



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



**DETERMINACION DE LOS POLIMORFISMOS ALELICOS, GENOTIPIICOS Y
HAPLOTÍPICOS DE LOS ANTÍGENOS HLA CLASE I Y CLASE II, EN
POBLACION MESTIZA BOLIVIANA TIPIFICADOS EN LOS
DEPARTAMENTOS DE LA PAZ Y COCHABAMBA**

Elaborado por: Lic. Ana Rosa Lopez Lecoña

Tesis de Grado para optar al título de:

Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud mención en “Inmunología”

La Paz-Bolivia

2012



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



**DETERMINACION DE LOS POLIMORFISMOS ALELICOS, GENÉTICOS Y
HAPLOTÍPICOS DE LOS ANTÍGENOS HLA CLASE I Y CLASE II, EN
POBLACION MESTIZA BOLIVIANA TIPIFICADOS EN LOS
DEPARTAMENTOS DE LA PAZ Y COCHABAMBA**

Elaborado por: Lic. Ana Rosa López Lecoña

Asesor: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya, *Esp.*

Asesor: Dr. Evaristo Venegas Bertón, *MSc*

Tesis de Grado para optar al título de:

Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud mención en “Inmunología”

La Paz-Bolivia

2012

DEDICADO

A LA LUZ DE MIS OJOS

PABLO NICOLAS

AGRADECIMIENTO

A DIOS por haberme dado salud, bienestar y una razón de vivir para llegar a cumplir mis metas esperadas

A mi asesor Dr. Fernando Sosa Tordoya, por compartir sus conocimientos, su amistad su ayuda incondicional durante mi formación profesional.

Al Dr. Evaristo Venegas por brindarme su amistad, colaboración y sus conocimientos.

A mi familia por brindarme amor, paciencia y apoyo en todo momento

Al Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS), por la confianza puesta en los Residentes de 2005-2007.

RESUMEN

El polimorfismo genético de las moléculas HLA (A, B, C y DR) varía entre los diferentes grupos poblacionales tanto para el tipo, frecuencia alélica, genotípica y haplotípica. En el presente estudio se determinó las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II, se estudiaron 909 resultados de tipificación HLA de la población de pacientes mestizos bolivianos tipificados en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés y pacientes mestizos oriundos del departamento de Cochabamba tipificados en el unidad de Histocompatibilidad e Inmunogenética del laboratorios Diana de la ciudad de Cochabamba, entre las gestiones 1998 hasta diciembre del 2011. Las tipificaciones HLA fueron realizadas por el método de reacción de la polimerasa-iniciador de secuencia específica (PCR-SSP) en la ciudad de La Paz y por el método serológico basado en citotoxicidad dependiente de complemento en la ciudad de Cochabamba.

Se determinó que los alelos HLA más frecuentes en los pacientes de la ciudad de La Paz fueron: A*02 (40,0%), A*24(16,8 %), B*35(39.5%),B*48(10,2%), C*04(38,8%),C*07(12,1%), DR*04(26,9%),DR*08(21,9%) y para ciudad de Cochabamba fueron A02(30,2%), A24 (12,7%),B35(26,7%),B51(10,3%),C*04(31,5%),C*01(16,4%),DR04(24,8%),DR08(12.2%) Los genotipos más frecuentes para la ciudad de La Paz fueron: A*2A*2 (34,2%), A*2A*24 (26,3%), B*35B*35 (29,8%), B*35B*48(14,0%), C*04C*04 (35,3%), C*03C*04(20,6%), DR*04DR*04 (36,9%), DR*08DR*09(17,4%) y para la ciudad de Cochabamba fueron A2A2(4,3%), A2A24 (10,1%), B35B35 (12,4%), B35B15(8,3%), C*04C*04 (13,5%) , C*03C*04(13,5%), DR4DR4 (13,5%), DR7DR8(8,9%). Los holotipos más frecuentes para la ciudad de La Paz fueron: A*02,B*35,DR*04 (15,9%), A*24,B*35,DR*04 (3,6%); y A*02,B*15,DR*04 (2,8%) y en Cochabamba. A2,B35,DR4 (17,9%); A2, B35,DR1 (2,8%) y A24,B35,DR4 (2,5%).

Los resultados muestran que en la poblaciones de La Paz y Cochabamba los alelos más frecuentes son los mismos y que a partir del segundo alelo más frecuente puede haber diferencia entre los dos grupos poblacionales. Además se observa que las frecuencias en las que se presentan los alelos en cada población varia de una población a otra, este hecho influye también en las frecuencias genotípicas y haplotípicas de los alelos HLA expresados por las poblaciones en estudio. El conocer las frecuencias alélica, genotípicas y haplotípicas de los pobladores que habitan en los diferentes departamentos del país permitirá determinar con mayor probabilidad que un paciente sensibilizado por transfusiones, trasplante previo o embarazos, pueda encontrar un donante compatible o identificar en pacientes con alelos HLA raros (frecuencia menor al 1 %), encontrar un donante compatible en algún lugar del país donde estos alelos se expresen con mayor frecuencias.

SUMMARY

The genetic polymorphism of HLA molecules (A, B, C y DR) varies among different populations groups, as example: allele type, allele frequency, genotypic and haplotype frequencies. In the present study the allele frequencies, genotype and haplotype of HLA class I and II system were determined. 909 HLA typing results of Bolivian mestizos patients were studied and typified in the laboratory of Histocompatibility and Immunogenetics of the SELADIS Institute, from Pharmaceutical and Biochemistry Sciences Faculty at Mayor de San Andrés University, and in the other hand results of mestizos born in Cochabamba city that were typified in the laboratory of Histocompatibility and Immunogenetics of Diana Laboratories in Cochabamba city. Both from 1998 to December 2011. The HLA typing was performed by the polymerase reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) method in La Paz city, and the serological method based on complement-dependent cytotoxicity in Cochabamba city.

