosina-Na	10.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 ml
SDS al 10%	
SDS	10.0 gr
H ₂ O dest.	100.0 gr
Solución TMAC	
TMAC	3.0 M
Tris-Base (Sigma) pH 8.0	50.0 mM
EDTA (Sigma)	2.0 mM
SDS	0.1 %

Cloruro de tetrametil amonio (TMAC) 5 M (Sigma)**Tris-Base 1 M pH 8.0**

Tris-Base	121.2 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

EDTA 0.4 M pH 8.0

EDTA	148.88 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

Solución de desnaturalización

NaCl 0.5 M (Sigma)	29.22 gr
NaOH 0.5 M (Sigma)	20.0 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

Solución de enjuague

NaCl 2.5 M (Sigma)	146.1 gr
Tris-Base 0.5 M (Sigma) pH 7.4	60.55 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

Buffer SSC 20X

NaCl 3.0 M	175.3 gr
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ (citrato de sodio) 300 mM	88.2 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
pH 7.0 con NaOH	

Solución de hibridación (Lifecodes)**Solución de TMAC-SDS**

TMAC	3.0 M
SDS	0.1 %

Reactivos para quimioluminiscencia**Buffer 0**

Ac. maléico 0.1 M (Sigma)	11.6 gr
NaCl 0.15 M (Sigma)	8.76 gr
H ₂ O dest.	1.0 l
pH 7.5 con NaOH	

Buffer 1

Preparar una solución de 0.3 % de Tween 20 en buffer 0. (Sigma)

Buffer 2

Solución de bloqueo diluida 1:10 en buffer 0

Solución de bloqueo (Boehringer) al 10% en buffer 0

**Anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina
dilución 1:10,000 en buffer 2**

Buffer 3

Tris-HCl (Sigma)	0.1 M pH 9.5
NaCl (Sigma)	0.1 M
MgCl ₂	50.0 mM

Tris-HCl 1.0 M pH 9.5

Tris-HCl	157.6 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

NaCl 5 M

NaCl (Sigma)	292.2 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

MgCl₂ 1.0 M

MgCl ₂	95.33 gr
H ₂ O dest.	1.0 l

Substrato AMPPD dilución 1:100 en buffer 3. (Boehringer)

Buffer Quick-Light (Lifecodes)

Lumi-Phos (Lifecodes)

APÉNDICE 3

DETALLES TÉCNICOS

Obtención de células mononucleares en gradiente de Ficoll-Hypaque.

- Preparar un tubo Falcon de 50 ml con 15 ml de Ficoll-Hypaque y agregar, sin romper la interfase, 30 ml de sangre desfibrinada diluida 1:1 con RPMI 1640.
- Centrifugar a 2000 rpm/30 min.
- Obtener el anillo de mononucleares de la interfase y transferirlo a un tubo de 13 X 100 mm. Lavar las células mononucleares resuspendiéndolas en medio RPMI 1640 y por centrifugación a 2000 rpm/10 min.
- Decantar el sobrenadante y realizar al botón de células un segundo lavado a 1200 rpm/10 min.
- Decantar y transferir el botón a un tubo Fisher resuspendiendo en 1 ml de RPMI 1640.
- Contar los linfocitos y ajustarlos a 2.5 millones/ml.
- Separar 200 μ l de la suspensión celular para la serología ABC y ocupar el resto para la obtención de linfocitos B.

Obtención de linfocitos B con Lympho-KwikTM.

- Centrifugar la muestra obtenida anteriormente a 1000 g por 1 min. Decantar el sobrenadante.
- Adicionar al botón celular 0.8 ml del reactivo 1 de Lympho-KwikTM. Homogeneizar.
- Incubar a 37°C durante 1 hr. Agitar de vez en cuando el tubo Fisher.
- Completar el volumen hasta 1 ml con RPMI y centrifugar a 2000 g por 2 min.
- Decantar el sobrenadante y adicionar 0.5 ml del reactivo 2 de Lympho-KwikTM. Homogeneizar.
- Centrifugar a 2000 g por 2 min
- Decantar el sobrenadante y lavar el botón celular con RPMI dos veces. Centrifugar a 1000 g durante 1 min.
- Resuspender el botón celular en 100 μ l de RPMI y ajustar las células a 2×10^6 /ml.

Selección positiva de linfocitos B con perlas inmunomagnéticas y selección negativa de linfocitos T.

- Tomar 100 µl de Dynabeads HLA Cell Prep II (anti CD19) y realizar de dos a tres lavados con 5 ml de PBS ayudándose con el magneto Dynal MPC-1. Resuspender en 100 µl de PBS.
- Agregar los Dynabeads a la suspensión celular obtenida a partir de sangre desfibrinada, como se describió previamente, y mezclar mediante rotación e inclinación durante 7-12 min a 2-8°C.
- Absorber las células B unidas a los Dynabeads mediante el magneto y el sobrenadante conteniendo los linfocitos T transferirlo a otro tubo de 13 X 100. Realizar una segunda absorción.
- Concentrar las células T que se encuentran en el sobrenadante y resuspender el botón celular en 100 µl de RPMI 1640 en un tubo Fisher.
- Resuspender las células B unidas a los Dynabeads en 100 µl de RPMI 1640 en un tubo Fisher.
- Ajustar ambas células a 2×10^6 /ml.

Selección positiva de linfocitos T con perlas inmunomagnéticas y selección negativa de linfocitos B.

