



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y SU DESEQUILIBRIO GENETICO EN LA POBLACION NORMAL MESTIZA MEXICANA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
Que para obtener el Título de :
B I O L O G A
P r e s e n t a :
ANA LUISA WECKMANN GONZALEZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN.....	3
--------------	---

INTRODUCCION

1. El Sistema Principal de Histocompatibilidad (SPH).....	4
a. Región de clase I.....	7
b. Región de clase II.....	10
c. Región de clase III.....	12
2. Desequilibrio de Unión y Haplotipos Extendidos.....	16
a. Causas del desequilibrio de unión.....	16
b. Definición de haplotipo extendido.....	17
c. Implicaciones de los haplotipos extendidos.....	19
3. Polimorfismo y Evolución del SPH	
a. Origen del polimorfismo del SPH.....	20
b. Evolución del SPH.....	23
4. Frecuencias de Genes y Haplotipos del SPH.....	24
a. Estudios en diferentes poblaciones.....	25
b. Estudios en México.....	28
c. Tablas de haplotipos en distintas poblaciones.....	28

MATERIALES Y METODOS

1. Familias.....	35
2. Tipificación de HLA y Complotipos	
a. Tipificación de HLA.....	35
b. Tipificación de C2.....	35
c. Tipificación de C4.....	36
d. Tipificación de factor B.....	36
e. Nomenclatura de genes del complemento.....	36
3. Análisis Estadístico de los Resultados	
a. Frecuencias génicas de alelos de HLA-A, -B y -DR.....	37

b. Frecuencia de haplotipos de dos puntos (de HLA-A, -B, de -B, -DR, de -B, complotipo, de -DR, complotipo), de tres puntos (de HLA-B, -DR y complotipo) y frecuencia de complotipos.....	37
c. Asociación gamética o desequilibrio de ligamiento entre dos loci de HLA o entre HLA y complotipo.....	37

RESULTADOS Y DISCUSION

1 HLA-A.....	39
2. HLA-B.....	40
3. HLA-DR.....	42
4. Complotipos.....	43
5. Haplotipos de dos puntos.....	45
6. Haplotipos de tres puntos.....	50
7. Aplicaciones del estudio.....	51

CONCLUSIONES.....	52
-------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	53
-------------------	----

Apéndice.....	59
---------------	----

Glosario.....	68
---------------	----

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS
DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD
Y SU DESEQUILIBRIO GENETICO
EN LA POBLACION NORMAL MESTIZA MEXICANA

RESUMEN:

El sistema genético más polimórfico del humano es el Complejo Principal de Histocompatibilidad. Si sus alelos se combinan de manera no aleatoria forman haplotipos extendidos. Este trabajo los caracteriza en la población normal mexicana. Se estudiaron 259 familias mestizas mexicanas de candidatos a trasplantes de órganos en los que se tipificaron HLA-A y -B, y además, 32 familias normales que dieron 87 cromosomas, en las que se tipificaron HLA-A, -B, -DR, C4A, C4B, FB y C2 mediante técnicas convencionales. Las frecuencias antigénicas y haplotípicas se calcularon mediante cuenta directa y se compararon con las descritas previamente para la población mexicana, caucásica y japonesa. Se buscó si existía desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA y entre alelos de HLA y complotipos, mediante el cálculo de la llamada delta. El análisis estadístico se realizó mediante Chi cuadrada y corrección de Yates. Los alelos más frecuentes de cada locus de HLA fueron A2 (28%), B16 (15%) y DR4 (25%). El complotipo más frecuente fue SC31 (40.2%). De los haplotipos de dos puntos, B35 DR4, B16 DR2 y B35 DR8 tuvieron la frecuencia más alta (6.9%); cuando se extendió a tres puntos (con los complotipos), el B35 DR4 siempre se encontró con SC31 y constituyó el haplotipo más frecuente (6.9%). En las comparaciones con los trabajos anteriores, se observaron diferencias en frecuencias génicas de HLA-A y -B en mexicanos. Se encontraron alelos comunes y distintos para HLA-A, -B y -DR al comparar con caucásicos y japoneses; los haplotipos de tres puntos fueron totalmente diferentes. Se concluye que los haplotipos mexicanos probablemente extendidos, son tres: B35 DR4 SC31, B16 DR2 SC31 y B40 DR4 SC31.

INTRODUCCION

1. El Sistema Principal de Histocompatibilidad

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH) es un conjunto de genes que se encuentra en el brazo corto del cromosoma seis del humano (6p21.3) (Fig 1). Se ha encontrado, gracias a estudios de electroforesis pulsada en gel, que abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas. (Dunham et al, 1987; Lawrence et al, 1987; Sargent et al, 1989). Incluye a los genes del sistema HLA (antígenos de histocompatibilidad), que son los más polimórficos del ser humano (Yunis, 1988).

Hacia el telómero está la región de clase I del SPH, que tiene por lo menos 17 genes relacionados entre si (Koller et al, 1988), incluso los loci HLA-A, -B y -C. Hacia el centrómero está la región de clase II, que se puede dividir en cuatro subregiones (DP, DO/DZ, DQ y DR), cada una por lo menos con un par de genes α y β (Trowsdale, 1987). Dentro de la región de clase II se incluyen los determinantes HLA-Dw, que al parecer son codificados por el locus HLA-DR (Bodmer et al, 1987). Entre las regiones de clase I y clase II, se encuentra la región de clase III, cuyos genes codifican para los componentes del complemento C2, factor B (fB), C4A y C4B, así como los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB).

Dentro del SPH se incluyen el gen de la glioxalasa I, que es el más centromérico de todos, los genes del factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β), que están entre el HLA-B y la región de clase III y también el gen de una proteína con estructura periódica no común llamada RD, que se encuentra entre el gen del factor B y el de C4A.

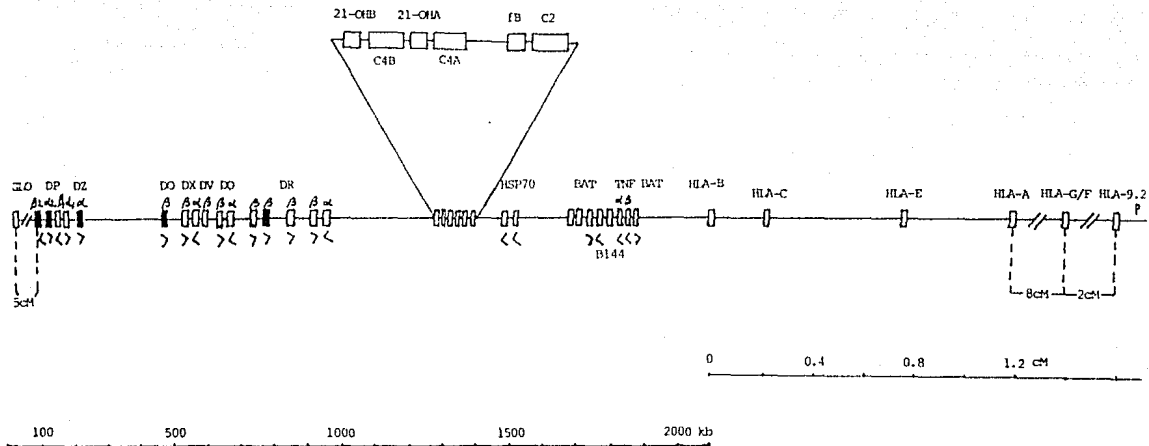


Fig 1: Mapa genético del SPH humano. Se indican las posiciones relativas de los loci de genes de clase II, clase III, HSP70, BAT 1-5, B144, TNF y clase I. Las distancias se dan en kilobases, excepto entre los genes de clase I, donde se dan en centimorgans (1 cM equivale aproximadamente a 1,000 kb). Rectángulo oscuro indica pseudogen. α , gen de cadena α . β , gen de cadena β . Las flechas indican la dirección en que ocurre la transcripción. El SPH ocupa aproximadamente 3,000 kb, desde el locus DP β 2 hasta el HLA-A. Hay 10 cM entre HLA-A y HLA-9.2p, el gen conocido más alejado en el extremo del telómero.

Recientemente se han encontrado otros cinco genes asociados al locus HLA-B, llamados "transcritos asociados a B", que son BAT-1, -2, -3, -4 y -5, así como también un gen llamado B-144 que es análogo a un gen con igual nombre del ratón (Spies et al, 1989). También se encontraron dos loci de la proteína de "choque de calor", HSP70-1 y HSP70-2, entre los genes de clase III y del factor de necrosis tumoral α (Sargent et al, 1989) (Fig 2).

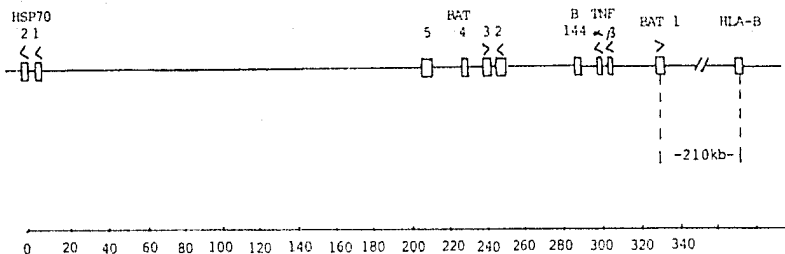


Fig 2.: Mapa genético de los loci de HSP70, BAT 1-5, B-144, TNF y HLA-B en el brazo corto del cromosoma G humano. Se indican las posiciones relativas de los loci. Las distancias se dan en kilobases. Las flechas indican la dirección en que ocurre la transcripción. El centrómero está a la izquierda. Los loci de HSP70 están a unas 92 kb del locus de C2, hacia el centrómero.

Los productos de los genes de las clases I, II y III se expresan de manera mendeliana codominante. Las moléculas de clase I se expresan en las membranas de todas las células del cuerpo, excepto en neuronas y trofoblastos maduros y son difíciles de detectar en eritrocitos. De los tres loci de clase I clásicos, HLA-A, -B y -Cw, el locus -Cw es el que menos se expresa bien. El HLA-B se detecta difícilmente en plaquetas. (Cresswell, 1987). Las moléculas de clase II se expresan sólo en ciertas células, tales como macrófagos, linfocitos B, células dendríticas, células del endotelio vascular, células epiteliales del timo y células de Langerhans. No se expresan en linfocitos T no activados, pero puede inducirse su expresión con mitógenos o estímulos antígeno-específicos. Ni los eritrocitos maduros ni los

granulocitos expresan moléculas de clase II (Cresswell, 1987).

La frecuencia de recombinación génica dentro del SPH es muy baja (menor del 2%), debido a que este conjunto de genes ocupa solamente unas 3,800 kb. El entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que incluya a los genes HLA-A y -B o a HLA-B y -DR ocurre con una frecuencia un poco menor de 1% de un total de meiosis (Alper et al, 1982). Por esta razón el complejo génico puede considerarse como una sola unidad genética.

Los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno). Una combinación dada de alelos de los loci B, C2, C4A y C4B forman un llamado complotipo (Awdeh et al, 1981) o haplotipo de genes del complemento.

a. Región de clase I

Los antígenos de clase I son mediadores de la eliminación alogénica y de la restricción de linfocitos T efectoras. (Strachan, 1987). Se constituyen de un par de cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: una cadena pesada α , que es glucoproteica, transmembranal, de 45 kD y una cadena ligera β , también glucoproteica, de 12 kD. La cadena α es polimórfica y es codificada por el HLA-A, -B o -C y la cadena β , monomórfica, es la $\beta 2$ -microglobulina, codificada por un gen en el cromosoma 15.

La estructura de los antígenos de clase I del SPH, se dedujo inicialmente a partir de la determinación de la secuencia de aminoácidos de material purificado de una línea celular humana linfoblastoide (Strominger, 1987). Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica corta (Fig 3). Se ha podido encontrar además la estructura tridimensional de una molécula de clase I, el antígeno HLA-A2, por medio de cristalografía de rayos X (Bjorkman et al, 1987a). La cadena pesada α consta de tres dominios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los más distales a la membrana celular y son los que contienen los residuos polimórficos. Estos dos dominios conforman el sitio de unión a

un antígeno (Bjorkman et al, 1987b), que es así presentado por la molécula del HLA al receptor del linfocito T.

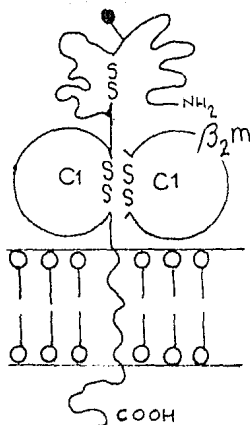


Fig 3: Modelo de la estructura molecular de un antígeno de clase I.

Los círculos representan segmentos que se pliegan como un dominio de inmunoglobulinas. C1 es un dominio constante. Los tres segmentos que inician en el extremo amino-terminal (NH₂) son los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la cadena pesada. $\beta 2$ -m es la cadena ligera de $\beta 2$ -microglobulina. Los símbolos SS entre los círculos indican enlaces disulfuro intracatenarios. El símbolo \dagger indica sitio de glucosilación N.

Koller et al (1989) construyeron un mapa de los genes de clase I, que incluye seis loci: HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-A, HLA-F(5.4)/HLA-G(6.0) y HLA-9.2p. Abarca en total 11 cM (Fig 4).