It was determined that the most frequent HLA alleles in patients from La Paz city were: A*02 (40,0%), A*24(16,8 %), B*35(39.5%),B*48(10,2%), C*04(38,8%),C*07(12,1%), DR*04(26,9%),DR*08(21,9%), and the most frequent HLA alleles in patients from Cochabamba city were: A02(30,2%),A24(12,7%),B35(26,7%),B51(10,3%), C*04(31,5%),C*01(16,4%),DR04(24,8%),DR08(12,2%).

The most common genotypes for La Paz city were: A*2A*2 (34,2%), A*2A*24 (26,3%), B*35B*35 (29,8%), B*35B*48(14,0%), C*04C*04 (35,3%), C*03C*04(20,6%), DR*04DR*04 (36,9%), DR*08DR*09(17,4%), and for Cochabamba city were: A2A2(4,3%), A2A24 (10,1%), B35B35 (12,4%), B35B15(8,3%), C*04C*04 (13,5%), C*03C*04(13,5%), DR4DR4 (13,5%), DR7DR8(8,9%).

The most common holotypes for the city of La Paz were: A*02,B*35,DR*04 (15,9%), A*24,B*35,DR*04 (3,6%); y A*02,B*15,DR*04 (2,8%) and Cochabamba city were: A2,B35,DR4 (17,9%); A2, B35,DR1 (2,8%) y A24,B35,DR4 (2,5%).

The results show that in the cities of La Paz and Cochabamba the most common alleles are the same, and from the second most frequent allele may be a difference between the two population groups.

Furthermore, it is noted that the frequencies that every allele gets present in each population varies from one population to another, this fact also influences in the genotype and haplotype frequencies of HLA alleles expressed by the study populations.

The knowledge of allelic, genotype and haplotype frequencies of the people who live in different departments of our country, will allow to determine with greater probability that a sensitized patient by transfusions, previous transplantation or pregnancy, would be able to find an ideal donor for transplant or be identified in a group of patients with rare HLA alleles (frequency less than 1%), and by this way be able to find an ideal donor somewhere in the country where these alleles are expressed more frequently.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pagina
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
III. JUSTIFICACION	4
IV. MARCO TEORICO	5
1. HISTORIA DE LA MOLECULA HISTOCOMPATIBILIDAD MHC	5
2. ORIGEN Y EVOLUCION MHC	7
3. LOCALIZACION DE LOS GENES MHC	7
4. ESTRUCTURA DE LOS GENES MHC I	9
5. ESTRUCTURA DE LOS GENES MHC II	10
6. FUNCION DEL MHC	12
7. HLA-ENFERMEDAD	22
8. MECANISMOS DE GENERACION DEL POLIMORFISMO	25
9. REGULACION DEL MHC	30
10. NOMENCLATURA	31
11. TIPIFICACION DEL MHC	33
1) REACCION DE LA POLIMERASA	33
2) METODO SEROLOGICO	34
V. OBJETIVOS	35
A. OBJETIVO GENERAL	35
B. OBJETIVO ESPECIFICOS	35
VI. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	36
a) POBLACION EN ESTUDIO	37
b) DESCRIPCION DE LA POBLACION	37
c) TAMAÑO DE LA MUESTRA	37
d) CRITERIOS DE INCLUSION	37
e) CRITERIOS DE EXCLUSION	37
f) DISEÑO DEL ESTUDIO	37
g) MATERIALES	38
h) METODOS	39
VII. RESULTADOS	41
A. RESULTADOS FRECUENCIAS ALElicas	41
B. RESULTADOS FRECUENCIAS GENOTIPICAS Y HAPLOTIPOS	56
VIII. DISCUSION	62
IX. CONCLUSION	69
X. RECOMENDACIONES	71
XI. BIBLIOGRAFIA	72
XII. ANEXOS	

CONTENIDO DE TABLAS

CONTENIDO	Pagina
TABLA Nº 1 Resultados De Pacientes Mestizos Bolivianos Según El Departamento de Procedencia	42
TABLA Nº 2 Frecuencia Alélicas del Locus A del sistema HLA en la población de pacientes mestizos bolivianos	43
TABLA Nº 3. Comparación de las Frecuencias Alelicas del Locus A De Los Pacientes Mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de Cochabamba Y La Paz	44
TABLA Nº 4 Frecuencias Alélicas del Locus B del sistema HLA en la población de pacientes mestizos bolivianos	45
TABLA Nº 5 Comparación de la frecuencias alélicas del locus B de los pacientes mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de La Paz y Cochabamba	47
TABLA Nº 6 Frecuencias Alélicas del Locus C del sistema HLA en la población de pacientes mestizos bolivianos	49
TABLA Nº7 Comparación de la frecuencias alélicas del locus C de los pacientes mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de La Paz y Cochabamba	50
TABLA Nº 8 Resultado de Frecuencias del HLA-DR de Pacientes Mestizos Bolivianos	51
TABLA Nº 9 Comparación de la frecuencias alélicas del locus DR de los pacientes mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de La Paz y Cochabamba	52
TABLA 10. Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A en la población de pacientes mestizos bolivianos	53
TABLA Nº 11 . Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A de las Ciudades de La Paz y Cochabamba	54
TABLA Nº 12 Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus B en la población de pacientes mestizos bolivianos	55
TABLA Nº 13 . Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A de las Ciudades de La Paz y Cochabamba	56
TABLA Nº 14 Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus C en la población de pacientes mestizos bolivianos	57
TABLA Nº 15. Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus C de las Ciudades de La Paz y Cochabamba	58
TABLA Nº 16 . Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus B en la población de pacientes mestizos bolivianos	59

TABLA N° 17. Resultados de Frecuencias Genotipicas del Locus A de las Ciudades de La Paz y Cochabamba	60
.TABLA 18. Resultados de Frecuencias de Haplotipos de los locus A,B,DR, de las Ciudades de La Paz y Cochabamba	61

CONTENIDO DE CUADROS

CONTENIDO	Pagina
CUADRO 1. MOLECULAS HLA CLASICAS Y NO CLASICAS	12
CUADRO. 2 ASOCIACION DE ENFERMEDADES –HLA	24
CUADRO 3. ALELOS DEL POLIMORFISMO HLA	29
CUADRO 4 NOMENCLATURA HLA	32