- Lavar 100 µl de Dynabeads M -450 Pan-T (CD2) 2 a 3 veces con 5 ml PBS y con la ayuda del magneto Dynal MPC-1.
- Resuspender los Dynabeads en 100 µl de PBS. Agregar los Dynabeads a la suspensión celular obtenida como se explicó anteriormente y mezclar mediante rotación e inclinación durante 7-12 min a 2-8°C.
- Absorber los linfocitos T unidos a los Dynabeads con el magneto y transferir el sobrenadante conteniendo los linfocitos B a otro tubo y realizar una segunda absorción.
- Concentrar las células B que se encuentran en el sobrenadante y resuspender el botón celular en 100 µl de RPMI 1640 en un tubo Fisher.
- Resuspender los linfocitos T unidos a los Dynabeads en 100 µl de RPMI 1640 en un tubo Fisher.
- Ajustar ambas poblaciones celulares a 2×10^6 /ml

Tipificación serológica ABC y DR con colorantes vitales.

- Depositar 1 µl de la suspensión de linfocitos T o B en cada pozo de las placas Pel-Freez correspondiente e incubar durante 30 min para HLA-ABC y 60 min para HLA-DR a temperatura ambiente.

- Depositar 5 µl del complemento e incubar a temperatura ambiente 1 hora para ABC y 2 horas para DR.
- Depositar 2 µl de eosina al 5%, esperar 3 min y poner 5 µl de formalina.
- Leer en el microscopio invertido.

Tipificación serológica ABC y DR por inmunofluorescencia.

- Depositar 1 µl de la suspensión correspondiente en cada pozo de las placas Pel-Freez e incubar como anteriormente se explicó en la serología de colorantes vitales.
- Preparar un 1 ml del complemento (ABC y DR) y agregarle 20 µl de solución stock naranja de acridina/bromuro de etidio.
- Adicionar 5 µl del complemento para fluorescencia a cada pozo e incubar durante 90 min.
- Agregar 5 µl de tinta india a cada pozo (placas ABC y DR). Leer en un microscopio de fluorescencia invertido.

Determinación de complotipos.

Factor B.

Preparación de geles: para elaborar los geles de acrilamida de 10 x 20 cms se construye un dispositivo colocando un marco de acrílico entre una placa de vidrio de 10 X 20 cm y un rectángulo de acrílico de las mismas medidas, perfectamente limpios, los cuales se mantienen fijos con pinzas para formar una cámara a la cual se transfieren aproximadamente 25 ml de agarosa al 1% a la cámara y se deja solidificar.

Aplicación de las muestras: Una vez que ha solidificado el gel se quitan los sujetadores, el marco y el rectángulo de acrílico, enseguida se seca la zona del gel, en donde se aplicarán las muestras, con papel filtro dos veces. Se coloca el aplicador de muestras aproximadamente a dos centímetros de la parte inferior del gel. En el primer pozo se colocan 10 µl de hemoglobina hemolizada y en los siguientes pozos se colocan las muestras problema de plasma-EDTA por analizar, se deja transcurrir 10 min, se quita el exceso de muestra con papel filtro y por último se retira el aplicador con cuidado.

Corrida electroforética: La base en donde se coloca la placa de gel debe tener una temperatura entre 6 y 10°C la cual es mantenida durante la corrida electroforética mediante agua fría circulante. El contacto entre el amortiguador y el gel se efectúa a través de 5 hojas de papel filtro del mismo ancho que el gel (10 X 20 cm), tanto en la parte superior como inferior y la distancia entre ambas es de 6.5 cm. Por

último se cubre con un vidrio la superficie del gel sin tocarlo para evitar su desecamiento. El voltaje que se aplica al gel es de 350V durante 3 hrs, aproximadamente el tiempo que tarda la hemoglobina en alcanzar el papel filtro superior.

Inmunoprecipitación: Las bandas del factor B van a emigrar menos que la hemoglobina (aproximadamente de 1 a 2 cm menos) y en esta zona se aplican 400 μ l de anti-Factor B humano. Se deja incubar una hora en una cámara húmeda, se lava el gel con agua destilada y posteriormente se seca con papel filtro y se deja toda la noche con solución salina. Al día siguiente se lava el gel con agua destilada, 20 min, y se deja secar. Una vez que está completamente seco el gel se tiñe con azul de Coomassie y se elimina el exceso de colorante con solución decolorante.

Factor C4.

Para la determinación de C4 es necesario quitar el ácido siálico a las muestras que se van a estudiar, para ello se colocan 10 μ l de la muestra con 2 μ l de neuraminidasa en un sistema de diálisis continua durante 18 hrs a 4°C usando el buffer de diálisis.

El procedimiento electroforético es similar al efectuado para determinar las variantes del factor B excepto que: la distancia entre las dos mechas de papel filtro es de 10.5 cm, la corrida electroforética se efectúa a 300V durante 4 horas y para la inmunoprecipitación se usan 0.5 ml de anticuerpo anti C4.

Factor C2.

Para la elaboración del gel de acrilamida se construye una cámara colocando un marco de acrílico en forma de U entre una placa de vidrio de 20.5 x 15 cm y un rectángulo de acrílico de la misma medida los cuales se mantienen fijos con pinzas. A la cámara se transfieren aproximadamente 25 ml de la solución de acrilamida, se deja solidificar y se polimeriza durante 1 hora bajo una lámpara de luz fluorescente.

Después de la polimerización se quitan las pinzas, el rectángulo de acrílico y el marco, se seca con papel filtro el área del gel donde se aplicarán las muestras, se coloca el aplicador de muestras y se depositan 20 μ l de plasma EDTA de cada muestra por analizar sobre el gel, se dejan transcurrir 10 min, se quita el exceso de muestra con papel filtro y se retira el aplicador con cuidado. Enseguida se acomoda el gel en posición invertida sobre un aparato para isoelectroenfoque a 4°C (cuarto frío). La fuente de poder estará a 1.5

watts/gel, 1000 de voltaje máximo y 6 mA/gel durante 18 horas.