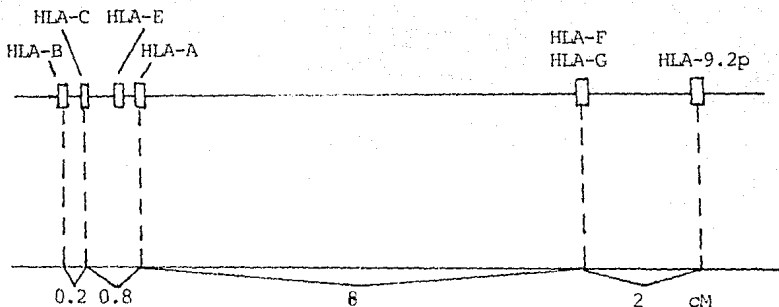


Fig 4: Mapa genético de los loci de clase I del SPH humano. Se indican las posiciones relativas de los loci y se dan las distancias que los separan en centimorgans. (1 cM equivale aproximadamente a 1,000 kb). Se puede observar que la distancia entre HLA-A y HLA-F/G es relativamente grande (de alrededor de 3,000 kb), pues en cambio, la distancia entre el locus de clase II más centromérico (DP β 2) y HLA-A es de aproximadamente 3,000 kb.

El gen de la cadena α tiene ocho exones: el exón 1 codifica para el líder; el exón 2, para el dominio α 1; el exón 3, para el dominio α 2; el exón 4, para el dominio α 3; el exón 5, para la región transmembranal y parte de la citoplásmica; los exones 6 y 7, para partes de la región intracitoplásmica y el exón 8, para la cola 3' no traducida (Strominger, 1987).

La mayor diversidad de aminoácidos de los antígenos de clase I se halla en diferentes sitios en los dominios α 1 y α 2, lo que se ha confirmado con experimentos de transfecciones génicas y por medio de reconocimiento con aloanticuerpos (Strachan, 1987). El α 3 está muy conservado. El polimorfismo de estas moléculas es mayor que el de las regiones variables de las inmunoglobulinas. La mayoría de las posiciones polimórficas está en los residuos 1 al 194.

En el humano se han detectado por serología alrededor de 23 alelos del locus HLA-A, 49 de HLA-B y 8 de HLA-Cw. Se estima que al encontrarse más subtipos de cada alelo, aumenten a 50 para HLA-A y a más de 100 para HLA-B (Klein, 1987).

b. Región de clase II

Los antígenos de clase II son determinantes primarios en la generación de respuestas proliferativas de linfocitos T en cultivo mixto de linfocitos (Strominger, 1987) y pueden presentar antígenos al receptor del linfocito T. Estas moléculas se encontraron como impurezas en preparaciones de antígenos de clase I. Se constituyen (Fig 5) de dos cadenas glucoproteicas, unidas no covalentemente, una pesada α monomérica, de 33 kD y una cadena ligera β polimérica, de 28 kD (Trowsdale, 1987), ambas codificadas por loci del HLA. La molécula de clase II tiene cuatro dominios externos: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, análogos a los dominios $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 2$ y a la $\beta 2$ -microglobulina, de la molécula de clase I, respectivamente. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son del tipo de los dominios de las inmunoglobulinas, muy conservados y los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ son polimórficos. No se ha deducido la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X, de las moléculas de clase II, pero se ha propuesto un modelo (Brown et al, 1988), parecido al de la estructura de la molécula de clase I.

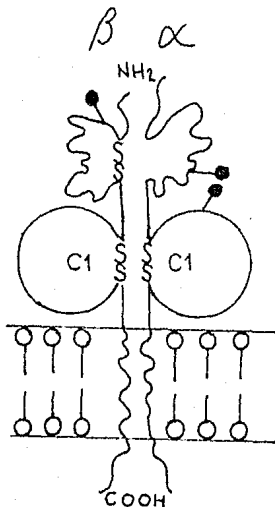


Fig 5: Modelo de la estructura molecular de un antígeno de clase II. Símbolos como en la figura 3. Los dominios que comienzan en el extremo amino-terminal (NH_2) de cada cadena son $\beta 1$, $\beta 2$ y $\alpha 1$, $\alpha 2$.

La molécula de clase II tiene asociada a las cadenas α y β una glucoproteína transmembranal de 31 kD, conocida como cadena γ o cadena invariante. Esta cadena no se detecta con anticuerpos en la superficie celular, por lo que se piensa que se disocia del complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular (Cresswell, 1987).

De las cuatro subregiones de los genes de las moléculas de clase II (Fig 6), la subregión DP consta de dos pares de loci α y β , de los cuales DP α 2 y DP β 2 parecen pseudogenes. La subregión DZ/DO se constituye de los genes DZ α y DO β , pero como estos dos loci están separados por varios cientos de kilobases, quizá no formen un dímero α/β (Trowsdale, 1987). La subregión DQ tiene un gen α y uno β ; incluye dos genes DX (α y β) y un gen DV β entre los genes DQ y DX (Blanck y Strominger, 1988). La subregión DR tiene cuatro genes β : el β 1 codifica para las especificidades DR1 a la DR18, el β 2 es pseudogen, el β 3 codifica para el determinante DRw52 y el β 4 para el determinante DRw53. Hay un gen DR α .

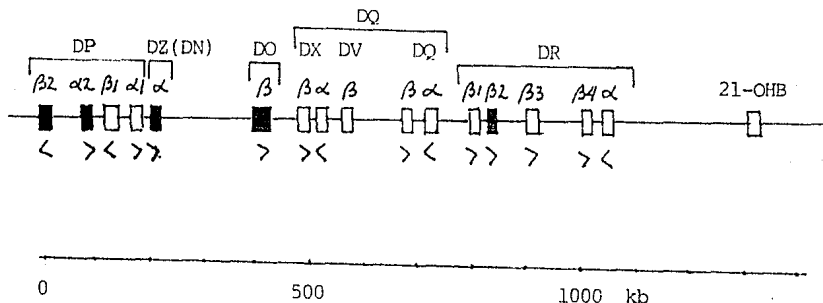


Fig 6: Mapa genético de la región de clase II del SPH humano. Esta región se divide en cuatro subregiones: DP, DO/DZ, DQ y DR. La subregión DP abarca aproximadamente 200 kb (de DP β 2 a DP α 1); la subregión DO/DZ, unas 200 kb (DZ α a DO β); la subregión DQ, unas 250 a 300 kb (de DX β a DQ α); la subregión DR, unas 250 kb (de DR β 1 a DR α). Los loci DP β 1 y DP α 1 codifican para los antígenos DPw1 a DPw6; los loci DQ α y β , para los antígenos DQw1 al DQw9. El locus DR β 1 codifica para la cadena β de las especificidades de DR1 a DRw18. El locus DR β 3 codifica para la cadena β de DRw52 y el locus DR β 4 para aquella de DRw53. El locus DR α es monomórfico para la cadena α de DR. Un rectángulo oscuro indica un pseudogen. Las flechas indican la dirección en que ocurre la transcripción. El locus DR α está a aproximadamente 300 kb del locus 21-OHB, que está hacia el telómero.

Se expresan tres tipos de productos de clase II: DP, DQ y DR. No hay evidencias de que $DQ\alpha$ y $DQ\beta$ se expresen como proteínas, aunque se ha encontrado ARNm normalmente poliadenilado, de ambos genes, en células B.

Pueden formarse pares de cadenas $DQ\alpha$ y $DQ\beta$ en "trans", es decir, la cadena $\alpha 1$ y la $\beta 1$ codificadas cada una por uno de los dos cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de diferentes loci, como $DR\alpha$ y $DQ\beta$, en ratones transfectados (Trowsdale, 1987).

Los genes de la cadena α de clase II tienen cinco exones: el exón 1 codifica para la región 5' no traducida; los exones 2 y 3, para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$; el exón 4, para el péptido que conecta una cadena con la otra, la región transmembranal, la cola citoplásmica y parte de la región 3' no traducida; el exón 5 codifica para el resto de esta región (Trowsdale, 1987).

Los genes de la cadena β de clase II tienen seis exones, los primeros cinco son análogos a los exones de clase I, con la diferencia de que la cola citoplásmica se codifica por los exones 4, 5 y 6.

El polimorfismo de las moléculas de clase II se encuentra en las cadenas β de los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR. Los residuos polimórficos están en cuatro cúmulos en los dominios $\beta 1$ de DQ y DR, así como en un cúmulo en $\alpha 1$ de DQ. El polimorfismo de la cadena $DP\beta$ es limitado (Strominger, 1987).

El polimorfismo alélico de los antígenos de clase I y II se reconoce fenotípicamente por serología. Las variantes de HLA-Dw se detectan por cultivo mixto de linfocitos. El polimorfismo genotípico se reconoce mediante secuenciación de nucleótidos y análisis de fragmentos de restricción (Bidwell, 1988).

c. Región de clase III

Los genes de clase III del SPH, después del HLA, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del humano (Alper et al, 1983). Los cuatro loci de esta región (C2, factor

B, C4A y C4B) se heredan en bloque, pues al analizar varios centenares de meiosis informativas, se ha observado que no hay intercambios genéticos entre ellos (Alper, 1976; Awdeh y Alper, 1980).

Las moléculas de C2 y del factor B son glucoproteínas de una sola cadena de 10,200 y 90,000 Daltones, respectivamente y circulan en el plasma en forma de pro-enzimas (Campbell, 1987). Se sintetizan en el hígado y en células de la línea monocito/macrófago. Ambas moléculas parecen tener tres dominios globulares.

La molécula de C4 (Fig 7) pesa 200 kD y tiene tres subunidades unidas covalentemente por puentes disulfuro: α (95 kD), β (75 kD) y γ (30 kD). Se sintetiza como una sola cadena en el orden β - α - γ que luego se glucosila y se procesa intracelularmente; se secreta como una estructura de tres cadenas (Carroil y Alper, 1987).

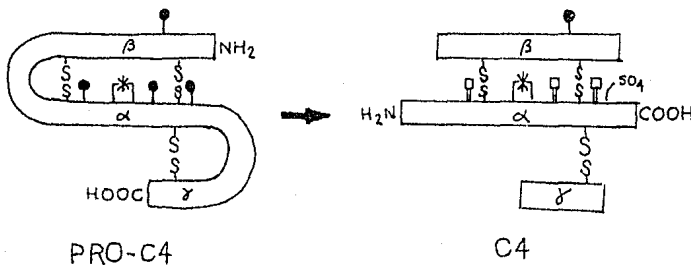


Fig 7: Estructura de C4. La proteína pro-C4 se sintetiza como una sola cadena polipeptídica de 1,722 aminoácidos. El procesamiento postranscripcional incluye glucosilación, adición de un grupo sulfato y rompimiento proteolítico, lo que resulta en una cadena plasmática con tres unidades unidas por puentes disulfuro.

La enzima 21-hidroxilasa es un citocromo P-450. Cuando está ausente total o parcialmente, provoca un defecto en el

metabolismo esteroideo y causa entonces hiperplasia adrenal congénita. Se sintetiza en la glándula suprarrenal.

Se ha podido hacer un mapa molecular de los genes de clase III, gracias al aislamiento de clonas de cósmidos que los contienen y se ha establecido el orden relativo de los loci de C2, fB y C4. Esta región ocupa aproximadamente 120 kb (Fig 8). El orden de los genes, de centrómero a telómero, es 21-OHB, C4B, 21-OHA, C4A, fB y C2.

El gen del fB tiene dieciocho exones, caso semejante al del gen de C2. La organización de los exones del fB revela una relación estructural y evolutiva, a nivel de organización génica, entre esta proteína y otras proteasas de serina (Campbell, 1987). Existen dos variantes principales de fB, detectadas por medio de electroforesis de plasma, en gel de agarosa, más inmunofijación: F y S. Existen dos variantes menores, F1 y S1 y catorce variantes muy raras.

Las variantes de C2 se pueden detectar mediante isoelectroenfoque de plasma o suero y un ensayo hemolítico. Los patrones de C2 constan de dos bandas prominentes de lisis y dos o tres bandas adicionales ácidas o básicas. La variante común de C2 se llama C, la básica rara es B y la ácida, A (Alper, 1976).

Hay dos loci para C4 en el humano (Awdeh y Alper, 1980). Producen proteínas similares que difieren serológica, estructural y funcionalmente entre sí. Los antígenos del grupo sanguíneo Chido y Rodgers se encuentran en los productos de los genes de C4B y C4A respectivamente. El polimorfismo estructural de C4 es mayor que el de C2 o fB y es el que proporciona el polimorfismo de los complotipos (Carroll y Alper, 1987). Los alelos de cada locus de C4 se designan con números según la movilidad electroforética del cátodo al ánodo. El nombre de un alelo está dado por: nombre del locus, un asterisco y un número o el símbolo "Q0" si el alelo es nulo (Awdeh y Alper, 1980).

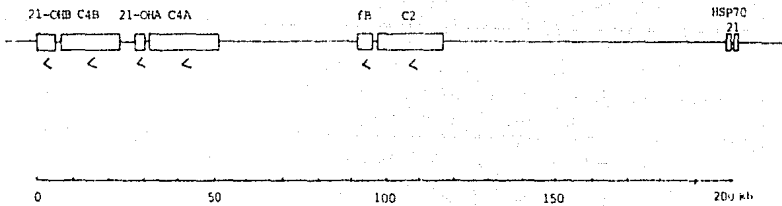


Fig 8: Mapa genético de los loci de clase III del SPH humano. Estos loci abarcan un total aproximado de 120 kb. C2 se encuentra a 421 pares de bases de fB; C4A está a 30 kb de fB y a 10 kb de C4B. Los loci de la 21-hidroxilasa están en los extremos 3' de cada locus de C4. Los genes de clase III se encuentran a unas 300 kb de los de clase II hacia el centrómero y a unas 92 kb de los loci de la HSP70 hacia el telómero. Las flechas indican la dirección en que ocurre la transcripción.

Existen alelos nulos de C4A y C4B. Alrededor de la mitad resultan de pérdidas de ADN que incluyen a C4A y 21-OHA o a C4B y 21-OHA o a C4B y 21-OHB. No se ha visto pérdida de C4A y 21-OHB. Los alelos nulos que no se deben a pérdidas de ADN probablemente resultan de varios defectos en la transcripción o la traducción (Carroll y Alper, 1987).