CONTENIDO DE FIGURAS

CONTENIDO	Pagina
Fig 1. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA MOLECULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD	7
FIG.2 LOCALIZACION DE LOS GENES	9
FIG.3 ESTRUCTURA DE LA MOLECULA HLA CLASE I	10
FIG. 4 ESTRUCTURA DE LA MOLECULA HLA CLASE II	11
FIG. 5 MARCADORES DE LO PROPIO EN EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	13
FIG. 6 PROCESAMIENTO Y PRESENTACION ANTIGENICA POR LA MOLECULA HLA I	14
FIG. 7 PRESENTACION Y PROCESAMIENTO POR LA MOLECULA HLA II	18
FIG. 8 SINTESIS DEL CLIP	20
FIG. 9. HLA ENFERMEDAD	21
FIG.9. HLA ENFERMEDAD	25
FIG10. LA COMPLEJIDAD DEL MHC.	26
FIG.11 GRAPH SHOWING NUMBERS OF ALLELES NAMED BY YEAR FROM 1987 TO OCTOBER 2012	29
FIG.12 NOMENCLATURA HLA	31
FIG. 13 TIPAJE BIOLOGIA MOLECULAR. FUNDAMENTO DEL TIPAJE HLA POR BIOLOGÍA MOLECULAR.	33
FIG. 14 TECNICA DE MICROLINFOCITOXICIDAD	34
FIG 15 DISTRIBUCIÓN SEGÚN SEXO DEL UNIVERSO SE PACIENTES QUE SE REALIZARON TIPIFICACIÓN HLA POR MÉTODOS SEROLÓGICOS O MOLECULARES EN LOS LABORATORIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INMUNOGENÉTICA DEL INSTITUTO SELADIS Y LABORATORIOS DIANA.	41

I. INTRODUCCION

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 y codifica el sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), constituye uno de los sistemas más polimórficos del genoma humano. Su alta variabilidad genética ha sido de gran interés en muchos campos como la antropología para determinar distancias genéticas entre poblaciones, asociación HLA enfermedad, paternidad y trasplantes de órganos. Este sistema es estrictamente regulado a nivel genético y sus componentes principales son las moléculas HLA de clase I y clase II. Desde su descubrimiento en 1954 a través de la investigación de regiones genéticas y por su papel en la compatibilidad de tejidos ha sido la base para su aplicación en la clínica de los trasplantes. *(Rodríguez, 2007)*

Las moléculas del MHC clase I y clase II, juegan un papel primordial en la respuesta inmunológica celular y humoral específica contra diferentes agentes patógenos, ya que son las responsables de presentar péptidos antigénicos procesados por la vía endógena o exógena a los linfocitos T CD8+ y T CD4+, respectivamente. Los péptidos que se unen a las moléculas HLA clase I provienen de microorganismos intracelulares, células tumorales, son reconocidas por las células TCD8+ citotóxicas. En contraste los péptidos que se unen a las moléculas HLA clase II provienen de microorganismos extracelulares y son reconocidos por las células CD4+ cooperadoras (Th), estas últimas son requeridas para la inducción de las respuestas humoral y celular. *(Roitt, 2010)*

Una característica fundamental de las moléculas de histocompatibilidad es su extremo polimorfismo, difieren en distintos organismos, en consecuencia, además de mediar en la respuesta inmune de tal individuo, cuando son introducidas en otro organismo, como ocurre en un trasplante, son inmunógenas, es decir, habrá una respuesta contra ellas que si no es controlada, puede conducir a un rechazo. Por eso pronto se descubrió la importancia de igualarlas en un trasplante. De hecho, los trasplantes de órganos han evolucionado, no sólo por el avance de las técnicas quirúrgicas, sino también por la intervención de la inmunología en la selección de pareja donante - receptor y en las terapias de inmunosupresión desarrolladas. *(Piccinell y Col,)*

En nuestro país, son muy pocos los estudios que han determinado las frecuencias de antígenos HLA en nuestra población. Muestra de este hecho es que en 1998, Sánchez L. y col., realizaron un estudio de frecuencias alélicas con una población de 119 pacientes, en el 2005, Sosa L., y col, realizó otro estudio similar con una población de 213 pacientes, en el 2008, Maldonado A. un estudio con una población de 172 pacientes, en el 2008, Venegas E, y cols realizó un estudio con una población de 200 pacientes. Estos estudios fueron realizados en el Instituto SELADIS de la Universidad Mayor de San Andrés de La Paz y el Laboratorio Diana de Cochabamba. Sin embargo, Estos estudios no determinaron las frecuencias haplotípicas del sistema HLA de nuestra población En el presente estudio se pretende determinar las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas en la población de pacientes cochabambinos, tipificados en los laboratorios de histocompatibilidad e inmunogenética del Instituto SELADIS de la Paz y laboratorios Diana de Cochabamba.

II. ANTECEDENTES

A partir de la determinación de las frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA Jorge Cervantes, en el año 2002, nos brinda información acerca de aspectos genéticos de las poblaciones de Perú y Bolivia. Con su estudio demuestra que los mestizos de Perú y Bolivia presentan varios alelos del sistema MHC originalmente descritos en tribus amerindias genéticamente aisladas, y que los mestizos de Perú y Bolivia desde el punto de vista genético cercanamente relacionados. Determinó que en mestizos bolivianos provenientes de La Paz, Sucre, Tarija y Tupiza el alelo HLA clase II mas frecuente es HLA-DQB1*0402, mientras que los mestizos peruanos revelo que los alelos HLA clase II son HLA-DRB1*1101 y DRB1*1302 y la clase I HLA-Cw*01 y B*40 se encontraban en mayor proporción. (*Cervantes, J, 2002*)

Emma Laura y Col, en el año 2004 con el propósito de contribuir al conocimiento de la variabilidad genética de este sistema en el Norte Argentino con una muestra constituida por individuos provenientes de las 6 provincias que integran el Noroeste argentino determinaron que, para el locus A los alelos A2, A24, A28 y A31 presentaron frecuencias superiores al 10%. Para el locus B la especificidad B35 es la única presente en todas las provincias con una frecuencia superior o igual al 15%, mientras que B62, B60, B51, B39, B44, B7 y B8 mostraron frecuencias entre el 4 y el 8%. Los haplotípos

A28, B35 y A2, B35 se presentaron entre los 5 más frecuentes en todas las provincias. Se observó una gran disparidad entre provincias en el número de haplotipos con desequilibrio de ligamiento.