Después de transcurrido este tiempo el gel se transfiere a 25 ml de solución stock de yodo diluido en 500 ml de solución salina por 30 min a temperatura ambiente, después de lo cual se coloca otros 30 min en amortiguador de barbital-salina pH 7.2. A continuación se pone un marco alrededor del gel y encima el rectángulo de acrílico para formar una cámara de aproximadamente de 1 mm, la cual se llena con una solución que contiene:

7.5 ml de agarosa al 2%

7.5 ml de solución diluyente de fijación del complemento (el cual es un buffer de veronal pH 7.2 con concentraciones máximas de magnesio y calcio)

0.75 ml de eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo anticarnero de conejo al 10%.

0.2 ml de suero humano deficiente en C2 (suero normal a 50°C, durante 20 min).

En esta solución el gel se incuba 1 hr a 4°C y posteriormente durante 2-4 horas a 37°C hasta que aparezcan las bandas de lisis. Después de esto se pasa el gel a un recipiente limpio, se lava en 300 ml de PBS y 3 ml de glutaraldehído, se enjuaga durante 30 min, y por último se deja secar a temperatura ambiente.

La lisis los eritrocitos de carnero sensibilizados mantenidos en presencia de complemento carente de C2 sólo ocurre en los sitios donde C2 ha migrado electroforéticamente.

Extracción del DNA a partir de 300 µl de sangre total.

1. Incubar 300 µl de sangre (paquete globular) con 600 µl de buffer de lisis en un tubo Eppendorf de 2.0 ml a 68°C por 5 min.
2. Añadir 900 µl de cloroformo, agitar 2 min y centrifugar a 14,000 rpm por 5 min.
3. Extraer la fase superior (con una puntilla de plástico) y pasarla a otro tubo Eppendorf, añadir 900 µl de agua destilada mas 100 µl de solución CTAB, mezclar suavemente por inmersión a 2 min y centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. En esta etapa el DNA se precipita y se recupera en forma de pastilla. Decantar el sobrenadante.
4. Resuspender la pastilla en 300 µl de NaCl 1.2 M y añadir 750 µl de etanol frío, agitar suavemente y centrifugar por 10 min a 14,000 rpm. Decantar el sobrenadante procurando no perder el paquete.
5. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm por 5 min. Decantar el sobrenadante.
6. Secar la pastilla en un desecador o en una centrifuga de vacío y resuspender en 50 µl de TE para hidratar.

Extracción del DNA a partir de 20 ml de sangre total.

1. Colocar 20 ml de sangre anticoagulada con EDTA en un tubo Falcon de 50 ml, llevar a un volumen final de 50 ml con PBS.
2. Centrifugar a 2,000 rpm / 10 min.
3. Eliminar el sobrenadante y al paquete se le agrega la solución de AKC a un volumen final de 50 ml, agitar e incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 1,500 rpm / 10 min.
5. Eliminar el sobrenadante. Agregar la solución de PBS a un volumen final de 50 ml, centrifugar a 1,500 rpm / 5 min.
6. Eliminar el sobrenadante, agregar la solución de AKC hasta un volumen final de 50 ml y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min.
7. Descartar el sobrenadante, agregar la solución de PBS a un volumen final de 50 ml y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min.
8. Eliminar el sobrenadante y agregar 3 ml de RCB, 100 µl de proteinasa K y 300 µl de SDS al 10%, mezclar perfectamente bien e incubar toda la noche en baño maría a 65 -70°C.
9. Al día siguiente saturar el fenol con Tris-Base 0.5 M pH 8.0 volumen a volumen y se deja reposar la mezcla unos 15 min.
10. Sacar el tubo Falcon del baño maría y agregarle 3 ml de fenol saturado, mezclar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min.
11. Eliminar la fase orgánica, agregar nuevamente 3 ml de fenol saturado y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min.
12. Eliminar la fase orgánica, agregar 2 ml de buffer Tris-EDTA y 5 ml de cloroformo, mezclar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min.
13. Eliminar la fase orgánica y adicionar nuevamente 5 ml de cloroformo. Mezclar y centrifugar a 1,500 rpm / 5 min. Repetir este paso hasta que la fase acuosa quede cristalina.
14. Adicionar a la fase acuosa la décima parte del volumen final de NaCl 5 M. Mezclar y agregar etanol absoluto en una relación 1:4. En este paso se precipita el DNA.
15. Sacar el DNA con la ayuda de una pipeta y colocarlo en un tubo Eppendorf de 2.0 ml.
16. Lavar el DNA con etanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
17. Secar el DNA en una centrifuga de vacío e hidratarlo con 200 µl de Tris-EDTA.

Amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Región DR-β, DQ-β y DR-52. Protocolo de Lifecodes Corporation.

Por cada muestra se prepara la siguiente mezcla de reacción en un tubo Eppendorf de 0.5 ml:

Buffer PCR	10	μl
Primer derecho	10	μl
Primer izquierdo	10	μl
dNTPs	10	μl
Taq polimerasa	2.5	U.
DNA	1.0	μg

La concentración final es: 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs (0.05 mM de cada dNTP) y 0.5 μM de cada primer a un volumen final de 100 μl.

A cada tubo se le agrega 2 gotas de aceite mineral y se colocan en el termociclador con las siguientes condiciones

Desnaturalización inicial	30 seg a 95°C	1 ciclo
Desnaturalización	1 min a 95°C	30 ciclos
Reasociación	1 min a 60°C	30 ciclos
Extensión	1 min a 72°C	30 ciclos
Extensión final	10 min a 72°C	1 ciclo

Electroforesis del DNA amplificado.

