

12  
2ef.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**TUBERCULOSIS PULMONAR Y  
SUSCEPTIBILIDAD GENETICA  
LIGADA A HLA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
**CLAUDIA CELIA CUERVO ESPINOSA**

Directores de Tesis:  
QFB. ANGEL E. CAMARENA OLVERA  
BIOL. MA. ARMIDA JUAREZ CISNEROS  
Asesor: Dr. en C. VICTOR M. ZENDEJAS BUTRON

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



INSTITUTO NACIONAL  
DE ESTADÍSTICA Y  
CENSA DE  
MEXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Tuberculosis Pulmonar y Susceptibilidad Genética

ligada a HbA

que presenta la pasante: Claudia Celia Cuervo Espinosa  
con número de cuenta: 8729939-3 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli. Edo. de Méx., a 26 de Septiembre de 1997

PRESIDENTE Dra. Gilda Flores Rosales

VOCAL Dr. Marco Antonio Vega López

SECRETARIO M.en C. Victor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

**Este trabajo lo dedico a:**

**A Jesús que siempre ha iluminado mi camino  
y a María de Guadalupe que ha estado conmigo  
en todo momento.**

**A mi madre: Profra. Celia Espinosa de Cuervo  
con todo mi amor y gratitud por ser una hija,  
esposa y madre admirable que nunca se ha  
dejado vencer por las tremendas pruebas que la  
vida le ha puesto.  
Por su dedicación, amor, consuelo y sabios  
consejos que siempre me ha brindado.  
Te amo mamá. Gracias!**

**A mi padre: Ing. Otilio Cuervo Román  
que también me demostró que en esta  
vida el que tiene deseos de salir adelante  
lo puede hacer. Agradezco su amor, sus  
palabras de aliento, su apoyo y su gran  
confianza en mí. Te amo papá.**

**A mis hermanos: Ing. Addina Cuervo Espinosa  
y M.V.Z. Omar Otilio Cuervo Espinosa por haber  
compartido momentos buenos y no tan buenos,  
por haberme apoyado siempre, por su ayuda y  
por no dejarme caer nunca. Gracias!**

A mis abuelitos: Sra. Vita Alejandre de E. y Sr. Wulfrano Espinosa C. Ustedes fueron y seguirán siendo sumamente importantes en mi vida. Ustedes me enseñaron muchas cosas que guardo como mi más grande tesoro. Siempre vivirán en mi corazón.

A mi tía Saby y a mi abuelita Galdina que también se fueron hace mucho tiempo pero que siguen viviendo en mi corazón.

A mi novio Lic. José Martín Serna de Anda. Todos los momentos que hemos compartido han dejado una huella muy profunda en mi alma, tus detalles de amor, comprensión, tus horas de paciencia, el total apoyo que me has brindado y los momentos no tan dulces de nuestra vida reforzaron este bello sentimiento que hoy nos une. Gracias.

A mis compañeros y amigos:  
Adriana, Carmen, Iván, Alfredo, Sandra, Bernardo, Madeline, Gisela, Ángel, Armida, Doroteo, Cecilia, Paula, Paty, Héctor, Eduardo, Rafael, Tessy, Amanda, e Ingrid.

**Mi más sincero agradecimiento a:**

**Dios, porque él es el combustible  
que impulsa cada día de mi vida.**

**Agradezco infinitamente al QFB. Ángel E. Camarena  
Olvera y a la Bióloga Ma. Armida Juárez Cisneros,  
porque sin conocerme confiaron en mí y me apoyaron  
incondicionalmente, por darme todas las facilidades para  
la realización de esta tesis. Gracias por sus consejos y  
enseñanzas y sobre todo mil gracias por la amistad que  
me brindaron.**

**Gracias al Dr. en C. Victor M. Zendejas Buitrón,  
académico de la FES-C, UNAM.**

**Agradezco a mis maestros y compañeros por sus  
enseñanzas y vivencias compartidas.**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER) PERTENECIENTE A LA SECRETARÍA DE SALUD BAJO LA DIRECCIÓN Y ASESORÍA DE EL Q.F.B. ANGEL EDUARDO CAMARENA OLVERA, LA BIÓLOGA MARÍA ARMIDA JUÁREZ CISNEROS Y EL DR. LUIS TERÁN ORTÍZ**

## ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	i
Índice de Cuadros	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	6
-Complejo Principal de Histocompatibilidad	6
-Tuberculosis	38
-SIDA	44
III. Objetivos e Hipótesis	62
IV. Material y Métodos	64
V. Resultados	92
VI. Discusión	113
VII. Conclusiones	116
Apéndice 1	117
Apéndice 2	118
Apéndice 3	119
Apéndice 4	120
IX. Bibliografía	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Título
1	Estructura y Distribución de moléculas HLA clase I y II
2	Estructura tridimensional de las moléculas HLA clase I
3	Estructura tridimensional de las moléculas HLA clase II
4	Complejo Principal de Histocompatibilidad en Humanos
5	Herencia de haplotipos HLA
6	Entrecruzamiento de dos cromosomas
7	Función biológica de las moléculas HLA clase I
8	Función biológica de las moléculas HLA clase II
9	Fagocitosis de bacilos tuberculosos
10	Multiplicación acelerada de bacilos tuberculosos
11	Necrosis caseosa
12	Estructura del HIV
13	Patogénesis de HIV

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título
1	Grupos de genes que constituyen el MHC
2	Especificidades HLA reconocidas internacionalmente 1996
3	Antígenos públicos HLA clase I y II
4	Especificidades originales y antígenos asociados del sistema HLA
5	Asociación HLA-Enfermedad
6	Frecuencias génicas de HLA-DR y -DQ en sujetos inmunodeficientes y testigos sanos (Tipificación serológica)
7-21	Cuadros de contingencia para el análisis serológico de los antígenos HLA clase II más frecuentes
22	Frecuencias génicas de HLA-DR $\beta$ 1, -DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1 en sujetos inmunodeficientes y testigos sanos (Tipificación molecular)
23-39	Cuadros de contingencia para el análisis molecular de los antígenos HLA clase II más frecuentes
40	Valores de subpoblaciones de linfocitos T circulantes

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AR	Artritis Reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
Bf	Factor B
C	Complemento
CD4	Marcador de linfocitos T cooperadores
CD8	Marcador de linfocitos T citotóxicos
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
Cw	Alelo C
DMID	Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Alelo P
DQ	Alelo Q
DR	Alelo R
EDTA	Ácido Etilen diamino tetra acético
F.A	Frecuencia Antigénica
F.G	Frecuencia Génica
GRC	Glóbulos Rojos de Carnero
gp	Glicoproteína
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HLA	Antígenos de Leucocitos Humanos
HSP70	Proteína de Choque Térmico 70
HTR	Hipersensibilidad Retardada
IC	Inmunidad Celular
IL	Interleucina

INF	Interferon
Ir	Genes de Respuesta Inmunológica
Is	Genes Inmunosupresores
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
li	Cadena Invariante
LMP	Proteosomas de Bajo Peso Molecular
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MLC	Cultivo Mixto de Linfocitos
N.S	No Significativo
21-OH	21- Hidroxilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
POD	Peroxidasa
RE	Reticulo Endoplásmico
RR	Riesgo Relativo
S	Significativo
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SSC	Solución Salina de Citratos
SSP	Primers Secuencia Específica
TAE	Trizma-Base, Acetato, EDTA
TAP	Proteínas Transportadoras de Antígeno
TB	Tuberculosis
TbP	Tuberculosis Pulmonar
TCR	Receptor de Linfocitos T
Th1	Linfocitos T cooperadores 1
Th2	Linfocitos T cooperadores 2
UV	Luz Ultravioleta
$\chi^2$	Chi-cuadrada

## RESUMEN

La Tuberculosis pulmonar (TbP) sigue siendo un problema importante de salud en el mundo, la pandemia causada por la infección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y su asociación con TbP, ha causado un considerable aumento en la incidencia de ésta en muchos países. Para dicha patología existe predisposición por factores ambientales, nutricionales y genéticos.

Dada la frecuencia de TbP en nuestro país, el aumento en los casos de HIV y por la falta de estudios realizados en la población mexicana, el objetivo de este estudio fue definir el papel que juegan los marcadores genéticos del MHC en la susceptibilidad o resistencia a TbP y HIV en sujetos mestizos mexicanos.

Las moléculas HLA clase II (HLA DR y DQ) fueron investigadas en un grupo de 34 pacientes con TbP, 31 pacientes con SIDA y 10 pacientes con SIDA-TbP. Se incluyeron 95 sujetos como controles sanos. Se tipificaron los alelos HLA clase II por métodos serológicos (microlinfocitotoxicidad) y por métodos moleculares (PCR-SSP). Los resultados de la tipificación serológica mostraron una asociación significativa con DR2 para TbP y DR5 para HIV .

Para definir con mayor precisión el subtipo que corresponde a DR2 y DR5, se utilizó el método de primer secuencia específica. Los resultados nos indican que los alelos 1501 (DR2) ( $X^2=26.01$ ,  $p=0.001$ ) y 1101 (DR5) ( $X^2=15.41$ ,  $p=0.001$ ) muestran significancia estadística. Los datos anteriores nos revelan que los alelos que pudieran conferir susceptibilidad a la enfermedad están relacionados con la región HLA-DR.

## INTRODUCCION

La historia de la tuberculosis (TB) nos relata que se han encontrado rastros de esta enfermedad desde hace 2000 años antes de Cristo (Reichman, 1993).

La tuberculosis sigue siendo un problema importante de salud en el mundo. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 2000 millones de personas se encuentran infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*: ascendiendo la mortalidad a 3 millones de defunciones, lo que nos indica, que una tercera parte de la población se encuentra infectada con el bacilo de la tuberculosis (95% en los países en vías de desarrollo y 5% en los países industrializados) (Reichman, 1993 y Richter, 1995).

Aún cuando en este siglo la medicina y la tecnología se han desarrollado de manera importante, la tuberculosis ha continuado siendo un sólido problema de salud en dos terceras partes del mundo. Es una enfermedad frecuente en los países en vías de desarrollo y México no es la excepción (Olvera, 1994). Afecta predominantemente a individuos con escasos recursos económicos, en los que la desnutrición, insalubridad y hacinamiento son el denominador común. Sin embargo, en algunas familias, aunque todos sus miembros comparten las mismas condiciones ambientales, nutricionales, solamente uno o dos de ellos adquieren la enfermedad; lo que lleva a uno a suponer que exista cierta susceptibilidad genética a desarrollar la enfermedad (Terán, 1992).

Al ser la tuberculosis un problema de gran relevancia en México, se ha observado un elevado aumento en la incidencia de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes tipos de fármacos (Beck-Sague, 1992); fenómeno debido a programas inapropiados de control de la tuberculosis y más aún, la

pandemia causada por la infección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y la evidencia de una asociación entre la TbP y la infección por HIV, ha causado importantes aumentos en la incidencia de TbP en algunos países (Reichman, 1993, Richter, 1995).

Debido a su habilidad para destruir el sistema inmunológico, el HIV ha emergido como el factor de riesgo más importante en la progresión a la infección por TbP (Richter, 1995).

Durante los primeros casos reportados de Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana (SIDA) en el año de 1981, las personas con esta enfermedad presentaban una deficiencia severa en su sistema inmunológico, sin ninguna causa aparente. El SIDA es una enfermedad de carácter mundial y un grave problema de salud con casos documentados en más de 170 países y 10 millones de personas infectadas con HIV en todo el mundo (Quinn, 1996).

La aparición de infecciones oportunistas poco frecuentes como neumonías causadas por *Pneumocystis carinii* o tumores poco comunes como el Sarcoma de Kaposi, permitieron obtener los reportes de la sintomatología de dicha enfermedad y en ésta se mostraba prevalencia en homosexuales activos, usuarios de drogas intravenosas, y hemofílicos; más tarde se observaron los mismos síntomas en receptores de transfusiones y en niños infectados por sus madres (Scorza, 1986).

En Latinoamérica, la realidad del HIV y SIDA es cada día más alarmante. En México, la epidemia del SIDA se ha extendido debido principalmente a la promiscuidad sexual, drogadicción y sobre todo a una evidente falta de información sobre la enfermedad mortal en todos los sectores de la sociedad (SIDA-ETS, 1996).

En países en vías de desarrollo, la tuberculosis ha emergido como una de las enfermedades oportunistas más comunes asociadas con la infección de HIV. En algunos países latinoamericanos (Brasil, Argentina y México), aproximadamente el 25% de los pacientes presentan tuberculosis clínica durante el curso de la enfermedad por HIV (Reichman, 1995).

Uno de los grupos de genes que pudieran estar involucrados y por lo tanto permitiera estudiar la predisposición, son aquellos que comprenden a los antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y que, dentro de otras funciones, forman parte de los receptores involucrados en el proceso de reconocimiento inmunológico (Festenstein, 1981).

El MHC tiene como característica primordial la de discriminar lo propio de lo extraño ya que se encuentra conformado por una gran cantidad de genes muy importantes que desencadenan una respuesta inmunológica apropiada (Stites, 1993).

Los genes del MHC, que en el humano se les denomina HLA (por Human Leucocyte Antigens), se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (Arnaiz-Villena, 1993) y por características estructurales y de localización, se pueden clasificar en tres diferentes clases de moléculas, de las cuales, las de clase I y clase II juegan el papel principal al estar involucradas en la presentación de péptidos antigénicos a las células T citotóxicas (CD8) y a las células T cooperadoras (CD4), respectivamente (Van Rood, 1993).

Una de las características más importantes de estas moléculas, es su gran polimorfismo (Erich, 1991 y Klein, 1987), es decir, presentan un número elevado de

variaciones denominados alelos dentro de un mismo *locus*; haciéndose más evidente en las moléculas de clase II al ser tipificadas por métodos serológicos, celulares y más aún, por métodos más específicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), SouthernBlot y otros (Chia, 1995).

El sistema inmunológico ha ido evolucionando rápidamente de generación en generación y muchos de estos cambios afectan a los genes polimórficos, genes que expresan muchas formas diferentes del mismo MHC o de la misma molécula de anticuerpo (Stites, 1993).

## **ANTECEDENTES**

## COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), fue descrito originalmente por su importancia en el rechazo o aceptación de trasplantes ya que presenta una función decisiva para la viabilidad del injerto (Festestein, 1981).

En 1916 Little estableció los principios básicos de los trasplantes al demostrar que injertos cutáneos de estirpes idénticas tenían éxito, mientras que los aloinjertos fracasaban (Festestein, 1981).

Los estudios realizados por Gorer en 1936 establecieron que la reacción entre aloinjertos en ratones estaba relacionada con el grado de histocompatibilidad de los aloantígenos descubriendo lo que creyó era otro sistema sanguíneo en el ratón, cuyos genes codificaban al antígeno 2 denominándolos genes de histocompatibilidad o H (Festestein, 1981 y Goulub, 1981).

En 1947 Gorer, Lyman y Snell demuestran que el gen para el antígeno 2 se encuentra en el cromosoma 17 en donde se localiza el gen que causa anomalías en la cola (braquiuria). En 1955, Allen demuestra que no se trata de un sólo gen sino de un sistema alelomórfico H-2 diferenciado (Festestein, 1981, Robles, 1984, Goulub, 1981). En 1953, Amos demuestra que el producto de los genes de esa región podía detectarse por leucoaglutinación (Festestein, 1981, Robles, 1984 y Goulub, 1981).

En 1943 Medawar y colaboradores demostraron las bases inmunológicas del rechazo de trasplante de tejido normal, comparando trasplantes de piel autóloga y alogénica en conejos y posteriormente (1953) induce tolerancia inmunológica en

ratones recién nacidos, inyectando células linfoides del donador del injerto de piel (Festenstein, 1981). Los descubrimientos del sistema HLA, independientes del sistema H-2, se iniciaron entre 1920 y 1950 (Festenstein, 1981). En 1958, Dausset descubre en individuos transfundidos la producción de anticuerpos aloespecíficos, reaccionando con individuos no relacionados para el primer antígeno leucocitario al que llamó Mac (ahora HLA-A2) (Bach, 1976). Payne y Van Rood lo descubren en sueros de mujeres múltiples. Cada antisero daba una reacción positiva con las células de algunos sujetos pero no con todos y diferentes antiseros reaccionaban con las células de poblaciones de individuos distintos pero entremezclados. De esta manera se propuso que los antiseros detectaban antígenos presentes en las células de sujetos de una especie determinada y estos eran producto de algún *locus* genético polimórfico (Van Rood, 1993).

En esos años, se descubrió que los genes de histocompatibilidad no sólo eran cruciales para el éxito del trasplante sino que también eran importantes en las transfusiones sanguíneas (Stites, 1993).

Los avances en el conocimiento de nuevas especificidades se aceleraron cuando Terasaki y McClelland, en 1964, miniaturizaron la técnica de citotoxicidad para así reconocer un número elevado de células y antiseros (Borucki, 1976 y Stewart, 1993).

En 1965, Dausset e Ivanyi postulan que estos antígenos detectados en humanos formaban parte de un sistema genético semejante al MHC del ratón (H-2) y lo llaman HU-1 (Borucki, 1976). Más tarde serían denominados Antígenos de Leucocitos

Humanos (HLA por human leucocyte antigens) por un comité de nomenclatura (Festestein, 1981).

En 1970, Yunis describe al *locus* HLA-D como análogo al murino (Festestein, 1981) y Amos, en 1971, lo asocia con la proliferación linfóide en cultivo mixto de linfocitos (MLC) (Borucki, 1976).

En 1972, se localiza el gen CML, fuera del *locus* HLA-B, conocido como HLA-D; sin embargo, existe otro gene que se identifica entre HLA-A y HLA-C de reacción al MLC (Stewart, 1993).

En 1975, Oliver y Festenstein, postulan la existencia del *locus* HLA-C separado del *locus* HLA-B por ocurrencia de entrecruzamiento y recombinación en familias (Festestein, 1981).

En 1976, Teisberg describe el polimorfismo del componente del complemento C4, asociado al *locus* HLA-B, y O'Neill, en 1978, determina 2 *loci* para el mismo, cada uno con un alelo común silencioso (Festestein, 1981). En 1984, se establecieron los *loci* HLA-DP y HLA-DQ (Stites, 1993).

El primer reporte de asociación entre el MHC y la susceptibilidad o resistencia a determinada enfermedad fue realizado por Lilly en 1964 al encontrar, en ratones, ciertos genes que le conferían resistencia a padecer leucemia inducida por el virus de Gross (Bach, 1976; Goulob, 1981 y Festestein, 1981).

Amiel estableció la primera asociación del sistema HLA con la enfermedad en 1967 al encontrar, en pacientes con enfermedad de Hodgkin, un antígeno con mayor frecuencia que en la población en general (Goulob, 1981 y Festestein, 1981).

En 1973, se descubrió que el sistema HLA se encontraba relacionado con enfermedades específicas en una gran proporción (Festestein, 1981).

Las primeras caracterizaciones de los antígenos específicos del sistema HLA se llevaron a cabo con las pruebas de microcitotoxicidad que permitieron identificar los diferentes *locus* (A, B, C, D, DQ, DR, DP). Actualmente, los métodos de DNA recombinante han sido de gran ayuda para delinear los genes HLA y la cristalografía ha permitido visualizar internamente a la molécula de HLA para determinar su función en la respuesta inmunitaria (Festenstein, 1981; Roitt, 1991 y Stites, 1993).

### ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN

**MOLÉCULAS DE CLASE I:** Son glicoproteínas constituidas por una cadena pesada de 44 kDa (350 a.a), denominada cadena alfa, y una cadena ligera de 12 kDa (100 a.a), denominada beta 2 microglobulina. Ésta es una proteína no glicosilada codificada en el cromosoma 15 en humanos. La beta 2 microglobulina no tiene un dominio transmembranal y permanece asociada con células por su interacción con la región extracelular de la cadena pesada. Se encuentra unida de manera no covalente con el dominio alfa 3, que es parecido al de las inmunoglobulinas, y que contiene un sitio de unión para el receptor CD8 en el linfocito T citotóxico.

La cadena pesada está constituida por tres dominios extracelulares (alfa 1, alfa 2, y alfa 3), una región transmembranal y una porción intracitoplasmática. Cada cadena pesada posee exones separados que pueden codificar para distintos dominios de la proteína (Parham, 1990) (Figura 1).

Los antígenos de clase I están distribuidos sobre todas las células nucleadas, sobre reticulocitos, en baja densidad sobre eritrocitos y probablemente se encuentran sobre el trofoblasto y el esperma (Lawlor, 1990).

**MOLÉCULAS DE CLASE II:** son proteínas membranales integrales heterodiméricas divididas en tres subclases DR, DP y DQ. Cada dímero está constituido por una cadena alfa de 32-34 kDa (229 a.a) y una cadena beta de 28-29 kDa (237 a.a). Ambas cadenas se encuentran orientadas con una porción extracelular amino terminal, dos dominios extracelulares de 90-100 a.a, un dominio transmembranal y una porción citoplasmática carboxilo terminal de 10-15 a.a. Ambas son codificadas por genes del MHC y durante su síntesis y transporte intracelular, el dímero alfa-beta se halla asociado a una cadena de 31 kDa llamada invariante, codificada genéticamente fuera del sistema HLA. Se ha postulado que esta cadena podría jugar un papel importante en la orientación de las moléculas de clase II hacia los endosomas, sitio donde podría ocurrir la unión a péptidos antigénicos (Stewart, 1993).

En lo que respecta a HLA-DR, esta región tiene de 3 a 5 genes que codifican, dependiendo del alelo, un número variable de codones  $\beta$ . El gen de la cadena  $\alpha$  es DR $\alpha$  y no es polimórfico, mientras que las cadenas  $\beta$  son codificadas por los genes DR $\beta$ 1.

HLA-DQ presenta un polimorfismo acentuado en ambas cadenas, hay dos genes  $\alpha$  y hasta tres  $\beta$ , sólo DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1 son funcionales y sus productos se denominan DQ. DQ $\alpha$ 2, DQ $\beta$ 2 y DQ $\beta$ 3 son pseudogenes. HLA-DP presenta las mismas características

en sus cadenas a excepción de la cadena alfa que presenta cierta variabilidad (Serjeantson, 1989).

Otros genes de la región clase II, que son estructuralmente distintos de las moléculas MHC, codifican polipéptidos que colaboran en el procesamiento de antígenos. Entre estos se encuentran los genes TAP1 y TAP2, que codifican transportadores de péptidos, y LMP2 y LMP7, que codifican componentes del proteosoma o proteasas multicatalíticas del citosol. Estas moléculas son esenciales para la generación y transporte de péptidos que se unirán eventualmente a las moléculas clase I en el interior del retículo endoplásmico (RE) (Neeffes, 1993).

Se localizan principalmente en la superficie de células inmunocompetentes, linfocitos B, macrófagos, monocitos, linfocitos T activados, células epiteliales y cualquier célula que actúe como presentadora de antígeno (Mach, 1986) (Figura 1).

**MOLÉCULAS DE CLASE III :** La región HLA clase III está localizada entre las regiones clase I (HLA-B) y clase II (HLA-DR), abarca 1000 kb de DNA. La región clase III contiene una colección heterogénea de genes codificando componentes del sistema del complemento (C2, C4 y factor B), genes de la 21-hidroxilasa, tres genes HSP 70, dos genes TNF y un grupo de genes también llamado BAT y G. Los genes de clase III presentan un grado moderado de variabilidad genética y se encuentra definido como un segmento cromosomal completo (Trowsdale, 1991).

Análisis electroforéticos han demostrado que C2, C4A y C4B y el factor B (Bf) son polimórficos y debido a su marcado desequilibrio de enlace, las combinaciones

específicas de los alelos C2, C4 y Bf son heredadas como unidades genéticas simples que se conocen como complotipos (Trowsdale, 1991).