Los dos loci de la 21-hidroxilasa, 21-OHA y 21-OHB, se encuentran en dirección 3' junto a los loci de C4A y C4B, respectivamente (Carroll et al, 1985; White et al, 1985).

Se ha sugerido que los genes de la 21-hidroxilasa se duplicaron junto con los dos genes de C4. Sólo el locus 21-OHB es importante para la biogénesis de esteroides (Carroll y Alper,

2. Desequilibrio de Unión y Haplotipos Extendidos

La frecuencia de los diferentes antígenos y haplotipos del SPH varía de una población a otra y algunos de ellos son característicos de ciertos grupos étnicos (Bodmer et al, 1987).

Pueden existir alelos de dos o más loci que se encuentran juntos con una frecuencia mayor que la esperada, si su asociación ocurriera al azar. Este fenómeno se llama desequilibrio de ligamiento o de unión y se presenta en el SPH (Alper et al, 1982). Sus causas se desconocen. Es una característica del sistema HLA en todas las poblaciones estudiadas y es el fenómeno generalmente responsable de los haplotipos más frecuentes, aunque en algunos casos no es así.

a. Causas del desequilibrio de unión

Se han sugerido varios mecanismos para explicar el mantenimiento de un desequilibrio de ligamiento, tales como deriva génica al azar, efecto del fundador, consanguinidad, origen evolutivo reciente, migraciones, mezcla de dos poblaciones diferentes, estratificación de una población y otros (Alper et al, 1982). Sin embargo, no es muy probable que estos sean los responsables del desequilibrio observado en el SPH durante más de algunos miles de años, debido a la distancia que abarca este conjunto de genes. Entonces se proponen otros mecanismos: selección de genes específicos, eliminación de entrecruzamiento y sesgo en la transmisión de haplotipos de individuos masculinos (Awdeh et al, 1983).

Ohta (1982) propone dos mecanismos para explicar el desequilibrio de unión entre dos loci de un mismo cromosoma: la selección natural epistática y la deriva génica al azar antes mencionada. El primer mecanismo aumenta las frecuencias de combinaciones favorables de alelos en una población y por lo tanto, se espera así un desequilibrio estable. Alper et al (1982), proponen que esta selección podría actuar simultáneamente sobre dos o más alelos del SPH o cercanos a él. El desequilibrio de unión resultante llevaría a la persistencia de haplotipos con

frecuencias relativamente altas en ciertas poblaciones. Los loci sobre los que probablemente operaría más la selección son los que controlan la respuesta inmune.

El segundo mecanismo provoca una fluctuación al azar de las frecuencias gaméticas en la población y entonces aumenta la varianza del coeficiente de desequilibrio de unión. El desequilibrio de unión aumenta cuando la migración está limitada. Es decir, la migración limitada es muy efectiva para aumentar, por deriva génica al azar, la diferenciación de tipos de gametos entre las colonias de una población (Ohta, 1982).

Un origen reciente podría ser la explicación más probable de una mutación o alelo raro ligados al SPH, que se encuentren restringidos a un grupo étnico. Tal es el caso de la deficiencia de C2 en el haplotipo HLA-A25, -B18, -Dw2, -DR2, S042; esta deficiencia hereditaria homocigota existe en familias caucásicas de Norteamérica y de Europa Central, lo que va de acuerdo con un origen evolutivo reciente como mutación única en un cromosoma 6.

Se han definido generalmente a pares de alelos, más que a segmentos génicos más largos, como grupos de ligamiento, debido a que históricamente, los loci HLA-A y -B se descubrieron primero que los otros loci del SPH y constituyen un par; además, la evaluación estadística del desequilibrio de unión para tres o más loci es complicada y requiere de grandes cantidades de datos para detectar diferencias (Alper et al, 1982).

b. Definición de haplotipo extendido

Como el desequilibrio de ligamiento entre los loci del HLA se extiende a otros genes de la región, se forman haplotipos llamados extendidos que incluyen entonces a los genes de las clases I, II y III y al gen de la glioxalasa I (GLO I). Se pueden observar tales grupos de ligamiento extendido al analizar haplotipos completos del SPH (Alper et al, 1982; Awdch et al, 1983). Se ha observado una distribución restringida de haplotipos con ciertos alelos de HLA-A, -B y -DR; estos haplotipos extendidos se presentan con frecuencias significativamente mayores a las esperadas si la asociación de

estos alelos fuera al azar.

En el ratón existe una región llamada T/t en el cromosoma 17, que se extiende a lo largo del SPH de esta especie, el sistema H-2. El locus T del ratón se halló porque una mutación dominante (T) producía braquiuria o cola corta. Pronto se encontró que había un número de alelos o pseudoalelos (*t*'s) de T que interactuaban y que eran en su mayoría recesivos. El estado homocigoto de los alelos recesivos *t* se asociaba con letalidad, semi-letalidad o viabilidad total en una etapa específica de la embriogénesis y característica de cada alelo (Awdch et al, 1983).

Los alelos *t* en estado heterocigoto se asocian con supresión marcada del entrecruzamiento en una región de aproximadamente catorce cM que incluye al SPH. Es decir, no hay entrecruzamiento entre cromosomas silvestres y cromosomas con una mutación *t*. Los cromosomas con alelos *t* se transmiten de los machos a su descendencia con una proporción distinta de la esperada de 0.5; la mayoría de los alelos tienen una proporción mayor de 0.5 ó cercana a 1.0. Por otro lado, las frecuencias alélicas de alelos *t* en ratones silvestres son muy altas (de 0.2 ó más) y los mutantes *t* específicos difieren de una población a otra (Alper et al, 1992).

Si algunos haplotipos extendidos humanos son equivalentes a los cromosomas del ratón que portan mutantes *t*, se esperaría supresión de entrecruzamiento en las meiosis entre estos cromosomas y otros cromosomas con haplotipos no extendidos, pero no habría supresión en las meiosis que incluyeran dos haplotipos extendidos o dos no extendidos. Si los haplotipos extendidos del humano se recombinan solamente entre sí, se mantendrían intactos en poblaciones aisladas donde existieran sólo pocos haplotipos extendidos, pero al mezclarse diferentes poblaciones, aumentarían los haplotipos extendidos y podrían incrementarse también los haplotipos recombinantes (Awdch et al, 1983).

Si algunos haplotipos extendidos en el cromosoma 6 humano surgieron por supresión de entrecruzamiento y alcanzaron frecuencias altas en cierta población, debido a una proporción

elevada de transmisión en el sexo masculino, habría diferentes mutaciones tipo *t* en diferentes poblaciones humanas, como en el ratón, y se marcarían por diferentes haplotipos extendidos (Alper et al, 1982).

Si el locus o loci responsables de la supresión de entrecruzamiento se encuentran entre el centrómero y el SPH, como en el ratón, y si hay un gradiente de supresión, los marcadores más razonables de mutaciones *t* serían grupos de ligamiento que incluirían alelos de HLA-DR, -Dw, complotipos y quizá HLA-B. Se esperaría variabilidad en el locus -B y más en el locus -A, porque este último es el más alejado del supuesto locus *t* y por lo tanto, el que menos probablemente se incluiría en la zona de supresión (Alper et al, 1982).

Un cromosoma de humano que porte un alelo tipo *t* tendría las siguientes características:

1. Ser letal recesivo durante la embriogénesis, de tal modo que se observe ausencia o menor número de homocigotos en las poblaciones.
2. Tener supresión de entrecruzamiento con otros cromosomas portadores de *t*.
3. Incluir al locus de la glioxalasa I dentro de la supresión, debido a que este locus está más cerca del centrómero que el SPH.

Awdeh et al (1983), observaron el sesgo de transmisión del haplotipo extendido HLA-A1, -B8, -DR3, SC01, GLO2, ya que se transmitió al 83% de la descendencia de hombres que lo portaban. No se observó el sesgo en mujeres ni tampoco en individuos con el alelo GLO1. Este haplotipo extendido podría marcar una mutante humana parecida a la *t* del ratón.

c. Implicaciones de los haplotipos extendidos

La existencia de haplotipos extendidos en las poblaciones humanas, es decir, de cromosomas tipo *t*, tiene varias implicaciones (Alper et al, 1982). Por ejemplo, los mutantes que

no solamente actúan contra, sino que también revierten el proceso de entrecruzamiento en la meiosis, representarían una fuerza evolutiva considerable, pues el entrecruzamiento se considera una característica de importancia evolutiva de los organismos eucariontes diploides.

Otra implicación es que la tasa de entrecruzamiento en el cromosoma 6 es mayor en mujeres que en hombres, debido quizá a la proporción incrementada de transmisión del sexo masculino de cromosomas tipo t.

También el hecho de que existan en diferentes poblaciones humanas distintos juegos con desequilibrio, puede relacionarse con que variables marcadores del SPH están incrementados en diversos grupos étnicos, en enfermedades iguales.

Además, la dificultad para explicar por qué muchas enfermedades se asocian con el SPH podría disminuir, si existiera una región con supresión de entrecruzamiento, que incluyera a algunos cromosomas de hasta el 0.3% del genoma humano.

El conocimiento de los haplotipos extendidos de una población, puede aplicarse en transplantes de órganos entre individuos de diferentes grupos étnicos. Se ha demostrado por medio de cultivo mixto de linfocitos que no hay aloestimulación cuando se cultivan células de individuos no emparentados que comparten haplotipos extendidos (Awdeh et al, 1985), lo que indica que los individuos que tienen dos haplotipos extendidos pueden ser donadores potenciales de órganos, en la población a la que pertenecen, además de los hermanos que son HLA-idénticos a los enfermos.

La existencia de haplotipos extendidos relativamente fijos provee de una herramienta importante para la investigación sobre la evolución humana y las migraciones de poblaciones (Awdeh et al, 1983).

3. Polimorfismo y Evolución del SPH

a. Origen del polimorfismo del SPH

Un sistema genético pasa por una fase en la que representa un

polimorfismo antes de que un nucleótido o una sustitución de un aminoácido se fije, es decir, antes de que todos los individuos de una especie adquieran dicho nucleótido. La sustitución surge por una mutación y se dispersa en una población hasta que tiene una frecuencia apreciable (>0.01) y más aún, hasta que tiene una frecuencia de 1.0. Cuando la frecuencia ya es apreciable, pero no se ha fijado, representa un polimorfismo. Así, las diferencias entre especies surgen de polimorfismos. Cuando la frecuencia llega a 100%, un gen se ha diferenciado en una especie, a partir del gen correspondiente en otra especie, que surgió de un ancestro común de ambas (Klein, 1987).

Se sugiere que cuando un polimorfismo se mantiene, un hospedero puede enfrentarse a la variación continua de sus parásitos. Conforme cambian los parásitos, se necesitan nuevos alomorfos (alelos) del SPH para proteger, por lo menos a algunos individuos de la población, de las nuevas variantes. Sin embargo, hay pocos datos a favor de esta proposición.

También se acepta en general que el polimorfismo de un locus en una especie dada surgió después de que la especie apareció, es decir, que la evolución de los polimorfismos es postespecífica. Se considera por lo tanto que una especie surgió de un número muy pequeño de individuos, que se aisló de la población parental y que el polimorfismo de la población parental se pierde. En el caso del SPH, si su polimorfismo evolucionara de manera postespecífica, debía ocurrir rápidamente: en 600,000 años debió haber surgido el polimorfismo en el humano, pues éste es el tiempo que tardaron en separarse *Homo sapiens* y *Homo erectus* a partir de un ancestro común (Klein, 1987).

El surgimiento de un polimorfismo también se puede explicar con una evolución transespecífica. Esto es que las diferencias en aminoácidos se acumulan en forma gradual y que cada especie fija solamente unas cuantas sustituciones y pasa el cambio a una especie que le sigue en su línea evolutiva. Según esta hipótesis, el polimorfismo del SPH pudo haberse originado porque los alelos principales del HLA existieran en los primates mucho antes de que apareciera *Homo sapiens*; cuando se estableció la

línea de los homínidos que llevó al hombre moderno, no se inició el HLA con un único alelo en cada locus, sino con todas las formas ancestrales de los alelos principales del humano actual. Klein (1987) explica así que luego hubo mutaciones de estos alelos que produjeron variantes, o alelos menores, que se han ido descubriendo en el humano.

De acuerdo con lo anterior, el mismo autor afirma que los alelos del SPH relacionados con algunos alelos del HLA, se encontrarán en los primates más cercanamente relacionados con el humano, específicamente en el chimpancé y el gorila. De hecho se ha demostrado parentesco serológico entre ciertos alelos de HLA-A y del ChLA (Sistema Principal de Histocompatibilidad del chimpancé).

Hay especies que tienen un polimorfismo muy alto en el SPH, como el humano y el ratón. En el humano hay alrededor de 23 alelos conocidos de HLA-A y 49 de HLA-B. En cambio, hay otras especies que tienen un polimorfismo bajo, como el hamster de Siria (*Mesocricetus auratus*) y la rata de Noruega (*Rattus norvegicus*). Mientras que algunas especies poseen un polimorfismo alto, otras poseen uno no mayor que el de muchos otros loci.

Por otro lado, a pesar de que algunas especies tengan un polimorfismo alto, algunas poblaciones son monomórficas u oligomórficas durante periodos grandes de tiempo (Klein, 1987). Por ejemplo, los ratones (*Mus musculus helgolandicus*) de la Isla Helgoland en el Mar del Norte, tienen sólo dos alelos funcionales en sus loci de clase I; en otras islas, los ratones son completamente monomórficos. Se ha propuesto que la mayoría o todos los alelos del SPH de una población son funcionalmente equivalentes y que por eso los ratones y otros mamíferos no adquieren desventajas cuando se convierten en monomórficos para el SPH.