Jorge Cervantes, en el año 2002, nos brinda información acerca de aspectos genéticos de las poblaciones de Perú y Bolivia. Con su estudio demuestra que los mestizos de Perú y Bolivia presentan varios alelos del sistema MHC originalmente descritos en tribus amerindias genéticamente aisladas, y que los mestizos de Perú y Bolivia desde el punto de vista genético cercanamente relacionados. Determinó que en mestizos bolivianos provenientes de La Paz, Sucre, Tarija y Tupiza el alelo HLA clase II mas frecuente es HLA-DQB1*0402, mientras que los mestizos peruanos revelo que los alelos HLA clase II son HLA-DRB1*1101 y DRB1*1302 y la clase I HLA-Cw*01 y B*40 se encontraban en mayor proporción. (*Cervantes, J, 2002*)

Humberto Ossa y Col, (2009) realizaron la publicación del Polimorfismo del HLA en una población Colombiana determinando las frecuencias alélicas del sistema HLA-A*, B* y DRB1* en una muestra de 981 individuos de la población colombiana. Se encontró una diversidad total de 66 alelos que representan el 87% de la diversidad alélica mundial a nivel de los loci A*, B* y DRB1*. Se hallaron 19 alelos para el locus HLA-A*, 33 para el locus HLA-B* y 14 para el DRB1*. Los alelos HLA-A*02 y HLA-A*24 presentaron una frecuencia de 0,2696 y 0,2706 respectivamente, que corresponden al 54% de la muestra analizada. Los alelos HLA-B*35 y HLA-B*51 fueron los más frecuentes del loci B*: 0,1926 y 0,1314, respectivamente. Para los DRB1*, únicamente el DRB1*04 presenta una alta frecuencia: 0.238. Los restantes alelos muestran frecuencias inferiores al 12%. Los resultados de este trabajo confirman, a nivel molecular, la diversidad genética de la población estudiada, dado que Colombia posee el 87% de los polimorfismos HLA (loci A*, B* y DRB1*) encontrados en el mundo. (*Ossa, 2005*)

Fernando Sosa y col, en 2007 hacen referencia a datos de tipificación de HLA de pacientes de nacionalidad Bolivia (donantes y receptores) de trasplante que han sido tipificados en el laboratorio de Histocompatibilidad y Inmunogenética de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, determinando que los alelos más frecuentes son:

A2;A24;A28;A31;A3;A1;B35;B51;B62;B39;B48;B44;Cw4;Cw7;Cw3;Cw1;Cw6;Cw5
(Sosa,2007)

Evaristo Venegas y Col, (2011) publicó un estudio de frecuencias de antígenos HLA en personas de la población mestiza boliviana con el objetivo de determinar la frecuencia de antígenos de histocompatibilidad clase I y Clase II y su relación con la insuficiencia renal crónica (IRC) y diabetes mellitus tipo II. Determinó que los antígenos HLA más frecuentes de clase I y clase II de la población en general son: A2; A30; A3; A1; B35; B5; B12; B16, en la clase II DR4; DR1; DR8; DQ1; DQ7 (Venegas, 2011)

III. JUSTIFICACION

En Bolivia el Centro Médico Quirúrgico Boliviano-Belga reporta que la incidencia de insuficiencia renal crónica terminal es de 130 casos por millón de habitantes y que de estos pacientes solo el 6% puede acceder al trasplante renal. En el 2007 el Programa Renal del Ministerio de Salud reportó que el 30% de los pacientes trasplantados rechazan el riñón injertado. Desde el punto de vista inmunológico se conoce que los pacientes que rechazan el órgano trasplantado se sensibilizan principalmente contra moléculas del MHC y en menor proporción contra otras proteínas oligomórficas conocidas como moléculas del complejo menor de histocompatibilidad. Otros pacientes pueden quedar sensibilizados ya sea por transfusiones sanguíneas o por embarazos, lo cual también complica la posibilidad de que estos pacientes puedan encontrar un donante que no tenga los antígenos contra los que están sensibilizados y así poder acceder al trasplante de órgano.

En el caso de los pacientes sensibilizados se hace imperioso conocer hacia que antígenos HLA están sensibilizados, principalmente para evitar a donantes que porten esos antígenos. En este caso particular el conocer las frecuencias alélicas genéticas y haplotípicas permiten saber desde el punto de vista matemático la posibilidad que tiene un receptor sensibilizado de conseguir un donante que porte antígenos HLA hacia los cuales no está sensibilizados.

Existen casos particulares que los receptores de trasplante portan antígenos que están en baja proporción en una población determinada. En estos casos particulares el conocimiento de las frecuencias alélicas y genéticas de una población permite seleccionar con mejor

precisión el área geográfica en la cual este paciente podría encontrar con mayor probabilidad un donante, por lo antes expuesto el presente trabajo de investigación proponemos determinar las frecuencias alélicas, genéticas, haplotípicas de los loci genéticos HLA-A, HLA-B, HLA-C Y HLA-DR en la población mestiza tipificados en los departamentos de La Paz y Cochabamba.