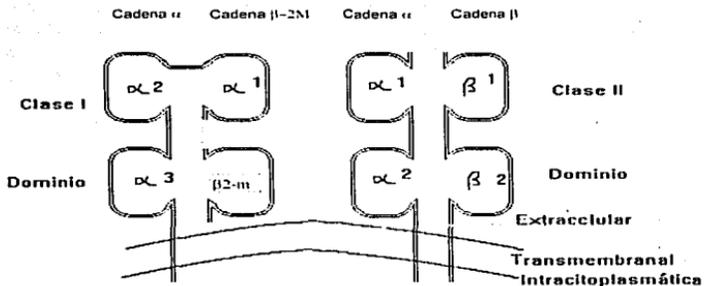


Figura 1. Estructura de las moléculas clase I y II (Trucco, M., 1992).  
 Abreviaturas:  $\alpha$  1,2,3 = cadenas alfa de la molécula HLA clase I;  $\beta$ 2-m = beta 2 microglobulina;  $\alpha$  1,2 y  $\beta$  1,2 = cadenas alfa y beta de la molécula HLA clase II.

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS MOLÉCULAS CLASE I Y CLASE II

Mediante estudios cristalográficos analizando las estructuras HLA-A2 y HLA-DR1, se ha logrado definir la estructura tridimensional de las moléculas HLA clase I y HLA clase II. Ambas moléculas presentan ciertas similitudes; sin embargo, las moléculas clase II unen péptidos mayores de 24 residuos debido a la variación que muestran en el extremo carboxilo terminal (Bell, 1989 y Monaco, 1992).

### CLASE I :

La estructura cristalográfica de la molécula de clase I, ha permitido determinar que los dominios alfa 1 y alfa 2 forman un sitio de unión para péptidos pequeños. Este sitio de unión está conformado por una hoja beta plegada unida a dos alfa hélices, una para alfa 1 y otra para alfa 2. El sitio de unión del péptido está constituido por ocho láminas beta-plegadas que, junto con los dominios alfa 3 y beta 2-microglobulina (que se encuentra ligada al dominio alfa 3 pero también se encuentra ligada con la hoja beta plegada de la región alfa 1-alfa 2 del sitio de unión del péptido) integran la estructura que brinda un sitio suficiente para acomodar péptidos pequeños de 8 a 10 a.a (Figura 2) (Fields, 1996).

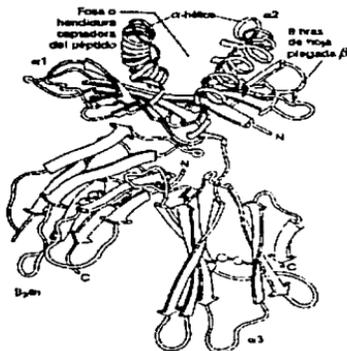
### CLASE II

La estructura tridimensional de los antígenos de histocompatibilidad HLA clase II es muy similar a la descrita para las moléculas HLA clase I.

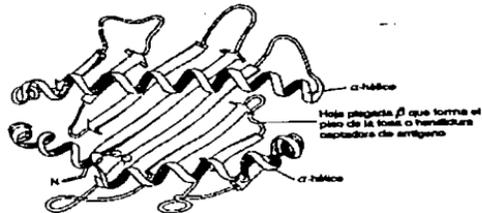
La estructura de HLA clase II permite observar que los dominios que se encuentran en la parte más externa de las cadenas alfa 1 y beta 1 se pliegan para formar una hendidura en la cual se instala el péptido antigénico. Estos dominios

muestran un polimorfismo muy elevado que genera residuos localizados en una región hipervariable muy discreta (Bell, 1989).

a)



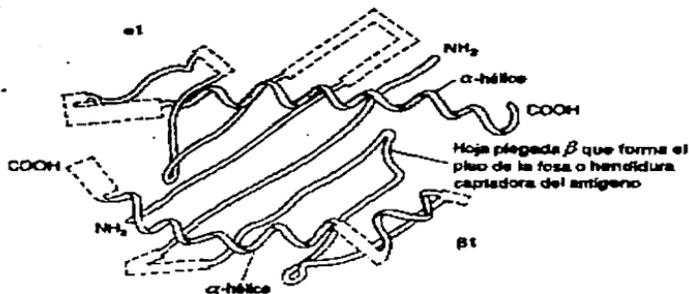
b)



**FIGURA 2. Estructura tridimensional de las moléculas HLA clase I (Stites, 1993).**  
a) Cristalografía de las moléculas HLA clase I. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  son las alfa hélices que rodean el piso de la estructura  $\beta$  plegada, que conforman el nicho o surco donde se une el péptido. Ahí radica todo el polimorfismo de los antígenos clase I. b) El nicho, visto desde arriba, acepta péptidos pequeños (básicamente de naturaleza endógena) en forma de espiral y dejan  $\alpha 3$  a que sobresaliera para que el receptor de células T (TCR) se una a ellas confiriendo la especificidad al reconocimiento de linfocitos T. Dibujo modificado de Stites, 1993

Al comparar ambas estructuras (clase I y clase II), se observa que los dominios alfa de clase II empalman cercanamente con los dominios alfa 1 correspondientes y la subunidad beta 2-microglobulina. El dominio beta 2 es relativamente equiparable al dominio alfa 3 (Brown, 1993).

El sitio de unión del péptido en ambas moléculas está formado por ocho bandas de una hoja beta-plegada antiparalela que semeja un piso y dos regiones en hélice antiparalelas a los lados. Las diferencias en la porción de la hélice determinan el por qué las moléculas clase II unen péptidos grandes (15-24 residuos) y las moléculas clase I unen péptidos nonaméricos pequeños (Fields, 1996) (Figura 3).



**Figura 3. Estructura tridimensional de las moléculas HLA clase II (Stites, 1993).**

El nicho de las moléculas de clase II es más flexible y acepta péptidos (principalmente exógenos) de 12 a.a. a 22 a.a. Hay más a.a. que pueden contactar al TCR y el péptido se acomoda de forma extendida. Abreviaturas: a.a. = aminoácidos; TCR= Receptor de Células T.

## ORGANIZACIÓN GENÉTICA

El MHC es una región del genoma humano de alrededor de 4000 kb que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (Figura 4) y que está constituido, al menos, por el siguiente grupo de genes: A, B, C, DR, DP, DQ, C2, C4, FB (Trowsdale, 1991) (Cuadro 1) Klein propone una clasificación basándose en la estructura, distribución y función: de tal forma que se clasifican en los siguientes grupos de genes :

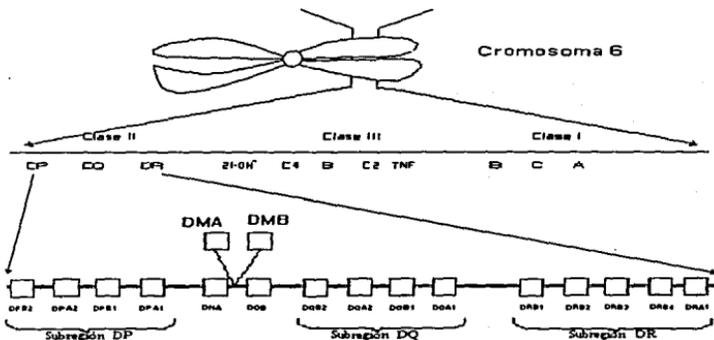
**Cuadro 1. Grupos de genes que constituyen el MHC**

CLASE	GENES
I	A B C ( Clásicos ) E F G H I ( No clásicos )
II	DP DQ DR ( Funcionales ) DMA DMB DNA DO ( No funcionales )
III	C2 C4A C4B y FB

La región genética de clase I es una región compleja con genes que codifican para la cadena pesada, altamente polimórfica, de los antígenos HLA clase I, ésta ha sido estudiada detalladamente y ha sido posible descubrir tres nuevas clases de genes que codifican para una cadena pesada de los antígenos HLA clase I diferente a la que ocupan los genes llamados "clásicos" (HLA-A, -B y -C). Estos genes denominados "no clásicos" se han clasificado como HLA-E, -F y -G, de los cuales se desconoce su función. Del mismo modo se ha determinado la existencia de pseudogenes (genes que no expresan productos proteínicos) entre los que se encuentran HLA-H, -I y -J (Arnaiz-Villena, 1993; Monaco, 1992 y Parham, 1988).

La región genética de clase II contiene una gran variedad de genes localizados en una región de aproximadamente 6 millones de pares de bases dentro del cromosoma 6 (Smith, 1994). Esta región ha sido subdividida en tres subregiones designadas como DR, DQ y DP en la que cada una de ellas codifica para, al menos, un grupo de cadenas funcionales alfa y beta. Las regiones principales han sido llamadas regiones funcionales (Arnaiz-Villena, 1993 y Schwartz, 1988).

Sin embargo, no todos los genes alfa y beta expresan productos funcionales. Las subregiones DR y DP contienen pseudogenes no funcionales y la región DQ, contiene genes que no son pseudogenes pero no se expresan (Arnaiz-Villena, 1993 y Serjeantson, 1989).

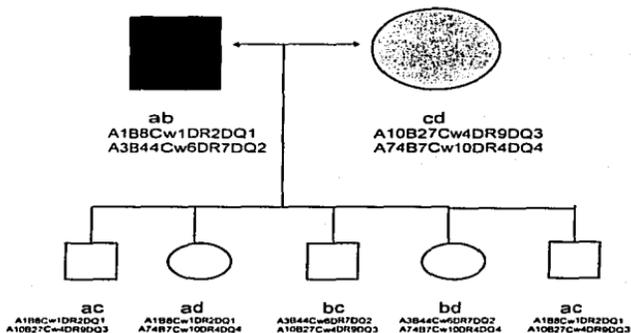


**Figura 4. Complejo Principal de Histocompatibilidad en Humanos (Trucco, 1992).**  
 Abreviaturas: 21-OH= 21-Hidroxilasa, C4 y C2= Complemento 4 y 2. TNF= Factor de Necrosis Tumoral, DP, DQ y DR= Genes HLA clase II; A, B, C= Genes HLA clase I.

## HERENCIA

Como especie humana contamos con 46 cromosomas en cada célula somática (22 pares autosómicos y un par sexual), que confieren características diploides de los cuales 23 cromosomas pertenecen a la madre y 23 cromosomas al padre. Los genes se encuentran en lugares específicos del cromosoma (*locus*), encontrándose su homólogo en el otro cromosoma que forma el par con la existencia de variantes alélicas. Cuando un individuo presenta alelos homólogos idénticos tendrá características homocigotas, pero si éstos son diferentes será heterocigoto dominante (un gene domina a otro) o codominante (ambos se expresan) (Winchester, 1986; Sturtevant, 1962 y Mettler, 1979).

Por herencia mendeliana, un individuo hereda 2 haplotipos HLA (Stites, 1993 y Winchester, 1986), siendo todos sus genes muy próximos y ligados entre sí, polimórficos y codominantes; así dentro de una familia, donde el padre presenta los haplotipos *a* y *b*, y la madre los haplotipos *c* y *d*, se espera que las asociaciones de haplotipos para 4 de sus hijos sean las siguientes: *ac*, *ad*, *bc*, *bd*. De tal forma que la presencia de otro hijo con la combinación *ac* nos indicaría que existe un 25% de probabilidad para que dos hermanos compartan los mismos haplotipos, 50% de compartir un haplotipo y 25% de incompatibilidad en sus antígenos HLA. De tal forma, que el sistema HLA se hereda en bloque, en forma codominante y siguiendo las leyes de segregación mendeliana (Figura 5).



**Figura 5. Herencia de haplotipos HLA (Stites, 1993).**

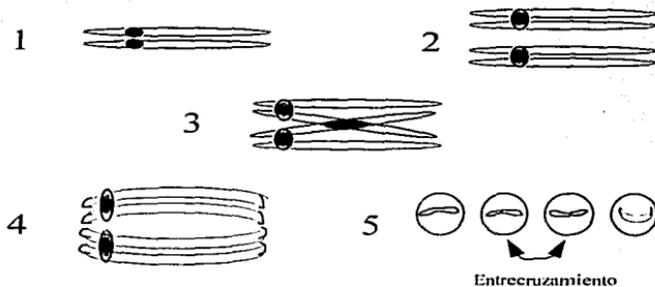
Los padres con cuatro haplotipos diferentes (2 cada uno) tienen hijos con cuatro combinaciones posibles con una probabilidad de compatibilidad total o incompatibilidad total del 25% y 50% de compatibilidad parcial entre hermanos.

## RECOMBINACIÓN

Desde el punto de vista evolutivo, la recombinación de genes ligados es un proceso de gran importancia ya que de esto depende la continuidad de la existencia de cualquier población natural de una especie (Stites, 1993; Sturtevant, 1962; Mettler, 1979 y Winchester, 1986).

Durante la meiosis, los cromosomas homólogos se aparean antes de reducirse de 46 cromosomas a 23 cromosomas, dando lugar a la recombinación al intercambiarse las regiones homólogas apareadas; trayendo como consecuencia el origen de una nueva unión, de esta manera, la frecuencia de recombinación entre dos *loci*, es proporcional a la distancia que los separa, segregándose como unidad los más próximos y en forma independiente los alejados. En casi todos los casos, la alineación es perfecta debido a que la atracción entre cromosomas homólogos es de gene a gene (Winchester, 1986; Sturtevant, 1962 y Mettler, 1979) (Figura 6).

Cada *loci* del sistema HLA codifica para un gran número de alelos. Los cinco *loci* (A, B, C, D y DR), cada uno diploide, poseen 10 genes (2 x 5) para antígenos del sistema HLA. Dependiendo si el individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más antígenos, un mínimo de cinco y un máximo de diez antígenos diferentes pueden ser demostrados en este fenotipo; estos antígenos se heredan de manera codominante y como consecuencia de su cercanía al *loci* HLA del cromosoma se heredan juntamente, es decir como una unidad. Se cree que esta recombinación se da con una frecuencia del 0.2% entre B y C, 0.7 % entre A y C y 1% entre B y D (Stites, 1993).



**Figura 6. Entrecruzamiento de dos cromosomas (Winchester, 1986).**  
 Entrecruzamiento: (1) Dos cromosomas homólogos antes de la meiosis. (2) Cada cromosoma se vuelve doble, formando dos cromátidas. (3) Una cromátida de cada cromosoma intercambia una porción con una cromátida homóloga del otro cromosoma; esto es el entrecruzamiento. (4) Los dos cromosomas se separan en la anafase de la primera división de la meiosis. (5) Un óvulo y tres cuerpos polares. Dos son portadores de cromosomas cruzados y dos no.

## DESEQUILIBRIO DE ENLACE

El desequilibrio de enlace nos indica la aparición de dos antígenos sobre el mismo haplotipo siendo más frecuente de lo que se espera al multiplicar sus frecuencias individuales (Winchester, 1986; Sturtevant, 1962 y Mettler, 1979).

El desequilibrio de enlace se encuentra al determinar los antígenos HLA de una población, señala sus orígenes y migraciones, así como las relaciones con la expresión de algunas enfermedades (Lisker, 1981).

Se han postulado hipótesis para explicar el desequilibrio de enlace y entre ellas se encuentran las siguientes (Lisker, 1981):

1. Migración o mezcla de poblaciones
2. Selectividad
3. Consanguinidad
4. Derivación al azar.

## POLIMORFISMO

Una de las características más importantes del sistema HLA es que posee el polimorfismo más grande que se conoce en mamíferos (Erllich, 1991). El polimorfismo indica la presencia de un número elevado de variaciones denominados alelos dentro de un mismo *locus*. Este polimorfismo implica en las moléculas HLA, a semejanza de los anticuerpos, la existencia de porciones constantes y porciones variables; dentro de su estructura las primeras nos darán las características del *loci* al que pertenecen y las

segundas serán las características del alelo (Klein, 1987). La porción variable contiene el repertorio de especificidades, es decir, de péptidos que puede presentar para desencadenar una respuesta inmunológica, por tanto es lógico pensar que algunos alelos correlacionan con ciertas enfermedades, unas con características autoinmunes y otras de predisposición a infecciones (Rudert, 1992; Schwartz, 1988 y Thorsby, 1989), afectando de esta manera, la cantidad y calidad de la protección inmunológica (Klein, 1987).

Las moléculas de clase I y clase II que forman parte del sistema HLA son extremadamente polimórficas (Mach, 1986). Su variación alélica genera un gran número de especificidades (67 para HLA-A, 149 para HLA-B, 39 para HLA-C y más de 314 para los *loci* DR, DP y DQ) (Stites, 1993; Olerup, 1996 y Parham, 1996). Estas especificidades han sido confirmadas por medio de aloantisueros, anticuerpos monoclonales, cultivo mixto de linfocitos (MLC), análisis bioquímicos y por técnicas moleculares basadas particularmente en técnicas con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Bell, 1989). En el cuadro 2 se observa la lista de especificidades HLA reconocidas internacionalmente en el taller efectuado en 1996.

## NOMENCLATURA

La nomenclatura del sistema HLA fue establecida por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La región HLA se encuentra conformada de los *loci* HLA-A, -B, -C (clase I), HLA-DR, -DP y -DQ (clase II) y TNF alfa y beta, C4A, C4B, CYP 21, Bf (clase III) (Festenstein, 1981; Parham, 1990 y

Stewart, 1993). Se reconocieron primeramente los *loci* HLA-A y B, que se encuentran numerados en forma coordinada del 1 al 77, y posteriormente el *locus* C. En el *locus* B y en el *locus* DR, la designación Bw4, Bw6, DRw52 y DRw53, conocidos como antígenos públicos, se emplean para describir una serie de epitopos dialélicos asociados con los alelos de los *locus* mencionados (Cuadro 3). La mayoría de los antígenos de los *loci* A, B, C, DR, DP y DQ se reconocen como antígenos paternos (Stiles, 1993), estos antígenos son usualmente designados en paréntesis después del antígeno del hijo. Por ejemplo; A23(9) y A24(9) son ambas divisiones originales del antígeno paterno A9 (Cuadro 4). Cuando un antígeno no ha podido ser definido óptimamente por carecer de reactivos específicos el número del antígeno es precedido por la letra w que indica que requiere de clasificación. Al contar con los reactivos necesarios la w se elimina (Trowsdale, 1991).

Las especificidades del *locus* C se encuentran bien definidas. Sin embargo, las especificidades siguen marcándose con la letra w, (Cw1, Cw2, Cw3, entre otros), para no confundirse con los componentes del complemento de las moléculas clase III (C2, C4) (Trowsdale, 1991).

En lo que respecta al polimorfismo y siendo estos *loci* tan polimórficos se han encontrado microvariantes y subtipos de antígenos ó alelos por medio del rango de la variación de secuencias de aminoácidos. La nomenclatura de estas microvariantes se deriva de la estándar del antígeno original. Ejemplo: los microvariantes para HLA-B27 son designadas B\*2701, B\*2706 (Benjamin, 1990). El asterisco indica que los alelos han sido definidos únicamente por el nivel de aminoácidos o nucleótidos. El sistema numérico de los microvariantes establece como "01" a el microvariante más frecuente.

Con ayuda de la biología molecular se han encontrado 8 pseudogenes, 15 secuencias no representativas y 4 genes abreviados, 3 genes restantes actúan como moléculas clase I y han sido designadas HLA-E,-F y -G (Lew, 1992; Chia, 1994 y Du, 1993).

**Cuadro 2. Especificidades HLA reconocidas internacionalmente 1996 (Pel-Freez, 1996).**

LOCUS A	LOCUS B		LOCUS C	LOCUS D	LOCUS DR	LOCUS DQ	LOCUS DP
A1	B5	B51 ( 2 )	Cw1	D1	DR1	DQ1	DP1
A2	B7	B52 ( 5 )	Cw2	D2	DR2	DQ2	DP2
A3	B8	B53	Cw3	D3	DR3	DQ3	DP3
A9	B12	B54 ( 22 )	Cw4	D4	DR4	DQ4	DP4
A10	B13	B55 ( 22 )	Cw5	D5	DR5	DQ5 ( 1 )	DP5
A11	B14	B56 ( 22 )	Cw6	D6	DR6	DQ6 ( 1 )	DP6
A19	B15	B57 ( 17 )	Cw7	D7	DR7	DQ7 ( 3 )	
A23 ( 9 )	B16	B58 ( 17 )	Cw8	D8	DR8	DQ8 ( 3 )	
A24 ( 9 )	B17	B59	Cw9 ( w3 )	D9	DR9	DQ9 ( 3 )	
A25 ( 10 )	B18	B60 ( 40 )	Cw10 ( w3 )	D10	DR10		
A26 ( 10 )	B22	B61 ( 40 )		D11 ( 7 )	DR11 ( 5 )		
A28	B27	B62 ( 15 )		D12	DR12 ( 5 )		
A29 ( 19 )	B35	B63 ( 15 )		D13	DRw13 ( w6 )		
A30 ( 19 )	B37	B64 ( 14 )		D14	DR14 ( 6 )		
A31 ( 19 )	B38 ( 16 )	B65 ( 14 )		D15	DR15 ( 2 )		
A32 ( 19 )	B39 ( 16 )	B67		D16	DR16 ( 2 )		
A33 ( 19 )	B40	B70		D17 ( 7 )	DR17 ( 3 )		
A34 ( 10 )	B41	B71 ( 70 )		D18 ( 6 )	DR18 ( 3 )		
A36	B42	B72 ( 70 )		D19 ( 6 )			
A43	B44 ( 12 )	B73		D20			
A66 ( 10 )	B45 ( 12 )	B75 ( 15 )		D21	DR52		
A68 ( 28 )	B46	B76 ( 15 )		D22	DR53		
A69 ( 28 )	B47	B77 ( 15 )		D23			
A74 ( 19 )	B48	B78		D24			
A80	B49 ( 21 )	B81		D25			
	B50 ( 21 )	B4		D26			
		B6					

**Cuadro 3. Antígenos Públicos HLA Clase I y Clase II (Stites, 1993).**

Especificidades Públicas	Asociaciones
Bw4	B5, B13, B17, B38(16), B44(12), B47, B49(21), B51(5), B5102, B5103, B52(5), B53, B57(17), B58(17) B59, B63(15), B77(15)
Bw6	B7, B703, B8, B14, B18, B22, B35, B39(16), B3901, B3902, B40, B4005, B41, B42, B45(12), B46, B48, B50(21), B54(22), B55(22), B56(22), B60(40), B61(40), B62(15), B64814, B65(14), B67, B70, B71(70), B72(70), B73, B75(15), B76(15), B7801
DR51	DR2, DR15(2), DR16(2)
DR52	DR3, DR5, DR6, DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR1403, DR1404, DR17(3), DR18(3)
DR53	DR4, DR7, DR9

En el locus B y en el locus DR, la designación Bw4, Bw6, DR52 y DR53, conocidos como antígenos públicos, se emplean para describir una serie de epitopos dialécticos asociados con los alelos de los locus mencionados.

**Cuadro 4. Especificidades originales y antígenos asociados del sistema HLA (Stites, 1993).**

Especificidades originales	Divisiones originales y Antígenos asociados
A2	A203, A210
A9	A23, A24, A2403
A10	A25, A26, A34, A66
A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74
A28	A68, A69
B5	B51, B52
B7	B703
B12	B44, B45
B14	B64, B65
B15	B62, B63, B75, B76, B77
B16	B38, B39, B3901, B3902
B17	B57, B58
B21	B49, B50, B4005

Especificidades originales	Divisiones originales y Antígenos asociados
B22	B54, B55, B56
B40	B60, B61
B70	B71, B72
Cw3	Cw9, Cw10
DR1	DR103
DR2	DR15, DR16
DR3	DR17, DR18
DR5	DR11, DR12
DR6	DR13, DR14, DR1403, DR1404
DQ1	DQ5, DQ6
DQ3	DQ7, DQ8, DQ9
Dw6	Dw18, Dw19
Dw7	Dw11, Dw17

La mayoría de los antígenos de los loci A, B, C, DR, DP y DQ se reconocen como antígenos paternos, estos antígenos son usualmente designados en paréntesis después del antígeno del hijo. Por ejemplo: A23(9) y A24(9) son ambas variaciones del antígeno paterno A9.