Según la hipótesis del origen transespecífico de un polimorfismo, se puede concluir que debido a que existe un número grande de alelos principales (troncales) del HLA en el humano, y de su análogo H-2 en el ratón, que estas especies surgieron de

poblaciones relativamente grandes que tenían las formas ancestrales de todos estos alelos. En cambio, otras especies quizá surgieron de un grupo pequeño de individuos, que tenía un polimorfismo pequeño del SPH, y continuarían teniéndolo bajo, aún en el presente. Este sería el caso del hamster sirio y de la rata noruega.

b. Evolución del SPH

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas α de las moléculas de HLA se han comparado entre los antígenos de humano, ratón, rata y conejo. Todos los loci de clase I se relacionan, pues comparten muchos aminoácidos que se encuentran casi en las mismas posiciones a lo largo de toda la cadena α . Esto indica que no ocurrió ningún remodelado de los genes de clase I, al menos durante la evolución de los mamíferos (Klein y Figueroa, 1986). Algunas secuencias las comparten solamente el ratón y la rata y otras, sólo el humano y el conejo, lo que hace pensar que pudo haber existido un gen ancestral del HLA que originó a los genes del ratón y la rata y otro que originó a los genes del hombre y del conejo. Por esta razón, Klein y Figueroa (1986) afirman que el locus H-2K (de clase I) del ratón está igualmente relacionado con los loci HLA-A, -B y -Cw del humano y que no tiene sentido buscar homología interespecífica entre estas dos especies.

Los mecanismos genéticos que pueden explicar la evolución de genes de clase I, incluyen transposición de ADN, entrecruzamiento desigual, recombinación recíproca y conversión génica. No hay evidencia de transposición. El entrecruzamiento desigual entre secuencias intergénicas puede promover homogeneidad en la secuencia de genes no alélicos del HLA. Si hay evidencias de recombinación recíproca entre HLA-A2, -A28 y -Cw3. También hay evidencias de conversión génica, pues se han observado mutaciones sobre todo en ciertas regiones de los exones 2 y 3, en alelos de HLA-A y -B, lo que podría indicar que ha habido una transferencia de bloques de secuencias (Strachan, 1987). Así mismo, se ha visto similitud entre las secuencias nucleotídicas de HLA-B.2, -A2, -A28 y -Cw3 (Koller et al, 1988).

Klein (1984) apoya la creencia de que ocurren entrecruzamientos

Intragénicos (es decir, conversión génica), en los genes del SPH para generar el polimorfismo. Las secuencias de oligonucleótidos compartidas entre genes muy separados entre sí, más bien se deben a mutaciones múltiples y no a conversión génica.

De acuerdo con la hipótesis del origen transespecífico de un polimorfismo, cuando una especie nueva evoluciona sin cambiar drásticamente su modo de vida en comparación con la especie ancestral, hereda de ésta la mayoría del polimorfismo; si se cambia a un nicho totalmente distinto, desarrollará un nuevo polimorfismo. Así alternarían periodos de evolución neutral con periodos en los que actúa la selección natural, de tal modo que esta combinación de evolución transespecífica con evolución neutral y selección natural, es la mejor explicación del origen del polimorfismo del SPH (Klein, 1987).

También se ha propuesto que los genes del SPH están interrelacionados funcionalmente y que se mantienen fuertemente ligados debido a una necesidad funcional, es decir, por selección natural epistática. Ohta (1982) afirma que es más probable que estos "supergenes" se hayan mantenido unidos por una duplicación de un gen primordial.

En cuanto a los genes de clase III, el ligamiento de los genes de C2 y del factor B con genes del HLA, se ha establecido en varias especies además del humano, como en el ratón, el cobayo, el mono y el chimpancé. Por esto parece que el ligamiento no es fortuito, sino resultado de una presión genética selectiva (Campbell, 1987). Las secuencias genicas de C4A y C4B difieren en menos de 1%, en cambio, las de C2 y FB son idénticas solamente en 39%. Parece que durante la evolución de estos genes hubo dos eventos independientes de duplicación génica en paralelo: una duplicación reciente de C4 y 21-OH y otra anterior que generó a C2 y FB (Alper et al, 1983; Campbell, 1987).

4. Frecuencias de Genes y Haplotipos del SPH

El conocimiento de la distribución del HLA en diferentes grupos étnicos puede ser una herramienta valiosa para descubrir características antropológicas e identificar problemas

epidemiológicos particulares, así como nuevos alelos.

Los estudios de comparaciones de frecuencias de alelos, de complotipos y de haplotipos del SPH entre distintas poblaciones, son importantes para caracterizar individuos y poblaciones y para estudiar migraciones, así como para investigar asociaciones entre el HLA y las enfermedades (Tokunaga et al, 1985).

Las frecuencias antigénicas y haplotípicas en distintas poblaciones tienen aplicaciones en estudios clínicos. Desde que se demostró la asociación entre el SPH y la enfermedad, en ratones en 1964, se han estudiado asociaciones en el humano; se han encontrado 50 enfermedades o más asociadas a uno o más antígenos del SPH (Yunis, 1988).

Para hacer estudios de susceptibilidad a enfermedades, es necesario conocer las frecuencias antigénicas normales en la población (Bodmer et al, 1987). Las frecuencias de haplotipos extendidos pueden mostrar además, la posibilidad de desequilibrio de ligamiento de un haplotipo con un gen que dé susceptibilidad a una enfermedad.

Se ha encontrado que los haplotipos son mejores marcadores de un grupo étnico que la frecuencia de un sólo alelo (Bodmer et al, 1987). Además, un haplotipo particular puede estar incrementado en una enfermedad, en vez de un alelo individual. Esto explica el interés que hay en examinar la frecuencia de haplotipos en lugar de aquella de alelos aislados.

Los estudios de familias son importantes para identificar los diferentes alelos del SPH que se heredan ligados, en bloque. Además, para mostrar que dos especificidades se codifican en diferentes loci, es necesario demostrar la segregación de ambas en familias (Bodmer et al, 1987).

a. Estudios en diferentes poblaciones

Se ha descrito la existencia de ocho haplotipos extendidos en 151 familias normales caucásicas (Awdeh et al, 1983), los que

representan el 28% del total de haplotipos observados. Estos haplotipos tuvieron un desequilibrio de ligamiento de 3 puntos (HLA-B, -DR y complotipo), con $P < 0.05$. Se observó que los complotipos revelan distribuciones restringidas y los conjuntos de distribución restringida difieren totalmente de un complotipo a otro: SC01 se restringe a HLA-A1, -BB, -DR3 y en cambio, FC01 no tiene asociación con -BB ni con -DR3.

Se encontró una variación limitada del locus HLA-A en los haplotipos extendidos, lo que sugiere que existen "familias" de estos haplotipos. Además, se encontró que un haplotipo extendido (HLA-B8, -DR3, SC01, GLO2) se transmitía al 83% de la descendencia, lo que mostró un sesgo de transmisión en el sexo masculino.

Alper et al (1983), obtuvieron 623 complotipos diferentes normales de familias caucásicas. Ciertas combinaciones de alelos de C4 aparecieron con mayor o menor frecuencia que lo esperado y además, algunos complotipos posibles no fueron encontrados.

En 1985 se publicó un estudio de Tokunaga et al, donde se presenta el polimorfismo de los loci HLA-A, -B, -C, -DR, C2, C4 y fB, en 83 familias japonesas. Se encontraron ocho diferentes haplotipos extendidos característicos de japoneses, distintos de los caucásicos, que sumaron 37.5% del total de haplotipos. En cuanto a frecuencias antigénicas, el alelo C4A3 tuvo la misma frecuencia que en caucásicos, C4B5 fue relativamente frecuente (no lo es en caucásicos) y C4B1 fue menos frecuente.

Los haplotipos C4A0-B1 y C4A3-B0 tuvieron la misma frecuencia que en caucásicos. De los haplotipos extendidos observados, el HLA-B44, FC31 y el HLA-B7, SC31 también son extendidos caucásicos, aunque difieren en alelos de HLA-DR.

Se han publicado las frecuencias antigénicas y haplotípicas del HLA y de Bf en 450 individuos españoles (Arnaiz-Villena et al, 1981). En este estudio se encontraron haplotipos con desequilibrio de unión para los loci HLA-A, -B, otros para HLA-B, -C y otros para HLA-B, -DR. Algunos de estos haplotipos ya se

habían descrito en poblaciones caucásicas, pero otros haplotipos no.

Se mencionaron cuatro haplotipos que incluían alelos de HLA-A, -B, -DR y fB y un haplotipo que incluía además un alelo de HLA-C. Este último (HLA-Aw30, B18, Cw5, DR3, Bff1), con posible origen norafricano, es frecuente en vascos y sardos; se considera el haplotipo más característico de la población ibérica (González et al, 1986). Los cinco haplotipos quizá tengan desequilibrio de ligamiento y sean extendidos.

También se ha reportado que en las poblaciones españolas el antígeno HLA-A29 es más frecuente que en otras poblaciones (su frecuencia está entre 0.146 y 0.194) (González et al, 1986). El alelo más frecuente en el locus HLA-B es el B44 (0.315), seguido del B35 (0.228). El B27 tiene frecuencia de 0.04; no se encontraron Bw42 ni Bw63. En el locus HLA-Cw, el Cw4 es el alelo más frecuente (0.233). En el locus HLA-DR, el más frecuente es DR7 (0.492), seguido de DR5 (0.397).

González et al (1986) reportan un estudio de HLA-A, -B, -Cw y -DR realizado a 330 individuos normales no relacionados, originarios de las Islas Canarias. Los alelos más frecuentes para cada uno de los loci estudiados fueron: A2 (0.248), B12 (0.184), Cw4 (0.279), y DR3 (0.120).

En 1986 se publicó un trabajo sobre frecuencias antigénicas y haplotípicas de los loci HLA-A, -B, -C, -DR, -D, Bf, C2, C4A, C4B y GLO, en 162 individuos no relacionados de Corea del Sur (Kim et al, 1986). Se encontraron 29 haplotipos con desequilibrio de unión, constituidos solamente por dos alelos de loci del HLA. Catorce complotipos estuvieron en desequilibrio de ligamiento. Si se consideran haplotipos que incluyan alelos del HLA y de loci de moléculas de clase III, se encontró asociación sólo entre HLA-B12 y Bff, que también existe en chinos.

Se describieron frecuencias génicas de HLA-A, -B, -C, -DR, Bf y GLO y algunos posibles haplotipos del SPH en 109 hombres de Arabia Saudita (Ollier et al, 1985). Se encontraron ocho

haplotipos de estos con desequilibrio de unión, de los cuales sólo dos incluían alelos de HLA y Bf.

b. Estudios en México

Se han hecho estudios sobre frecuencias de antígenos de HLA en la población mestiza mexicana (Gorodezky et al, 1979; Arellano et al, 1981). No se incluyen los complotipos.

Gorodezky et al (1979), tipificaron a 200 individuos sanos no relacionados de la Ciudad de México y calcularon las frecuencias antigénicas y haplotípicas de los loci HLA-A y -B. Se encontraron haplotipos caucásicos en frecuencias menores que en dicho grupo étnico. Los cinco haplotipos que mostraron desequilibrio de ligamiento no resultaron ser los más frecuentes.

En el estudio de Arellano et al (1981), se calcularon las frecuencias génicas y haplotípicas de los loci HLA-A, -B y -C. Se estudiaron 665 mestizos mexicanos sanos, no relacionados, en la Ciudad de México. Se encontraron algunas diferencias entre este trabajo y el de Gorodezky et al (1979), en las frecuencias antigénicas. También hubo diferencias cuando se hicieron comparaciones con dos estudios de poblaciones México-norteamericanas. Se encontraron sólo dos haplotipos de HLA-A, -B con desequilibrio de ligamiento, uno de los cuales (A1, B8) también fue encontrado por Gorodezky et al, (1979).

c. Tablas de haplotipos en distintas poblaciones

A continuación se presentan algunos haplotipos y algunas de las frecuencias reportadas para estos trabajos.