IV. MARCO TEORICO

1. HISTORIA DEL MOLECULA HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

En 1940 Peter Medawar estableció las bases inmunológicas del rechazo y tolerancia tisular trabajando con implantes de piel sobre grandes áreas de quemaduras cutáneas. Otros investigadores demostraron que los linfocitos eran capaces de atacar el órgano trasplantado aun en la ausencia de anticuerpos, y es, en 1952, cuando Jean Dausset describe el complejo de genes de histocompatibilidad en los humanos (HLA), lo que permitió primeramente avanzar en el tan soñado campo de los trasplantes, posteriormente adentrarse en la investigación genética de las poblaciones y una de las más importantes: el conocimiento para entender el mecanismo molecular individual en el reconocimiento de lo propio y lo extraño. (De leo Cervantes, 2005)

Luego, en 1967 a través de investigaciones de diversas procedencias se estableció de forma definitiva la naturaleza del sistema HLA. El sistema HLA comprende a un grupo de genes que se localiza en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). (Bravo, 2005)

Aunque estas moléculas fueron originalmente descritas como HLA por su implicación en la Histocompatibilidad de trasplantes, hoy sabemos que se pueden encontrar en la mayoría de las células del organismo y que por su polimorfismo son responsables de la diversidad biológica de la especie humana al presentar cada individuo moléculas distintas, por lo que su denominación más adecuada podría ser la de Moléculas-marcadores Celulares de Diversidad (MCD). (Peña, 2005)

Las primeras descripciones sobre las características de estas moléculas fueron realizadas en ratones en los años 30, viendo cómo se reproducía rechazo de trasplantes de tejidos entre animales de distintas cepas endogámicas. Estos estudios permitieron también obtener aloantisueros mediante inmunización con células de distintas cepas. En humanos, el primer antígeno de histocompatibilidad descrito fue Mac (en la actualidad conocido como HLA-A*02), descrito por Jean Dausset en 1958. Posteriormente, Jean Dausset, Jan van Rood y colaboradores demostraron por primera vez que los pacientes que rechazan riñones o que presentan reacciones a los leucocitos en las transfusiones contienen con frecuencia anticuerpos circulantes que reaccionan con antígenos presentes en la superficie de los leucocitos de la sangre o el órgano donado. Los sueros que reaccionan frente a las células de otros individuos alogenos se denominan antisueros y contienen aloanticuerpos, cuyos blancos moleculares se designan como aloantígenos. Se supuso que estos aloantígenos son los productos de los genes polimorfos que distinguen tejidos extraños de tejidos propios. Se recolectaron un vasto número de aloantisueros procedentes de donantes inmunizados con aloantígenos, tales como mujeres multíparas (inmunizadas con los antígenos paternos expresados por el feto durante el embarazo), voluntarios inmunizados activamente y receptores de transfusiones o trasplantes. Estos sueros se compararon según su capacidad para unirse y lisar linfocitos procedentes de diferentes donantes (Anaya, 2005)

El primer gen que se identificó a partir de estos estudios de respuestas celulares se ubicó en una región adyacente al locus del HLA definido con pruebas serológicas y en consecuencia recibió el nombre de HLA-D la proteína codificada por el locus HLA-D se detectó posteriormente mediante aloanticuerpos y se denominó moléculas relacionada con el HLA-D o HLA-DR. Posteriormente se descubrió que otros dos genes ubicados adyacentes al HLA-D codificaban proteínas similares estructuralmente al HLA-DR, estos genes se designaron HLA-DQ y HLA-DP, eligiéndose la P y la Q por su proximidad alfabética a la R. (Abbas, 2002)

2. ORIGEN Y EVOLUCION DEL MHC

En la mayoría de los casos el MHC contiene genes que codifican proteínas cuya función está estrechamente relacionada entre sí. La evolución de la región genómica del MHC se ha explicado como un proceso de duplicación cromosómica a larga escala, de fragmentos genómicos de los vertebrados, similares en constitución y función al MHC. Esta hipótesis fue planteada por Kasahara y colaboradores, después de descubrir que el genoma humano contiene al menos tres regiones parálogas, similares al MHC, definidas como “regiones de pares duplicados”, estas regiones de pares duplicados están ubicadas en los cromosomas 1, 9 y 19 en el humano, en la cual se definió la región clase III como la más ancestral, seguidamente la región clase I del MHC y por último la clase II. (Anaya, 2005)

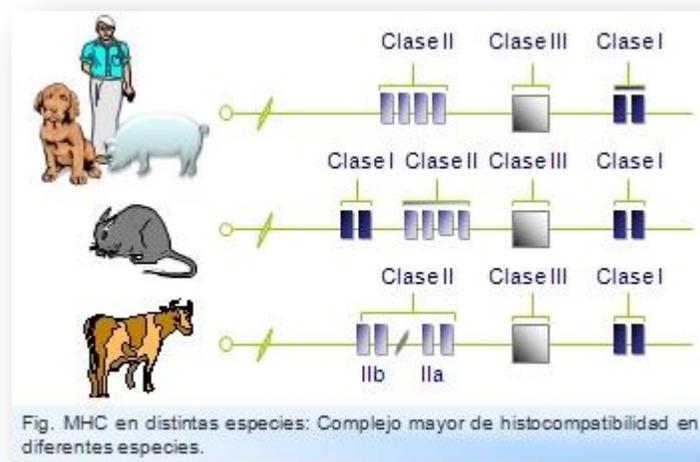


Fig. 1. Origen y evolución de la Molécula de Histocompatibilidad

Fuente.

http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&catid=40%3Ahistocompatibilidad&id=67%3Ahistocompatibilidad&Itemid=126&showall=1

3. LOCALIZACION DE LOS GENES MHC

El MHC se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Ocupa un segmento aproximadamente 3500 kb (3.500.000 bases) de DNA. Dentro de este complejo se ubica un conjunto de genes que codifican y controlan la síntesis de glicoproteínas de membrana

celular, las cuales se expresan en todas las poblaciones de células inmunocompetentes. El MHC es un conjunto de genes que codifican 3 clases de moléculas:

- Genes de Clase I: Codifican glicoproteínas que se expresan en la superficie de casi todas las células nucleadas excepto en los glóbulos rojos, células germinales, células germinales de embriones pre-implantados, sincitiotrofoblasto, y en algunas células como las neuronas, los monocitos, hepatocitos presentan niveles bajos (menos a 10^3 moléculas por célula). Su principal función es presentar antígenos peptídicos a Linfocitos Citotóxicos ($CD8^+$)(MHC)
- Genes de Clase II: Codifican glicoproteínas que se expresan primariamente en la superficie de células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas y células B). Su función es presentar péptidos antigénicos extracelulares procesados a los Linfocitos T cooperadores ($CD4^+$)
- Genes de Clase III: Codifican proteínas secretadas, componentes del complemento (C2, C4, factor B) y moléculas relacionadas con la inflamación (citoquinas como $TNF-\alpha$, LTA, LTB) o proteínas de choque térmico (hsp).