## FUNCIÓN BIOLÓGICA

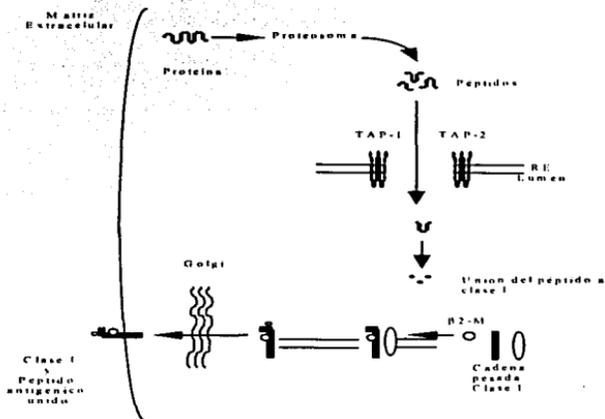
La principal función de las moléculas del MHC (unión y presentación de péptidos) se encuentran íntimamente ligadas con su estructura (Parham, 1988). Tanto para las moléculas clase I y clase II es muy importante mantener una estructura tridimensional estable para poder llevar a cabo el transporte intracelular a la superficie de la célula (Monaco, 1992).

Los genes del MHC codifican para la expresión de glicoproteínas que son importantes en diversos aspectos de la regulación de la respuesta inmune ya sea produciendo anticuerpos, produciendo varias clases de linfocitos T ó potenciando ciertas respuestas inmunológicas (Parham, 1990). Pueden servir como sustratos para la eliminación de patógenos o como marcadores para identificar genes relevantes en la patogénesis de enfermedades (Kersh, 1996).

La función biológica de las moléculas del MHC es la de presentar péptidos antigénicos para activar a los linfocitos T (Brodsky, 1991). Las células T tienen expresión clonal y el receptor de la célula T (TCR) solamente interactúa con péptidos cortos que están ligados a las moléculas de clase I o clase II del MHC. Dichos fragmentos son producidos por degradación intracelular o procesamiento de bacterias, virus o proteínas extrañas. El HLA con el péptido unido presenta el antígeno al TCR de la célula T. Los linfocitos T que reconocen moléculas de clase I pertenecen a la subpoblación citotóxica/supresora (CD8). Estas moléculas presentan péptidos intracelulares (endógenos) y la citotoxicidad sólo se observa en células que presentan el marcador CD8; estas células constituyen la principal defensa contra este tipo de

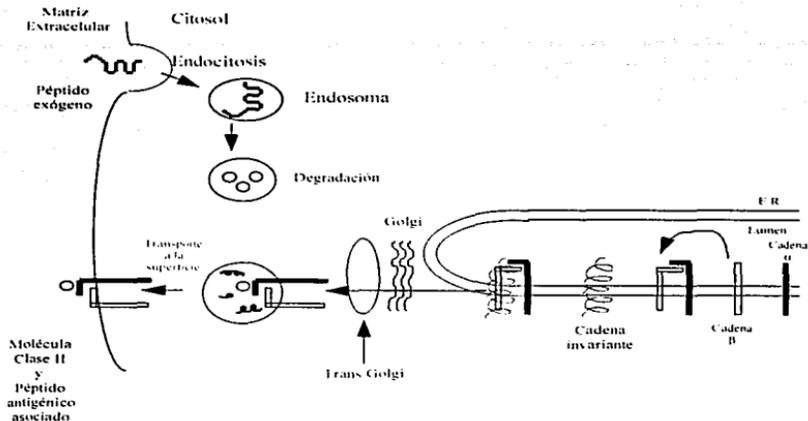
patógenos (Salter, 1990). Al fenómeno anterior se le denomina restricción genética de la citotoxicidad o fenómeno de Zinkernagel-Doherty (Zinkernagel, 1996) (Figura 7).

Las moléculas HLA clase II tienen la función de presentar péptidos de origen exógeno a los receptores de linfocitos T cooperadores (CD4) que reconocen al antígeno extraño y así producir la respuesta inmunológica (Brodsky, 1991 y Neefjes, 1993) (Figura 8).



**Figura 7. Función biológica de las moléculas HLA clase I (Neefjes, 1993).**

Los péptidos derivados de las proteínas citoplasmáticas (antígenos endógenos, antígenos virales y tumorales) son presentados por las moléculas clase I. El antígeno es degradado en el citoplasma a péptidos de diferentes tamaños por acción de dos proteosomas de bajo peso molecular (LMP-2 y LMP-7). Posteriormente, los péptidos son transportados hacia el interior del retículo endoplásmico por las proteínas TAP-1 y TAP-2 para unirse a las moléculas clase I. El péptido unido a la abertura permite una mayor contribución para el ensamble y estabilidad de los antígenos clase I que viajan para alcanzar la superficie celular y presentar el péptido al receptor de células T (TCR) en la célula T.



**Figura 8. Función biológica de las moléculas HLA clase II (Neefjes, 1993).**

Los dímeros de clase II se forman dentro de la célula y se asocian con el retículo endoplásmico con una tercera glicoproteína, la cadena invariante (Ii), hasta que éste alcanza un compartimento endocítico. Aquí, bajo un pH ácido, el dímero se disocia de la cadena Ii y se asocia con un péptido exógeno (derivado de proteínas extracelulares e insertadas en la membrana) y son, después, transportada a la superficie celular. El TCR de las células Th pueden ahora asociarse con los péptidos e inducir la respuesta inmunológica. Abreviaturas TCR=Receptor de Células T. Th=Células T cooperadoras.

## ASOCIACIÓN HLA - ENFERMEDAD

El descubrimiento de asociaciones entre ciertas enfermedades y el MHC es uno de los avances más importantes de la última década ya que se cuenta con una base para poder determinar y comprender las causas y la patogénesis de enfermedades difíciles de entender (Trowsdale, 1994) (Cuadro 5).

Actualmente, la tipificación por métodos moleculares, ha permitido una definición más precisa de la naturaleza de HLA y su asociación con la enfermedad; lo cual ha conducido a una revaloración en prácticamente todas las patologías. En el caso de alteraciones como la enfermedad de Hodgkin, en población europea, se ha observado que una asociación con DP $\beta$ 1\*0301 representa un riesgo relativo de 2 mientras, que en japoneses y otros orientales, DP $\beta$ 1\*0401 se encuentra disminuido (Chia, 1994; Du, 1993; Gyllensten, 1991 y Rudert, 1992).

Antes de considerar el mecanismo responsable para la asociación de la enfermedad en un individuo se deben tomar en cuenta las enfermedades catalogadas como autoinmunes (síndrome de Goodpasture, diabetes, entre otros) (Trucco, 1992 y Tuomiletho, 1993); enfermedades mediadas por complejos inmunes (lupus eritematoso sistémico) y enfermedades no inmunes (narcolepsia) (Benjamin, 1990 y Kuntz, 1989).

Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar estas asociaciones están:

1. *Efectos de los genes Ir (genes de respuesta inmune) y genes Is (Inmunosupresores).*- Los genes Ir e Is proveen un mecanismo muy atractivo para explicar muchas de las enfermedades ligadas a HLA, ya que los genes Ir confieren la

capacidad de responder y montar una eficiente respuesta celular inmune contra los antígenos de micobacterias, mientras que los genes *Is* pueden dejar al huésped en desventaja cuando se confrontan con la infección. La susceptibilidad a enfermedades autoinmunes puede ser debida al efecto de los genes *Ir* con una secuencia de aminoácidos de un alelo específico a una del *loci* clase II ó a variaciones polimórficas afectando la regulación de los genes HLA clase II (Kuntz, 1989). En lo que respecta a los genes *Is*, las posibles explicaciones por las que no hay respuesta contra el patógeno (en este caso micobacterias) pueden ser: a) la presencia de células T reactivas en estado de anergia posiblemente causada por bloqueadores del TCR, deficiencia en la producción de IL-2 o anomalidades en la expresión del receptor de IL-2; b) Células T reactivas suprimidas debido a la acumulación de moléculas inhibitoras de Mycobacterium (PGL-1, LAM o Manósido). c) Las células Th1 reactivas de Mycobacterium pueden fallar para desarrollarse, favoreciendo la teoría de la supresión clonal. d) Supresión mediada por células T que involucra anomalidades genéticas en el TCR y los genes MHC.

Entre los mecanismos que podrían explicar la supresión se encuentra el papel de las citocinas (IFN- $\gamma$  o IL-2), la resistencia innata de los macrófagos debido a una muy eficiente capacidad bacterioestática o que la supresión es debida a los genes DQ, probablemente por asociación con ciertos péptidos específicos en posiciones relevantes del hueco DQ1 y la exposición de ciertos residuos que interfieran con el TCR en las células Th2 (Gorodezky, 1993).

**2. Anormalidades en el receptor de células T (TCR).**- La naturaleza del TCR en la respuesta inmune a antígenos extraños en humanos no ha sido explorada

ampliamente. Algunos datos muestran alteraciones en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren y la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). Se ha sugerido que las células T autorreactivas que pueden reconocer antígenos propios en el timo con una afinidad muy elevada son eliminadas en un evento de selección primaria conocido como selección negativa. Estas células no maduran y sobreviene la muerte programada (apoptosis). Las células T no son eliminadas pero aquellos TCRs que mantienen la habilidad de interactuar con antígenos propios del HLA, son seleccionados positivamente para diferenciarse y madurar. Ambas selecciones, debido a su dependencia en el reconocimiento específico de HLA, son factores claves en la generación de especificidades de TCR autorreactivos contribuyendo a la enfermedad autoinmune (Trowsdale, 1994 y Lechler, 1994).

**3. Mimetismo molecular.-** Explica la susceptibilidad mediante reacciones cruzadas entre antígenos de microorganismos infecciosos y autoantígenos con moléculas del sistema HLA. Esta hipótesis está sostenida por la observación de una homología de los aminoácidos consecutivos entre la molécula B27 y los residuos 188-193 de la nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* en la espondilitis anquilosante, otras enfermedades que pueden incluirse dentro de este mecanismo son la enfermedad de Chagas, fiebre reumática, SIDA, proteínas de choque térmico, entre otras (Benjamin, 1990 y Lahesmaa, 1993).

**4. Moléculas MHC clase I y II como receptores de virus.-** El mecanismo por el cual una gran mayoría de virus entran a las células involucra el ataque a las glicoproteínas de superficie celular, seguidas por la fusión de sus membranas con

las membranas plasmáticas celulares ya sea en la superficie celular o después de la endocitosis. Tales proteínas celulares receptoras deben tener glicoproteínas que reciclan o las cuales sobrellevan la endocitosis después de la unión cruzada inducida por el virus. Los genes HLA se ajustan a este criterio. Algunas de las moléculas que se conocen y que están involucradas en la penetración viral dentro de las células son receptores C3d para el virus Epstein-Barr y las moléculas CD4 para el HIV-1 (Lechler, 1994).

Se han demostrado 3 virus que se adhieren específicamente a las moléculas del MHC humano. El virus Semliki-Forest y el adenovirus tipo 2 se unen a las moléculas clase I del MHC y el virus de la lactato deshidrogenasa se une a las moléculas clase II. Es posible que algunos virus penetren a las células por la formación de enlaces específicos a las moléculas de HLA. Esto pudiera crear la posibilidad de que algunos genes HLA confieran resistencia a virus particulares. Sin embargo, esto daría una ventaja muy importante a virus mutantes que escapen de la restricción alélica (Lechler, 1994).

**5. Acción de los genes no HLA en el MHC.-** Muchos genes están presentes en el MHC en adición a aquellos que codifican genes HLA. Algunos de estos han sido caracterizados e influyen genes que codifican proteínas muy importantes para el sistema inmunológico. Estos incluyen los genes en la región clase III que codifica a los componentes del complemento C2 y C4 y el factor B, los genes del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- $\alpha$  y  $\beta$ ) y los genes para las proteínas de choque térmico 70 (HSP-70). Recientemente se han identificado transportadores de péptidos (TAP) y unidades de proteosoma (LMP) en la región HLA clase II. Se ha encontrado

que el TNF- $\alpha$  y  $\beta$  y las HSP-70 intervienen en la respuesta inmune. Se ha argumentado que las alelos de C4 y C2, por sí mismos, predisponen a enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y que estos efectos no son debidos a desequilibrios de enlace con otros genes inmunológicamente relevantes en el complejo HLA. Sin embargo, el complemento tiene un papel muy importante en el procesamiento de complejos inmunes en la circulación sanguínea y en los tejidos. Parece ser que las deficiencias de complemento favorecen directamente el surgimiento de LES por la formación de complejos que se depositan en los tejidos y de esta manera inician la inflamación, resultando en la liberación secundaria de antígenos propios que estimulan la producción de autoanticuerpos. El TNF  $\beta$  es uno de los factores solubles que pueden inducir o incrementar la expresión de genes del MHC clase II en algunas células. Se ha establecido que existen fragmentos polimórficos de longitud variable (RFLP) en este *locus* y no se conoce si estos fragmentos codifican una región o una variación en la secuencia regulatoria los cuales podrían ocasionar diferencias funcionales en la inducción del gene del TNF- $\beta$  o en su eficiencia en inducir la expresión clase II en la respuesta inmunológica dada por las células T, la variación en los efectos del TNF podría ejercer una fuerte influencia en la autoinmunidad (narcolepsia asociada a DRw15) (Kuntz, 1989 y Lechler, 1994).

6. **Características genéticas.**- Algunas enfermedades tienen una forma recesiva de heredarse. Algunos de los genes involucrados son HLA-B y DR. (hemocromatosis idiopática, SIDA asociado a HLA-B35) (Scorza, 1986).

**7. Presencia de estructuras vecinas.-** Se han encontrado copias dobles de genes que codifican cerca del HLA. Estos genes caen en desequilibrio y se manifiesta la asociación con la enfermedad (21-hidroxilasa, hemocromatosis congénita asociada con HLA-A3) (Lechler, 1994).

**8. Asociación con genes DR.-** Esta asociación podría reflejar la influencia de los genes que operan a diferentes niveles interactuando en la determinación de ciertas características clínicas de la enfermedad. Para la artritis reumatoide (AR) asociada a los grupos serológicos HLA-DR4 y HLA-DR1 se ha creado la hipótesis de que una tercera región de alta variabilidad (HVR) de los genes DR $\beta$ 1\*0401, \*0404, \*0405 y DR $\beta$ \*01 es al menos, parte responsable para la susceptibilidad genética a AR. Un modelo hipotético del sitio de unión de las moléculas clase II indica que los residuos 67 a 74 de la cadena  $\beta$  son localizados en el propuesto sitio de unión. De esta manera, la expresión de una secuencia común asociada a AR podría permitir uno o más antígenos propios para ser presentados a las células T cooperadoras (TCD4) iniciando una respuesta inmunológica que conlleve a la enfermedad (Jeannet, 1989; Kuntz, 1989 y Lechler, 1994).

**Cuadro 5. Asociación HLA-Enfermedad (Juárez, 1990).**

ENFERMEDAD	RAZA	RIESGO RELATIVO
<b>Artritis Reumatoide</b>		
B27	C	2.0
Bw54	O	2.5
DR4	O	2.8
DR4	N	5.4
<b>Artritis Reumatoide Juvenil</b>		
B27	C	3.9
DR5	C	3.3
<b>Espondilitis Anquilosante</b>		
B27	C	69.1
B27	O	207.9
B27	N	54.5
<b>Uveítis Anterior Aguda</b>		
B27	C	8.2
<b>Enfermedad de Reiter</b>		
B27	C	37.1
<b>Diabetes Mellitus Juvenil</b>		
B8	C	2.6
B15	C	2.2
DR3	C	2.4
DR4	C	3.7
Bw54	O	5.7
DR3	O	4.9
DR4	O	2.6
B8	N	2.5
B15	N	2.2
DR3	N	3.2
DR4	N	6.7
<b>Enfermedad de Graves</b>		
B8	C	2.6
DR3	C	3.8
B35	C	4.4
<b>Lupus Eritematoso Sistémico</b>		
B8	C	2.8
DR3	C	2.7
<b>Síndrome de Goodpasture</b>		
DR2	C	13.8

RR=Riesgo relativo  
C=Caucásico  
O=Oriental

ENFERMEDAD	RAZA	RIESGO RELATIVO
<b>Esclerosis Múltiple</b>		
B7	C	1.9
DR2	C	2.8
<b>Miastenia Gravis</b>		
B8	C	3.4
<b>Narcolepsia</b>		
DR2	O	358.1
DR2	C	129.8
<b>Enfermedad Cellaca</b>		
B8	C	7.7
DR3	C	11.7
DR7	O	7.7
<b>Pemfigus Vulgaris</b>		
A26	CJ	4.9
B38	CJ	4.6
DR4	CJ	14.7
<b>Psoriasis Vulgaris</b>		
B13	C	4.1
B17	C	5.3
B37	C	4.0
Cw6	C	7.5
DR7	C	3.3
B13	O	3.0
B17	O	2.0
B37	O	8.5
Cw6	O	8.5
DR7	O	7.7
<b>Dermatitis Herpetiformes</b>		
B8	C	9.9
DR3	C	17.3
<b>Enfermedad de Behcet</b>		
B5	C	3.8
B5	O	4.6
<b>Hemocromatosis Idiopática</b>		
A3	C	6.8
B7	C	3.0
B14	C	2.8
<b>Síndrome de Sjögren</b>		
B8	C	3.3
Dw3	C	5.8

N=Negro  
J=Judío

## TUBERCULOSIS

### DEFINICIÓN

La Tuberculosis Pulmonar (TbP) es una enfermedad infecciosa generalizada, aunque el sitio de infección primaria son los pulmones, puede transmitirse por diversas vías e infectar los huesos, el bazo, las meninges, los riñones y la piel (Bloom, 1994).

La TbP es causada por *Mycobacterium tuberculosis* y provoca lesiones inflamatorias, formación de tubérculos y necrosis caseosa y que el organismo al tratar de lograr una defensa contra la agresión bacteriana, produce un granuloma (Reichman, 1993).

La TbP es la más frecuente y está asociada a la inhalación de los agentes causales provenientes de sujetos infectados, quienes por lo general, los liberan al ambiente a través de sus numerosos accesos tusígenos (Bloom, 1994 y Reichman, 1993).

### EPIDEMIOLOGÍA

La tuberculosis es una enfermedad en la que se encuentran involucrados una gran cantidad de factores que la favorecen, el bacilo es sólo uno entre muchos más como el hacinamiento, desnutrición, infecciones concomitantes, inmunodeficiencia, entre otros. Ataca con mayor frecuencia al adulto joven en la época en que es más productivo (Reichman, 1993 y Olvera, 1994).

La OMS ha estimado recientemente que alrededor de 2000 millones de personas están infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* y cada año 10 millones desarrollan tuberculosis en una forma reconocida y 3 millones mueren de esto (Bloom, 1994 y Reichman, 1993).

En México, la TbP es un problema de salud pública por la incapacidad que provoca en las personas que la padecen así como por los métodos preventivos no controlados que en lugar de detenerla, la incrementan (Olvera, 1994 y Terán, 1992).

### PATOGENIA

Generalmente, el bacilo penetra al organismo humano por el aparato respiratorio inferior al ser inhalado el material infectante. Los aerosoles son muy pequeños y esto les permite permanecer en el ambiente sin secarse, así, quedan suspendidos durante largos periodos y se diseminan ampliamente prolongando el peligro de contagio (Bloom, 1994 y Torres, 1994).

Al ser inhalado el bacilo tuberculoso hacia los alvéolos; los macrófagos alveolares ingieren al bacilo y a menudo lo destruyen (Figura 9). La destrucción depende del particular poder microbicida de los macrófagos alveolares y a la virulencia genética y fenotípica del bacilo ingerido. Un bacilo virulento en un macrófago relativamente débil es capaz de multiplicarse e iniciar la enfermedad (Reichman, 1993).

La inmunidad mediada por células (IC), en la cual los antígenos estimulan células T específicas para activar macrófagos, no está involucrada en la destrucción

inmediata de bacilos tuberculosos inhalados debido a que el número de bacilos que son inhalados es mínima y su capacidad antigénica es nula.

Si los primeros macrófagos alveolares fallan al destruir o inhibir a los bacilos inhalados, éstos se multiplican hasta que el macrófago es destruido, de esta manera su carga bacilar es, posteriormente, ingerida por otros macrófagos alveolares y macrófagos inactivos provenientes de la circulación sanguínea que son atraídos al sitio por efecto de los bacilos liberados, los restos celulares y una gran variedad de factores quimiotácticos creados por el huésped (Figura 10).

Los macrófagos inactivados que ingieren a los bacilos liberados desarrollan una relación simbiótica en la cual ni los bacilos ni los macrófagos del huésped se dañan; estos macrófagos no han sido activados y no pueden inhibir o destruir al bacilo y los bacilos no pueden dañar a los macrófagos porque el huésped no ha desarrollado hipersensibilidad a la tuberculina. Esto trae como consecuencia un acumulamiento de macrófagos y bacilos en la lesión; siendo los macrófagos inactivados los responsables de la lesión primaria. Es en este estado de simbiosis que los bacilos se multiplican de manera logarítmica a la misma velocidad tanto en sujetos susceptibles como sujetos resistentes (Dannenberg, 1994).

En un período de 2 a 3 semanas el crecimiento logarítmico se detiene abruptamente y de la misma manera se desarrolla la necrosis caseosa. Los bacilos tuberculosos no pueden multiplicarse en este material caseoso por la falta de oxígeno, el pH reducido y la presencia de ciertos ácidos grasos que los inhiben. Sin embargo, los bacilos pueden sobrevivir por años en el material caseoso sólido; lo que trae como consecuencia que el huésped destruya localmente a su tejido para controlar la

multiplicación intracelular de los bacilos que no ha sido inhibida. Cuando se ha controlado la multiplicación, los macrófagos activados, producidos por la IC, se han acumulado alrededor del foco caseoso y previenen la extensión de la enfermedad (Figura 11).

Los fagocitos mononucleares tienen una producción continua en la lesión tuberculosa caseosa en donde se acumulan desarrollando una respuesta mediada por células T. Es en este punto, que una gran cantidad de antígenos bacilares están presentes y estimulan la producción local de citocinas (Dannenberg, 1994).

En los individuos susceptibles se desarrolla una IC débil, los bacilos tuberculosos liberados del borde del centro caseoso, son fagocitados por macrófagos incompetentes (no activados o parcialmente activados). La hipersensibilidad de tipo retardado (HTR), mediada por células T, detiene la multiplicación bacilar intracelular por lo que el centro caseoso se amplía y el tejido del pulmón es destruido (Bloom, 1994).

Los individuos resistentes desarrollan una IC muy fuerte. Es probable que los antígenos bacilares expandan poblaciones específicas de células T. Estas células, cuando son estimuladas por los mismos antígenos, liberan INF- $\gamma$  y quizás otras citocinas que activan a los macrófagos locales. De esta manera, una gran cantidad de macrófagos se acumulan alrededor del centro caseoso fagocitando y destruyendo a los bacilos que escapan del borde del material caseoso y la destrucción tisular es mínima o nula. Ambos individuos (susceptibles y resistentes) muestran necrosis caseosa; pero sólo los individuos resistentes desarrollan grandes números de macrófagos altamente activados. Desafortunadamente, aún si la IC es fuerte, la progresión de la enfermedad puede ocurrir en los individuos resistentes así como en los susceptibles. Esta

progresión es causada por la licuefacción del material caseoso y la formación de cavidades (Bloom, 1994 y Reichman, 1993).