La comprobación del DNA amplificado se realiza en un gel de agarosa al 1%, para ello en cada pozo se coloca 5 μl de la muestra y 7 μl del colorante Naranja G. En otro pozo se pone 1 μl del marcador de peso molecular conocido con 7 μl del colorante. La electroforesis se realiza a 75 volts durante 30 min. Transcurrido este tiempo el gel es observado en un transiluminador UV en donde las bandas se comparan con el marcador de peso molecular conocido.

Dot blot (Transferencia en punto).

1. Cuadricular la membrana de nylon en cuadros de 1 cm².
2. Depositar 2 μl del DNA amplificado en un cuadro para cada muestra.
3. Dejar secar la membrana durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Hornear la membrana a 80°C durante 1 hora o exponerla al crosslinker UV a 120,000 microjoules durante 25 seg.
5. Colocar la membrana en un recipiente limpio, de preferencia de la marca Rubhermaid, y cubrirla con la

- solución de desnaturalización. Agitar a temperatura ambiente durante 15 min.
6. Desechar la solución de desnaturalización y cubrir la membrana con solución de enjuague. Agitar a temperatura ambiente durante 15 min.
 7. Eliminar la solución de enjuague y cubrir la membrana con una solución de SSC 2X. Agitar a temperatura ambiente durante 5-10 min.
 8. Eliminar la solución de SSC 2X y colocar las membranas de nylon sobre un papel filtro limpio. Dejar secar durante 15 min.

Hibridación y Quimioluminiscencia.

1. Colocar la membrana en un recipiente limpio y adecuado al tamaño de ella. Adicionar 20 ml de SSC 2X y agitar a temperatura ambiente durante 5 min.
2. Preparar 25 μ l de la sonda con 25 ml de la solución de hibridación precalentada a 45°C.
3. Eliminar la solución de SSC 2X y agregar la sonda. Incubar en un baño maría con agitación durante 30 min a 45°C.
4. Tirar la sonda y agregar 100 ml de SSC 2X y agitar durante unos minutos a temperatura ambiente.
5. Desechar la solución y agregar 100 ml de la solución de TMAC. Incubar con agitación a 60°C durante 20 min.
6. Desechar la solución de TMAC y adicionar 100 ml de SSC 2X. Agitar unos minutos y desechar la solución.
7. Cubrir las membranas con buffer Quick-Light 1X y agitar a temperatura ambiente durante 1 min. Realizar este paso tres veces.
8. Colocar las membranas hibridadas en un folder y rociarlas con Lumi-Phos. Sellar el folder.
9. Colocar el folder en un chasis con una película para rayos X y exponerla a la quimioluminiscencia de 30 min a 2 horas a 37°C. El tiempo de incubación varía dependiendo de la sonda trabajada.
10. Deshibridar en caso de que se pretenda rehibridar las membranas con otra sonda. Colocar las membranas en un recipiente limpio y cubrirlas con una solución de SSC 2X y SDS al 0.1%. Incubar con agitación a 65°C durante 60 min.

Amplificación del DNA por PCR usando primers sintetizados en España o en México.

Preparar la siguiente mezcla de reacción por cada muestra en un tubo Eppendorf de 0.5 ml:

Buffer PCR	5 μ l
Primer derecho	5 μ l
Primer izquierdo	5 μ l
dNTPs	5 μ l
Taq polimerasa	1.25 U.
DNA	0.5 μ g

La concentración final es: 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.4, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 25 pmoles de cada uno de los primers a un volumen final de 50 μ l.

A cada tubo se le agrega 2 gotas de aceite mineral y se colocan en el termociclador con las siguientes condiciones

Desnaturalización	1 min a 94°C	30 ciclos
Reasociación	1 min a 60°C	30 ciclos
Extensión	1.5 min a 72°C	30 ciclos
Extensión final	7 min a 72°C	1 ciclo

Electroforesis del DNA amplificado.

La comprobación de la amplificación del DNA se realiza de la misma forma que en el protocolo de Lifecodes.

Dot blot.

1. Cortar una membrana de nylon de 5 cm X 5 cm. Se cuadrícula para que cada cuadro mida 1 cm².
2. Humedecer la membrana en H₂O destilada. Colocarla en una solución de SSPE 10X durante 15 min a temperatura ambiente. Secar la membrana a 60°C.
3. Depositar 2 μ l del DNA amplificado en un cuadro para cada muestra. Dejar secar a temperatura ambiente.
4. Colocar la membrana 30 seg en el transiluminador UV. Hornearla a 80°C durante 15 min.
5. Desnaturalizar el DNA la membrana colocándola en una solución de NaOH 0.5 M/NaCl 1.5 M durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Colocar la membrana en una solución de NaCl 1.5 M/Tris-Base 0.5 M pH 7.4 durante 1 min.
7. Hornear a 80°C durante 10 min y colocarla en el transiluminador UV por 3 min.

Marcaje de oligonucleótidos.

1. Colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml la mezcla de reacción que contiene: 4 μ l de buffer Tailing 5X, 4 μ l de CoCl₂ 25 mM, 95 pmoles de oligonucleótido que se desee marcar, 1 μ l de ddUTP-Dig 1 mmol/ μ l y 37.5 unidades de terminal transferasa.