COMPLOTIPOS EN CAUCASICOS NORMALES *

N = 643 COMPLOTIPOS

COMPLOTIPO	FRECUENCIA
SC31	0.389
SC01	0.127
FC31	0.112
SC30	0.064
SC42	0.050
SC61	0.031
SC21	0.028
FC(3,2)0	0.022
SC02	0.022
SC33	0.020
FC01	0.016
SB42	0.016

* Carroll y Alper (1987)

HAPLOTIPOS EXTENDIDOS CAUCASICOS *

HLA-A	HLA-B	COMPLOTIPO	HLA-DR	FRECUENCIA HAPLOTIPICA
1 0.75				
3 0.11				
2 0.07				
OTRO 0.07	B8	SC01	DR3	0.093
3 0.46				
2 0.31				
OTRO 0.23	B7	SC31	DR2	0.059
2 0.45				
29 0.27				
w23 0.18				
OTRO 0.09	B12(w44)	FC31	DR7	0.037
2 0.60				
OTRO 0.40	B12(w44)	SC30	DR4	0.034
1 0.50				
2 0.30				
OTRO 0.20	B17(w57)	SC61	DR7	0.028
2 0.75				
3 0.25	B40(w61)	SC02	DRw6	0.011
2 0.50				
3 0.50	B14	SC22	DR1	0.011
1 0.33				
2 0.33				
3 0.33	B15(w62)	SC33	DR4	0.009

* Awdeh et al (1983)

HAPLOTIPOS DE HLA-COMPLEMENTO EN JAPONESES *

HLA-A	HLA-C	HLA-B	COMPLOTIPO	HLA-DR	FRECUENCIA HAPLOTIPICA
24	-	52	SC20	2	0.111
24 U 11	1	54	SC35	4	0.059
33	-	44	FC31	13	0.042
24	7	7	SC31	1	0.042
11	4	62	SC31	4	0.036
2	1	46	SC42	8	0.033
26	3	61	SC31	9	0.029
2 O 24	1	59	SC35	4	0.023

* Tokunaga et al (1985)

HAPLOTIPOS DE HLA Y Bf CON PROBABLE DESEQUILIBRIO
DE LIGAMIENTO EN ESPAÑOLES *

A3 B7 Bw6 BfS DR2
A29 Bw44 Bw4 BfF DR7
A1 B8 Bw6 BfS DR3
AW30 B18 Cw5 Bw6 BfF1 DR3

* Arnaiz Villena et al (1981)

ANTIGENOS Y HAPLOTIPOS DE HLA MAS CARACTERISTICOS
DE POBLACIONES IBERICAS Y ABORIGENES DEL AREA IBEROAMERICANA *

ESPAÑA
A30 B18 CW5 DR3
AW33 B14
DR7

ISLAS CANARIAS
B14
DR3

PORTUGAL
AW33 B14
B35 CW4
A24 B35
A25 B38

AMERICA CENTRAL Y DEL SUR
A31 B35 CW4
A2 B35 CW4
A2 B39 CW-

* González et al (1986)

HAPLOTIPOS DE HLA Y Bf CON PROBABLE DESEQUILIBRIO
DE LIGAMIENTO EN ARABIA SAUDITA *

Aw19 Cw7 B8 DR3 BfF
A2 B51 DR4
A2 Cw4 Bw53 DR1
Cw6 Bw50 DR7 BfSO.7
Aw33 Cw3 Bw58 DR3
Dw8 B14 DR1
Cw7 B7 DR2
A9 Cw4 B35 DR5

* Ollier et al (1985)

HAPLOTIPOS DE HLA-A Y -B CON DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO
EN MESTIZOS MEXICANOS

▪		@
A1 B8		A1 B8
A1 Bw35		A28 B1
A2 B12		
A10 Bw35		
A28 Bw21		

▪ Gorodezky et al
(1979)

@ Arellano et al
(1981)

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- Encontrar la frecuencia de antígenos del SPH en la población normal mestiza mexicana.
- Observar si existe o no desequilibrio de ligamiento entre alelos del SPH en esta población.
- Encontrar los haplotipos del SPH más frecuentes en la población mencionada.
- Observar si se presentan o no haplotipos extendidos.
- Comparar los resultados con los descritos previamente.

MATERIALES Y METODOS

1. Familias

Se tipificaron 259 familias mestizas mexicanas de candidatos a trasplantes de órganos que acudieron al Departamento de Trasplantes del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", de enero de 1987 a abril de 1988. Se incluyeron 32 familias mestizas mexicanas normales de individuos nacidos en la Ciudad de México.

2. Tipificación de HLA y Complotipos

a. Tipificación de HLA

Los antígenos de histocompatibilidad (HLA) se tipificaron mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad (Terasaki, et al, 1964; Terasaki et al, 1978) en linfocitos de sangre periférica, aislados por medio de gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque. Estas células se probaron contra un juego de antisueros HLA comerciales (Pel Freez Clinical Systems, Brown Deer, Wisconsin, USA), que definían 16 especificidades del locus HLA-A, 37 del locus -B y 12 del locus -DR. Para la tipificación del locus HLA-DR en particular, se usó la técnica del VIII Taller Internacional de Histocompatibilidad en Oxford, Inglaterra (Van Rood et al, 1975), para lo cual se aislaron los linfocitos B mediante roseteo con glóbulos rojos de carnero. En el ensayo, los anticuerpos presentes en los antisueros se unen a los sitios antigénicos correspondientes sobre la membrana celular del linfocito y con la adición de suero de conejo como fuente de complemento, se lisa la membrana celular. Posteriormente se tiñen las células lisadas con eosina y se fijan con formalina. Las células así teñidas indican una reacción positiva de antígeno-anticuerpo.

b. Tipificación de C2

El polimorfismo de C2 se tipificó por medio de isoelectroenfoque de plasma o suero en geles de poliacrilamida (Alper, 1976). Los patrones se revelaron mediante un ensayo hemolítico con eritrocitos de carnero sensibilizados y suero humano diluido 1:80 en solución salina isotónica de veronal (lo que lo hace deficiente en C2), con 0,1% de gelatina con Mg^{++} $10^{-3}M$ y Ca^{++}

$1.5 \times 10^{-4} M$. El patrón de bandas de lisis es característico para cada alelo. El gen estructural de C2 tiene 3 alelos designados como C2^A, C2^B y C2^C.

c. Tipificación de C4

Se eliminó el ácido siálico de muestras de plasma mediante incubación con neuraminidasa tipo VI obtenida de *Clostridium perfringens* (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a una concentración de 10 U de enzima por mililitro de plasma, durante 18 h. a 4 grados centígrados; esto se realizó al mismo tiempo que se dializó la muestra contra un amortiguador de fosfatos que contenía 0.005 mol/l de Na₂EDTA. (Awdeh y Alper, 1980). Las variantes estructurales se detectaron por electroforesis del plasma desializado en geles de agarosa e inmunofijación con antisuero anti-C4 humano. Se hizo inmunoelectroforesis cruzada de muestras de plasma desializado para detectar haplotipos con alelos nulos en heterocigosis (Awdeh et al, 1979).

d. Tipificación de factor B

El factor B se tipificó con muestras de plasma EDTA que se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa con amortiguador de barbital 0.05 mol/ml, que contenía lactato de calcio (1.8 mol/ml). Los patrones se identificaron mediante inmunofijación con anti-factor B humano de cabra (Atlantic Antibodies, Scarborough, Maine), según Alper et al, 1972.

e. Nomenclatura de genes del complemento

La nomenclatura empleada está de acuerdo con las normas sugeridas por el Comité Internacional para genes humanos (Shows et al, 1979). Se asignaron los alelos de C4 según las normas acordadas en el cuarto taller internacional para la genética del complemento, efectuado en la ciudad de Boston, Mass. en 1982 (Mauff et al, 1983).

En el locus C4A existen seis variantes estructurales comunes, designadas como C4A¹ hasta C4A⁶ y una variante nula, designada como C4A^{Q0}. En el locus C4B, existen cinco variantes estructurales comunes, designadas como C4B¹ hasta C4B⁵ y además, una variante nula, C4B^{Q0}.

Los alelos de estos genes se heredan en bloque (son llamados complotipos); así por ejemplo, el complotipo SC31 se constituye de los alelos FB¹S, C2¹C, C4A¹3, C4B¹.

3. Análisis Estadístico de los Resultados

Se tomaron en cuenta sólo los haplotipos de las familias informativas.

a. Frecuencia génica de alelos de HLA-A, -B y -DR:

Se calculó por cuenta directa (dividir el número de cromosomas con un alelo dado entre el número total de cromosomas).

b. Frecuencia de haplotipos de dos puntos (de HLA-A, -B, de -B, -DR, de -B, complotipo, de -DR, complotipo), de tres puntos (de HLA-B, -DR y complotipo) y frecuencia de complotipos:

También calculadas por cuenta directa (dividir el número de apariciones de un haplotipo dado entre el número total de haplotipos).

c. Asociación gamética o desequilibrio de ligamiento entre dos loci de HLA o entre HLA y complotipo:

Una estimación del grado de desequilibrio de ligamiento (llamada delta), está dada por la diferencia entre las frecuencias observada y esperada de cromosomas que no llevan ninguno de los genes en cuestión (Simons y Tait, 1984). Para la fórmula de la delta (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1971), se supone la existencia de un locus con determinantes alélicos para ciertos antígenos, con frecuencias alélicas p_i , $i=1\dots k$ y un segundo locus, con frecuencias alélicas p_j , $j=1\dots m$; x_{ij} es la frecuencia del haplotipo con los alelos i y j en cada locus.

Las asociaciones gaméticas entre i y j están dadas en la siguiente tabla de contingencia de 2 x 2, donde se dan las frecuencias de cada haplotipo:

	i+	i-	
j+	$x_{ij}=a$	$(P_j-x_{ij})=b$	P_j
j-	$(P_i-x_{ij})=c$	$(1-P_i-P_j+x_{ij})=d$	$1-P_j$
	P_i	$1-P_i$	1

La asociación gamética (desequilibrio de unión) entre los alelos i y j está dada por:

$$D_{ij} = x_{ij}(1-P_i-P_j+x_{ij}) - (P_i-x_{ij})(P_j-x_{ij}) = x_{ij} - P_iP_j = ad-cb$$

Las frecuencias génicas de HLA-A y -B, las frecuencias de haplotipos de HLA-A, -B y sus deltas, se compararon con las reportadas por Arellano et al (1981), por medio de Chi cuadrada con corrección de Yates. Las frecuencias de los complotipos se compararon con las reportadas por Tokunaga et al (1985), para observar el grado de mestizaje oriental en la población mexicana. Las frecuencias de haplotipos de tres puntos se compararon con las reportadas por Tokunaga et al (1985) y por Awdeh et al (1981), para analizar el mestizaje oriental y caucásico, así como para encontrar los posibles haplotipos extendidos que distingan a la población mestiza mexicana.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. HLA-A

Se obtuvieron frecuencias génicas de HLA-A a partir de 768 cromosomas y se encontraron ocho alelos troncales diferentes.

Las frecuencias de los alelos troncales (como A19, A9 y B16) mostraron ser marcadores más representativos de la población estudiada, pues los subtipos individuales se detectaron con muy bajas frecuencias. Por esa razón las frecuencias de los subtipos se sumaron a la frecuencia del alelo troncal correspondiente.

En el locus HLA-A, el alelo más frecuente fue el A2 (0.2761, Tabla I). Este alelo parece caracterizar a la población mestiza mexicana, pues en contraste, los alelos A1, A3, A10 y A11 son entre cuatro y seis veces menos frecuentes. Otros alelos muy comunes fueron A19 (0.1978), A9 (0.1635) y A28 (0.1223).

I . F R E C U E N C I A S G E N I C A S * D E H L A - A

	N=768	N=665
	CROMOSOMAS *	INDIVIDUOS **
A2	0.2761	0.351
A19	0.1978	0.056 ***
A9	0.1635	0.146
A28	0.1223	0.058
A1	0.0728	0.070
A3	0.0632	0.067
A10	0.0563	0.078
A11	0.0453	0.058

* Presente trabajo

** Arellano et al (1981)

*** P < 0.025 corregida con Yates (Simons y Tait, 1984, p. 108-109)

Al comparar las frecuencias obtenidas con las del estudio de Arellano et al (1981), se encuentran diferencias en todos los alelos, sobre todo en el A19. Se encontró que su frecuencia es de 0.1978, mientras que Arellano et al la reportan de 0.056 (la suma de los subtipos A29, Aw30, Aw31 y Aw32). Las diferencias fueron significativas ($P < 0.025$, con corrección de Yates). Esto indica que las diferencias pueden deberse a que en el trabajo de Arellano et al, no se detectaron adecuadamente los antígenos, y que en el presente, al emplear nuevos antisueros, se encontraron frecuencias más reales.

Otro factor probable es que en este estudio se obtuvieron las frecuencias por cuenta directa y a partir de estudios de familias. Así se pudo confiar con seguridad en la asignación de homocigotos y heterocigotos. En cambio, Arellano et al, hicieron los cálculos con base en las frecuencias fenotípicas, sin poder así tomar en cuenta a los homocigotos, de manera distinta de los heterocigotos. Por otro lado, se encontraron con baja frecuencia alelos caucásicos como A1 y A3.

2. HLA-B

En el locus HLA-B se encontraron veinte alelos troncales distintos a partir de 759 cromosomas. El más frecuente fue el B16 (0.1542, Tabla II); le siguió el B35 (0.1423). Estos alelos parecen caracterizar a la población indígena y a la mestiza. Otros frecuentes fueron el B40 (0.1054), el B5 (0.0922), que es representante de la población oriental y el B12 (0.0856).

II. FRECUENCIAS GENICAS DE HLA - B

N=753 CROMOSOMAS * N=665 INDIVIDUOS **

B16	0.1542	0.061
B35	0.1423	0.153
B40	0.1054	0.043
B5	0.0922	0.109
B12	0.0856	0.111
B15	0.0672	0.062
B14	0.0619	0.042
B7	0.0567	0.092
B21	0.0487	0.034
B8	0.0303	0.042
B18	0.0303	--
B17	0.0264	0.024
B27	0.0237	0.021
B13	0.0171	0.025
B41	0.0145	--
B53	0.0105	--
B70	0.0105	--
B22	0.0092	0.015
B42	0.0079	--
B37	0.0053	--

* Presente trabajo

** Arellano et al (1981)

Al comparar con los datos de Arellano et al, de nuevo se observan diferencias en todos los alelos. Cabe recalcar que aunque sean similares las frecuencias de B35, se detectó claramente que el otro alelo muy común, el B16, es más frecuente y sin duda muy característico de los mestizos mexicanos, pues en estos estudios de familias se observa sin duda su alta frecuencia; en cambio, Arellano et al, sólo lo reportan con 0.061. Se puede considerar que en el citado trabajo se detectó defectuosamente este alelo y que la frecuencia reportada aquí es más real, debido a que se contó con mejores reactivos para caracterizar los antígenos.

Por otro lado, fue posible detectar alelos no reportados por Arellano (B18, B37, B41, B42, B53 y B70), lo que enriquece la información sobre el HLA en mestizos mexicanos. A pesar de que se hayan encontrado con frecuencias bajas, su detección real podría indicar que tuvieron un ingreso reciente a la población.