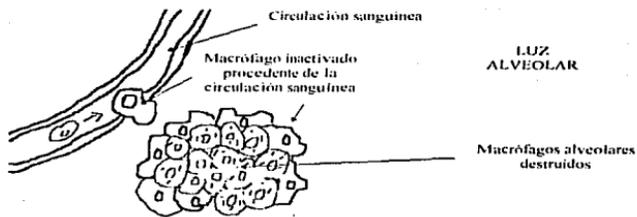
Los macrófagos no sobreviven en el material caseoso licuado, posiblemente porque han sido sensibilizados pasivamente por la tuberculina o por otros antígenos que se encuentran presentes en condiciones elevadas y que pueden ser letales. Tal vez, los macrófagos que entran en el material caseoso licuado son muertos por ciertos ácidos grasos tóxicos originados por las células del huésped o por los bacilos. De esta manera, los macrófagos producidos por una IC bien desarrollada, son completamente inefectivos controlando la multiplicación extracelular de los bacilos (Dannenberg, 1994 y Rook, 1994).

Se desconocen los factores que causan la licuefacción del material caseoso, posiblemente la HTR, generada por células T, se encuentre asociada o podría ser efecto de los elevados niveles de la tuberculina o un elevado número de enzimas hidrolíticas (proteinasas, nucleasas y lipasas) (Bloom, 1994).



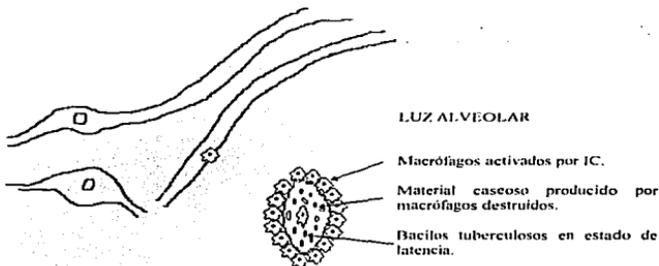
**Figura 9. Fagocitosis de bacilos tuberculosos por macrófagos alveolares activados.**

1) Los macrófagos alveolares interaccionan con los bacilos tuberculosos por ingerir. 2) Se produce la endocitosis del bacilo con la formación del fagosoma. 3) Se estimulan los mecanismos bioquímicos generadores de radicales libres de  $O_2$  dentro del macrófago y se forma el fagolisosoma. 4) Muerte y digestión de los bacilos tuberculosos ingeridos.



**Figura. 10 Multiplicación acelerada de bacilos tuberculosos no destruidos**

Si los macrófagos alveolares fallan al destruir o inhibir a los bacilos inhalados, posiblemente por tratarse de bacilos muy virulentos en macrófagos incompetentes, estos bacilos se multiplican hasta que el macrófago es destruido liberando su carga bacilar, que es posteriormente ingerida por otros macrófagos alveolares y macrófagos provenientes de la circulación sanguínea, que son atraídos al sitio por acción de los mismos bacilos, restos celulares y otros factores quimiotácticos. Se desarrolla una relación simbiótica y se acumulan macrófagos y bacilos en la lesión



**Figura.11 Necrosis caseosa**

Con el paso de las semanas la multiplicación bacilar se detiene de manera abrupta formándose un foco caseoso originado por los macrófagos destruidos. En este material, los bacilos tuberculosos no pueden multiplicarse pero sobreviven por varios años; lo que trae como consecuencia la destrucción local tisular. Los macrófagos activados por la IC, se acumulan alrededor del foco caseoso y previenen la extensión de la enfermedad.

## SÍNDROME DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

### DEFINICIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un síndrome clínico caracterizado por un defecto adquirido en la función inmunitaria (inmunidad celular) con características clínicas diversas, incluidas las infecciones oportunistas recurrentes, ciertos cánceres, pérdida de peso y degeneración del sistema nervioso (Roitt; 1991, Stites, 1993 y Turgeon, 1996).

El agente causal es el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) miembro de la familia de los retrovirus (Barré-Sinoussi, 1996). Por microscopía electrónica, HVI-1 y HVI-2 tienen las características de los lentivirus, con un núcleo proteínico en forma cónica y formado por las proteínas virales *Gag* p25 ó p24. Dentro de la cápsula, o nucleocápsula, existen dos bandas idénticas de RNA con las cuales la polimerasa viral dependiente de RNA (*Pol*, también llamada transcriptasa reversa) y las proteínas de nucleocápsula (p9 y p6) están cercanamente asociadas. La p17 del núcleo proteínico provee la matriz para la estructura viral y es vital para la integridad del virión. Estudios recientes sugieren que la matriz es necesaria para la incorporación de las proteínas *Env* dentro de viriones maduros. La glucoproteína de envoltura de superficie externa 120 (gp120) y la glucoproteína transmembranal 41 (gp41) son transportadas a la superficie celular, en donde sólo partes de las porciones centrales y N-terminales de la gp41 son expresadas sobre la superficie del virión. El virión gp120, localizado en la

superficie viral, contiene el sitio de unión para receptores celulares y el principal dominio neutralizante (Levy, 1993).

El HIV afecta de manera predominante al sistema inmunitario al cual debilita permitiendo así que el individuo sufra infecciones causadas por agentes oportunistas causándoles, posteriormente, la muerte (Stites, 1993, Levy, 1993) (Figura 12).

### *EPIDEMIOLOGÍA*

El SIDA es un problema global de salud con casos documentados en más de 170 países, y una estimación de 10 millones de personas infectadas con HIV en todo el mundo (Barré-Sinoussi, 1996 y Quinn, 1996). En países de Europa y América, la transmisión se lleva a cabo por contacto sexual, administración de sangre o sus derivados contaminados, inseminación artificial con semen infectado (Levy, 1993), exposición a agujas que contengan sangre contaminada, o transmisión de una madre infectada al feto o al niño durante o después del nacimiento (Francis, 1992; Jordan, 1991 y Quinn, 1996).

En África, los casos de SIDA se distribuyen por igual entre hombres y mujeres y se piensa que la transmisión heterosexual es responsable de la mayor parte de los casos (Richter, 1995).

En México la principal vía de contagio es la sexual. Hasta el 1 de abril de 1996, el 84.5% de los casos de SIDA acumulados habían adquirido la infección por contacto sexual; presentándose un patrón cada vez más heterosexual en donde la mujeres

adultas presentan la mitad de todos los casos acumulados (51.6%) y presentando, para el segundo trimestre de 1996, el 75.6 % de los casos (SIDA-ETS 1996).

La epidemia ha presentado tres tipos de tendencia en cuanto a su magnitud :

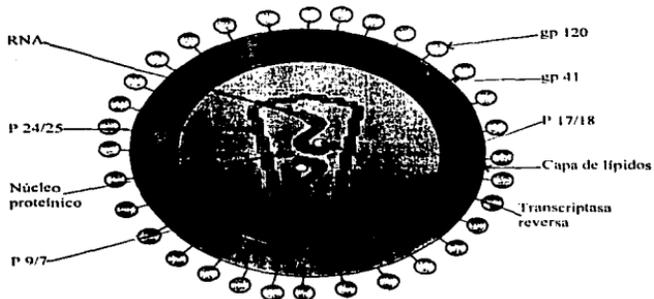
- de 1983 a 1986 el crecimiento fue lento
- de 1987 a 1990 fue de tipo exponencial
- a partir de 1991 ha tenido un crecimiento exponencial amortiguado, con una tendencia a la estabilización (SIDA-ETS, 1996).

El impacto de la epidemia causada por el SIDA se ve parcialmente reflejada en el aumento de la mortalidad de adultos, especialmente entre 25 y 44 años. Durante los segundos trimestres de 1991, 1995 y 1996 la mayor parte de los casos reportados ocurrió en los grupos de heterosexuales, homosexuales y bisexuales de 20 a 49 años (SIDA-ETS, 1996).

De los casos pediátricos acumulados hasta el 1 de julio de 1996, el 60.3% se transmitió por vía perinatal; el 37.7% por transfusión sanguínea y el 2 % por abuso sexual (SIDA-ETS, 1996).

Hasta el 1 de julio de 1996 se contaba con 27 950 casos de SIDA reportados; sin embargo , corrigiendo datos por subnotificación y retraso en la notificación, se cuenta con una estimación real de los casos de 39 939 (SIDA-ETS, 1996).

Del total de casos, 15 948 han fallecido (57.1%); continúan vivos 9 996 (35.8%) y se desconoce la evolución de 2 006 (7.2%) (SIDA-ETS, 1996).



**Figura 12. Estructura de HIV (Matsudaira, 1995).**  
Estructura esquemática del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) mostrando particularmente la localización de algunos de sus componentes.

## PATOGENESIS

La infección por el HIV se produce cuando las partículas virales que van en la sangre y/o el semen de un individuo infectado se unen a las células de un individuo sano. Las glucoproteínas de cubierta gp120 y gp41 son importantes para la infección del HIV. (Stites, 1993 y Levy, 1993).

Por medio de análisis cristalográficos de rayos X, se ha definido que son necesarias tres regiones no contiguas del extremo carboxilo terminal de la gp120 del HIV para unirse a las moléculas CD4. Del mismo modo se ha encontrado que varios residuos del extremo amino terminal, del dominio de la molécula CD4 similar a la Ig V, son muy importantes para la unión (Turgeon, 1996).

Las partículas de HIV que se unen a la molécula CD4 entran en la célula mediante la fusión directa de la membrana viral con la membrana celular del huésped, este proceso es facilitado por la gp41 de la membrana viral. La unión de la gp120 a la molécula CD4 permite a la gp41 insertar su cabeza amino terminal hidrofóbica en la membrana celular adyacente, iniciando la fusión de la envoltura del virus con la célula (Levy, 1993).

Una vez que el virión del HIV entra en la célula comienza el ciclo reproductor. El núcleo proteínico del virus se rompe, el genoma RNA del HIV se transcribe a DNA de doble cadena por acción de la transcriptasa inversa viral, el DNA viral entra en el núcleo en donde por acción de la integrasa viral se produce la integración del DNA viral en el genoma de la célula huésped. Este DNA es llamado provirus y puede permanecer inactivo durante meses o años, con ninguna o poca producción de nuevas proteínas

virales o viriones, y de esta forma la infección de una célula individual por el HIV puede permanecer latente (Stites, 1993).

El inicio de la transcripción genética del HIV en las células T está ligado probablemente a la activación fisiológica de la célula T por el antígeno o por la estimulación por citocinas. Las secuencias de repetición terminal larga (LTR) se encuentran en los extremos de los genes de la estructura viral, estas secuencias están influidas por la estimulación del TCR y por citocinas del huésped. Por ejemplo, las lectinas que se unen al TCR, el TNF y la linfotoxina, estimulan la expresión del gen HIV en las células T; y la IL-1, la IL-3, la IL-6, el TNF, la linfotoxina, el INF- $\gamma$  y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, estimulan la expresión genética del HIV y la replicación viral en los monocitos y en los macrófagos. La estimulación de la transcripción genética del HIV mediante la estimulación del TCR o citocinas, probablemente implica la inducción de factores nucleares que se unen a las secuencias de unión del NF- $\kappa$ B en el LTR viral. Este fenómeno puede ser significativo en la patogenia del SIDA ya sea por la activación fisiológica de una célula T infectada de forma latente en la cual se acaba la latencia y comienza la producción de virus o por las múltiples infecciones que adquieren los pacientes con SIDA lo que provoca una producción elevada de TNF; esto puede estimular la producción de HIV (Stites, 1993 y Levy, 1993).

Tras la transcripción de los genes virales *gag*, *pol* y *env*, las proteínas virales se sintetizan en el citoplasma. El ensamblaje de las partículas virales infecciosas comienza al introducirse los transcritos completos de RNA del genoma proviral dentro del complejo nucleoproteico que incluye a las proteínas del núcleo proteínico *gag* y las

enzimas codificadas por el gen *pol*, necesarias para el siguiente ciclo de integración. Este complejo nucleoproteico se encierra dentro de una envoltura de membrana y sale de la célula brotando de la membrana celular. La producción de virus maduros se asocia con la lisis celular (Levy, 1993 y Bour, 1995) (Figura 13).

La infección por HIV destruye progresivamente a los linfocitos CD4 y el número de células CD8 permanecen constantes aunque, se ven incrementados relativamente a causa de la disminución de los primeros. Con el paso de los meses, e incluso años, los niveles de células CD8 permanecen elevados y el número de células CD4 se incrementa a valores superiores a lo normal. Posteriormente disminuyen lentamente en períodos persistentes (25-40 células/ $\mu$ l al año) lo que ocasiona la alteración de la relación normal CD4 : CD8 (Richter, 1995, Bour, 1995).

Los linfocitos CD4 son relevantes para el buen funcionamiento del sistema inmunológico, interactúan con las células presentadoras de antígeno (CPA), células B, células T citotóxicas y células asesinas naturales (NK). Los linfocitos T CD4 son esenciales para las respuestas inmunitarias celulares y humorales frente a varios microorganismos, la pérdida de estos linfocitos es la razón principal por la que los pacientes con SIDA se hacen susceptibles a muchas infecciones. Sin embargo, los mecanismos que causan la pérdida de células T CD4 no se comprenden del todo (Bour, 1995; Roitt; 1991, Stites, 1993 y Turgeon, 1996).

Se han propuesto varias teorías (Bour, 1995 y Levy, 1993) para explicar la disminución en el número de células T CD4 infectadas y entre estas se encuentran:

1. **Muerte celular por fusión virus-célula.**-Se ha observado la muerte celular por toxicidad directa de parte del virus o proteínas virales de envoltura. Las cantidades

relativas de proteínas vírales de envoltura producidas por la células infectadas con el HIV pueden determinar citopatocidad. Se cree también que los efectos citopáticos del HIV son resultado de las proteínas de envoltura pudiendo reflejar la extensión y tipo de glicosilación de la gp41 que puede ser tóxica para las células, un cambio en la gp viral 41 produce cierta modificación o produce variantes citopáticas. Los mecanismos para la inducción de muerte celular por las proteínas virales de envoltura no son claros. Algunas variaciones en la permeabilidad de la membrana pueden estar involucradas (Levy, 1993).

En algunos estudios realizados *in vitro*, las células infectadas por HIV y que producen citopatocidad, demostraron incapacidad para controlar el flujo de cationes monovalentes y divalentes que se acumulan en la célula con H<sub>2</sub>O. La pérdida de fuerza iónica intracelular no sólo conduce a la muerte celular, sino que origina ciertos niveles no citopáticos que pueden cambiar el potencial eléctrico de la célula y comprometer su función normal (Bour, 1995).

II. **Apoptosis.-** *In vitro*, se ha demostrado que los linfocitos T cooperadores infectados por el HIV mueren por apoptosis. Los linfocitos T cooperadores necesitan dos estímulos para activarse. La primera señal es proporcionada por el péptido antigénico que la célula presentadora de antígeno (CPA) muestra en su superficie en el interior de una hendidura de la molécula clase II del MHC y que es reconocido por el receptor de los linfocitos (TCR); la segunda señal se deriva de la interacción entre la molécula CD4 de la superficie de los linfocitos T y la molécula de clase II del MHC de la CPA. Cuando ambas señales son simultáneas, el linfocito T CD4 queda activado y prolifera para poner en marcha la respuesta inmunológica. Se había

demostrado que un anticuerpo anti-TCR podía actuar como antígeno en este proceso y suministrar la primera de las dos señales necesarias para activar a un linfocito T cooperador. Un segundo anticuerpo dirigido contra la molécula CD4 podría complementar la activación y de esta manera "engañar" a los linfocitos T cooperadores y que éstos se comporten como si hubieran encontrado el antígeno extraño contra el cual actúan (Cohen, 1994). Se piensa que la primera señal fue interpretada como una señal de alarma y puso en estado de alerta el programa de suicidio celular apoptótico, que posteriormente acabó activándose por efecto de la segunda señal.

La molécula CD4 de los linfocitos T cooperadores es el receptor del HIV porque es capaz de unirse a la gp120 de la cápsula del virus. Se cree que la gp120 podría suministrar las dos señales que requieren los linfocitos T cooperadores para activarse (Nagata, 1995).

Las personas infectadas con el HIV son portadoras desde el inicio de la infección de una de las dos señales activadoras, con lo que cualquier patógeno, un virus gripal por ejemplo, podría proporcionar la segunda señal, que, al estar separada de la primera, en lugar de activar una respuesta inmunitaria, podría activar un programa de suicidio celular o apoptosis (Levy, 1993).

**III. Superantígenos.-** El HIV podría tener un péptido que actúe como superantígeno que pueda reconocer a los linfocitos T CD4 en alguna porción de su TCR. Algunos investigadores suponen que los péptidos virales se unen a las cadenas  $\beta$  de dicho receptor. Este fenómeno podría programar la muerte celular por el proceso de apoptosis (Levy, 1993).

**IV. Recubrimiento de células CD4 no infectadas con la gp 120.-** Posiblemente el linfocito T CD4 que ha sido cubierto con la gp120 no está disponible para actuar con las moléculas HLA clase II de las células presentadoras de antígeno (CPA), lo que traería como consecuencia la inhibición de la respuesta de células T. De esta manera las células no infectadas son reconocidas como células infectadas siendo destruidas por células efectoras NK, que realizan la lisis celular de manera no específica y sin estar restringidas por el MHC, o linfocitos T citotóxicos (CD8) que pueden contribuir con la lesión tisular de algunas enfermedades. El reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos (CD8) involucra la interacción con moléculas MHC clase I, los antígenos de superficie en la célula nativa y el receptor de células T. Las células T CD8 requieren de dos señales para activarse. Una de ellas está dada por la interacción de los receptores de la célula T CD8 para el antígeno con un complejo de un epitopo extraño y el MHC sobre la célula infectada por el virus. La segunda señal está proporcionada por la IL-2, producida por la célula activada, que libera citotoxinas que acaban con la célula infectada. Si las células T CD4, no infectadas, se encuentran cubiertas con la gp120, los linfocitos T CD8 se activan, se da el reconocimiento antigénico y se destruye a la célula (Bour, 1995, Levy, 1993).

Del mismo modo, la unión de la gp120 al linfocito T CD4 podría reducir la expresión superficial de varias moléculas necesarias para la activación de la célula T como por ejemplo: la propia CD4.

**V. Efecto de las proteínas virales y complejos inmunes.-** Se ha demostrado que las proteínas virales de envoltura tienen efectos inmunosupresores en la respuesta mitogénica de linfocitos T o sobre la actividad normal de células NK. En lo que

respecta a la función de células B, la gp120 podría interferir con la cooperación normal de células T bloqueando sus sitios de contacto. La proteína Tat puede suprimir la respuesta de células CD4 para reconocer antígenos. La formación de complejos virales antígeno-anticuerpo podría limitar el sistema reticuloendotelial, afectando la producción de citocinas y de esta manera afectar la función inmune (Bour, 1995).

**VI. Anticuerpos anti-linfocitos.-** En estudios experimentales realizados con HIV se han detectado anticuerpos contra linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8. Algunos de estos anticuerpos podrán resultar de una respuesta anti-MHC inducida por las proteínas del HIV. Golding y colaboradores (1993), han demostrado que algunos anticuerpos para la secuencia c-terminal en la gp41 del HIV tienen reacción cruzada con regiones de HLA, particularmente con la cadena  $\beta$ . Los anticuerpos contra las proteínas de la molécula HLA clase II se encuentran únicamente en individuos infectados con HIV. Estos anticuerpos se unen a los antígenos HLA clase II naturales e interfieren con la activación normal de las células T CD4 (Bour, 1995).

**VII. Efecto de las citocinas.-** Los macrófagos producen IL-1 y otras citocinas que permiten que las células CD4 alcancen niveles de maduración suficientes para producir IL-2, necesaria para la auto estimulación de células CD4 y para el crecimiento y función de las células CD8. La IL-6 actúa en el crecimiento y función de células B y la IL-4 para la maduración de células T. Se ha postulado que la IL-4 induce la apoptosis inhibiendo la función de otras citocinas (TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en macrófagos) que previenen la muerte celular programada en algunas células. El TNF- $\alpha$  ayuda a mantener el balance en la producción de una gran mayoría de

citocinas pero, por sí misma, puede ser citotóxica para las células T y puede inducir apoptosis. Para un gran número de investigadores, el TNF- $\alpha$  es la causa principal de los síntomas clínicos y la patología de HIV (Livingstone, 1996).

Otras células susceptibles a la infección por HIV incluyen fibroblastos de piel humana, líneas celulares fibroblastoides derivadas de músculo y médula ósea, células de trofoblastos, monocitos, macrófagos, células de la microglia, células de Langerhans, células dendríticas foliculares, células B, células de retina, células de la mucosa del colon, células adrenales fetales y líneas celulares de carcinoma humano de hígado (Levy, 1993).

## TUBERCULOSIS Y VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

La pandemia causada por la infección del HIV y la evidencia de una asociación entre el HIV y la Tuberculosis Pulmonar (TbP), ha causado importantes aumentos de la TbP en algunos países en los cuales ésta se encontraba erradicada. Debido a que el HIV inhabilita el sistema inmune, éste ha emergido como el factor de riesgo más importante en el progreso de la infección por TbP (Reichman, 1993).

Es muy evidente que las enfermedades oportunistas asociadas con HIV desarrollan niveles diferentes de inmunocompetencia decadente (Bloom, 1994 y Suzuki, 1996). La TbP, que es una de las más virulentas, es, a menudo, la primera infección que se presenta (Reichman, 1993).

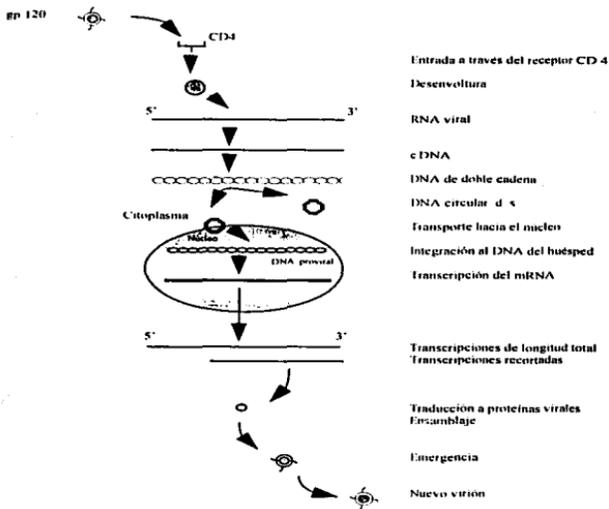
Se sabe que la TbP pulmonar, por sí sola, es inmunosupresora y causa una depresión en el conteo sanguíneo de CD4 (Bloom 1994 y Reichman 1993).

De los pacientes con SIDA en América Latina, del 20 - 30% , tienen tuberculosis (Reichman 1993), la TbP, como una infección oportunista, aparece relativamente en el curso de una infección por HIV y en áreas donde la infección por HIV es común, una elevada proporción de los casos de tuberculosis son coinfección con HIV (Quinn, 1996).

Debido al aumento en la resistencia de la TbP a los fármacos en personas con SIDA, se incrementa el riesgo de una infección primaria con *Mycobacterium tuberculosis*. La resistencia múltiple se encuentra fuertemente asociada con el SIDA y con la seropositividad a HIV (Beck-Sague, 1992).

#### **CÉLULAS T COOPERADORAS (Th1 / Th2) Y SU RELACIÓN CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y SIDA.**

En 1986 , Mosmann y colaboradores reportaron que clones de células T CD4 murinas podrían ser clasificadas en dos grupos, Th1 y Th2, basándose en las citocinas que éstas producían y sus actividades funcionales. Actualmente se sabe que las células Th1 producen interleucina 2 (IL-2), interferón gama (INF- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ) y que las células Th2 se definieron por su producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13; ambos tipos celulares (Th1 y Th2) producen IL-3, TNF- $\alpha$  y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); del mismo modo, las células Th0 se caracterizan por la producción de citocinas de los tipos Th1 y Th2 y son los precursores de las células Th1 y Th2, las células que producen grandes cantidades de factor transformante de crecimiento-beta (TGF- $\beta$ ) (Mosmann, 1996).