2. Incubar la mezcla a 37°C durante 30 min y después colocar el tubo en hielo.
3. Mezclar en un tubo Eppendorf 1 µl de glicógeno con 200 µl de EDTA-Na₂ 0.2 M pH 8.0. Añadir 2 µl de esta solución a la mezcla de reacción anterior.
4. Precipitar el oligonucleótido marcado con 2.5 µl de LiCl 4 M mas 85 µl de etanol absoluto a -20°C. Mezclar y el tubo colocarlo a -80°C durante 15 min. Colocar el tubo después a -20°C por 2 hrs.
5. Centrifugar a 12,000 x g durante 20 min a 4°C, eliminar el sobrenadante. Lavar el oligonucleótido con 60 µl de etanol al 70%, centrifugar a 12,000 x g durante 10 min a 4°C.
6. Eliminar el sobrenadante y secar el oligonucleótido. Resuspenderlo en 20 ml de solución de hibridación.

Hibridación y Quimioluminiscencia.

1. Colocar la membrana en un recipiente limpio. Prehibridar con solución de hibridación durante 30 min a 42°C.
2. Desechar la solución y añadir el oligonucleótido marcado. Incubar a 42°C durante toda la noche en un baño maría con agitación suave.
3. Lavar la membrana con 100 ml de la solución SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente durante unos minutos. Desechar esta solución.
4. Lavar la membrana 2 veces con 100 ml de la solución de TMAC a 59°C por 15 min. Eliminar la solución.
5. Cubrir la membrana con el buffer 1 durante 5 min en agitación a temperatura ambiente. Desechar la solución.
6. Agregar el buffer 2 y agitarla por 30 min a temperatura ambiente. Desechar la solución.
7. Incubar con 25 ml del anticuerpo antidigoxigenina-AP durante 30 min a temperatura ambiente en agitación suave.
8. Lavar dos veces con 100 ml del buffer 1 durante 15 min a temperatura ambiente en agitación. Eliminar la solución.
9. Cubrir la membrana con el buffer 3 en agitación suave por 5 min a temperatura ambiente.
10. Incubar con el AMPPD por 5 min a temperatura ambiente con agitación suave. Retirar el substrato.
11. Incubar a 37°C durante 15 min. Colocar la membrana en un folder sellado, transferirla junto con una película de rayos X a un chasis e incubar a temperatura ambiente durante 5 a 60 min dependiendo de la sonda utilizada.
12. Para deshibridar la membrana colocar ésta en un recipiente limpio, adicionar NaOH 0.4 M y agitar suavemente durante 20 min a 42°C. Eliminar la solución.
13. Cubrir la membrana con una solución Tris-HCl 0.2 M pH 8.0, SSPE 0.1X y SDS 0.1% e incubar 20 min a 42°C con agitación suave.

APÉNDICE 4

ABREVIATURAS

AKC: cloruro de amonio-carbonato de potasio

AMPPD: 3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)
fenil-1,2-dioxietano, sal disódica

CTAB: bromuro de hexadecil-trimetil-amonio

dNTPs: desoxinucleótidos

EDTA: ácido etilendiamino tetracético

NP40: Nonidet P40

PBS: amortiguador de fosfato salino

PVP 40: polivinilpirrolidona

RFLP: polimorfismo en la longitud de fragmento de restricción

RCB: amortiguador salino tris-EDTA

SDS: sulfato dodecil de sodio

SSC: amortiguador de cloruro de sodio y citrato de sodio

SSPE: solución salina fosfato-EDTA

TAE: amortiguador Tris-Acetato-EDTA

TMAC: cloruro de tetrametilamonio

BIBLIOGRAFÍA

- Abaza H., Hilal G., Asser L., Abdo A. & El-Sawy M. (1988). Histocompatibility and immunological studies in giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 437.
- Anderson M., Paabo S., & Nilsson T (1985). Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* 43, 215-222.
- Alper C.A., Kruskall M.S. & Marcus-Bagley D. (1989). Genetic prediction of non response to hepatitis B vaccine. *New Engl. J. Med.* 321, 708-712.
- Alvarez-Alva R., De la Loza-Saldivar A. (1971). Frecuencia de absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social de la República Mexicana. *Arch. Invest. Méd.* 2, (supl 1), 327.
- Arellano J., Granados J., Pérez E., Félix C. & Kretschmer R (1991). Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo patients with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunology* 13, 23-29.
- Arenzana-Seisdedos F., Mogensen S.C., & Vuillier F. (1988). Autocrine secretion of tumor necrosis factor under the influence of interferon-gamma amplifies HLA-DR gene induction in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6087-6091.
- Balboni A., Divetti-Pezzi P., Orlando P. *et al.* (1992). Serological and molecular HLA typing in Italian Bechcet's patients: significant association to B51-DR5-DQw3 haplotype. *Tissue Antigens* 39, 141-143.
- Basile J., Klein S. & Worthen N. (1983). Amebic liver abscess. The surgeon's role in management. *Am. J. Surg.* 146, 67-70.
- Batchelor J.R. & McMichael A.J. (1987). Progress in understanding HLA and disease associations. *Brit. Med. Bull.* 43, 156-183.

- Bjorkman P.J., Saper M.A. & Samraoui B. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Blackwell J.M. & Roberts M.B. (1987). Immunomodulation of murine visceral leishmaniasis by administration of monoclonal anti-Ia antibodies: differential effects of anti-I-A vs anti-I-E antibodies. *Eur. J. Immunol.* 17, 1669-1672.
- Blackwell J.M., Roberts C.W. & Alexander J. (1993). Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice. *Parasite Immunol.* 15, 317-324.
- Blackwelder W.C., Mittal K.K., Mc. Namara P.M. et al. (1982). Lack of association between HLA and age in an aging population. *Tissue Antigens* 20, 118-192.
- Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Dupont B., Erlich H.A., Mach B., Mayo W.R., Parham P. & Sasazuki T. (1994). Nomenclature for factors of the HLA system 1994. *Hum. Immunol.* 41, 1-20.
- Braga L.L., Ninomiya H., McCoy J.J., Adal K., Wiedmer T., Pham C., Sims P.J. & Petri Jr. W.A. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23, 133.
- Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Stern L.J., Urban R.G., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Campbell R. D. (1987). The molecular genetics and polymorphism of C2 and factor B. *Brit. Med. Bull.* 43, 37-49.
- Campbell R.D. & Trowsdale J. (1993). Map of the human MHC. *Immunol. Today* 14, 349-352.
- Carroll M.C. & Alper C.A. (1987). Polymorphism and molecular genetics of human C4. *Brit. Med. Bull.* 43, 50-65.
- Cicciarella J.C., Perdue S. & Terasaki P.I. (1982). HLA DR3 associated with improved kidney transplant survival. *Transplantation Proceedings* 14, 309-310.
- Clark C.G. & Diamond L.S. (1992). Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch. Med. Res.* 23, 15-16.