La frecuencia más alta de un alelo de HLA-B (B16, 0.1542), no fue tan alta como aquella de un alelo de HLA-A (A2, 0.2761). Esto es comprensible, ya que va de acuerdo con que el locus -B sea más polimórfico que el -A (de hecho es el locus más polimórfico del SPH).

El polimorfismo alto en la población estudiada (encabezado por el HLA-B), podría mostrar, de acuerdo con los conceptos de Klein (1987), que esta población se inició a partir de un grupo relativamente grande de individuos, que contribuyeron con una variedad amplia de alelos del SPH. Por lo tanto, se puede concluir que la población normal mestiza mexicana se ha constituido de individuos de diversos orígenes, que la proveyeron de un conjunto heterogéneo de alelos del SPH.

3. HLA-DR

Se reportan por primera vez las frecuencias de alelos del locus HLA-DR. Se encontró que el más frecuente es el DR4 (0.253, Tabla III), al que le siguen DR8 y DR2. Es interesante que el DR4 y el DR2 son frecuentes también en japoneses. En cambio, el DR3, común en caucásicos, no fue muy frecuente en este estudio. A pesar de que se contó con sólo cerca de cien cromosomas para los cálculos de estas frecuencias, se puede considerar que son confiables, debido a que el estudio se basó en asignaciones por haplotipos de familias y a que las frecuencias se basan en los genotipos.

III. FRECUENCIAS GENICAS DE HLA - DR

N=87 CROMOSOMAS

DR4	0.253
DR8	0.161
DR2	0.126
DR5	0.103
DR7	0.092
DR1	0.092
DR6	0.057
DR3	0.046
DRX	0.046
DR10	0.023

4. Complotipos

También este es el primer reporte de frecuencias de complotipos en mestizos mexicanos. Se encontró como más frecuente al complotipo SC31 (0.4020, Tabla IV). Es interesante observar que tiene una frecuencia similar a la de diversas poblaciones del mundo. También es el más común en japoneses y caucásicos. Por lo tanto, este complotipo podría servir como referencia, pues se halla con frecuencia cercana a 0.4 en diversas etnias.

IV. FRECUENCIAS DE COMPLITIPOS
EN TRES GRUPOS ETNICOS

MEXICANOS *		JAPONESES **		CAUCASICOS ***	
N=87 HAPLOTIPOS		N=322 HAPLOTIPOS		N=623 HAPLOTIPOS	
SC31	0.4020	0.410		0.403	
SC42	0.1150	0.099		0.040	
SC01	0.092	0.059		0.127	
SC30	0.046	0.037		0.053	
SC32	0.046	0.034		0.011	
SC21	0.046	--		0.022	
FC30	0.046	--		0.031	
FC01	0.046	--		0.029	
FC31	0.04	0.078		0.096	
SB42	0.023	0.022		0.019	
SC11	0.023	--		--	
SC34	0.012	--		--	
SC02	0.012	--		0.029	
FC3, 20	0.012	--		--	
FC42	0.012	--		--	
F1C30	0.012	--		--	
FC21	0.012	--		--	
SC20	--	0.096		--	
SC35	--	0.090		--	
FAT31	--	0.016		--	
FBI31	--	0.012		--	
SC61	--	--		0.034	
SC33	--	--		0.014	
SC22	--	--		0.013	

* Presente trabajo

** Tokunaga et al (1985)

*** Alper et al (1983)

Las frecuencias de complitipos obtenidas en este estudio tienen más similitudes con las japonesas que con las caucásicas. Se encontró que el SB42 tiene frecuencias similares en mestizos y

Japoneses, además del SC31.

Los complotipos SC42, SC32 y SB42 tuvieron frecuencias más similares a las japonesas que a las caucásicas. Los complotipos SC21, FC30 y FC01 no se encuentran en japoneses, pero en mexicanos se observaron con una frecuencia de 0.046 cada uno. Además, estos tres complotipos son menos frecuentes en caucásicos. Esto podría indicar que tengan un origen no oriental ni caucásico, sino probablemente autóctono. Esto mismo se puede aplicar al SC11, que es poco frecuente en este estudio, pero que no se observa en los otros dos grupos étnicos antes mencionados.

Se observaron seis complotipos raros, con frecuencia cada uno menor de 0.02. En total suman 0.072 de todos los complotipos. El complotipo SC31 es mucho más común que otros, así como ocurre en otras poblaciones. La frecuencia tan alta de un solo complotipo y la frecuencia tan baja de muchos otros, se debe probablemente a que el SC31 realmente representa un "complotipo troncal" de diversos subtipos. Se podrían encontrar subtipos si se estudiaran variantes de cada uno de los loci de clase III, por medio de técnicas electroforéticas o de biología molecular, que demostraran polimorfismos aún no revelados.

5. Haplotipos de Dos Puntos

El haplotipo de HLA-A, -B más frecuente fue el A2 B16 (0.0563, Tabla V), seguido de A2 B35 (también con 0.0563), A2 B5 y A2 B15 (cada uno de estos con 0.0375). Estos haplotipos se constituyen de alelos frecuentes en ambos loci. Se encontraron quince haplotipos con frecuencias mayores de 0.02.

V. FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS
DE HLA - A, - B Y DELTA

N=586 HAPLOTIPOS			N=665 INDIVIDUOS
HAPLOTIPO	FRECUENCIA *	DELTA	FRECUENCIA **
A2 B16	0.0563	0.0138	-0.0044
A2 B35	0.0563	0.0170	0.0514
A2 B5	0.0375	0.0121	0.057
A2 B15	0.0375	0.0121	-0.0038
A9 B16	0.0341	0.0089	0.0008
A28 B40	0.0307	0.0178	0.0029
A28 B16	0.0307	0.0119	-0.0005
A19 B12	0.0290	0.0121	-0.0009
A9 B40	0.0273	0.0101	0.0169
A1 B8	0.0222	0.0200	0.0159
A19 B40	0.0222	0.0013	-0.0028
A3 B7	0.0205	0.0169	0.0109
A9 B12	0.0205	0.0065	0.0103
A19 B16	0.0205	-0.0100	-0.0012
A19 B35	0.0205	-0.0077	-0.0031

* Presente trabajo. Se incluyen solamente los haplotipos con frecuencias mayores de 0.02.

** Arellano et al (1981)

En cuanto a los valores de delta, el haplotipo caucásico A1 B8 tuvo el más alto (0.0200), a pesar de no ser de los más frecuentes. Esta delta puede indicar un desequilibrio de unión positivo, que va de acuerdo con el concepto de haplotipo extendido expuesto en el trabajo de Awdeh et al (1983).

Otros haplotipos con deltas positivas mayores de 0.0100, fueron A2 B5, A19 B12, A2 B16, A3 B7, A2 B35, A28 B40 y A2 B15. Todos tienen frecuencias haplotípicas mayores de 0.02, pero como se observa en la Tabla V, los haplotipos más frecuentes no tienen las deltas más grandes.

Debido a que sólo en el caso de A1 B8 la delta fue mayor de

0.0199, probablemente los demás haplotipos no son extendidos característicos de los mestizos mexicanos. De los otros haplotipos con deltas elevadas, A2 B15, A3 B7 y A19 B12 también son haplotipos frecuentes en caucásicos, y forman parte de haplotipos extendidos en ese grupo étnico.

Se puede decir que no se encontraron haplotipos de HLA-A, -B característicos mexicanos porque la distancia entre los loci HLA-A y -B es relativamente grande como para mantener un desequilibrio de ligamiento. Por otro lado, se encontraron muchas deltas negativas, que no se muestran en la tabla, que indican desequilibrio negativo.

Los haplotipos más frecuentes de HLA-A, -B tuvieron deltas pequeñas, por lo que su alta frecuencia no se debe a un desequilibrio de unión, sino a las frecuencias elevadas de A2, B16 y B35.

En la Tabla V se incluyen datos de Arellano et al (1981). Las frecuencias haplotípicas son diferentes, pero no se consideró correcto realizar una prueba estadística para evaluar las diferencias, porque Arellano et al, emplearon una fórmula de delta que se basa en las frecuencias fenotípicas de los haplotipos, mientras que en este estudio se usó otra basada en las frecuencias genotípicas. Además, Arellano et al obtuvieron las frecuencias haplotípicas a partir de las deltas y reportan frecuencias negativas, por lo que tampoco se compararon las frecuencias.

Se puede pensar que las frecuencias reportadas en este estudio son más reales, puesto que se calcularon por cuenta directa a partir de genotipos, con base en asignaciones de alelos de dos o más loci, a un mismo cromosoma, gracias a los datos de familias.

En la Tabla VI se enlistan los ocho haplotipos de HLA-B, -DR encontrados con frecuencias mayores de 0.02. Los tres haplotipos más frecuentes son B16 DR2, B35 DR4 y B35 DR8, cada uno con frecuencia de 0.069. Con excepción de B16 DR8, con delta negativa, todos los haplotipos tienen deltas mayores de 0.0190.

Incluso hay tres (B16 DR2, B35 DR8 y B40 DR8) mayores de 0.0400 y una (B14 DR1) mayor de 0.0500. Este último haplotipo es caucásico: de nuevo la delta mayor se observó en un haplotipo caucásico, el cual no fue tan frecuente como otros con deltas menores.

VI. FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS
DE HLA - B, - DR Y DELTA
N=87 HAPLOTIPOS

HAPLOTIPO	FRECUENCIA	DELTA
B16 DR2	0.0690	0.0414
B35 DR4	0.0690	0.0254
B35 DR8	0.0690	0.0412
B16 DR4	0.0575	0.0022
B14 DR1	0.0575	0.0501
B40 DR8	0.0575	0.0408
B40 DR4	0.0460	0.0198
B16 DR8	0.0345	-0.0007

Se incluyen solamente los haplotipos con frecuencias mayores de 0.02.

Las Tablas VII y VIII muestran los datos de haplotipos de HLA-B, complotipo y de HLA-DR, complotipo y se puede observar que las deltas son menores entre alelos de -B, complotipo que entre alelos de -DR, complotipo. Esto hace pensar que puede existir un desequilibrio de unión mayor entre HLA-DR y complotipo que entre HLA-B y complotipo, lo que está de acuerdo con que los loci de HLA-DR y del complotipo están más cercanos entre si, están separados por 300 a 400 kb aproximadamente; en cambio, los loci de HLA-B y el complotipo están a 600 kb aproximadamente.

VII. FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS
 DE HLA-B, COMPLITIPO Y DELTA
 N=87 HAPLOTIPOS

HAPLOTIPO	FRECUENCIA	DELTA
B16 SC31	0.1034	0.0156
B35 SC31	0.0805	0.0111
B40 SC31	0.0575	0.0159
B5 SC31	0.0345	-0.0118
B35 SC42	0.0345	0.0147

Se incluyen solamente los haplotipos con frecuencias mayores de 0.02.

VIII. FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS
 DE HLA-DR, COMPLITIPO Y DELTA
 N=87 HAPLOTIPOS

HAPLOTIPO	FRECUENCIA	DELTA
DR4 SC31	0.1609	0.0592
DR2 SC31	0.0920	0.0411
DR8 SC42	0.0460	0.0275
DR5 SC31	0.0460	0.0044
DR7 FC01	0.0345	0.0303

Se incluyen solamente los haplotipos con frecuencias mayores de 0.02.

Para cada par de puntos, las deltas mayores se observan en los haplotipos B40 SC31 (0.0159), B16 SC31 (0.0156), DR4 SC31 (0.0592) y DR2 SC31 (0.0411). Estos haplotipos podrian constituir extendidos mexicanos junto con el locus HLA-B, a pesar de no ser los más frecuentes.

6. Haplotipos de Tres Puntos

En la Tabla IX se indican las frecuencias de haplotipos de tres puntos del SPH, las primeras reportadas para mestizos mexicanos. El hecho de que el haplotipo más frecuente haya sido el B35 DR4 SC31 (0.069) tiene importancia, ya que se constituye de alelos altamente frecuentes en sus respectivos loci. Se incluyen en la lista las frecuencias de muestras japonesas y caucásicas, con lo que se observa fácilmente que no se comparten haplotipos frecuentes de tres puntos con estos dos grupos étnicos.

IX. FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS DE HLA - B, - DR Y COMPLETOS EN TRES GRUPOS ÉTNICOS

MEXICANOS *	JAPONESES **	CAUCASICOS ***
N=87 HAPLOTIPOS	N=307 HAPLOTIPOS	N=350 HAPLOTIPOS
B35 DR4 SC31 0.069	B52 DR2 SC20 0.111	B8 DR3 SC01 0.093
B16 DR2 SC31 0.057	B54 DR4 SC35 0.059	B7 DR2 SC31 0.059
B40 DR4 SC31 0.046	B44 DR13 FC41 0.042	B12 DR7 FC31 0.037
B35 DR8 SC42 0.034	E7 DR1 SC31 0.042	B12 DR4 SC30 0.034
B14 DR1 SC21 0.034	B62 DR4 SC31 0.036	B17 DR7 SC61 0.028
B16 DR8 SC32 0.023	B46 DR8 SC42 0.033	B40 DR6 SC02 0.011
B16 DR4 SC31 0.023	B61 DR9 SC31 0.029	B14 DR1 SC22 0.011
B12 DR7 FC01 0.023	B59 DR4 SC35 0.023	B15 DR4 SC33 0.009
B40 DR8 SB42 0.023		
B14 DR1 SC01 0.023		
B16 DR4 SC01 0.023		

* Presente trabajo

** Tokunaga et al (1985)

*** Alper et al (1983)

En los mexicanos se distinguen ciertos haplotipos. Si se consideran los haplotipos de dos puntos con las deltas más

elevadas y con frecuencias altas, los probables haplotipos extendidos de tres puntos serían B35 DR4 SC31, B16 DR2 SC31 y B40 DR4 SC31.