Estos genes son muy polimórficos y están próximos, por lo que se heredan ligados. La colección de cada alelo se denomina haplotipo. En una misma célula se expresan los dos haplotípos.

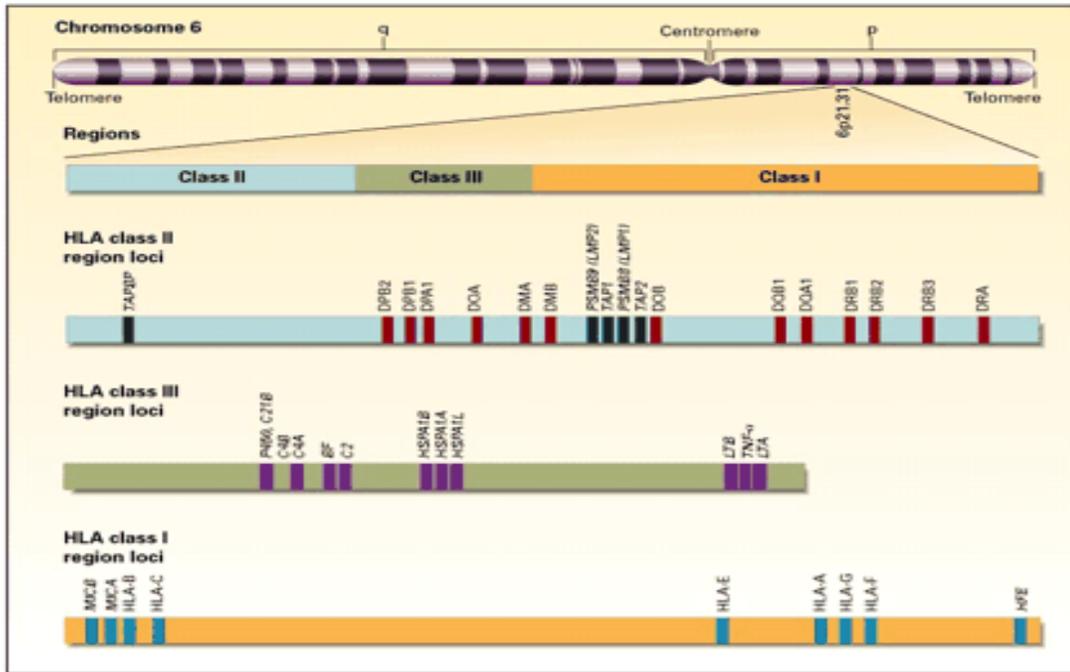


Fig 2. LOCALIZACION DE LOS GENES HLA . Klein J. Sato A. The HLA system. First of two parts. N Eng J Med 2000;343:702'9 (Garabito)

4. ESTRUCTURA DE LOS GENES DEL MHC I

Las moléculas de los antígenos de histocompatibilidad de clase I tanto en el sistema HLA como en el H-2 (ratón), se hallan constituidas por 2 cadenas polipeptídicas: una cadena pesada, glicosilada, de mayor tamaño, con un peso molecular de 45 kD, que se encuentra asociada, mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la beta-2-microglobulina que tiene un peso molecular aproximado de 12.5 kD. La beta-2-microglobulina, polipéptido idéntico al componente sérico normal, es idéntica en todos los individuos de la misma especie y los genes que la codifican no se encuentran en el MHC, situándose en el cromosoma 16 en el hombre y en el cromosoma 2 en el ratón.

El análisis estructural de la beta-2-microglobulina revela que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, con una notoria homología con el tercer dominio constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. La cadena pesada, por el contrario, es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo antígeno de las moléculas de histocompatibilidad clase I. Se distinguen tres zonas bien

definidas, una zona extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, hidrófoba, y finalmente una región intracitoplasmática de unos 35 aminoácidos.

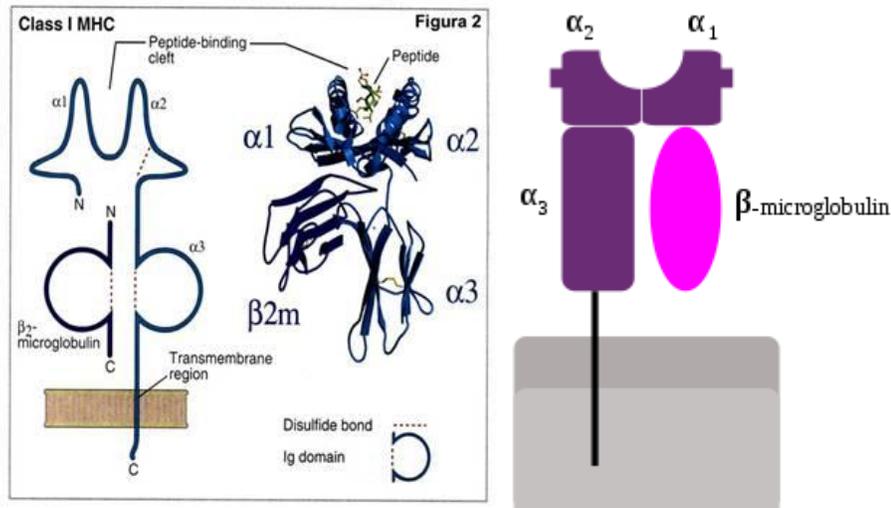


Fig.3 ESTRUCTURA DE LA MOLECULA HLA CLASE I.

Fuente. <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de aproximadamente unos 90 residuos cada uno, denominados α_1 , α_2 y α_3 mantenidos por la existencia de puentes intracatenarios. Los residuos glucídicos se encuentran unidos a la asparagina en la posición 86 del dominio α_1 . Los dominios α_1 y α_2 constituyen regiones de contenido variable en aminoácidos, es decir son las zonas donde radica la variabilidad de la molécula. Por el contrario el dominio α_3 es bastante constante, pertenece a la superfamilia de las Igs y por tanto muestra una notable homología con la región constante de las inmunoglobulinas y con la beta-2-microglobulina (por lo tanto no polimórfica.)