- Cooper D.N. (1994). Mapping the human genome. *Ann. Génét.* 37:3, 101-116.
- Chadee K., Johnson M.L., Orozco E., Petri W.A. & Ravdin J.I. (1988). Binding and internalization of rat colonic mucins by the galactose/N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 158:2, 398-406.
- Chia D., Terasaki P., Chan H., Tonai R. & Siau P-A. (1993). Direct detection of PCR products for HLA class II typing. *Tissue Antigens* 42, 146-149.
- Chien Y. & Davis M.M. (1993). How $\alpha\beta$ T-cell receptors "see" peptide/MHC complexes. *Immunol. Today* 14, 597-602.
- Daar A.S., Fuggle S.V. & Fabre J.W. (1984). The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 38, 293-298.
- Del Brutto O. R., Granados G., Talamas O. et al. (1991). Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, C, DR and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Human Biology* 63, 85-93.
- De Tolla L.J., Scott P. A. & Farrell J.P. (1981). Single gene control of resistance to cutaneous leishmaniasis in mice. *Immunogenetics*, 14, 29-32.
- De-Vries R.R.P. (1994). HLA and disease: past, present and future. *Neth. J. Med.* 45, 302-308.
- Diamond L.S. & Clark C.G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911). separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* 40, 340-344.
- Dieye A., Sarthou J.L., Balde-Toure A., Aribot G., Roussillon C., Rogier C., Trape J.F. & Heidrich H.G. (1993). Analysis of the antibody response to merozoite antigens in a malaria holoendemic area. *Dakar. Med.* 38, 169-174. Abstract.
- Duquesnoy R.J. (1991). Immunogenetics of the human major histocompatibility complex. *Clin. Lab. Med.* 11, 509-536.
- Dyer P.A. & Martin S. (1991). Techniques used to define human MHC antigens: serology. *Immunol. Lett.* 29, 15-22.

Eberle M. & Baxter-Lowe L.A. (1992). A silent mutation in HLA-DRB1*0301 can affect oligotyping. *Tissue Antigens* 40, 150-152.

Fielder A.H.L., Walport M. J., Batchelor J. R. *et al.* (1983). Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Brit. Med. J.* 186, 425-428.

Ghadirian E. & Kongshavn P. A. L. (1984). Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica*. *Parasite Immunology* 6, 349-360.

Gitler C., Mogyoros M., Calef E. & Rosenberg I. (1985). Lethal recognition between *Entamoeba histolytica* and the host tissues. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 581-586.

Gómez-Alcalá A., Soto B., Rivera J. y González E. (1995). Tratamiento del absceso hepático amibiano en niños. Revisión de 20 casos. *Rev. Med. IMSS* 33, 67-72.

González-Galnares M., García-Pérez M., Guicafre-Gallardo H. y Muñoz O. (1986). Comunicación de un brote de amibiasis invasora en niños de un campamento de damnificados por el volcán Chichonal. *Arch. Invest. Méd.* 17, 365-368.

Gottstein B. & Bettens F. (1994). Association between HLA-DR13 and susceptibility to alveolar echinococcosis. *J. Infect. Dis.* 169, 1416-1417.

Green A. (1982). The epidemiologic approach to studies of association between HLA and disease. *Tissue Antigens* 19, 245-258.

Gutiérrez G., Sánchez-Rebolledo J. & Sánchez R. (1970). Influencia de la edad en las características del absceso hepático en el niño. *Gac. Méd. Mex.* 100, 145-148.

Gutiérrez G. (1986). Epidemiología y control de la amibiasis en México. *Arch. Invest. Méd.* 17, 375-383.

Gutiérrez G. (1987). Investigaciones mexicanas sobre vacunas. Amibiasis. *Epidemiología (Méx.)*, 2, 125-133.

Haque R., Neville L.M., Wood S. & Petri W.A. (1994). Short report: Detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* directly in stool. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50, 505-506.

- Hawkins B.R. (1981). Table of critical chi-square values for investigations involving multiple comparisons. *Tissue Antigens* 17, 243-244.
- Heard R. (1994). HLA and autoimmune disease. In *HLA and Disease*, R. Lechler, p. 123-152, Academic Press.
- Heinzel F.P., Sadick M.D., Holaday B.J. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma and IL4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence of expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, 169, 59-72.
- Hill A.V.S., Allsopp C. E. M., Kwiatkowski D. et al. (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352, 595-600.
- Hill A.V.S., Elvin J., Willis A.C., Aidoo M., Allsopp C.E.M., Gotch F.M., Gao X. M., Takiguchi M., Greenwood B.M., Townsend A.R.M., McMichael A.J. & Whittle H.C. (1992). Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360, 434-439.
- Howard J.G., Hale C. & Chan-Liew W.L. (1980). Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. I. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol.* 2, 303-306.
- Howard J. G.(1986). Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis. *International Review of Experimental Pathology* 28, 79-116.
- Jiménez-Cardoso E. y Kumate J. (1982). Correlación clínica de zimodemos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inves. Méd.* 13 (supl. 3), 77-80.
- Juan M., Gayá A. y Vives J. (1992). Avances en la genotipificación de los antígenos HLA (Yokohama, 1991). *Inmunología* 11, 44-50.
- Jordan F., McWhinnie A.J., Turner S., Gavira N., Calvert A.A., Cleaver S.A., Holman R.H., Goldman J.M. & Madrigal J.A. (1995). Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 45, 103-110.
- Kauffmann S. H. E. (1994). Bacterial and protozoan infections in genetically disrupted mice. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 518-525.