No se observa homogeneidad en los haplotipos de tres puntos. La mayor variación se observa en los complotipos. Esto se debe probablemente a que aún no se fijan en esta población haplotipos que sean extendidos, pero quizá se fijan más adelante, después de cierto número de generaciones. Puede suponerse que en la población caucásica se observan los haplotipos extendidos porque se trata de una población consolidada desde hace varios siglos y en cambio, la población mestiza mexicana de este estudio tiene un origen más reciente.

De acuerdo con la hipótesis del origen transespecífico de un polimorfismo (Klein, 1987), en la población mestiza mexicana, que tiene un origen múltiple, se observarían diversos alelos y haplotipos provenientes de cada población parental (por efecto del fundador) que provocarían un estado muy polimórfico. Esta situación se mantendría mientras no se alcanzara un equilibrio en las frecuencias génicas y haplotípicas y no se detuvieran los movimientos migratorios. Según los resultados de este trabajo, la población estudiada se encuentra probablemente en un estado polimórfico previo al equilibrio, por lo que no se observan claramente los haplotipos extendidos.

7. Aplicaciones del Estudio

Se puede considerar que las aportaciones de este trabajo podrán ser trascendentes para múltiples estudios de población, tales como genética de poblaciones, análisis del mestizaje en mexicanos y orígenes étnicos de diversos grupos.

La información recabada en este estudio también podrá ser muy útil para los programas de trasplantes de órganos en nuestro país.

Así mismo, ofrece datos pertinentes para estudios de asociaciones entre el Sistema Principal de Histocompatibilidad y diversas enfermedades en la población mestiza mexicana.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo se pueden ennumerar como sigue:

1. Los alelos del SPH que caracterizan a los mestizos mexicanos son HLA-A2, -B16, -DR4, FB*2, C2*C, C4A*3, C4B*1.
2. No hay desequilibrio de unión positivo entre alelos de HLA-A y -B que caractericen a los mestizos.
3. Hay desequilibrio entre alelos de HLA-B y -DR, HLA-B y complotipo y HLA-DR y complotipo.
4. Las deltas más altas se observan en haplotipos caucásicos, de tal manera que, con base en este estudio, el carácter extendido se aplica solamente a haplotipos característicos de ese grupo étnico. Estos fueron reportados como tales por Awdeh et al (1983).
5. Los haplotipos de tres puntos con probable desequilibrio de unión son B35 DR4 SC31, B16 DR2 SC31 y B40 DR4 SC31.
6. No hay evidencias definitivas de haplotipos extendidos característicos de los mestizos mexicanos.

BIBLIOGRAFIA

Alper, CA; Boenisch, T; Watson, L. 1972. Genetic polymorphism in human glycin-rich beta-glycoprotein. J Exp Med 135: 68-80

Alper CA. 1976. Inherited structural polymorphism in human C2: Evidence for genetic linkage between C2 and Bf. J Exp Med 144: 1111-1115

Alper, CA; Awdeh, ZL; Raum, DD; Yunis, EJ. 1982. Hypothesis-Extended major histocompatibility complex haplotypes in man: role of alleles analogous to murine t mutants. Clin Immunol Immunopathol 24: 276-285

Alper, CA; Raum, D; Karp, S; Awdeh, ZL; Yunis, EJ. 1983. Serum complement "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (complotypes). Vox Sang 45:62-67

Arellano, J; Vallejo, M; Gómez Estrada, H; Kretschmer, R. 1981. HLA Profiles of the Mexican Mestizo population. Tissue Antigens 18: 242-246

Arnaiz-Villena, A; Rodríguez de Córdoba, S; Vela, F; Pascual, JC; Cerveró, J; Bootello, A. 1981. HLA antigens in a sample of the Spanish population: common features among Spaniards, Basques and Sardinians. Hum Genet 58 (3): 344-348

Awdeh, ZL; Raum, D; Alper, CA. 1979. Genetic polymorphism of the fourth component of human complement: detection of heterozygotes. Nature 282:205-207

Awdeh, ZL y Alper, CA. 1980. Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement (C4). Proc Natl Acad Sci USA 77:3576-3580

Awdeh, ZL; Raum, D; Alper, CA. 1981. Major histocompatibility complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes) (Abstract). Fed Proc 40: 1066

Awdeh, ZL; Räum, D; Yunis, EJ; Alper, CA. 1983. Extended HLA/complement allele haplotypes: evidence for T/t-like complex in man. Proc Natl Acad Sci USA 80:259-263

Awdeh, ZL; Eynon, E; Stein, R; Alper, CA; Alosco, SM; Yunis, EJ. 1985. Unrelated individuals matched for MHC extended haplotypes and HLA-identical siblings show comparable responses in mixed lymphocyte culture. Lancet Vol II (8460): 853-856

Bidwell, J. 1988. DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. Immunol Today 9: 18-22

Bjorkman, PJ; Saper, MA; Samraoui, B; Bennett, WS; Strominger, JL; Wiley, DC. 1987a. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329: 506-512

Bjorkman, PJ; Saper, MA; Samraoui, B; Bennett, WS; Strominger, JL; Wiley, DC. 1987b. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature 329: 512-518

Blanck, G. y Strominger, JL. 1988. Molecular organization of the DQ subregion (DQ-DX-DV-DQ) of the human MHC and its evolutionary implications. J Immunol 141: 1734-1737

Bodmer, JG; Kennedy, LJ; Lindsay, J; Wasik, AM. 1987. Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. Brit Med Bull 43 (1):94-121

Brown, JH; Jardetzky, T; Saper, MA; Samraoui, B; Bjorkman, PJ. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. Nature 332: 845-850

Campbell, RD. 1987. The molecular genetics and polymorphism of C2 and factor B. Brit Med Bull 43 (1): 37-49

Carroll, MC; Campbell, RD; Porter, RR. 1985. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. Proc Natl

Carroll, MC y Alper, CA. 1987. Polymorphism and molecular genetics of human C4. Brit Med Bull 43 (1): 37-49

Cavalli-Sforza, LI. y Bodmer, WF. 1971. The genetics of human populations. Freeman. San Francisco. 943 p.

Cresswell, P. 1987. Regulation of HLA class I and class II antigen expression. Brit Med Bull 43 (1): 66-80

Dunham, I; Sargent, CA; Trowsdale, J; Campbell, RD. 1987. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 84:7237-7241

González, T; Gantes, M; Bustabad, S; Barreda, G; García, C; Barreda, J. 1986. Las Islas Canarias en el Area Iberoamericana. Estudios de HLA y de paleopatología osteoarticular. Comunicación presentada en la V Reunión Iberoamericana de Reumatología en Buenos Aires, Argentina, noviembre de 1986. 31 p.

Gorodezky, C; Teran, L; Escobar-Gutiérrez, A. 1979. HLA frequencies in a Mexican Mestizo population. Tissue Antigens 14: 347-352

Kim, SJ; Nisperos, B; Mickelson, E; Choi, IH; Dahlberg, S; Kim, JD; Giblett, ER; Hansen, JA. 1986. The HLA system in the Korean population. Hum Immunol 17:259-272

Klein, J. 1984. Gene conversion in MHC genes. Transplantation 38 (4): 327-329

Klein, J y Figueroa, F. 1986. The evolution of MHC class I genes. Immunol Today 7:41

Klein, J. 1987. Origin of the major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. Hum Immunol 19: 155-162

Koller, BH; Geraghty, DE; Shimizu, Y; De Mars, R; Orr, HT. 1988. HLA-E: A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. J Immunol 141 (3):897-904

Koller, BH; Geraghty, DE; De Mars, R; Duvick, I; Rich, SS; Orr, HT. 1989. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. J Exp Med 169: 469-480

Lawrence, SK; Smith, CL; Srivastava, R; Cantor, CR; Weissman, SM. 1987. Megabase scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. Science 235: 1387-1380

Mauff, G; Alper, CA; Awdeh, Z; Batchelor, JR; Bertrams, J; Bruunpetersen, G; Dawkins, RL; Demant, P; Edwards, J; Grossewilde, H; Hauptmann, G; Klouda, P; Lamm, L; Mollenhauer, E; Nerl, C; Olaisen, B; Oneill, G; Rittner, C; Roos, MH; Skanes, V; Teisberg, P; Wells, L. 1983. Statement on the nomenclature of human C4 allotypes. Immunobiology 164:184-191

Ohta, T. 1982. Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 79: 1940-1944

Ollier, W; Doyle, P; Alonso, A; Awad, J; William, E; Gill, D; Welch, S; Klouda, P; Bacchus, R; Festenstein, H. 1985. HLA polymorphisms in Saudi Arabs. Tissue Antigens 25:87-95

Sargent, CA; Dunham, I; Trowsdale, J; Campbell, RD. 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1968-1972

Shows, TB; Alper, CA; Bootsma, D; Dorf, M; Douglas, T; Huisman, T; Kit, S; Klinger, HP; Kozak, C; Lalley, PA; Lindsley, D; McAlpine, PJ; McDougall, JK; Meera Khan, P; Meisler, M; Morton, NE; Oplitz, JM; Partridge, CW; Payne, R; Roderick, TH; Rubinstein, P; Ruddle, FH; Shaw, M; Spranger, JW; Weiss, K. 1979. International system for human genetic nomenclature (1979) ISGN

Simons, MJ y Tait, BD. 1984. Detection of immune-associated genetic markers of human disease. Churchill Livingstone. Londres. 174 p.

Spies, T; Blanck, G; Bresnahan, M; Sands, J; Strominger, JL. 1989. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. Science 243:214-217

Strachan, T. 1987. Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. Brit Med Bull 43 (1): 1-14

Strominger, JL. 1987. Structure of class I and class II HLA antigens. Brit Med Bull 43 (1): 81-93

Terasaki, PI y McClelland, JD. 1964. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 204:998-1000

Terasaki, PI; Bernoco, D; Park, MS; Ozturk, G; Iwaki, Y. 1978. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. The Philip Levine Award Lecture. Am J Clin Pathol 69: 103

Tokunaga, K; Omoto, K; Akaza, T; Akiyama, N; Amemiya, H; Amemiya, H; Naito, S; Sasazuki, T; Satoh, H; Juji, T. 1985. Haplotype study on C4 polymorphism in Japanese. Associations with MHC alleles, complotypes, and HLA-complement haplotypes. Immunogenetics 22:359-365

Trowsdale, J. 1987. Genetics and polymorphism: class II antigens. Brit Med Bull 43 (1): 15-36

Van Rood, JJ; Van Leeuwen, A; Keuning, JJ; Blusse; Van Oud, EJ; Albas, J. 1975. The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxicity technique. Tissue Antigens 5:75-79

White, PC; Grossberger, D; Onufer, BJ; Chaplin, DD; New, MI; Dupont, B; Strominger, JL. 1985. Two genes encoding steroid

21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. Proc Natl Acad Sci USA 82: 1089-1093

Yunis, EJ. 1988. MHC haplotypes in biology and medicine. 1987 Philip Levine Award Lecture. A.J.C.P. 89 (2):268-2

Tipificación de HLA por Microlinfocitotoxicidad

Los antígenos de histocompatibilidad (HLA) se encuentran comúnmente en las membranas celulares de ciertas células. La tipificación de HLA se hace principalmente con linfocitos de sangre periférica y una prueba de microcitotoxicidad. Se aíslan los linfocitos y se prueban contra un juego de antisueros en una microplaca. Los anticuerpos se unirán a los sitios antigénicos correspondientes sobre la membrana celular del linfocito y con la adición de complemento, se permeabilizará la membrana celular, lo que permite que entre colorante a la célula. Las células que se tiñen indican una reacción positiva de antígeno-anticuerpo. Los antígenos determinados por los loci HLA-A, -B, -C y -DR del SP6 se pueden detectar con este procedimiento.

MATERIALES

1. Centrifuga
2. Microscopio de contraste de fases invertido
3. Jeringas de disparo constante de 1 μ l y de 5 μ l
4. Hemocitómetro con cubreobjetos
5. Congelador de -70 C
6. Pipetas Pasteur
7. Tubos de plástico de centrifuga de 50 ml
8. Jeringas estériles
9. Cajas de petri
10. Medio de cultivo RPMI 1640 suplementado
11. Solución de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (o en su defecto, de Ficoll-Radialar) con densidad específica de 1.076
12. Suero de conejo como fuente de complemento
13. Eosina Y en polvo, en solución al 5% en agua, filtrada
14. Aceite mineral
15. Microplacas de Terasaki para tipificar HLA
16. Solución AKC (0.155 M NH_4Cl : 0.01 M K_2CO_3)
17. Solución de formalina
18. Suero bovino fetal
19. Antisueros HLA

20. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)
21. Eritrocitos de carnero
22. Heparina libre de fenol (1 U por cada mililitro de sangre)
23. Azul tripan al 0.4% en cloruro de sodio al 0.9%

PROCEDIMIENTO

A. Aislamiento de Linfocitos

1. Obtener 20 ml de sangre periférica en jeringa con heparina. Diluirla a la mitad con PBS o con medio RPMI 1640 suplementado en caso de procesarse al día siguiente.

2. Colocar la sangre diluida en un tubo de plástico de 50 ml y agregar con pipeta Pasteur 10 a 15 ml de solución de Ficoll-Hypaque.

3. Centrifugar a 1,500 rpm por 30 minutos o a 2,500 rpm por 20 minutos.

4. Retirar el anillo de células mononucleares y lavar en otro tubo con PBS, es decir, centrifugar a 1,500 rpm por 15 minutos o a 1,200 rpm por 10 minutos.

5. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón con PBS. Centrifugar a 1,000 ó 1,200 rpm por 10 minutos.