5. ESTRUCTURA DE LOS GENES DEL MHC II

Estos genes codifican glicoproteínas con estructura de inmunoglobulina, pero en este caso el complejo funcional está formado por dos cadenas, una α y una β (cada una de ellas con dos dominios, α_1 y α_2 , β_1 y β_2). Cada una de las cadenas está unida a la membrana por

una región transmembrana, y ambas cadenas están enfrentadas, con los dominios 1 y 2 contiguos, en el exterior celular (HLA).

Estas moléculas se expresan sobre todo en las células presentadoras de antígeno (dendríticas y fagocíticas, así como los linfocitos B), donde presentan péptidos antigénicos extracelulares procesados a los linfocitos T cooperadores (**CD4+**). El péptido antigénico se aloja en una hendidura formada por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$.

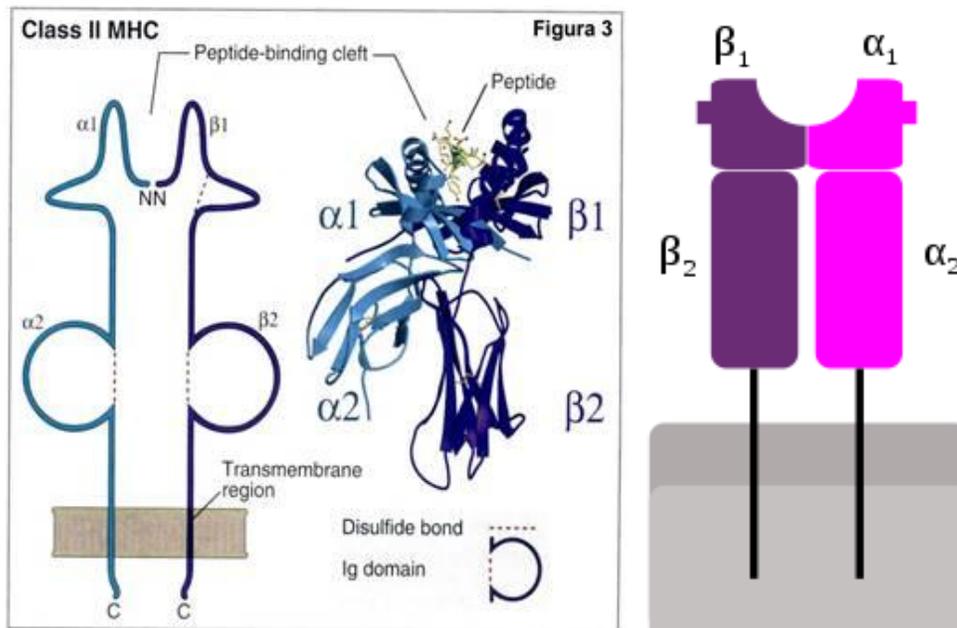


Fig. 4 ESTRUCTURA DE LA MOLECULA HLA CLASE II.

Fuente. <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

Las moléculas MHC-II en humanos presentan 5-6 isotipos, y pueden agruparse en:

- "clásicas", que presentan péptidos a los linfocitos T CD4; dentro de este grupo tenemos HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR;
- "no clásicas", accesorias, con funciones intracelulares (no están expuestas en la membrana celular, sino en membranas internas, de los lisosomas); normalmente, cargan los péptidos antigénicos sobre las moléculas MHC-II clásicas; en este grupo se incluyen HLA-DM y HLA-DO. Como se muestra en el Cuadro 1.

Además de las moléculas MHC-II, en la región Clase-II se encuentran genes que codifican moléculas procesadoras de antígenos, como TAP (por *transporter associated with antigen processing*) y Tapasin.

Cuadro 1. MOLECULAS HLA CLASICAS Y NO CLASICAS

Clases y formas moléculas HLA		
Moléculas HLA		Formas
Clásicas	Clase I	HLA-A, B y C
	Clase II	HLA-DR, DQ y DP
No clásicas	Clase I	HLA-E, F, G y CD1

Fuente

http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=67%3Ahistocompatibilidad&catid=40%3Ahistocompatibilidad&Itemid=126&limitstart=1

6. FUNCION DEL MHC

Las moléculas de histocompatibilidad presentes en las células del organismo son marcadores para las células del sistema inmunitario de "lo propio" (el yo inmunológico) e intervienen de manera fundamental en la educación tímica de los linfocitos T. La función biológica de las moléculas de histocompatibilidad es la de presentar péptidos antigénicos para la activación de los linfocitos T. Los linfocitos T que reconocen moléculas HLA clase I y su péptido pertenecen a la subpoblación citotóxica. Las células T que reconocen moléculas HLA clase II en su la mayoría tienen función reguladora produciendo citosinas. Las moléculas de histocompatibilidad de un individuo son antigénicas para otro y por lo tanto activan el sistema inmune (rechazo de trasplantes). (Peña.2011)



FIG. 5 Marcadores de lo Propio en el complejo Mayor de Histocompatibilidad
 Fuente: <http://es.scribd.com/doc/55730197/3/Marcadores-de-%E2%80%9CLo-Propio%E2%80%9D>

Los péptidos que se unen a la HLA de clase I por lo general pueden unir péptidos de 8 a 10 aminoácidos, que se unen por sus dos extremos amino y carboxilo libres y los sitios invariables que se encuentran en cada extremo del surco de unión al péptido que tienen cada una de las moléculas de HLA. Se han analizado mediante cristalografía de rayos X, el tamaño de los péptidos que se unen a la molécula HLA clase II y nos indican que cuando mínimo se unen péptidos de 13 aminoácidos por lo que se pueden unir péptidos mucho más largos.

Los linfocitos T de un individuo concreto presentan una propiedad denominada restricción MHC: sólo pueden detectar un antígeno si éste viene presentado por una molécula MHC del mismo individuo. Esto se debe a que cada linfocito T tiene una especificidad dual: el receptor del linfocito T (denominado TCR por *T cell receptor*) reconoce algunos residuos del péptido y simultáneamente algunos residuos de la molécula MHC que lo presenta. Esta propiedad es muy importante en el trasplante de órganos, e implica que, durante su desarrollo, los linfocitos T deben "aprender" a reconocer las moléculas MHC propias del individuo, mediante el proceso complejo de maduración y selección que tiene lugar en el timo.