**Figura 13 Patogénesis del HIV (Stites, 1993).**

La gp 120 se une a la molécula CD4 de la superficie de una célula T. Por acción de la gp 41 se fusiona la envoltura del virus con la célula. El virión del HIV entra en la célula, el núcleo proteínico se rompe y el RNA se transcribe a DNA de doble cadena por acción de la transcriptasa inversa; el DNA viral entra al núcleo y se integra en el genoma de la célula huésped, se introducen las transcripciones del RNA al complejo nucleoproteico y por acción de los genes gag, pol y env este complejo se encierra en una envoltura de membrana y sale de la célula provocando lisis celular.

Se ha observado en humanos y en modelos murinos *in vivo* que las características de expresión genética de las citocinas son predominantemente del tipo Th1 o Th2. Estas observaciones han demostrado que el INF- $\gamma$  y la IL-4 ejercen efectos contrarios que pueden abarcar desde el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas en las células B, una gran variedad de actividades funcionales de los macrófagos hasta el desarrollo de perfiles de citocinas de las células T. Actualmente está bien establecido que el INF- $\gamma$  y la IL-12 pueden promover la producción de INF- $\gamma$  y la IL-4 promueve la síntesis de IL-4 y otras citocinas Th2 por acción de las células T *in vivo* e *in vitro*. Es ampliamente evidente que estos patrones de citocinas son importantes en la mediación de resistencia o susceptibilidad a una gran variedad de agentes infecciosos (Kelso, 1995).

El concepto de la respuesta inmunológica de las células Th1 y Th2 ha llegado para jugar un papel central en el campo de la inmunidad a infecciones. En modelos murinos de leishmaniasis y lepra se ha observado el papel protector de las células de respuesta Th1 y el efecto inhibitorio dado por las células de respuesta Th2. En infecciones helmínticas a humanos y roedores, la respuesta inmunológica inicia en dirección a Th2, la cual parece ser más protectora para el huésped y se ha observado la tendencia a disminuir la regulación de respuesta de tipo Th1 (Liblau, 1995 y Kelso, 1995).

En la malaria, se encuentran ambos tipos de respuesta inmunológica y, parece ser también, que ambos confieren protección (Liblau, 1995).

Algunos estudios han indicado que la mayoría de las clonas de células CD4 reactivas contra *Mycobacterium tuberculosis* que han sido propagadas *in vitro*, son

semejantes a Th1, produciendo elevadas concentraciones de INF- $\gamma$  y bajas concentraciones de IL-4 e IL-5. En otros estudios se ha demostrado que tales clonas de células T secretan INF- $\gamma$  e IL-4 o incluso que dichas clonas producen ambos tipos de citocinas. Th1 y Th2 incluyendo INF- $\gamma$ , IL-2, IL-5 e IL-10. Se piensa que los macrófagos alveolares fagocitan a las micobacterias y producen IL-12 favoreciendo el desarrollo de células Th1 (Tossi, 1996 y Barnes, 1994).

Britton publicó ciertos hallazgos sugiriendo que el HIV no induce un cambio en el fenotipo de las células TH1 a las del fenotipo Th2. Ameisen y Lu argumentan que la anergia de las células T, en estados avanzados de la enfermedad, podría dar como resultado una disminución dinámica de las células T CD4 funcionales (Th1 y Th2) por la apoptosis inducida por el virus y por la ineficiencia del cambio de Th0 a Th1 debido a un defecto en la producción de IL-12 por células accesorias, tales como los macrófagos infectados (Andrieu, 1995).

Clerici y Shearer han indicado el papel central de la respuesta Th1 y Th2 en el curso de la infección con HIV y SIDA. Han sugerido que la respuesta de tipo Th1 confiere protección asociándose con una mejor prognosis, mientras que el cambio de respuesta de Th1 a Th2 está asociada con una peor prognosis. Betwich y colaboradores encontraron en inmigrantes etíopes que el sistema inmunológico está altamente activado con características Th2 y Th0. Los autores sugieren que este tipo de activación inmunológica facilita la infección por HIV y esto influye en el curso de la infección (Bentwich, 1995).

## RELACIÓN DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y SIDA CON HLA

La respuesta protectora contra *Mycobacterium tuberculosis* está mediada primeramente por los linfocitos T CD4 y los fagocitos mononucleares. La fagocitosis de la bacteria trae como consecuencia el procesamiento proteolítico de los antígenos bacterianos para producir péptidos pequeños que se puedan unir a las moléculas del MHC clase II y generar una respuesta inmune ya que las proteínas antigénicas son reconocidas como péptidos antigénicos por los linfocitos T sólo si vienen unidas a las moléculas del MHC.

En lo que respecta a la patología ocasionada por el HIV se ha propuesto que primeramente, el monocito y el macrófago entran en contacto con el virus fagocitándolo y procesándolo de manera que sea reconocido por las células T. Los antígenos virales unidos a las moléculas del MHC clase II son presentados a los linfocitos CD4 para su reconocimiento por medio del TCR y, posteriormente, su procesamiento. La gp120 se une a la molécula CD4 de la superficie de una célula T y por acción de la gp41 se fusiona la envoltura del virus con la célula. El virión del HIV entra en la célula, el núcleo proteínico se rompe y el RNA se transcribe a DNA de doble cadena por acción de la transcriptasa inversa; el DNA viral entra al núcleo y se integra en el genoma de la célula huésped, se introducen los transcritos del RNA al complejo nucleoproteico y por acción de los genes *gag*, *pol* y *env* este complejo se encierra en una envoltura de membrana y sale de la célula provocando lisis celular. Sin embargo, existen indicios de activación de circuitos inmunosupresores, como la acción de las citocinas, que podrían influenciar la expresión de ambas patologías (TbP y SIDA) (Stites, 1993; Levy, 1993 y Roitt, 1991).

El reconocimiento celular restringido por células T, la respuesta inmune a varios antígenos de origen microbiano, viral o parasitario y los genes de HLA, podrían jugar un papel significativo en la regulación genética de susceptibilidad a una infección. En particular, se han encontrado asociaciones entre TbP y SIDA con los *loci* de HLA en muchas poblaciones; en caucásicos, africanos y orientales se ha demostrado la asociación de TbP con el marcador DR2 y DQ1 como uno de los factores genéticos predisponentes a la enfermedad. Sin embargo, la variabilidad étnica de las asociaciones entre alelos particulares de HLA clase II y TbP interfieren en el entendimiento de los mecanismos involucrados en dicha patología (Livingstone, 1996, Rajalingam, 1996 y Susuki, 1996).

No existe todavía un marcador inmunológico o serológico que pueda identificar pacientes con HIV en los cuales la TbP va a desarrollarse eventualmente, se piensa que factores genéticos asociados con los fenotipos de HLA podrían jugar un papel en el desarrollo de SIDA y la susceptibilidad a ciertas enfermedades oportunistas. En homosexuales caucásicos con Sarcoma de Kaposi se ha encontrado una significancia importante con el marcador DR5. Otros investigadores han sugerido que el marcador DR3 confiere cierta resistencia a la enfermedad y otros han encontrado una asociación muy fuerte con DR1 (Kuntz, 1989 y Klein, 1987).

**OBJETIVOS  
E  
HIPOTESIS**

## OBJETIVO GENERAL

- \* Definir el papel que juegan los marcadores genéticos del MHC en la susceptibilidad o resistencia a tuberculosis pulmonar (TbP).

## OBJETIVOS PARTICULARES

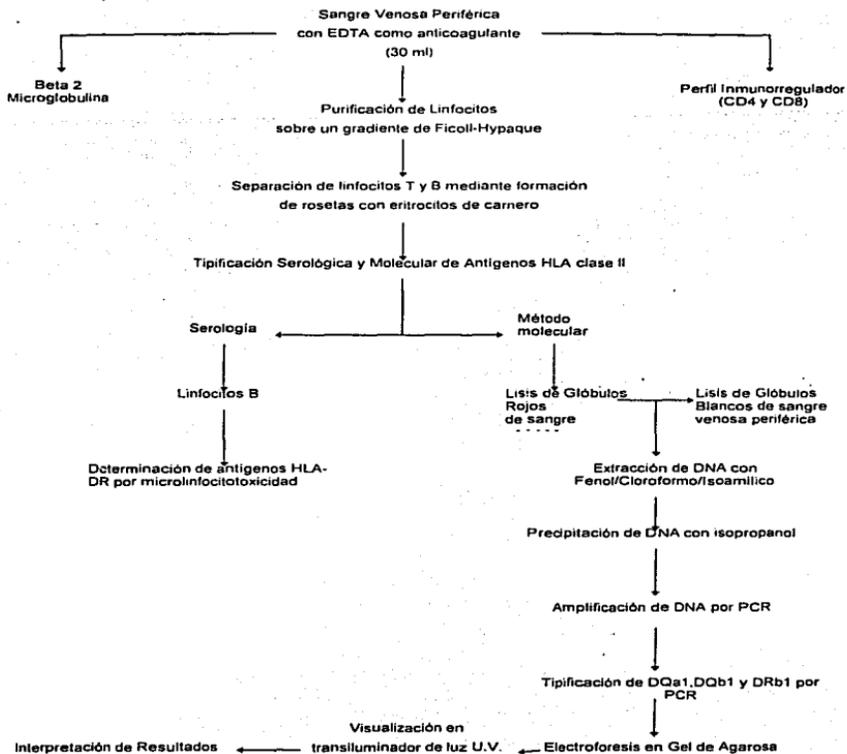
1. Determinar por medio de métodos serológicos (microcitolinfotoxicidad) y métodos moleculares (PCR), los antígenos HLA clase II (DR; DQ), que se encuentran asociados a TbP y HIV en sujetos enfermos y sanos de la misma etnia (mestizos mexicanos).
2. Comprobar que los métodos moleculares confieren resultados más exactos y precisos en la tipificación de moléculas HLA clase II ya que identifica subtipos de HLA DR $\beta$ 1, DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1 que no pueden ser detectados por serología.
3. Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en los grupos a estudiar, comparándolos con controles sanos, para determinar la relación de ambos en la patología en cuestión (TbP y HIV).

## HIPÓTESIS

" Determinando los antígenos del MHC clase II (HLA-DR $\beta$ 1, DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1) en individuos sanos y enfermos, con características étnicas semejantes (mestizos mexicanos), identificaremos el o los marcadores genéticos de susceptibilidad o resistencia ligados a tuberculosis pulmonar (TbP).

**MATERIAL  
Y  
MÉTODOS**

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## **A) Material Biológico:**

### **1.- Población en Estudio:**

Se tomó sangre periférica por punción venosa a 34 pacientes con tuberculosis pulmonar, 31 pacientes HIV positivos con manifestaciones clínicas de SIDA y 10 pacientes con tuberculosis pulmonar - SIDA. A todos los pacientes se les informó acerca del proyecto pidiéndoles su anuencia para la donación de la muestra sanguínea y debido a que no se trató de un procedimiento invasivo ni perjudicial para el paciente no fue necesario firmar un consentimiento por escrito. Para seleccionar a los pacientes adecuados para este proyecto se contó con la colaboración de los médicos residentes y médicos adscritos al servicio clínico No. 2 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), quienes facilitaron las historias clínicas con las que los pacientes fueron evaluados. La patología de cada grupo fue confirmada por PCR y BAAR (para Tuberculosis pulmonar) y ELISA e Inmunoelctrotransferencia (para HIV); así como 208 testigos sanos residentes del D.F. (mestizos mexicanos) con BAAR y ELISA negativos.

#### **• CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

##### **⇒ Tuberculosis:**

- ◊ Basioscopia positiva
- ◊ ADA en líquido pleural

##### **⇒ HIV:**

- ◊ ELISA e Inmunoelctrotransferencia positivos
- ◊ Pacientes infecciosos comprobados por cultivo de lavado bronquial ó biopsia transbronquial *in situ* o a cielo abierto.

**⇒ Tuberculosis pulmonar - HIV:**

- ◊ ELISA e Inmunoelctrotransferencia positivos
- ◊ Baciloscopia positiva y/o PCR positivo para tuberculosis
- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**
- ◊ No ser mestizos mexicanos por abolengo; es decir, que no tengan más de tres generaciones viviendo en México.
- ◊ Diagnóstico poco preciso de complicaciones en pacientes seropositivos
- ◊ Falta de consentimiento del paciente

A todos los sujetos del estudio se les realizó  $\beta$ -2m por ELISA (normal  $<2.5\mu\text{g/dl}$ ) y HLA clase II por microlinfocitotoxicidad que posteriormente se confirmó por PCR.

Las diferencias de los resultados entre los distintos grupos fueron analizados mediante la siguiente prueba estadística:

- Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ).

Dentro del material biológico también se utilizaron:

2.- *Sangre venosa periférica con EDTA como anticoagulante.*

3.- *Suero de conejo como fuente de complemento.*

4.- *Glóbulos rojos de camero.*

5.- *Linfocitos totales ajustados a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml con RPMI complementado con SFT al 20%*

6.- *Panel de referencia dirigidos a especificidades de Clase II obtenidos de placentas de mujeres multíparas, tipificados en EUA.*

**B) Material de vidrio y plástico:**

- Se encuentra indicado en el texto.

**C) Reactivos:**

- Se indican en el texto.

**D) Equipo:**

- Potenciómetro (Beckman)
- Parrilla de calor graduable y agitación constante (Thermolyne)
- Baño de agua. Modelo 180 (Precision)
- Balanza granataria de dos platos (Ohaus)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss)
- Microscopio invertido con condensador de contraste de fases (Carl Zeiss)
- Fuente de poder, lectura digital 250V (GIBCO)
- Campana de flujo laminar horizontal (Veco)
- Microfuga. Modelo 5415C (Eppendorf)
- Equipo para PCR. Modelo 480 (Perkin-Elmer)
- Equipo de electroforesis horizontal minisubmarino (Hoefer)
- Transiluminador de luz UV onda corta (UVP)
- Cámara polaroid DS-34 (Kodak)
- Bomba de vacío (Sorensen)

## PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS TOTALES

En la mayoría de las pruebas realizadas en el laboratorio de histocompatibilidad se utiliza un tipo particular de células o componentes de la sangre periférica (suero, granulocitos, linfocitos totales, linfocitos T y B, células mononucleares, eritrocitos, plaquetas y monocitos). Su aislamiento y purificación se basa en propiedades intrínsecas y extrínsecas de cada uno de estos componentes. Entre las propiedades intrínsecas se encuentra el tamaño, la densidad, la viscosidad, adhesividad y granularidad. Entre las extrínsecas están la expresión de marcadores de la superficie celular de receptores y capacidad fagocítica.

Una de las técnicas más usadas actualmente en el laboratorio es la separación de células mononucleares con soluciones de una densidad dada, usando Ficoll-Hypaque, la cual tiene una densidad de 1.077 g/ml que es idéntica a la de los linfocitos y monocitos. Este reactivo es una combinación de un polímero de sacarosa de alto peso molecular (Ficoll) y un compuesto orgánico yodado (diatrizoato de sodio; 3-5 bis acetilamino-2,4,6 ácido triyodobenzóico). Cuando se centrifuga la sangre en el gradiente de Ficoll-Hypaque, los granulocitos y eritrocitos que tienen una mayor densidad, pasan a través de éste formando un paquete en el fondo del tubo. Las plaquetas que tienen una densidad menor permanecen en la fracción plasmática y los mononucleares se localizan en la interfase. Cuando quedan en la interfase algunas plaquetas se pueden eliminar posteriormente centrifugando a baja velocidad (Tak Yan Yu, 1973; Stites, 1993; Ávila, 1989 y Juárez, 1990).

**Método:**

1. Se obtuvo la muestra por punción venosa (20 ml) empleando EDTA al 5% como anticoagulante.
2. Se separó 1 ml de la muestra para la técnica de subpoblaciones y el resto de la muestra se centrifugó a 1042 g durante 5 minutos para separar el plasma que se empleó en la determinación de beta 2-microglobulina por el método de ELISA.
3. Se diluyó la sangre con solución salina fisiológica (SSF) (PISA) en relación 2:1.
4. Se adicionaron 2.5 ml de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed) en tubo de vidrio.
5. Se homogeneizó la sangre diluida perfectamente y se agregó cuidadosamente por las paredes del tubo con la solución separadora, evitando que se mezclaran ambas fases.
6. Se centrifugó a 430 g durante 30 minutos y con la ayuda de una pipeta Pasteur se recolectó la banda de leucocitos que se localiza cerca de la interfase y se colocaron en un tubo de vidrio.
7. Se lavaron los linfocitos tres veces con SSF, centrifugando a 1042 g durante 5 minutos con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de Ficoll-Hypaque y plasma.
8. Se contaron las células en cámara de Neubauer ajustándolas a  $4 \times 10^6$  cel/ml para obtener de esta manera, la concentración adecuada de células para cada pozo.

## SEPARACIÓN DE CÉLULAS T Y B MEDIANTE LA FORMACIÓN DE ROSETAS

La formación de rosetas es uno de los métodos empleados para aislar linfocitos mediante su asociación con eritrocitos de carnero. Los linfocitos T humanos presentan receptores CD2 (LF3) que se unen perfectamente con los eritrocitos de carnero y al combinarse forman una roseta característica. Las células T se sedimentan al pasarse por gradientes de Ficoll y los linfocitos B, que carecen de estos receptores, permanecen en la interfase de donde son recuperados (Indiveri, 1979 y Stites, 1993).

### *Método :*

1. Se lavaron los glóbulos rojos de carnero (GRC) tres veces con SSF y se ajustaron al 2% con RPMI 1640 complementado con suero fetal de ternera (SFT) al 20 %.
2. Se mezclaron los linfocitos purificados con los GRC ajustando ambas concentraciones y se incubaron en baño María a 37 °C durante 15 minutos.
3. Se agitaron suavemente y se incubaron a 4°C durante 24 horas.
4. Se mezcló la suspensión suavemente y se depositó en gradientes de Ficoll centrifugando a 430 g durante 30 minutos.
5. Se separaron los linfocitos B, que permanecen en la interfase, y se lavaron tres veces con RPMI 1640 complementado con SFT 20% centrifugando a 1042 g durante 5 minutos. Se comprobó la pureza de linfocitos B con doble roseteo.

6. Se resuspendió el botón celular en la mínima cantidad de RPMI complementado con SFT 20% (80  $\mu$ l) y se sembró en las placas con antisueros específicos para HLA clase II.

## CONSERVACIÓN DE LINFOCITOS POR CONGELACIÓN

La criopreservación de linfocitos es un método excelente para el almacenamiento por largos períodos manteniendo el pH y la esterilidad.

El uso de células congeladas le da gran flexibilidad al laboratorio de HLA, pues reduce la necesidad de tomar muestras continuas de los donadores de panel celular y permite hacer estudios retrospectivos de individuos que no se pueden volver a muestrear. También esto permite repetir estudios y hacer líneas celulares de linfocitos B o clonas de linfocitos T.

Entre las técnicas que existen para la congelación de células se encuentra una automatizada y una manual. La automatizada requiere de un equipo especial que permite ir congelando células en una forma controlada y a una velocidad de disminución de 1-2  $^{\circ}$ C/min lo cual es óptimo para los linfocitos preparados en medio dimetilsulfóxido (DMSO).

El método manual es útil cuando se usan células que se deseen preservar con fines de cultivo de mezcla de linfocitos, linfocitos para la tipificación HLA, conservación de líneas celulares, o para guardar células con el fin de extraer DNA. Este método requiere almacenar las células a  $-70^{\circ}$ C en congeladores o a  $-196^{\circ}$ C en tanque de nitrógeno.

La criopreservación requiere de un pretratamiento de las células con un agente protector (el dimetilsulfóxido {DMSO} o la glicerina). Si no se usan estos agentes, los linfocitos pueden sufrir daño por diversos mecanismos: un enfriamiento lento causa daño por disminución o pérdida de agua intracelular, resultando en una elevada concentración de sales, mientras que, un enfriamiento rápido causa destrucción por la formación de cristales de hielo dentro de la célula. La inclusión de DMSO en el medio, sirve para reducir el tamaño de los cristales de hielo intracelulares así como la concentración de solutos. El DMSO suele ser citotóxico a los linfocitos a temperatura ambiente por lo que las células se deben meter en frío minimizando el tiempo en que éstas estén expuestas al criopreservador (Barrocci, 1984).

*Método:*

1. Se colocó en un vaso de precipitado hielo seco picado y se enfriaron dos viales para congelación.
2. Se adicionó 1 ml de las células previamente contadas y a la dilución adecuada ( $2 \text{ a } 8 \times 10^8$  células/ml).
3. Se preparó la mezcla de congelación de la siguiente manera: Por cada ml de suspensión celular se preparó 1 ml de mezcla tomando 0.9 ml de RPMI complementado con SFT 20% y 0.1 ml de DMSO.
4. Se agregó 1 ml de la mezcla de congelación a cada vial y se adicionó el ml de suspensión celular sobre la mezcla cuidadosamente formando una interfase.
5. Se invirtieron los viales lentamente para que ambas capas se mezclaran.

6. Se congelaron durante una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se pasaron a  $-72^{\circ}\text{C}$ .

### DESCONGELAMIENTO DE LINFOCITOS

1. Se preparó el baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Se sacó el vial del congelador y se sumergió en el baño María agitando suavemente.
3. Se vació el contenido a un tubo de ensaye cuando desaparecieron totalmente los cristales de hielo, se agregó solución salina y se agitó suavemente.
4. Se centrifugó a 1042 g durante 5 minutos y se repitió dos veces el proceso de lavado.
5. Se decantó el sobrenadante, y se resuspendieron las células en 1ml de solución salina para obtener el porcentaje de viabilidad utilizando azul de tripan.
6. Si las células iban a ser procesadas para la tipificación de HLA clase I y II se resuspendían en medio RPMI complementado con SFT al 20%. Si se iba a extraer DNA se tomó la cantidad necesaria y se procesaron.

**Nota-** El porcentaje de células viables se encontró entre un 80 y 92%.

### TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS HLA CLASE II POR MICROLINFOCITOTOXICIDAD

El método fue desarrollado por Paul Terasaki en 1964 y fundamentalmente se llevan a cabo reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y lisis por complemento.

La prueba de microlinfocitotoxicidad se usa para delinear el perfil HLA de un individuo, usando un grupo de sueros anti-HLA bien caracterizados. La

linfocitotoxicidad es una reacción dependiente del complemento en la que los linfocitos se incuban primero con un antisuero y después con una fuente de complemento fresco de conejo que se mantiene a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La unión de anticuerpo anti-HLA al antígeno que se halla sobre la superficie de la célula activa a la cascada de complemento, el cual finalmente daña a la membrana de la célula. El daño se visualiza por la incorporación de un colorante vital a la célula como la eosina amarillenta. Cuando un anticuerpo se pega y mueren más del 50% de células se considera que el antígeno HLA está presente (Moses, 1992).

*Método :*

1. Se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de aceite mineral a cada uno de los pozos de las placas Terasaki (de 72 pozos Robbins Scientific) para que no se evaporaran los antisueros.
2. Se sembró 1  $\mu\text{l}$  de los sueros de referencia con microjeringa Hamilton múltiple (AH Robbins) en cada pozo (especificidades DR1 a DR10).
3. Se adicionó 1  $\mu\text{l}$  de la suspensión de linfocitos en cada pozo de la placa que corresponde utilizando una jeringa Hamilton sencilla (AH Robbins), y se mezclaron con un agitador vórtex (Maxi-Mix II, Thermolyne) para que el suero y las células estuvieran en contacto.
4. La placa se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.
5. Se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de suero de conejo como fuente de complemento a cada pozo utilizando la jeringa Hamilton múltiple y se agitó suavemente en vórtex evitando que se saliera el complemento (C) de los pozos.

6. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el fin de que se activara el complemento y se produjera la lisis.
7. Se agregaron 5 µl de eosina amarillenta y se dejaron reposar durante 10 minutos.
8. Se agregaron 5 µl de formalina neutralizada al 40% y se dejaron fijar las células durante 30 minutos.
9. Se colocaron los cubreobjetos sobre la placa y se guardaron en refrigeración hasta su lectura.
10. Se leyeron en microscopio invertido con condensador de contraste de fases (Carl Zeiss), se valoró el número de células vivas y muertas y se reportaron los resultados con base al siguiente criterio establecido por Paul Terasaki en relación a sus experimentos :

<b>Mortalidad celular :</b>	<b>Calificación :</b>	<b>Interpretación:</b>
0-10	1	Negativo
11-20	2	Negativo
21-30	4	Dudoso
31-80	6	Positivo
81-100	8	Positivo

## DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4 Y CD8

Los dos subgrupos de células T (CD4 y CD8), se cuantifican mejor mediante el uso de anticuerpos monoclonales unidos a un fluorocromo. El uso de fluorocromos de dos colores distintos, acoplados cada uno a un anticuerpo particular, permite la fluorescencia simultánea de dos colores en células individuales.

Se aísla una suspensión de células de sangre u otros tejidos, y se marca con un anticuerpo fluorescente u otro fluorocromo y las células teñidas pueden ser observadas en un microscopio de epi-fluorescencia o bien valorada mediante citometría de flujo (Stites,1993).

### *Método:*

1. Se colocaron 10  $\mu$ l (1:20) del anticuerpo monoclonal CD4 (clona MT 310) y CD8 (clona DK25) (Dakko) en tubos de ensayo.
2. Se agregaron 50  $\mu$ l de sangre. se agitaron en vórtex y se incubaron a 4°C durante 30 minutos en completa oscuridad.
3. Se agregó 1 ml de solución de lisis de glóbulos rojos agitando suavemente e incubando 10 minutos en oscuridad.
4. Se adicionó solución amortiguadora de fosfatos a cada tubo y se centrifugó a 1042 g durante 10 min. Se repitió el proceso tres veces.
5. Se fijó la muestra agregando 10  $\mu$ l de formol al 37 % y se colocó en un portaobjetos; teniendo cuidado de sellar el cubreobjetos con barniz.

6. Se realizó el recuento de células fluorescentes y células no fluorescentes.

**Nota-** Las condiciones de oscuridad son esenciales para el proceso.

## **DETERMINACIÓN INMUNOENZIMÁTICA DE BETA 2-MICROGLOBULINA HUMANA**

El ensayo inmunoenzimático (Enzygnost beta 2-Microglobulin micro, Behring) está basado en el principio de competición para la determinación *in vitro* de la beta 2-microglobulina humana.

En la reacción inmunológica la beta 2-microglobulina de la muestra compete con la que se encuentra en el conjugado beta 2-m/POD para fijarse sobre los anticuerpos contra beta 2 -m adheridos a la superficie de la placa de microtitulación. El exceso de conjugado se elimina por lavado y se determina actividad enzimática. La intensidad cromática es inversamente proporcional a la concentración de beta 2-microglobulina y se determina fotométricamente a 492 nm.

## **EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA**

El aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) a partir de fuentes biológicas consiste de tres pasos fundamentales:

1. Lisis de la membrana celular
2. Inactivación de las nucleasas celulares
3. Separación del ácido nucleico deseado a partir de desechos celulares.

Actualmente existen varias metodologías que permiten la obtención del DNA partiendo de diferentes fuentes como por ejemplo: gotas de sangre seca, semen, tumores, cabellos, tejidos antiguos, entre otros. Sin embargo la fuente más empleada para obtener DNA es la sangre periférica. En este caso el primer paso es la eliminación de eritrocitos mediante un choque hipotónico para dejar limpios a los leucocitos. Posteriormente se lisan los leucocitos para liberar el DNA. La lisis puede llevarse a totalidad utilizando detergentes iónicos como el SDS. Alternativamente se puede hacer una lisis con detergentes no iónicos como el NP-40 o el Tritón X-100. En este caso se obtienen núcleos que se lisan posteriormente usando SDS.

En ambos casos la eliminación de proteínas y nucleasas se logra incubando el DNA liberado con proteinasa K y efectuando extracciones orgánicas o mediante el empleo de perclorato de sodio y extracciones orgánicas.

Generalmente la extracción del ácido nucleico a partir del lisado celular necesita el empleo de disolventes orgánicos muy potentes como es el caso del fenol/cloroformo que separa al ácido nucleico dejándolo en la fase acuosa y al resto de los componentes celulares, incluyendo proteínas, las mantiene en la fase orgánica. El procesamiento de la muestra requiere de más de dos horas y se emplean grandes volúmenes de muestra y reactivo (Du, 1993).

**Método:**

1. Se tomaron 30 ml de sangre periférica con ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) como anticoagulante (no usar heparina porque inhibe las enzimas de restricción).

2. Se centrifugaron a 1042 g durante 5 minutos.
3. Se tomó la capa de blancos de la superficie del paquete y se pasaron a un tubo de 10-15 ml.
4. Se llenó el tubo con 8-10 ml de amortiguador de lisis para glóbulos rojos mezclando cuidadosamente (Ver apéndice 1).
5. Se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos.
6. Se eliminó el sobrenadante de los eritrocitos lisados.
7. Se añadieron nuevamente 8-10 ml de solución de lisis.
8. Se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4°C.
9. Se descartó el sobrenadante.
10. Se resuspendió el botón de células blancas en 1ml de solución salina de citratos (SSC) 1X (Ver apéndice 1).
11. Se añadieron 4ml del amortiguador de lisis para glóbulos blancos (Ver apéndice 1).
12. Se dejó incubando toda la noche a 53°C en baño María.

#### **EXTRACCIÓN CON FENOL/CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO:**

##### *Método:*

1. Se añadió un volumen equivalente (V/V) de una solución de fenol saturado (Ver apéndice 2).
2. Se agitó 10 minutos manualmente de manera suave hasta la obtención de una emulsión.

3. Se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4°C.
4. Al terminar, se colocaron los tubos en hielo y se tomó la fase superior para pasarla a un tubo limpio (No tomar la interfase).
5. Se hizo una segunda extracción con fenol saturado y, nuevamente, se pasó la fase superior a un tubo limpio.
6. Se hicieron dos extracciones con fenol/cloroformo (v/v) centrifugando a 1500 g durante 15 minutos a 4°C.
7. Se pasó la fase superior a un tubo limpio.
8. Se hizo una última extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v) (Ver apéndice 2).
9. Se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4°C.
10. Se pasó la fase superior a un tubo nuevo.

#### PRECIPITACIÓN CON ISOPROPANOL ABSOLUTO:

*Método:*

1. Se agregó al DNA extraído en 5 ml de solución, 170 ml de NaCl 3M ó 100 ml de NaCl 5M para obtener una concentración final de 100 mM, más un volumen de isopropanol absoluto.
2. Se agitó suavemente durante 20 minutos hasta que precipitó el DNA.
3. Se recogió el DNA flotante con una varilla de vidrio con la punta curvada.

4. Se lavó 10 veces, sumergiendo la punta con el DNA y sacándola, en etanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
5. Se secó el DNA en la varilla colocándola de forma invertida.
6. Cuando ya no hubo exceso de etanol, se resuspendió en 1 ml de agua libre de DNasa y RNasa dejando la punta de la varilla con el DNA dentro del agua del tubo y retirándola cuidadosamente cuando el DNA empezó a hidratarse y a resbalar por la varilla.
7. Se dejó al DNA en agitación continua a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 2 ó 3 horas para que se resuspendiera completamente.
8. Se leyó a 260 nm para obtener la concentración de DNA. La lectura se multiplicó por 50 y se expresó en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Puede leerse todo el DNA o hacerse una dilución (1:100 ó 1:50).

### AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para la amplificación enzimática de secuencias específicas de DNA (Barrera, 1993 y Bell, 1989). La técnica de PCR tiene la capacidad de sintetizar millones de copias de una secuencia específica de DNA (Lew, 1992 y Eisestein, 1990).

La especificidad de la técnica está basada en dos iniciadores de oligonucleótidos que flanquean el segmento de DNA que va a ser amplificado e hibridizado en los segmentos opuestos (Eisestein, 1990 y Neviny, 1991).

**Método:**

**Preparación de las muestras para ser amplificadas:**

**I. Mezcla de amplificación para DQ-alfa:**

Agua destilada estéril	Varía en función a la cantidad de DNA a adicionar
Solución amortiguadora PCR 10X	10 $\mu$ l
Mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Perkin-Elmer)	10 $\mu$ l (2.5 $\mu$ l de cada nucleótido)
Ampli Taq DNA polimerasa	0.5 $\mu$ l
Iniciador GH27	1.0 $\mu$ l **
Iniciador GH26	1.0 $\mu$ l ***
DNA humano	1.0 $\mu$ l (500 ng/100 $\mu$ l)

⇒ Para evitar la pérdida de la muestra durante el ciclo de amplificación se adicionaron 100  $\mu$ l de aceite mineral a cada tubo.

**o Ciclo de amplificación:**

1. Desnaturalización 96°C 1 minuto
2. Alineación (35 ciclos )  
96°C 1 minuto  
60°C 30 segundos  
72°C 1 minuto
3. Extensión 72°C 5 minutos

\*\* Ver secuencias de amplificación genérica en apéndice 3

Al finalizar, se dejaron las muestras a 4°C para proceder a verificar la amplificación por medio de electroforesis.

## II. Mezcla de amplificación para DQ-beta:

Agua destilada estéril	Varía en función a la cantidad de DNA a adicionar
Solución amortiguadora PCR 10X	10 µl
Mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Perkin-Elmer)	10 µl (2.5 µl de cada nucleótido)
Ampli Taq DNA polimerasa	0.5 µl
Iniciador GH29	2.0 µl**
Iniciador DB130	2.0 µl**
DNA humano	1.0 µl (500 ng/100 µl)

⇒ Para evitar la pérdida de la muestra durante el ciclo de amplificación se adicionaron 100 µl de aceite mineral a cada tubo.

### ◊ Ciclo de amplificación:

- |                            |                |
|----------------------------|----------------|
| 1. Desnaturalización       | 94°C 1 minuto  |
| 2. Alineación (35 ciclos ) | 94°C 1 minuto  |
|                            | 60°C 1 minuto  |
|                            | 72°C 1 minuto  |
| 3. Extensión               | 72°C 5 minutos |

Al finalizar, se dejaron las muestras a 4°C para proceder a verificar la amplificación por medio de electroforesis.

\*\* Ver secuencias de amplificación genérica en apéndice 3.

### III. Mezcla de amplificación para DR-beta:

Agua destilada estéril	Varía en función a la cantidad de DNA a adicionar
Solución amortiguadora PCR 10X	10 $\mu$ l
Mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Perkin-Elmer)	10 $\mu$ l (2.5 $\mu$ l de cada nucleótido)
Ampli Taq DNA polimerasa	0.5 $\mu$ l
Iniciador GH 50	2.0 $\mu$ l***
Iniciador CRX 11	2.0 $\mu$ l**
DNA humano	1.0 $\mu$ l (500 ng/100 $\mu$ l)

⇒ Para evitar la pérdida de la muestra durante el ciclo de amplificación se adicionaron 100  $\mu$ l de aceite mineral a cada tubo.

#### 0 Ciclo de amplificación:

1. Desnaturalización 94°C 1 minuto
2. Alineación (30 ciclos )  
94°C 1 minuto  
55°C 1 minuto  
72°C 1 minuto
3. Extensión 72°C 5 minutos

Al finalizar, se dejaron las muestras a 4°C, se retiró el aceite con mucho cuidado procediendo a verificar la amplificación por medio de electroforesis.

---

\*\* Ver secuencias de amplificación genérica en apéndice 3.

## TIPIFICACIÓN DE LOS LOCI HLA DQ-ALFA, DQ-BETA Y DR-BETA POR AMPLIFICACIÓN CON PRIMER SECUENCIA ESPECIFICA (PCR-SSP)

La serología era el método primordial con el que se contaba para la determinación de las especificidades de los alelos HLA clase I y II, sin embargo no era posible determinar todos los fenotipos polimórficos de las subregiones de cada clase de alelos (I y II) del sistema HLA humano.

Actualmente, los métodos de biología molecular, en particular PCR, han permitido determinar la variabilidad genética de la mayoría de los alelos de HLA ya que el método de PCR puede ser utilizado específicamente para amplificar una región seleccionada de DNA (Rajalingam, 1996 y Riisom, 1988).

La mayoría del polimorfismo de las cadenas alfa y beta de los *loci* HLA clase II se encuentra localizado en el segundo exón que codifica para el dominio N-terminal. Las moléculas HLA-DQ presentan un elevado polimorfismo en ambas cadenas (alfa y beta) y un estrecho desequilibrio de enlace con la región DR, lo que hace que la tipificación de ambas subregiones necesite de métodos más específicos para la determinación de tal polimorfismo (Gao, 1990 y Olerup, 1993).

El método se basa en un iniciador cuya secuencia es totalmente complementaria a la del DNA molde. Este procedimiento fue introducido por Olerup y colaboradores para la tipificación de los alelos de todos los *loci* HLA DR, DQA, DQB así como de los alelos del subgrupo DR4.

Los iniciadores se diseñan y las condiciones se ajustan para que se amplifiquen con gran sensibilidad y especificidad alelos o grupos de alelos. La asignación de las

especificidades está basada en la presencia o ausencia del producto amplificado, el cual se visualiza en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta. Es un método con elevada resolución y los iniciadores utilizados son específicos para identificar la variabilidad del segundo exón (Rudert, 1992, Olerup, 1993 y Salazar, 1992).

I. Mezcla de iniciadores:

- HLA-DR $\beta$ 1 (5 mezclas de iniciadores) \*\*\*
- HLA-DQ- $\alpha$ 1 (12 mezclas de iniciadores\*\*\*\*)
- HLA-DQ- $\beta$ 1 (14 mezclas de iniciadores)\*\*\*\*\*
- 

Método:

1. Se tomaron 10  $\mu$ l de cada mezcla de iniciadores en tubos individuales de reacción para PCR.
2. Se adicionaron 100 ng de la muestra de DNA.
3. Se adicionaron 50  $\mu$ l de aceite mineral.
4. Se mantuvo el bloque del Termociclador a 72° C y se adicionaron 1.0 unidades de enzima Taq polimerasa (Perkin-Elmer).
5. Se mantuvo a 72° C durante 10 minutos.
6. Se empezó el ciclo de amplificación:

◊ Parámetros del ciclo:

- |                     |       |             |
|---------------------|-------|-------------|
| • Desnaturalización | 94° C | 50 segundos |
| • Alineamiento      | 60° C | 50 segundos |

---

\*\*\* Ver las secuencias en apéndice 4.

- Extensión 72° C 50 segundos
- Ciclos 35
- Al finalizar los ciclos se dejaron las muestras a 72° C durante 5 minutos

7. Al terminar el proceso, se retiró con mucho cuidado el aceite de las muestras y se procedió a la visualización en electroforesis.

### ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis consiste en mover partículas cargadas (iones) dentro de un campo eléctrico. El desplazamiento ocurre en un medio líquido sostenido por una sustancia sólida inerte. El líquido, una solución amortiguadora con pH y fuerza iónica conocidos, sirve como medio conductor de electricidad en el momento en que se aplica un voltaje externo.

Los geles semisólidos de agarosa y poliacrilamida constan de cadenas poliméricas ligadas entre sí confiriéndoles una consistencia porosa en la que sustancias de peso molecular elevado (proteínas, DNA ó RNA) pueden ser purificados y observados sin ser dañados al pasar por el gel (Roitt, 1991, Stites, 1993 y Turgeon, 1996).

#### *a) Preparación del gel:*

1. Se preparó una solución de agarosa al 1.8 % con amortiguador TAE (Tris-base, Ácido acético glacial y EDTA 0.25 M, pH 8.0) 1x (Ver apéndice 2).
2. Se disolvió la mezcla en baño María.



3. Se dejó enfriar la solución hasta que alcanzó una temperatura de 40-50 °C.
4. Se colocó el peine en la charola para el gel sellando los extremos con cinta adhesiva.
5. Se vertió la mezcla en la charola quitando las burbujas dejando solidificar el gel a temperatura ambiente.
6. Se retiraron la cinta adhesiva y el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis utilizando como solución amortiguadora de corrimiento TAE 1x.

*b) Electroforesis:*

Los pozos deben quedar del lado del cátodo.

1. Para montar las muestras se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora TAE 1X teñida con azul de bromofenol y 5  $\mu\text{l}$  de la muestra.
2. Se calentaron las muestras durante 10 minutos a 65° C y se dejaron enfriando en hielo durante 5 minutos.
3. Se centrifugó en microcentrifuga a 24 000 g durante 1 minuto.
4. Se colocaron cuidadosamente las muestras en cada pozo.
5. Se aplicó una corriente de 80 volts durante 45 minutos a 2 horas.
6. Se sacó el gel de la cámara teniendo cuidado de no romperlo.
7. Se colocó en un recipiente con 250  $\mu\text{l}$  de TAE y 20  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio, a una concentración de 10 mg/ $\mu\text{l}$ , protegiéndolo de la luz durante 30 minutos.
8. Se colocó el gel en el transiluminador en presencia de luz UV para tomar fotografías.  
Es indispensable utilizar lentes de seguridad.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se determinaron las frecuencias antigénicas (FA), génicas (FG), desequilibrio de enlace (D), "chi" cuadrada ( $\chi^2$ ) y el riesgo relativo (RR) para cada antígeno HLA (Avila, 1989, Robles, 1984 y Rodríguez, 1990).

- a) La frecuencia antigénica (FA) es la proporción de sujetos del total, que son portadores de un determinado antígeno.
- b) La frecuencia génica (FG) se calcula a partir de la FA la cual se toma en números absolutos mediante la fórmula de Haldane cuya expresión es la siguiente:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - A}$$

- c) Desequilibrio de enlace (D)- indica la diferencia entre la frecuencia haplotípica esperada y la observada.

$$D = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+c)(c+d)}{n^2}}$$

n= Tamaño de muestra.

a= Número de individuos con ambos antígenos del haplotipo en cuestión.

b= Número de individuos con uno de los antígenos del mismo haplotipo.

c= Número de individuos con el otro antígeno del haplotipo en cuestión.

d= Número de individuos que no poseen los antígenos del haplotipo.

La comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes, se efectúa, generalmente, mediante cuadros de contingencia de 2 x 2: de las cuales se calcula tanto el Riesgo Relativo (RR) como la  $\chi^2$  de una muestra de pacientes, a fin de comparar sus FA con las de una población normal.

**CUADRO DE CONTINGENCIA 2 x 2**

	Antígeno HLA positivo	Antígeno HLA negativo	Totales
<b>Pacientes</b>	a	b	a+b
<b>Controles sanos</b>	c	d	c+d
<b>Totales</b>	a+c	b+d	N

a = Número de pacientes con el antígeno de interés.

b = Número de pacientes sin el antígeno de interés.

c = Número de controles sanos con el antígeno de interés.

d = Número de controles sanos sin el antígeno de interés.

N = Número de muestras.

Para determinar la asociación de los antígenos HLA con una enfermedad y su significancia estadística, se calcula el riesgo relativo (RR) y la chi cuadrada corregida

por Yates para aquellos antígenos cuya frecuencia antigénica es mayor que la de ese antígeno en la población testigo

La prueba de  $\chi^2$  nos indica si la probabilidad de asociación es debida al azar o bien significativa; mientras menor sea el valor de la probabilidad ( $<0.05$ ), mayor es el significado de la asociación.

$$\chi^2 = (ad-bc-N^2) N / (a+b) (c+d) (a+c) (b+d)$$

El riesgo relativo (RR) indica cuántas veces es más frecuente la enfermedad en individuos portadores del antígeno respecto de los que carecen de éste. Un RR  $>1$  indica que el antígeno es más frecuente en los pacientes que en los controles, mientras que un RR  $<1$  indica asociación negativa. El valor de  $\chi^2$  ayuda a determinar que tan significativa es la asociación HLA-enfermedad.

$$RR = (ad)/(cb)$$

## RESULTADOS

Se diagnosticaron 75 pacientes, los cuales fueron agrupados de la siguiente manera: 34 sujetos con tuberculosis pulmonar, 31 sujetos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y 10 sujetos con SIDA y TbP. A todos los pacientes se les realizó tipificación de HLA clase II por métodos serológicos y métodos moleculares basados en PCR.

La distribución de las frecuencias génicas en un grupo de pacientes y sus testigos sanos, obtenidas de la tipificación serológica, se muestran en el Cuadro 6. Podemos observar que los antígenos más frecuentes son los siguientes:

Tuberculosis: DR2 (39.62%), DR5 (37.73%), DQ1 (56.60%) y DQ3 (75.47%).

SIDA: DR2 (45.16%), DR5 (64.51%), DQ1 y DQ3 (67.74%)

Tuberculosis-SIDA: DR2 (58.33%), DR5 (41.66%).

Al realizar el análisis estadístico (chi cuadrada  $\{\chi^2\}$ ), de los antígenos de mayor frecuencia, observamos que no hay diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan con sus testigos sanos.

Al definir posibles combinaciones entre los antígenos HLA-DR y DQ, se encontraron los haplotipos DR2, DR5, DQ1, DQ3 en TbP y SIDA que se muestran en los Cuadros 7 a 21. Únicamente la combinación DR2/DQ3, perteneciente al grupo de pacientes tuberculosos, muestra asociación estadísticamente significativa ( $\chi^2=5.038$ , RR=11.0, p=0.017) (Cuadro 16).

Por otro lado, las frecuencias génicas del grupo de pacientes obtenidas por tipificación a nivel molecular y sus testigos sanos, se presentan en la Cuadro 22. Al

comparar las frecuencias de los diferentes grupos de enfermos y sus testigos sanos, observamos que los alelos más frecuentes son los que se indican a continuación:

**Tuberculosis:** DQ $\alpha$ 1-0101 (69.6%), -0501 (45.4%), DQ $\beta$ 1-0501 (39.3%), -0604 (12.1%), DR $\beta$ 1-1101 (25.3%), -1501 (52.9%).

**SIDA:** DQ $\alpha$ 1-0101 (38.7%), -0501 (41.9%), DQ $\beta$ 1-0302 (39.3%), -0501 (39.3%), DR $\beta$ 1-1101 (46.6%), -1501 (26.6%).

El análisis estadístico nos revela que los siguientes alelos presentan una diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo testigo.

- Tuberculosis: DQ $\alpha$ 1-0101 ( $X^2=29.7$ , RR=11.4, p=0.0001), DQ $\beta$ 1-0501 ( $X^2=22.05$ , RR=5.52, p=0.0001), DR $\beta$ 1-1501 ( $X^2=26.01$ , RR=11.0, p=0.0001) (Cuadros 23, 25, 32).
- SIDA: DQ $\alpha$ 1-0101 ( $X^2=4.0$ , RR=2.7, p=0.045), DR $\beta$ 1-1501 ( $X^2=4.36$ , RR=3.4, p=0.037), DR $\beta$ 1-1101 ( $X^2=15.41$ , RR=6.6, p=0.0001) (Cuadros 27, 33, 34).

Al analizar las posibles combinaciones entre los alelos generados para los *loci* DR $\beta$ 1, DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1 sólo se observó desequilibrio de enlace en las asociaciones DR $\beta$ 1 1101/1501 ( $X^2=4.11$ , RR=0.21, p=0.043) y DQ $\alpha$ 1-0101/0501 ( $X^2=4.71$ , RR=0.18, p=0.030) de pacientes con tuberculosis pulmonar (Cuadros 36 y 38).