- Kennedy M.W., Wasson D.L., McIntosh A.E. & Thomas J.C. (1991). H-2 (I-A) control of the antibody repertoire to secreted antigens of *Trichinella spiralis* in infection and its relevance to resistance and susceptibility. *Immunol.* 73, 36-43.
- Klein J., Takahata N. & Ayala F.J. (1993). MHC polymorphism and human origins. *Scientific American* 269, 46-51.
- Kretschmer R. R. (1986). Immunology of amebiasis. In *Amebiasis*, de A. Martinez-Palomo, p. 95-167, Elsevier, Amsterdam.
- Kretschmer R. (1990). *Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lechler R. (1994). Mechanisms of HLA and disease associations. In *HLA and Disease*, R. Lechler, p. 83-92, Academic Press.
- Madden D.R., Gorga J.C., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353, 321-325.
- Madden D.R., Garboczi D.N. & Wiley D.C. (1993). The antigenic identity of peptide-MHC complexes: A comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75, 693-708.
- Madden K.B., Murrell K.D. & Lunney J.K. (1990). *Trichinella spiralis*: Major Histocompatibility Complex-Associated Elimination of Encysted Muscle Larvae in Swine. *Exp. Parasitol.* 70, 443-451.
- Mantovani M.P., Guandalini S., Cosentini E., Romano R., Giglio Y. & Martino L. (1990). ABO blood-group distribution and HLA typing in children with giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 380-381.
- Martínez M., Valdéz E., Gómez A., Arellano J., Kretschmer R. & Pérez-Rodríguez M. (1996). Comunicación Personal.
- Martínez-Palomo A. (1987). Las amibas, enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. 47-51.
- Matthews D.E. & Farewell V. (1985). *Using and understanding medical statistics*. S. Karger, New York, 39-57.
- Mendis K.N., David P.H. & Carter R. (1990). Human immune responses against sexual stages of malaria parasites:

considerations for malaria vaccines. *Inter. J. Parasit.* 20, 497-502.

Mercier B., Al Daccak R., Samaan A., David F., Carta A., Cracco P., Raquenes O., Dufosse E., Ferec C., Charron D. & Loiseau P. (1994). HLA-DRB and -DBQ typing by PCR amplification using sequence-specific primers (PCR-SSP): assessment after 1 year of routine use by three laboratories. *Eur. J. Immunogenetics* 21, 105-123.

Meza I. (1992). *Entamoeba histolytica*: Phylogenetic considerations. A review. *Arch. Med. Res.* 23, 1-5.

Mickelson E., Smith A., McKinney S., Anderson G. & Hansen J.A. (1993). A comparative study of HLA-DRB1 typing by standard serology and hybridization of non-radioactive sequence-specific oligonucleotide probes to PCR-amplified DNA. *Tissue Antigens* 41, 86-93.

Mirelman D., Bracha R., Wexler A. & Chayen A. (1986). Alteration of isoenzyme patterns of a cloned culture of non pathogenic *Entamoeba histolytica* upon changes in growth conditions. *Arch. Invest. Méd.* 17, 187-193.

Mirelman D., Keren Z. & Bracha R. (1992). Cloning and partial characterization of an antigen detected on membrane surfaces of non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23, 49-53.

Monaco J.J. (1993). Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 17-20.

Muñoz O. (1990). Clinical spectrum of amebiasis in children. In: *Amebiasis: Infection and Disease by Entamoeba histolytica*, ed. R.R. Kretschmer, p. 216-220, CRC-Press, Boca Raton, Florida.

Mytilineos J., Sherer S. & Dunckley H. (1993). DNA HLA-DR typing results of 4000 kidney transplants. *Transplantation* 55, 778-781.

Nagy M., Mayr W.R. & Menzel G.R. (1991). HLA-DR: serology versus restriction fragment length polymorphism. *Vox. Sang.* 61, 59-61.

Olerup & Zetterquist. (1993). HLA-DR Typing by polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP). In: *Handbook of HLA typing techniques*. Hui K.M. p. 149-173, CRC Press.

Plant J.E., Blackwell J.M., O'Brien A.D., Bradley D.J. & Glynn A.A. (1982). Are the disease resistance genes *Lsh* and *Ity* at one locus on mouse chromosome 1. *Nature* 297, 510-515.

Pérez-Montfort R. & Kretschmer R. (1990). Immunology of amebiasis. Humoral immune responses. In: Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*, ed. R.R. Kretschmer, p. 91-103, CRC-Press, Boca Raton, Florida.

Petri Jr. W.A., Clark C.G. & Diamond L.S. (1994). Host-Parasite relationships in amebiasis: Conference report. *J. Infect. Dis.* 169, 483-484.

Pickering L.K., Evans D.J. & Muñoz O. (1978). Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and México. *J. Pediatr.* 93, 283-286.

Pond L., Wassom D. L. & Hayes C. E. (1988). Disparate humoral responses to *Trichinella spiralis* infection in resistant and susceptible mice. *FASEB Journal* 2, A677.