6. Descartar el sobrenadante. En caso de haber eritrocitos en el botón, incubar 5 minutos a 37°C con 10 a 20 ml de AKC para lizarlos. Completar después a 50 ml con PBS y centrifugar a 1,200 rpm por 10 minutos. Lavar de nuevo el botón (paso 5).

7. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón. Contar las células mononucleares con hemocitómetro. Emplear azul tripan para observar la viabilidad.

8. Ajustar la suspensión celular a cinco millones de células por mililitro con PBS.

B. Tipificación de Antígenos de HLA-A, -B y -C

1. Retirar las microplacas del congelador y esperar a que tomen la temperatura ambiente. En cada pozo de las microplacas debe haber aceite mineral y un antisuero HLA con especificidad conocida.

2. Sembrar 1 μ l de la suspensión que contiene cinco millones de células por mililitro, en cada pozo de las microplacas. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

3. Agregar 5 μ l de suero de conejo por pozo. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.

4. Agregar 5 μ l de eosina Y al 5% por pozo. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente y agregar 5 μ l de formalina por pozo.

5. Leer las microplacas bajo el microscopio de contraste de fases invertido.

C. Tipificación de Antígenos de HLA-DR

Una vez obtenidas las células mononucleares de sangre periférica, deben eliminarse los macrófagos y los linfocitos T, para emplear solamente los linfocitos B en esta tipificación.

1. Colocar la suspensión celular que contiene cinco millones de células por mililitro, en una caja de petri e incubar a 37°C por una hora, para eliminar células adherentes. Las células deben estar suspendidas en RPMI 1640.

2. Recoger el sobrenadante de la caja de petri y colocarlo en un tubo de 50 ml. Lavar la caja con PBS usando una pipeta Pasteur para recuperar la mayor cantidad posible de células no adherentes. Tomar el sobrenadante del lavado en el mismo tubo.

3. Centrifugar a 1,000 ó 1,200 rpm por 10 minutos.

4. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón con RPMI 1640. Contar las células con hemocitómetro.

5. Ajustar la suspensión a diez millones de células por mililitro con RPMI 1640, para preparar rosetas con eritrocitos de carnero y así eliminar los linfocitos T.

6. Agregar a la suspensión celular el mismo volumen de eritrocitos de carnero al 4% en PBS, y la mitad del volumen de suero bovino fetal.

7. Centrifugar a 1,200 rpm por 10 minutos.

8. Incubar a 4⁰C por 12 horas.

9. Resuspender suavemente las rosetas y agregar, en hielo, 10 ml de solución de Ficoll-Hypaque frío.

10. Centrifugar a 4⁰C, durante 20 minutos a 1,500 rpm.

11. Retirar el anillo de linfocitos B y lavar con PBS, es decir, centrifugar a 1,000 ó 1,200 rpm por 10 minutos.

12. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón con PBS. Se puede realizar otro gradiente con Ficoll-Hypaque para obtener mayor pureza de células B.

13. Repetir el paso 11. Contar las células con hemocitómetro y ajustar a cinco millones de células por mililitro.

14. Realizar los pasos 1 al 5 del inciso B con las siguientes modificaciones:

En el paso 2, incubar 60 minutos a temperatura ambiente; en el paso 3, incubar 120 minutos a temperatura ambiente.

Tipificación de C2

El polimorfismo de C2 se puede detectar mediante isoelectroenfoque de plasma o suero en gel de acrilamida, seguido

de un ensayo hemolítico.

MATERIALES

1. Placas de vidrio de 1 mm de grosor, de 16.5 x 12.5 cm
2. Solución de almacenamiento de acrilamida
3. Riboflavina
4. Tiras de papel cromatográfico de 2 x 0.5 cm
5. Aparato de electroforesis
6. Eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos anti-carnero de conejo.
7. Agarosa
8. Solución salina amortiguadora de veronal
9. Yodo en solución
10. Suero humano deficiente en C2

PROCEDIMIENTO

Se prepara el gel de acrilamida. Se ponen las tiras de papel en sus extremos y sobre ellas, 20 μ l de cada muestra de suero o plasma.

El proceso se desarrolla a 1.5 watts/gel, con un voltaje máximo de 1,000 V y una corriente inicial mínima de 6 mA/gel.

Se corre la electroforesis durante 18 horas o hasta que la corriente disminuya a 2 mA/gel.

Se sumerge el gel en la solución de yodo por 30 minutos a temperatura ambiente; después se sumerge en 500 ml de la solución de veronal.

Se vierte sobre el gel una mezcla de 7.5 ml de la solución de veronal, 7.5 ml de agarosa al 2%, 0.75 ml de eritrocitos sensibilizados de carnero al 10% y 0.2 ml de suero deficiente en C2.

Se incuba el gel una hora a 4⁰C y luego a 37⁰C hasta que aparezcan las bandas de lisis (2 a 4 h).

El juego de bandas de lisis formado es característico para cada alelo.

Tipificación de C4

Los alelos de C4 se detectan mediante una electroforesis en gel de agarosa de muestras de plasma-EDTA desializado, seguida de una inmunoprecipitación y una tinción.

MATERIALES

1. Solución al 2% de Na₂EDTA
2. Neuraminidasa tipo VI de *Clostridium perfringens*
3. Solución amortiguadora de fosfatos y Na₄EDTA
4. Papel absorbente
5. Papel celofán
6. Solución amortiguadora de tris-veronal
7. Placas de vidrio de 26 x 12.5 cm
8. Agarosa
9. Hojas de acetato
10. Papel filtro # 1
11. Hemoglobina S (HbS)
12. Aparato de electroforesis
13. Antisuero humano anti-C4
14. Azul de Coomassie al 0.2% en metanol-ácido acético-agua

PROCEDIMIENTO

El plasma con EDTA se desializa con neuraminidasa. Se mezclan 10 μ l de plasma con 2 μ l de una solución de neuraminidasa y se hace una microdiálisis con membrana de celofán. La diálisis se lleva a cabo a 4^oC, durante toda la noche.

Se prepara el gel de agarosa y se refrigera hasta que se vayan a colocar las muestras. Estas se aplican por medio de hojas de acetato con ventanas de 8 a 10 mm de largo y 0.75 mm de ancho. Se colocan de 7 a 10 μ l de cada muestra dializada por ventana. Se usa HbS como marcador.

Se realiza la electroforesis con corriente constante de 65 mA (voltaje de 200 a 300 V) y se corre hasta que la HbS alcance el extremo opuesto (4 a 5 h).

Se diluyen 0.4 ml de antisuero anti-C4 en 1 ml de solución salina y se distribuyen uniformemente sobre una tira de papel filtro colocado en el centro del gel. Se incuba una hora en cámara húmeda para que se realice la inmunoprecipitación.

El gel se lava con agua corriente. Se cubre con papel filtro húmedo y varias capas de papel absorbente y se coloca un peso de 1 a 2 kg durante 10 minutos, para absorber la humedad.

Se sumerge el gel en solución salina durante la noche.

Se lava suavemente 20 minutos con agua corriente y se absorbe de nuevo la humedad. Se deja secar.

El gel seco se tiñe con azul de Coomassie al 0.2% y se lava con el solvente de éste.

Los alelos de C4 tienen cierta numeración de acuerdo con la posición relativa de la banda más ácida. Las bandas del locus C4A tienen una migración electroforética más ácida que las bandas del locus C4B.

Tipificación del Factor B (fB)

Los alelos del factor B se identifican mediante una inmunoprecipitación en gel delgado de agarosa, se emplea un sistema alcalino amortiguador de veronal.

MATERIALES

1. Amortiguador para los electrodos, de veronal, veronal sódico y lactato de calcio.
2. Placas de vidrio de 17 x 15 x 0.3 cm
3. Solución de agarosa al 1% en amortiguador de veronal

4. Papel filtro
5. Solución de hemoglobina A (HbA)
6. Aparato de electroforesis
7. Antisuero anti-fB
8. Papel absorbente
9. Azul de Coomassie al 0.2% en metanol-ácido acético-agua

PROCEDIMIENTO

Se prepara el gel de agarosa y se hacen pequeños pozos. Se colocan 2 μ l de cada muestra de suero por pozo y se usa la HbA como marcador.

Se realiza la electroforesis a 20 V/cm hasta que la HbA haya migrado 5.5 a 6 cm del origen (3 a 4 h).

Las bandas de fB migran a una zona que se encuentra de 3 a 6.5 cm del origen. En ésta se distribuye el antisuero anti-fB y se incuba el gel por una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

El gel se lava y se cubre con papel filtro y papel absorbente; se coloca encima un peso de 2 kg por 10 minutos.

Se sumerge toda la noche en solución salina y se lava 20 minutos con agua corriente.

Se tinte 10 minutos con azul de Coomassie al 0.2% y se lava con el solvente de éste.

Cada alelo de fB se identifica por una banda electroforética característica.

COMPARACION DE DATOS EN TABLAS DE 2 X 2 MEDIANTE CHI CUADRADA

Se realiza una prueba de chi cuadrada para conocer si las diferencias entre lo esperado y lo observado se deben o no al azar. En este estudio se hicieron comparaciones en tablas de contingencia de 2 x 2 y se aplicó la fórmula siguiente:

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

donde

n = número total de observaciones

a = número de eventos + +

b = número de eventos + -

c = número de eventos - +

d = número de eventos - -

Ejemplo: Diferencias de frecuencia de A2 entre el grupo A y el grupo B:

	Número de cromosomas A2+	Número de cromosomas A2-	
Grupo A	a	b	a + b
Grupo B	c	d	c + d
	a + c	b + d	n

Quando los valores de a, b, c y d son muy pequeños, se emplea la corrección de Yates (Simons y Tait, 1984):

$$\chi^2 = \frac{(|ad-bc| - 0.5n)^2 n}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

GLOSARIO

alelo: Forma alternativa de un gen situada en un locus particular en un par de cromosomas homólogos.

anticuerpo: Una molécula producida en respuesta a un antígeno que tiene la propiedad particular de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su formación.

antígeno: Una molécula que induce la formación de anticuerpos.

centiMorgan: Unidad de distancia genética que corresponde a 1% de frecuencia de recombinación.

codominante: Se dice del par de genes que se expresan por igual en el estado heterocigoto.

complemento: Serie compleja de proteínas que complementa no específicamente los efectos inmunológicos específicos de un anticuerpo por medio de la opsonización y lisis celular. Las tres funciones principales del complemento son activación del sistema inmune, citólisis de células blanco y opsonización.

complotipo: Haplotipo del complemento, es decir, la combinación de alelos de clase III del SPH que existe en un cromosoma y que se hereda en bloque.

conversión génica: El resultado del cambio de un gen a su alelo en el cromosoma homólogo. Resulta de la recombinación intragénica.

deriva génica al azar: La aparición de alelos a través de variaciones al azar en la estructura génica básica que alcanzan frecuencias significativas sólo por azar.

desequilibrio de ligamiento (de unión, genético): La tendencia de alelos de distintos loci de presentarse en un mismo cromosoma con mayor frecuencia que la esperada si se combinaran al azar. Se estima con la llamada "delta", D, que es la diferencia entre la frecuencia observada y la esperada de un haplotipo dado. En el equilibrio, D es igual a cero.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

efecto del fundador: La presencia de ciertos alelos en una población, que depende de las limitaciones de la contribución de genes que dio la población parental.

entrecruzamiento desigual: Intercambio entre cromosomas que da como resultado un producto que carece de genes o secuencias y otra copia, con genes o secuencias duplicados.

fenotipo: Expresión bioquímica o clínica del genotipo.

gen: Unidad de transmisión hereditaria, que ocupa un sitio específico o locus en un cromosoma y especifica un polipéptido o ARN en su secuencia codificada de ADN y que puede mutar a varias formas alélicas.

genotipo: Composición genética de un individuo.

H-2: Sistema principal de histocompatibilidad del ratón, que se encuentra en el cromosoma 17. Los genes de clase I son H-2K, H-2D, H-2M, H-2L, Qa-1, Qa-2 y Tla; los de clase II son A y E.

haplotipo: La combinación de determinantes controlados por genes (del SPH) en un mismo cromosoma, que se hereda como una unidad (excepto cuando hay entrecruzamiento). El genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno.

haplotipo extendido: Una combinación dada de alelos del SPH en la que hay desequilibrio de unión que se extiende a los genes de clases I, II y III y GLO.

heterocigoto: Se dice del individuo en el que dos genes homólogos (alelos) son diferentes entre sí.

histocompatibilidad: La capacidad de aceptar injertos entre individuos.

homocigoto: Se dice del individuo en el que dos genes homólogos (alelos) son iguales entre sí.

loci: Plural de locus.

locus: Lugar de un cromosoma ocupado por un gen.

opsonización: La adherencia de opsoninas (como componentes del complemento) a ciertas células, que las hace vulnerables a la fagocitosis.

polimorfismo genético: La presencia de dos o más alelos (de un mismo locus) en una población, cada uno con frecuencia de 0.01 ó mayor. Un locus se considera polimórfico si la frecuencia del alelo más común es igual a o menor de 0.99.

recombinación: La presencia de progente con combinaciones de alelos diferentes de aquellos de los progenitores, debido a intercambio entre genes ligados.

recombinación intragénica: Intercambio de segmentos cortos de ADN de un mismo gen entre cromosomas homólogos, seguido de reemplazamiento de bases que no son complementarias entre sí.

sistema principal de histocompatibilidad (SPH): Grupo de genes que codifican para moléculas que proveen del contexto para el reconocimiento de antígenos extraños por los linfocitos T. Se incluyen genes que codifican para ciertos componentes del sistema del complemento y para ciertas enzimas. Se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 del humano (6p21.3).