Los pacientes con TbP-SIDA no presentaron resultados que aportaran valores de significancia por lo que solamente se observan sus frecuencias génicas (Cuadro 22).

El ligero aumento en las subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos (CD8) en pacientes con TbP y la disminución de linfocitos T cooperadores (CD4) en los pacientes con SIDA no son indicativos de una relación con dichas patologías (Cuadro 40).

Sólo 6 de los 34 pacientes con Tbp y 10 de los 31 pacientes con SIDA presentaron un ligero aumento en la concentración de beta 2-microglobulina, datos que no aportaron valores de importancia.

**Cuadro 6. Frecuencias Génicas de HLA-DR y DQ obtenidas de la tipificación serológica a sujetos inmunodeficientes y sus testigos sanos.**

FRECUENCIA GÉNICA				
	TbP (n=34)	SIDA (n=31)	TbP-SIDA (n=10)	Testigos sanos
DR1	0 0992	0 495	-	0 075
DR2	0 2229*	0 2594*	0 3544*	0 145
DR3	0 1532	0 0841	0 0871	0 078
DR4	0 1204	0 1201	0 0425	0 174
DR5	0 2108*	0 4042*	0 2362*	0 156
DR6	0 0094	0 0495	-	0 059
DR7	0 1204	0 0495	0 1339	0 099
DR8	0 0287	0 0495	0 1339	0 032
DR9	0 0384	-	0 0425	0 022
DR10	0 0483	0 0162	0 0425	0 015
DRX	0 0094	-	-	0 146
DQ1	0 3412	0 4320	0 1834	0 325
DQ2	0 1644	0 0841	0 1834	0 174
DQ3	0 5047*	0 4320*	0 1834	0 293
DQ4	0 0287	0 0162	0 4220	-
DQX	0 1532	0 2170	0 1339	-

El cuadro 6 muestra la frecuencia génica de los antígenos HLA-DR y DQ en todos los individuos que participaron en el estudio. La proporción de todos los antígenos clase II fue similar en los testigos sanos y en el total del grupo de pacientes. DR2 y DR5 mostraron un ligero aumento al compararse con los testigos sanos (F. Génica 14 5% en los testigos sanos contra 22 3% en los pacientes con Tbp ( $\chi^2 = 0 017$ , RR= 1 0, p= 1 0) y 26% en los pacientes con SIDA ( $\chi^2 = 0 033$ , RR= 1 0, p= 0 05) ). Sin embargo, este aumento no es significativo de susceptibilidad o resistencia a cualquiera de estas patologías.

**Cuadros de Contingencia para el Análisis Serológico de los Antígenos HLA clase II más Frecuentes**

**Cuadro 7 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR2**

<b>Tuberculosis</b>	<b>DR2+</b>	<b>DR2-</b>	<b>Totales</b>
<b>Pacientes</b>	21	32	53
<b>Testigos sanos</b>	82	126	208
<b>Totales</b>	103	158	261

$X^2 = 0.017$

$p = 0.4694$

$RR = 1.0$

N.S

**Cuadro 8 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR5**

<b>Tuberculosis</b>	<b>DR5+</b>	<b>DR5-</b>	<b>Totales</b>
<b>Pacientes</b>	20	33	53
<b>Testigos sanos</b>	78	130	208
<b>Totales</b>	98	163	261

$X^2 = 0.0161$

$p = 0.6360$

$RR = 1.0$

N.S

Cuadro 9 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DQ1

Tuberculosis	DQ1+	DQ1-	Totales
Pacientes	30	23	53
Testigos sanos	114	88	202
Totales	144	111	255

$X^2 = 0.017$

$p = 0.05$

RR = 1.0

N.S

Cuadro 10 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DQ3

Tuberculosis	DQ3+	DQ3-	Totales
Pacientes	40	13	53
Testigos sanos	152	50	202
Totales	192	63	255

$X^2 = 0.021$

$p = 0.1040$

RR = 1.0

N.S

**Cuadro 11 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR2**

<b>SIDA</b>	<b>DR2+</b>	<b>DR2-</b>	<b>Totales</b>
<b>Pacientes</b>	14	17	31
<b>Testigos sanos</b>	94	114	208
<b>Totales</b>	108	131	239

$X^2 = 0.033$

$p = 0.0593$

$RR = 1.0$

**N.S**

**Cuadro 12 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR5**

<b>SIDA</b>	<b>DR5+</b>	<b>DR5-</b>	<b>Totales</b>
<b>Pacientes</b>	20	11	31
<b>Testigos sanos</b>	134	74	208
<b>Totales</b>	154	85	239

$X^2 = 0.0364$

$p = 0.0602$

$RR = 1.0$

**N.S**

Cuadro 13 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DQ1

SIDA	DQ1+	DQ1-	Totales
Pacientes	21	10	31
Testigos sanos	137	65	202
Totales	158	75	233

$$X^2 = 0.0463$$

$$p = 0.0633$$

$$RR = 1.0$$

N.S

Cuadro 14 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DQ3

SIDA	DQ3+	DQ3-	Totales
Pacientes	21	10	31
Testigos sanos	137	65	202
Totales	158	75	233

$$X^2 = 0.0463$$

$$p = 0.0633$$

$$RR = 1.0$$

N.S

Cuadro 15 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR2/DQ1

Tuberculosis	DR2/DQ31+	DR2/DQ31-	Totales
Pacientes	11	18	29
Testigos sanos	10	12	22
Totales	21	30	51

$$X^2 = 0.685$$

$$p = 0.800$$

$$RR = 0.73$$

N.S

Cuadro 16 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR2/DQ3

Tuberculosis	DR2/DQ3+	DR2/DQ3-	Totales
Pacientes	20	20	40
Testigos sanos	1	11	12
Totales	21	31	52

$$X^2 = 5.038$$

$$p = 0.017$$

$$RR = 11.0$$

S

Cuadro 17 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR5/DQ1

Tuberculosis	DR5/DQ1+	DR5/DQ1-	Totales
Pacientes	13	16	29
Testigos sanos	7	16	23
Totales	20	32	52

$\chi^2 = 0.596$

$p = 0.440$

RR = 1.8

N.S

Cuadro 18 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR5/DQ3

Tuberculosis	DR5/DQ3+	DR5/DQ3-	Totales
Pacientes	13	27	40
Testigos sanos	6	6	12
Totales	19	33	52

$\chi^2 = 0.581$

$p = 0.317$

RR = 0.48

N.S

Cuadro 19 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR2/DQ1

SIDA	DR2/DQ1+	DR2/DQ1-	Totales
Pacientes	8	14	22
Testigos sanos	6	5	11
Totales	14	19	33

$$X^2 = 0.388$$

$$p = 0.459$$

$$RR = 0.47$$

N.S

Cuadro 20 Análisis Serológico de los Antígenos HLA- DR5/DQ1

SIDA	DR5/DQ1+	DR5/DQ1-	Totales
Pacientes	16	6	22
Testigos sanos	4	5	9
Totales	20	11	31

$$X^2 = 1.167$$

$$p = 0.217$$

$$RR = 3.3$$

N.S

Cuadro 21 Análisis Serológico de los Antígenos HLA-DR5/DQ3

SIDA	DR5/DQ3+	DR5/DQ3-	Totales
Pacientes	4	7	21
Testigos sanos	6	4	10
Totales	20	11	31

$\chi^2 = 0.002$

$p = 1.00$

N.S

RR = 1.3

Cuadro 22. Frecuencias génicas de HLA-DR(1), DQ(1) Y(1) I obtenidas por tipificación molecular de sujetos inmunodeficientes y sus testigos sanos.

DQ(1)	TbP	SIDA	TbP-SIDA	Testigos	DQ(1)	TbP	SIDA	TbP-SIDA	Testigos	DR(1)	TbP	SIDA	Testigos
0101	0.4494*	0.2170	0.2929	0.094	0.201	0.1206	0.0667	0.2929	0.157	1101	0.1251	0.2676*	0.057
0102	-	0.0667	0.1339	0.089	0.202	-	-	-	-	1102	0.0299	0.0108	0.015
0103	0.0152	0.0109	-	0.015	0.011	0.1471	0.0881	0.2929	0.142	1103	0.0188	-	-
0104	0.0289	0.0109	0.1339	-	0.002	0.2214	0.1967	0.2929	0.200	1104	0.1088	0.0008	0.021
0201	0.0625	0.0841	-	0.105	0.015	0.0365	0.0495	-	-	1201	-	0.0513	-
0301	0.0954	0.0495	-	-	0.01	-	-	-	0.005	1202	-	0.0008	-
0302	0.0307	-	0.1339	-	0.01	0.0984	0.1806	-	-	1203	-	0.0008	-
0401	0.0468	0.0841	-	0.142	0.002	0.0367	0.0162	-	0.142	1204	-	-	-
0501	0.2614	0.2170	0.2929	0.154	0.001	0.2214*	0.1806	0.2929	0.052*	1501	0.314*	0.1436*	0.047
0601	0.0625	0.1619	0.1339	-	0.002	0.0367	0.0162	-	0.026	1502	-	-	0.015
06	0.0307	0.0427	-	-	0.003	-	0.0495	-	0.042	1503	-	-	-
					0.001	0.0468	0.1201	-	-	1504	-	-	-
					0.002	0.0168	0.0162	-	0.078	1601	0.0299	0.1136	-
					0.003	-	0.0127	-	0.015	1602	0.0188	0.0008	0.015
					0.004	0.0625	0.0495	-	0.015	1603	-	-	-
					0.005	-	-	-	-	16	0.0299	0.0513	-
					0.008	-	-	-	-				
					0.01	-	0.0841	-	-				

El cuadro 22 muestra la frecuencia génica (F G) de los alelos HLA-DQ(1)-DQ(1)1 y DR(1)1 en los individuos involucrados en el estudio

La mayoría de los alelos correspondientes a los genes HLA clase II presentan una proporción similar en los testigos sanos y en el total de el grupo de pacientes con excepción de los alelos marcados con un astensco que fueron significativamente elevados al compararse con sus testigos sanos. Este es el caso de HLA-DQ(1)\*0101 (F G = 9.4% en Testigos sanos (T s) contra F G = 44.94%,  $X^2 = 29.7$ ,  $p = 0.0001$  en pacientes con tuberculosis pulmonar (TbP) ) HLA-DQ(1)\*0501 (F G = 5.2% en T s contra F G = 22.14%,  $X^2 = 22.05$ ,  $p = 0.0001$  en pacientes con TbP) HLA-DR(1)\*1501 (F G = 4.7% en T s contra F G = 31.4%,  $X^2 = 26.01$ ,  $p = 0.0001$  en TbP y 14.36%,  $X^2 = 4.36$ ,  $p = 0.037$  en SIDA) HLA-DR(1)\*1101 (F G = 5.7% en T s contra F G = 27%,  $X^2 = 15.41$ ,  $p = 0.0001$  en pacientes con SIDA)

**Cuadros de Contingencia para el Análisis Molecular de los Antígenos HLA clase II más frecuentes**

**Cuadro 23 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\alpha$ 1-0101**

Tuberculosis DQ $\alpha$ 1	0101+	0101-	Total
Pacientes	24	9	33
Testigos sanos	18	77	95
Totales	42	86	128

$X^2 = 29.7$

$p = 0.0001$

RR = 11.4

S

**Cuadro 24 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\alpha$ 1-0501**

Tuberculosis DQ $\alpha$ 1	0501+	0510-	Total
Pacientes	15	18	33
Testigos sanos	37	58	95
Totales	52	76	128

$X^2 = 0.202$

$p = 0.653$

RR

N.S

=1.3

**Cuadro 25 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQβ1-0501**

<b>Tuberculosis DQ β1</b>	<b>0501+</b>	<b>0501-</b>	<b>Total</b>
<b>Pacientes</b>	13	20	33
<b>Testigos sanos</b>	10	85	95
<b>Totales</b>	23	105	128

$X^2 = 22.05$

$p = 0.0001$

$RR = 5.52$

S

**Cuadro 26 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQβ1-0604**

<b>Tuberculosis DQ β1</b>	<b>0604+</b>	<b>0604-</b>	<b>Total</b>
<b>Pacientes</b>	4	29	33
<b>Testigos sanos</b>	3	92	95
<b>Totales</b>	7	121	128

$X^2 = 2.26$

$p = 0.132$

$RR = 4.2$

N.S

Cuadro 27 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\alpha$ 1-0101

SIDA DQ $\alpha$ 1	0101+	0101-	Total
Pacientes	12	19	31
Testigos sanos	18	77	95
Totales	30	96	126

$X^2 = 4.0$

$p = 0.045$

$RR = 2.70$

S

Cuadro 28 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\alpha$ 1-0501

SIDA DQ $\alpha$ 1	0501+	0501-	Total
Pacientes	14	17	31
Testigos sanos	37	58	95
Totales	51	75	126

$X^2 = 0.16$

$p = 0.688$

$RR = 1.2$

N.S

Cuadro 29 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\beta$ 1-0302

SIDA DQ $\beta$ 1	0302+	0302-	Total
Pacientes	12	19	31
Testigos sanos	38	57	95
Totales	50	76	126

$$X^2 = 0.007$$

$$p = 0.933$$

$$RR = 0.94$$

N.S

Cuadro 30 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\beta$ 1-0501

SIDA DQ $\beta$ 1	0501+	0501-	Total
Pacientes	8	23	31
Testigos sanos	10	85	95
Totales	18	108	126

$$X^2 = 3.29$$

$$p = 0.069$$

$$RR = 2.95$$

N.S

**Cuadro 31 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DRβ1-1101**

Tuberculosis DR β1	1101+	1101-	Total
Pacientes	8	26	34
Testigos sanos	11	84	95
Totales	19	110	129

$X^2 = 1.97$

$p = 0.160$

$RR = 2.34$

N.S

**Cuadro 32 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DRβ1-1501**

Tuberculosis DR β1	1501+	1501-	Total
Pacientes	18	16	34
Testigos sanos	9	86	95
Totales	27	102	129

$X^2 = 26.01$

$p = 0.0001$

$RR = 11.0$

S

Cuadro 33 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DRβ1-1101

SIDA DR β1	1101+	1101-	Total
Pacientes	14	16	30
Testigos sanos	11	84	95
Totales	25	100	125

$$X^2 = 15.41$$

$$p = 0.0001$$

$$RR = 6.68$$

S

Cuadro 34 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DRβ1-1501

SIDA DR β1	1501+	1501-	Total
Pacientes	8	22	30
Testigos sanos	22	86	95
Totales	17	108	125

$$X^2 = 4.36$$

$$p = 0.037$$

$$RR = 3.4$$

S

**Cuadro 35 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\alpha$ 1-0101/0501**

Tuberculosis DQ $\alpha$ 1	0101/0501+	0101/0501-	Totales
Pacientes	9	10	19
Testigos sanos	20	4	24
Totales	29	14	43

$$X^2 = 4.716$$

$$p = 0.030$$

$$RR = 0.18$$

S

**Cuadro 36 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQ $\alpha$ 1-0101/0501**

SIDA DQ $\alpha$ 1	0101/0501+	0101/0501-	Totales
Pacientes	4	14	18
Testigos sanos	12	12	24
Totales	16	36	42

$$X^2 = 20291$$

$$p = 0.130$$

$$RR = 0.2$$

N.S

**Cuadro 37 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DQβ1-0302/0501**

<b>SIDA</b> <b>DQ β1</b>	<b>0302/0501+</b>	<b>0302/0501-</b>	<b>Totales</b>
<b>Pacientes</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>Testigos sanos</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>28</b>
<b>Totales</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>40</b>

$X^2 = 0.0423$

$p = 0.473$

$RR = 0.46$

**N.S**

**Cuadro 38 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DRβ1-1101/1501**

<b>Tuberculosis</b> <b>DR β1</b>	<b>1101/1501+</b>	<b>1101/1501-</b>	<b>Totales</b>
<b>Pacientes</b>	<b>4</b>	<b>17</b>	<b>21</b>
<b>Testigos sanos</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>27</b>
<b>Totales</b>	<b>18</b>	<b>30</b>	<b>48</b>

$X^2 = 4.114$

$p = 0.043$

$RR = 0.21$

**S**

Cuadro 39 Análisis Molecular de los Antígenos HLA DRβ1-1101/1501

DR β1	1101/1501+	1101/1501-	Totales
Pacientes	4	8	12
Testigos sanos	13	11	24
Totales	17	19	36

$$\chi^2 = 0.683$$

$$p = 0.409$$

$$RR = 0.42$$

N.S

Cuadro 40. Valores de Subpoblaciones de Linfocitos T circulantes

	TbP N=34	SIDA N=31	Testigos sanos
Linfocitos T Totales	44	38	62+/-5.4
Linfocitos T Cooperadores (CD 4 <sup>+</sup> )	40	27	45+/-5.0
CD 8 <sup>+</sup>	37	35	23+/-5.8
CD 4/CD 8	1.09	1.1	2.0+/-0.8

## DISCUSION

En este trabajo intentamos definir la frecuencia de las moléculas HLA clase II en pacientes mestizos mexicanos con TbP y pacientes con SIDA y de esta manera establecer la influencia genética de predisposición a la tuberculosis y a la patología de HIV.

Se ha observado en estudios realizados con enfermedades asociadas a HLA, que ciertos antígenos HLA-DR y -DQ predominan en ellas (Pospelov, 1996). Los estudios que se han llevado a cabo en pacientes con Tuberculosis Pulmonar incluyen sujetos caucásicos, orientales y africanos, en los que se ha encontrado asociación de la enfermedad con HLA-DR2 - HLA-DQ1 como marcadores predisponentes (Lew, 1992; Mach, 1986 y Rajalingam, 1996). En los pocos estudios realizados en población mestiza mexicana, se ha encontrado una asociación significativa con DR2 más no con HLA-DQ1 (Olvera, 1994 y Terán, 1992).

En lo que respecta a los pacientes con SIDA, los resultados más sobresalientes que se mencionan en la literatura, es el aumento significativo en la frecuencia de HLA-DR5 y en algunos casos HLA-DR2 en pacientes caucásicos (Suzuki, 1996).

Es necesario tener presente que las moléculas de clase II manifiestan un elevado polimorfismo, el antígeno DR en su cadena polimórfica  $\beta$  o en ambas cadenas como el antígeno DQ. Esto trae como consecuencia un inconveniente al momento de ser analizado por métodos serológicos por la limitación al definir los alelos. Para la precisión en la identificación de alelos es necesario emplear técnicas basadas en biología molecular con métodos basados en PCR como lo es el de Primer Secuencia Específica (SSP por sus siglas en inglés) que resulta ser exacto y muy sensible.

La mayoría de los estudios realizados para determinar la susceptibilidad a TbP y a SIDA, se han llevado a cabo empleando métodos serológicos sin poder ser comparados con métodos moleculares para su confirmación.

Rajalingam en 1996, en un estudio realizado en pacientes hindúes, rusos, indonesios y chinos con tuberculosis pulmonar encontró, por métodos moleculares, un moderado aumento del subtipo de HLA 1501 (DR2), indicando una susceptibilidad ligada con este alelo.

En nuestro trabajo se encontraron datos importantes que pueden dar la pauta para próximos estudios con ambos grupos.

En los pacientes con tuberculosis se encontró que existe una mayor presencia, la cual es estadísticamente significativa con el alelo de HLA 1501 (DR2) que pudo ser comprobada por los métodos moleculares al identificarse los alelos de mayor frecuencia, permitiendo afirmar que la asociación de tuberculosis con el alelo 1501 (DR2) es representativa de susceptibilidad. Del mismo modo, los pacientes con SIDA muestran asociación con el alelo 1101 (DR5) sin embargo su susceptibilidad no se ve tan marcada como en los pacientes con tuberculosis.

La asociación encontrada en los *loci* DR/DQ es significativa para los haplotipos que incluyen los alelos HLA antes mencionados, sin embargo, al hacer el análisis de las posibles combinaciones de alelos de diferentes *loci*, observamos que no hay asociaciones importantes entre los genes de DR $\beta$ 1 y DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1, lo cual nos sugiere que no existe desequilibrio de enlace en las patologías exploradas.

De los genes que comprenden a la subregión DQ, únicamente DQ $\beta$ 1 determina el tipo serológico de la molécula y un hecho que resulta relevante es el aumento

significativo de DQ $\alpha$ 1 \*0101 en pacientes con TbP y SIDA, este hallazgo por el momento no tiene explicación.

Por otro lado, se han reportado casos en los cuales se observa una correlación altamente significativa del alelo DQ1 y el aumento de la beta 2 microglobulina; así como alteraciones importantes en las subpoblaciones de células T. Sin embargo, en nuestro trabajo no se presentó correlación del alelo DQ1 con la beta 2 microglobulina; del mismo modo resultó no significativa la relación con las subpoblaciones de células T.

## CONCLUSIONES

Por su mayor grado de asociación, los antígenos HLA marcadores de tuberculosis pulmonar y SIDA en los mestizos mexicanos, determinados por serología, son el DR2 y el DR5, respectivamente. Por métodos moleculares, los alelos \*1501 (DR2) para TbP y \*1101 (DR5) para SIDA resultaron significativamente incrementados.

En los pacientes con SIDA se encontró el alelo \*1101 (DR5); sin embargo su significancia estadística no es indicativa de que sea un marcador predisponente a la enfermedad ya que debe tomarse en cuenta que los factores involucrados en la infección con HIV son muy variados.

Los niveles circulantes de las subpoblaciones de linfocitos T CD3, CD4 y CD8; así como los niveles de Beta 2-microglobulina no parecen reflejar algún fenómeno clínico o inmunológico en los pacientes de ambas patologías.

La serología no nos permite conocer todas las variantes alélicas que pueden encontrarse en las regiones del sistema HLA y así determinar si alguna de ellas se encuentra involucrada en la susceptibilidad o resistencia a una determinada patología. Los métodos moleculares confieren resultados más exactos y precisos en la tipificación de moléculas HLA clase II al identificar subtipos de las regiones DQ y DR (alfa y beta).

## APENDICES

## APÉNDICE 1

### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS PARA CÉLULAS BLANCAS

Tris-HCl, pH 7.6	0.01 M
EDTA, Ph 8.0	0.01 M
NaCl	0.05 M
SDS	0.2%
Proteinasa K	300 µg/ml

Disolver por separado el Tris-HCl en un volumen mínimo de agua libre de DNasa y RNasa y ajustar el pH a 7.6 utilizando HCl o NaOH según se requiera.

Preparar el EDTA en un volumen mínimo de agua libre de DNasa y RNasa y ajustar el pH a 8.0.

En un matraz aforado estéril mezclar las dos soluciones anteriores adicionando el NaCl, la proteinasa K y el SDS, disolver todos los reactivos hasta tener una solución homogénea y se filtra al vacío.

Guardar la solución en alícuotas de 150 ml para almacenar y en alícuotas de 20 ml para uso constante a -20°C.

### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS PARA CÉLULAS

Tris-HCl, pH 7.6	0.01 M
MgCl <sub>2</sub>	0.005 M
NaCl	0.01 M

Mezclar los reactivos en agua libre de DNasa y RNasa, aforar al volumen deseado y guardar la solución a temperatura ambiente.

### SSC 20 X (por litro):

NaCl	3.0 M
Citrato de Sodio	0.3 M

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10 M en 800 ml de agua destilada y aforar a un litro.

## APÉNDICE 2

### FENOL SATURADO EQUILIBRADO

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, porque el DNA puede quedarse dentro de la fase orgánica si el pH es ácido.

El fenol bidestilado se debe almacenar a -20°C. Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a 68°C (Baño María).

Al fenol líquido se le adiciona 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. La 8-hidroxiquinolina es un antioxidante, un inhibidor parcial de RNAsa y un quelante débil de iones.

Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar con una barra magnética durante 15 min, permitir que se separen las dos fases, eliminar la fase superior (acuosa).

Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0. Agitar con barra magnética 15 min, remover la fase acuosa. Repetir hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente pH 8.0)

Después de que el fenol está equilibrado, remover la fase acuosa y adicionar 0.1 volumen de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 conteniendo 0.2% de 2-mercaptoetanol.

Guardar en un frasco ámbar a 4°C por periodos mayores de un mes.

### FENOL/CLOROFORMO

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar solamente la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar, dejar a 4°C toda la noche y utilizar la fase inferior.

### CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO

Tomar 24 partes de cloroformo puro y añadir una parte de alcohol isoamílico, mezclar y guardar a 4°C.

### TAE 50 X:

Tris-Base (Sigma)	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.25 M, pH 8.0	200.0 ml

### APÉNDICE 3

#### Amplificación Genérica

Gen	Secuencia	Producto ( pb)
DRB1		274
CRX11	TCTAGAAGTACTCTACGTCT	257
GH50	CTCCCCAACCCCGTAGTTGTGTCTGCA	272
DQA1		229
GH 27	CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG	229
GH 26	GTGCTGCAGGTGTAACCTGTACCAG	242
DQB1		214
GH29	GAGCTGCAGGTAGTTGTGTCTGCACAC	263
DB130	AGGGATCCCCGCAGAGGATTTCGTGTACC	263

Iniciadores para la amplificación genérica que amplifican el segundo exón de los loci DRB1, DQA1 y QB1 (Perkin-Elmer, 1996).

## APÉNDICE 4

### MEZCLA DE INICIADORES PARA LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS DQ $\alpha$ 1 (Olerup, O. 1993).

NOMBRE	SECUENCIA	SECUENCIA	ESPECIFICIDAD	TAMANO (pb)
	5'	3'		
A1	CATGAATTGATGGAGATGAGG	ATGATGTTCAAGTTGTGTTTGC	DQA1*0101_0104	149
A2	ACGGTCCCTCTGGCCAGTA	ATGATGTTCAAGTTGTGTTTGC	DQA1*0101_0102_0104	172
A3	CATGAATTGATGGAGATGAGC	ATGATGTTCAAGTTGTGTTTGC	DQA1*0102_0103	149
A4	ACGGTCCCTCTGGCCAGTT	ATGATGTTCAAGTTGTGTTTGC	DQA1*0103	172
A5	ACGGTCCCTCTGGCCAGTT	CAGGATGTTCAAGTTATGTTTAC	DQA1*0201	170
A6	TTTCACTGCTCAGTCACTCAT	CAAAATGGGGTCAAACTTCT	DQA1*0301	183
A7	TTTCACTGCTCAGTCACTCAC	CAAAATGGGGTCAAACTTCT	DQA1*0302	183
A8	ACCCATGAATTTATGGAGAC	CACATGCCATTGGTAGCAGCA	DQA1*0401	190
A9	ACGGTCCCTCTGGCCAGTA	AGTTGGAGCTTTATCAGAC	DQA1*0501	186
A10	ACGGTCCCTCTGGCCAGTT	GGTCAAACTAAAATGCTGAGA	DQA1*0601	117
A11	AGCCCTTGTGGAGGTGAAGA	AGTGGTTGGGGCTCTGGTTT	todos menos DQA1*0104	196
A12	GCCTTGTGGAGGTGAAGG	AGTGGTTGGGGCTCTGGTTT	DQA1*0104	195

MEZCLA DE INICIADORES PARA LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS DQβ1 (Olerup, O. 1993).

NOMBRE	SECUENCIA 5'	SECUENCIA 3'	ESPECIFICIDAD	TAMAÑO (pb)
B1	CGGAGCGCTGCGGGG	GCTGTCCAGTACTCGGCAA	DOB1*0501	128
B2	TGCGGGGTGACACAGC	TGTTCCAGTACTCGGCGT	DOB1*0502	117
B3	TGCGGGGTGACACAGC	GCGGGGTACACGCCGA	DOB1*0503	87
B4	GCCATGTCTACTTCAACAAT	CACGGTGTCCAATCCGCT	DOB1*0504	138
B5	CGTGCCTCTGTGACACAGT	GCTGTCCAGTACTCGGCAAT	DOB1*0502	121
B6	GGAGCGCTGCGCTTGTGA	GCTGTCCAGTACTCGGCAAT	DOB1*0503 *0507	127
B7	CTGTGTACAGTTTAAAGGCTT	CTAGGATCCCGCGGATCC	DOB1*0504	254
B8	GTGCGCTCTGTGACACAGG	GCAGGGTGTGCGGAGCT	DOB1*0201 *0202	205
B9	GACGGAGCGCTGCGCTGT	CTGTTCAGTACTCGGGG	DOB1*0201 *0202 *0202	129
B10	GACGGAGCGCTGCGCTTA	AGTACTCCGGGTACAGGG	DOB1*0301 *0304	122
B11	GACGGAGCGCTGCGCTTA	AGTACTCCGGGTACAGGG	DOB1*0302 *0303	122
B12	GACGGAGCGCTGCGCTTA	CTGTTCAGTACTCGGCGT	DOB1*0303	129
B13	CACCACGGGACCCAGCT	GGTAGTGTGTCTGCATACG	DOB1*0401	200
B14	CACCACGGGACCCAGCG	GGTAGTGTGTCTGCATACG	DOB1*0402	200
B1-2	GTGCGGGGTGTACACAGAT	TGTTCCAGTACTCGGCGT	DOB1*0504	118
B2-2	CGTGTACCGGTTAAGGGCC	GCAGGATCCCGGGTACC	DOB1*0505	254
B3-2	GGAGCGCTGCGCTTGTGA	TGCACACCCTGTCCACCG	DOB1*0506	176
B4-2	GACGGAGCGCTGCGCTGT	AATCCCGCCGGGTCCC	DOB1*0602 *0603 *0608	165
B5-2	GGAGCGCTGCGCTTGTGA	GCTGTCCAGTACTCGGCAA	DOB1*0601 *0602 *0603 *0604 *0605 *0606 *0607 *0608	127
B6-2	GGAGCGCTGCGCTTGTGA	CAACTCCGCGCGGCTCT	DOB1*0601 *0602 *0603 *0604 *0605 *0606 *0607 *0608	163
B7-2	GACGGAGCGCTGCGCTTA	CTGTTCAGTACTCGGCGT	DOB1*0601 *0601	129
B8-2	GACGGAGCGCTGCGCTTA	CTGTTCAGTACTCGGCGG	DOB1*0304	129

MEZCLA DE INICIADORES PARA LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS DRβ1 (Olerup, O. 1992).

NOMBRE	SECUENCIA 5'	SECUENCIA 3'	ESPECIFICIDAD	TAMANO (pb)
R1	TTCTGGAGCTTAAGTTCGAT	CTGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0103	76
R25	TCTCTTAGACCTTAGAG	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0102	76
R26	TCTCTTAGACCTTAGAG	AGGTGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0102	73
R3	TACTTCCATAGCAGGAGGA	TAGAGTTCGATTAAGTTCG	DRB1*01:0102	75
R37	TACTTAGACCTTAGAGGA	CTGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:01	77
R38	TACTTCTATAGCAGGAGGA	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0103	76
R4	GTTCCTTAGACCTTAGAG	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0103	73
R7	CTCTTAGACCTTAGATATA	AGGTGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0102	72
R41	ATAGCTTAGACCTTAGATTT	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0104	76
R9	GTTCCTTAGACCTTAGATTT	CTGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:01	73
R13	TGGTTCCTTAGACCTTAG	CTGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:01	70
R511	GTTCCTTAGACCTTAGATTC	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0104	76
R512	AGTACTTAGACCTTAGATTT	AGGTGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0102	76
R131	TATTTCTATAGCAGGAGGA	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0103	73
R132	GTTCCTTAGACCTTAGATTC	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0104	77
R141	GTTCCTTAGACCTTAGATTC AGTACTTAGACCTTAGATTT	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0104 1425	77
R142	TACTTCTATAGCAGGAGGA	TGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB1*01:0103	77
R52	TTCTTGGAGCTGGCTAAGTC GTTCCTTAGACCTTAGATTC	CTGGAGCTTAAGTTCGAT CTGGTCCAGTATTCGAT	DRB3*01:0101	121-122-123
R53	GAGCGAGTGTGGACCTGA	CTGGAGCTTAAGTTCGAT	DRB4*01	213

1. Andrieu, J.M. y Lu, W. 1995. Viro-immunopathogenesis of HIV disease: implications for therapy. *Immunology today* 16 (1): 5-7.
2. Arnaiz-Villena. 1993. MHC research: fast forward. *Immunology Today* 14 (1) 3-5.
3. Ávila, P. L. M. 1989. Estudio Inmunogenético en Mestizos Mexicanos con Artritis Reumatoide. Tesis Maestría. Fac. de Medicina. UNAM.
4. Barrocci, S. 1984. A simple Procedure for Freezing and Storing Lymphocyte Panels in Trays. *Journal of Immunological Methods* 69: 17-21.
5. Barré-Sinoussi, F. 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348: 31-35.
6. Barrera ,H., Ortiz, R., Rojas, A. y Reséndez, D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo* enero/febrero 50-60.
7. Beck-Sague, C; Dooley, S.W; Hutton, M; Otten, J; Breeden, A; Crawford, J; Pitchenik, C; Woodley, C; Cauthen, G; y Jarvis, W. 1992. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 268 (10): 1280-1286.
8. Bell, J. 1989. The polymerase chain reaction. *Immunology Today* 10 (10): 351-355.
9. Bell, J; Todd, J. y McDevitt, D. 1989. "Molecular structure of human class II antigens". *Immunology of HLA*. vol 2, 93-112. New York, USA. Tomado del Manual del VII Curso Teórico-Práctico de Genética Molecular, Coordinadora Dra. Clara Gorodezky.
10. Benjamin, R. y Parham, P. 1990. Guilt by association HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunology Today* 11 (4): 137-141.



11. Bentwich, Z; Kalinkovich, A. y Weisman, Z. 1995. Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunology today* **16** (4): 187-190.
12. Bloom, B. R. 1994. "Tuberculosis". Edit. ASM Press, USA, 389-481.
13. Bour, S., Geleziunas, R. y Wainberg, M.A. 1995. The human immunodeficiency virus type (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol. Rev.* **59** (1) : 63-93.
14. Brodsky, F. y Guagliard, L. 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol* **9**: 707-744.
15. Brown, J. H., Jardetzky, T.S; Gorga, J; Stern, L; Urban, R; Strominger, J. y Wiley, D. 1993. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**: 33-39.
16. Chia, D., Terasaki, P; Chan, H; Acalinovich, A; Maruya, E; Saji, H. y Ware, K. 1994. A new simplified method of gene typing. *Tissue Antigens* **44**: 300-305.
17. Chia, D., Terasaki, P; Acalinovich, A; Chan, H. y Balan, R. 1995. HLA-DR typing by polymerase chain reaction in Terasaki trays. *Transplantation Proceedings* **27** (1): 696-697.
18. Cohen, J. 1994. Apoptosis: el proceso fisiológico de muerte celular. *Hospital Practice*. **3** (10): 439-448.
19. CONASIDA, Epidemiología. 1996. Situación epidemiológica del SIDA. *SIDA-ETS* **2** (2): I-XX.
20. Dannenberg, J.R. 1994. "Tuberculosis". Edit. ASM Press, USA, 389-481.
21. Du, Z; Hood, L. y Wilson, R. 1993. Automated fluorescent DNA sequencing of polymerase chain reaction products. *Methods in Enzymology* **218**: 104-121.

22. Eisenstein, B. 1990. The polymerase chain reaction. *The New England Journal of Medicine* 322 (3): 178-184.
23. Erlich, H. A. y Gyllensten, U.B. 1991: Shared epitopes among HLA class II alleles: gene conversion, common ancestry and balancing selection. *Immunology Today* 12 (11): 411-414.
24. Fostenstein, H. 1981. "Inmunogenética Fundamental. Biología y Aplicaciones Clínicas de HLA y H-2". Edit. El Manual Moderno. México. 10-50.
25. Fields, B. y Mariuzza, R. 1996. Structure and function of the T-cell receptor: insights from X-ray crystallography. *Immunology Today* 17 (7): 328-335.
26. Francis, D. P. 1992. Toward a comprehensive HIV prevention program for the CDC and the Nation. *JAMA* 268 (1): 1444-1447.
27. Gao, X; Fernandez-Viña, M. Shumway, W. y Statsny, P. 1990. DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. *Human Immunology* 27: 40-50.
28. Gorodezky, C; Flores, J; Arévalo, N; Castro, L. E; Silva, A. y Rodríguez, O. 1987 Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. *Lepr. Rev.* 58 : 401-406.
29. Gyllensten, U. y Allen, M: 1991. PCR-based HLA class II typing. *PCR Methods and Applications* 1: 91-98.
30. Indiveri, F; Pellegrino, M; Molinaro, G; Quaranta, V. y Ferrone, S. 1979. Rosetting of Human T Lymphocytes With Goat Red Blood Cells: Effect of treatment With 2-Aminoethylisothiouonium Bromide (AET) and Comparison With AET Treated Sheep Red Blood Cells. *Journal of Immunological Methods* 30: 317-328.

31. Jeannet, M., Sztajzel, R., Carpentier, N., Hirschel, B. y Tiercy J. M. 1989. HLA antigens are risk factors for development of AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2: 28-32.
32. Jordan, T. J., Lewit, E.M; Montgomery, R. y Reichman, L. 1991. Isoniazid as a preventive therapy in HIV-infected intravenous drug abusers. *JAMA* 265 (2): 2987-2991.
33. Juárez, C. A. 1990. Protocolo de Búsqueda de Antisueros HLA-A, -B a partir de placentas humanas. Tesis de Licenciatura ENEP-Zaragoza. UNAM.
34. Kelso, A. 1995. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunology today* 16 (8): 374-379.
35. Kersh, G. y Allen, P. M. 1996. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen *Nature* 380: 495-498.
36. Klein, J. 1987. Origin of Major Histocompatibility Complex Polymorphism: the trans-species hypothesis. *Human Immunology* 19: 155-162.
37. Kuntz, B.M.E. y Brüsier, T. 1989. Time-dependent variation of HLA-antigen-frequencies in HIV-1-infection (1983-1988). *Tissue Antigens* 34: 164-169.
38. Lahesmaa, R; Skurnik, M. y Toivanen, P. 1993. Molecular mimicry: any role in the pathogenesis of spondyloarthropathies?. *Immunol Res.* 12: 193-208.
39. Lechler, J. 1994. "Mechanisms of HLA and Disease Association". Academic Press, pp. 83-89.
40. Levy, J.A. 1993. Pathogenesis of HIV infection. *Microbiol. Rev.* 57: 178-289.

41. Lew, A.M; Brandon, B; Panaccio, M. y Morrow, C. 1992. The polymerase chain reaction and other amplification techniques in immunological research and diagnosis. *Immunology* 75: 3-9.
42. Liblau, R; Singer, S. y McDevitt, H. 1995. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology today* 16 (1): 34-38.
43. Lienert, K. y Parham, P. 1996. Evolution of MHC class I genes in higher primates. *Immunology and Cell Biology* 74: 349-356.
44. Livingstone, W.J; Moore, M; Innes, D; Bell, J; Simmonds, P. y Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. 1996. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. *Lancet* 348: 649-54.
45. Mach, B; Gorski, J; Rollini, P; Berte, C; Amaldi, J; Berdoz, J. y UCLA C. 1986. Polymorphism and regulation of HLA class II genes of the major histocompatibility complex. *Symposia on Quantitative Biology* 51: 67-74.
46. Matsudaira, P; Darrell, J; Lodish, H; Baltimore, D; Berk, A. y Zipuski, L. 1995. "Molecular Cell Biology". 3ª Edición. Edit. Scientific American Book, New York. USA. pp1281.
47. Mettler, L; y Gregg, T. 1979. "Genética de las poblaciones y evolución" Edit. Unión tipográfica editorial hispano-americana, S.A de C.V. México. pp.70-102.
48. Monaco, J.J. 1992. A molecular model of MHC class - I - restricted antigen processing. *Immunology Today* 13 (5): 173-178.

49. Moses, J. H; Marsh, E; Ikeda, H; Trowsdale, J. y Bodmer, J.G. 1992. A novel method of screening alloantisera in a microcytotoxicity assay using human mutant cells transfected with HLA-class II alleles. *Tissue Antigens* 39: 156-158.
50. Mosmann, T. y Sad, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* 17 (3): 138-145.
51. Nagata, S. y Suda, T. 1995. Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunology today* 16 (1): 39-42.
52. Neefjes, J.J. y Momburg, F. 1993. Cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 5: 27-34.
53. Olerup, O., Aldener, A. y Fogdell, A. 1993. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 41: 119-134.
54. Olerup, O. y Zetterquist, H. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39: 225-235.
55. Olvera, C. R. 1994. Resistencia secundaria en tuberculosis *Revista del INER*, 6 (4): 185.
56. Parham, P. 1988. Presentation and processing of antigens in Paris *Immunology Today* 9 (3) 65-66.
57. Parham, P. 1990. Structure of class I MHC molecules : HLA-B27 and disease. *Scand. J. Rheumatology, Suppl.* 87: 11-20.

58. Parham, P. 1990. Recognition of antigen and alloantigen by T cells: a common mechanism?. *Biochemical Sciences* **15** (3): 79-81.
59. Pospelov, L.E., Matrakshin, A. G., Chernousova, L. N., Tsoi, K. N., Afanasjev, K. Y., Rubtsova, G. A. y Yeremeyev, V.V. 1996. Association of various genetic markers with tuberculosis and other lung diseases in Tuvian children. *Tubercle and Lung Disease* **77**: 77-80.
60. Quinn, T.C. 1996. Global burden of the HIV pandemic. *Lancet* **348**: 99-106.
61. Rajalingam, R; Mehra, N; Jain, R; Myneedu, L. y Pande, J. 1996. Polymerase chain reaction-based sequence-specific oligonucleotide hybridization analysis of HLA class II antigens in pulmonary tuberculosis: Relevance to chemotherapy and disease severity. *The Journal of Infection Disease* **173**: 669-676.
62. Reichman, L.B. y Hershfield, S.E. 1993. "Tuberculosis: a comprehensive international approach". Edit. Dekker. Vol. 66. USA. 20-60.
63. Richter, C; Koelemay, W; Swai, M; Perenboom, R; Mwakyusa, D. y Oosting, J. 1995. Predictive markers of survival in HIV - seropositive and HIV - seronegative Tanzanian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease* **76**: 510-517.
64. Riisom, K., Sorensen, J.I; Moller, B; Kruse, T; Graugaard, B. y Laam, L. 1988. HLA-DR typing using restriction fragment length polymorphism (RFLP) with one enzyme and two probes. *Tissue Antigens* **31**: 141-150.
65. Robles, G. J. 1984. Antígenos HLA y su relación con la intolerancia a la D-penicilamina y sales de oro de un subgrupo de pacientes con artritis reumatoide. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM.

66. Rodríguez, B. M. L. 1990. Aspectos inmunogenéticos de la diabetes tipo 1 en mexicanos. Tesis maestría IPN. ENCB.
67. Roitt, I. 1991. "Essential immunology". Blackwell Scientific Publications. 7ª edición pp.51-64.
68. Rudert, W. y Trucco, M. 1992. "A novel approach to rapid HLA class II molecular typing". Oxford University Press. Inglaterra. pp 54-58.
69. Rudert, W. y Trucco, M. 1992. Rapid detection of sequence variations using polymers of specific oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **20** (5): 210.
70. Salazar, M., Yunis, J; Delgado, M; Bing, D. y Yunis, E. 1992. HLA-DQB1 allele typing by a new PCR-RFLP method: Correlation with a PCR-SSO method. *Tissue Antigens* **40**: 116-123.
71. Salter, D.R. y Benjamin, R. 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha_3$  domain of HLA-A2. *Nature* **345**: 41-46.
72. Scorza, R. 1986. HLA-associated susceptibility to acquired immunodeficiency syndrome in Italian patients with HIV infection. *The Lancet*, **22** 1187-1189.
73. Schwartz, B. 1988. Diversity and regulation of expression of human leukocyte antigen class II molecules. *The American Journal of Medicine* **85** (suppl 6A): 6-8.
74. Serjeantson, S.W. 1989. The reasons for MHC polymorphism in man. *Transplantation Proceeding* **21** (1): 598-601.
75. Smith, M; Lam, K; Hersh, E; Lebl, M. y Grimes, W. 1994. Peptide sequences binding to MHC class I proteins. *Molecular Immunology* **31** (18): 1431-1437.
76. Stewart, D. 1993. Class II HLA antigens. XII Curso teórico-Práctico de Actualización en Histocompatibilidad. Julio, México, D.F. Coordinadora Dra. Clara Gorodesky.

77. Stites, D. P. 1993. "Inmunología Básica y Clínica". Ed. Manual Moderno, México D.F. 47-63, 329-347.
78. Sturtevant, A.H. y Beadle, G.W. 1962. "An introduction to genetics". Edit. Dover publications inc. New York. USA. pp. 93-126.
79. Suzuki, Y., Wong, S., Grumet, C.F., Fessel, J., Montoya, G., Zolopa, A.R., Portmore, A., Schumacher-Perdreau, F., Schrappe, M., Köppen, S., Ruf, B., William Brown, B. y Remington, J. 1996. Evidence of genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *Journal Infectious Disease* **173**: 265-268.
80. Tak Yan Yu, D; Peter, J; Paulus, H. y Machleder, H. 1973. Lymphocyte populations: Separation by Discontinuous Density Gradient Centrifugation. *The Journal of Immunology* **116** (6): 1615-1622.
81. Terán, O. L; Lezcano, D; Camarena, A; Juárez, A; Rubio, G; Montes, R; Galván, O; Rubio, H; Torres, M; Sada, E. y Selman, M. 1992. Inmunogenética en tuberculosis pulmonar. *INER* **5**: 183-186.
82. Thorsby, E; Lundin, A; Ronningen, K; Sollid, M. y Vartdal, F. 1989. Molecular basis and functional importance of some disease-associated HLA polymorphisms. *Tissue Antigens* **34**: 39-49.
83. Torres, M; Terán, L. y Camarena, A. 1994. Comparison of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. *Clin. Exp. Immunol* **96**: 75-78.
84. Toossi, Z. 1996. Cytokine circuits in Tuberculosis. *Infectious Agents and Disease*. **5**: 98-107.

85. Trowsdale, J; Powis, S. y Campbell, D. 1994. "The Contribution of novel MHC genes to disease". Capítulo 9. Academic Press. New York, USA. 167-179.
86. Trowsdale, J; Ragoussi, J. y Capbell, D. 1991. Map of the human MHC. *Immunology Today* 12 (12) 443-446.
87. Trucco, M. 1992. To be or not to be ASP 57, that is the question. *Diabetes Care* 15 (5): 705-715.
88. Tuomiletho, E; Tuomiletho, J; Graham, A; Aulikki, N; Stengard, J; Pekkanen, J; Kivinen, P; Kaarsalo, E. y Karnoven, K. 1993. Genetic susceptibility to non-insulin dependent diabetes mellitus glucose intolerance are located in HLA region. *British Medical Journal* 307: 155-159.
89. Turgeon, M.L. 1996. "Immunology and serology in laboratory medicine", 2ª edición. Edit. Mosby-Year Book. Missouri, USA. pp. 141-149, 295-313.
90. Van Rood, J. 1993. HLA and I. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 1-28.
91. Winchester. 1986. "Genética". Un estudio de los principios de la herencia. Edit. CECSA. México. pp. 265-292, 86-118.
92. Wormser, G.P. 1992. "AIDS and Other Manifestations of HIV Infection". 2ª edición. Edit. Raven Press. USA.
93. Zinkernagel, R. y Doherty, P.C. 1997. The Discovery of MHC restriction. *18* (14): 14-17.