Powell M.R. & Wassom D.L. (1993). Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. *Parasite Immunol.* 15, 215-221.

Proust J., Moulias R., Fumeron F., Bekkhoucha F., Busson M., Schmid M. & Hors J. (1982). HLA and longevity. *Tissue Antigens* 19, 168-173.

Ramos-Martínez E., Martínez-Madrigal F., Velásco-Áviles F., Flores-Barroeta F. y Aguirre-García J. (1986). Amibiasis: estudio comparativo de dos grupos de 5,000 necropsias del Hospital General "Dr. Bernardo Sepúlveda G." del Centro Médico Nacional. *Arch. Invest. Méd.* 17, 351-357.

Ravdin J.I. (1995). State-of-the-art clinical article. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1453-1466.

Reed S.L., Eruber J.A. & Herdman D.S. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *E. histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155, 266-274.

Reveille J.D., Moulds J.M. & Arnett F.C. (1995). Major histocompatibility complex class II and C4 alleles in Mexican Americans with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 45, 91-97.

Rustgi A.K. & Richter J.M. (1989). Pyogenic and amebic liver abscess. *Med. Clin. of North Am.* 73, 847-858.

Sargeant P.G. (1992). A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahé, The Seychelles. Arch. Med. Res. 23, 265-267.

Skamene E. & Pietrangeli C. (1991). Genetic of the immune response to infectious pathogens. Curr. Opin. Immunol. 3, 511-517.

So A. (1994 a). Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. In HLA and Disease, R. Lechler, p. 1-34, Academic Press.

So A. (1994) (b). Structure and assembly of class I and class II molecules. In HLA and Disease, R. Lechler, p. 35-47, Academic Press.

Spies T., Blanck G., Bresnahan M. (1989). A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. Science 243, 214-217.

Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide Nature 368, 215-221.

Svejgaard A., Platz P. & Ryder L.P. (1983). HLA and disease 1982- A survey. Immunol. Rev. 70, 193-218.

Svejgaard A. & Ryder L. P. (1994). HLA and disease associations: Detecting the strongest association. Tissue Antigens 43, 10-27.

Talamás-Rohana P., Rosales-Encina J.L., Gutiérrez M.C. & Hernández V.I. (1992). Identification and partial purification of an *Entamoeba histolytica* membrane protein that binds fibronectin. Arch. Med. Res. 23, 119-123.

Talamás-Rohana P., Schlie-Guzman M.A., Hernández-Ramírez V.I. (1995). T cell suppression and selective *in vivo* activation of Th2 subpopulation by the *E. histolytica* 220 kilodalton lectin. Infect. and Immunity 63, 3953-3958.

Thorsby E. (1995). HLA-associated disease susceptibility-Which genes are primarily involved?. Immunologist 3, 51-58.

Todd J. A., Bell J. I & Mc Devitt H. O. (1987). HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 329, 599-604.

Tortora G.J. & Anagnostakos N.P. (1977). Introducción al cuerpo humano. En Principios de Anatomía y Fisiología. p. 2-12, Harla, TEC-CIEN.

Treviño-García Manzo N. (1990). Clinical spectrum of amebiasis in adults. In: Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*, ed. R.R. Kretschmer, p. 191-208, CRC-Press, Boca Raton, Florida.

Vargas-Alarcón G. y Granados J. (1993). El sistema principal de histocompatibilidad. Rev. Mex. Reumat. 8, 251-256.

Vázquez-Prado J. & Meza I. (1992). Fibronectin "receptor" in *Entamoeba histolytica*: purification and association with the cytoskeleton. Arch. Med. Res. 23, 125-128.

Venkatesan P., Finch R.G. & Wakelin D. (1993). MHC haplotype influences primary *Giardia muris* infections in H-2 congenic strains of mice. Inter. J. Parasit. 23, 661-664.

Wakelin D. (1980). Genetic control of immunity to parasites. Infection with *Trichinella spiralis* in inbred and congenic mice showing rapid and slow responses to infection. Parasite Immunol. 2, 85-98.

Wakelin D. & Donachie A.M. (1980). Genetic control of immunity to parasites: adoptive transfer of immunity between inbred strains of mice characterized by rapid and slow immune expulsion of *Trichinella spiralis*. Parasite Immunol. 2, 249-260.

Wakelin D. & Donachie A.M. (1983). Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis*: influence of H-2-linked genes on immunity to the intestinal phase of infection. Immunol. 48, 343-350.

Wakelin D., Goyal P.K., Dehlawi M.S. & Hermanek J. (1994). Immune responses to *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* in mice. Immunol. 81, 475-479.

Walsh J.A. (1986). Amebiasis in the world. Arch. Invest. Méd. 17, 385-389.

Wang W., Keller K. & Chadee K. (1994). *E. histolytica* modulates NO synthetase gene and NO production by macrophages for cytotoxicity against amoeba and tumor cells. Immunol. 83, 601-610.

Wassom D.L. & Kelly E.A.B. (1990). The role of the major histocompatibility complex in resistance to parasite infections. *Immunolgy* 10, 31-52.

Webb G.C. & Chaplin D.D. (1990). Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J. Immunol.* 145, 1278-1285.

Weiss W.R., Good M.F., Hollingdale M.R., Miller L.H. & Berzofsky J.A. (1989). Genetic control of immunity to *Plasmodium yoelli* sporozoites. *J. Immunol.* 143, 4263-4266.

Wilson A.G., di Giovine F.S. & Blakemore A.I.F. (1992). Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor (TNF α) gene detectable by *Nco*I restriction of PCR product. *Hum. Mol. Genet.* 1, 353-360.