Las moléculas MHC sólo pueden presentar péptidos, lo que implica que los linfocitos T, dado que sólo pueden reconocer un antígeno si viene asociado a una molécula MHC, sólo

pueden reaccionar ante antígenos de origen proteico (procedentes de microbios) y no a otro tipo de compuestos químicos (ni lípidos, ni ácidos nucleicos, ni azúcares). Cada molécula MHC puede presentar un único péptido cada vez, dado que la hendidura de la molécula sólo tiene espacio para alojar un péptido. Sin embargo, una molécula MHC dada tiene una especificidad amplia, porque puede presentar muchos péptidos diferentes (aunque no todos). (Abbas, 2002)

Las vías de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas de clase I son útiles para la defensa frente a virus, bacterias intracelulares y células tumorales. Estos péptidos asociados a moléculas de clase I son producidos por degradación citosólicas, luego transportadas al retículo endoplasmico donde se unen a las moléculas de clase I en formación y finalmente se expresan en la membrana. A continuación se describen con detalles estos pasos.

- Degradación proteolítica en el citoplasma

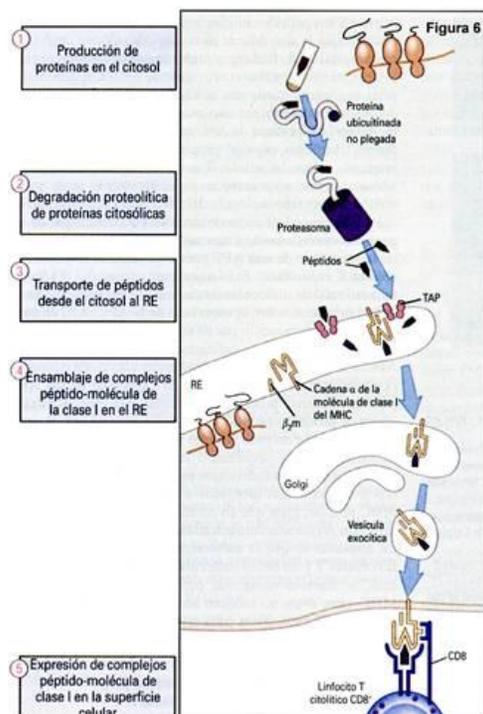


FIG. 6 PROCESAMIENTO Y PRESENTACION ANTIGENICA POR LA MOLECULA HLA I
Fuente. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

El mecanismo por el cual se generan la mayor cantidad de péptidos antigénicos citoplasmáticos es a través del proteasoma. Este un complejo multienzimático, que reconoce a proteínas intracelulares, que hayan sido “marcadas” por un pequeño polipéptido denominado Ubiquitina. Luego de la Ubiquitinización, las proteínas se despliegan e ingresan al proteasoma, quien las degrada a pequeños péptidos capaces de interactuar con las moléculas del MHC I.

Existe amplia evidencia que demuestran la importancia de la degradación proteosomal de las proteínas para ingresar en la vía del MHC I. Inhibidores específicos de la función del proteasoma, bloquean la presentación de proteínas citoplasmáticas por el MHC I a Linfocitos T CD8+ específicos para el epítipo del péptido de una proteína en particular, sin embargo también se ha demostrado, que si el péptido es sintetizado en el citoplasma y no obtenido por proteólisis, la inhibición del proteasoma no obstaculiza y el péptido puede ser presentado igual. Estos estudios resaltan la importancia del proteasoma para la fragmentación de proteínas en pequeños péptidos que luego se incorporan a las moléculas del MHC I, pero, en casos donde el péptido ya existe como tal, el rol del proteasoma no es vital para la vía.

- Transporte de los péptidos del citoplasma al retículo endoplasmico

Debido a que las moléculas de clase I son sintetizadas en retículo endoplasmico (ER) y los péptidos se encuentran en el citoplasma, debe existir un mecanismo que transporte estos péptidos al interior de ER. Esta función es suplida por las proteínas TAP (transportador asociado al procesamiento de antígeno).

Estas proteínas son un heterodimero, cuyos genes, TAP 1 y TAP2, se ubican en la región II de los genes del MHC. Las proteínas TAP se ubican en la membrana del ER, donde median un transporte activo-ATP-dependiente, de los péptidos desde el citosol a la luz de ER.

En su extremo luminal, las proteínas TAP se encuentran unidas de modo no covalente a las moléculas del MHCI nacientes, por una proteína denominada “tapasina”, de esta manera

se mantienen espacialmente cerca, de modo que, cuando las TAP internalizan al péptido, automáticamente este se encuentre con las moléculas de clase I y puedan unirse.

- Ensamblaje del péptido a las moléculas de clase I

La síntesis y el ensamblaje de las moléculas de clase I, es un proceso de múltiples etapas, en donde la unión del péptido juega un papel crucial.

En el interior del ER se sintetizan la cadena α y la β 2-microglobulina. También encontramos en el sector luminal del ER a proteínas chaperonas como la “calnexina” y la “calreticulina”, que se encargan del correcto plegamiento de las cadenas α .

Una vez que el péptido ha ingresado vía TAP se une a la molécula del MHC I naciente, ahora este complejo péptido-MHC I se encuentra en una conformación estable que se libera de las tapasina y se encuentra disponible para expresarse en la membrana.

Cabe plantearse la cuestión de: ¿Cómo es posible que el péptido que ingresa al ER no se una a las moléculas de clase II, que también están siendo sintetizadas en el ER? en caso de que estemos hablando de una APC. Esto no es posible por dos motivos: uno de ellos es que las moléculas de clase I se encuentran unidas a las TAP por las tapasinas, y de esta manera cuando el péptido ingrese ya toma contacto con el MHC I. Otro mecanismo, como se verá mas adelante, es que las moléculas de clase II mantienen cubierto su sitio de unión al péptido en el ER por una proteína denominada “cadena invariante” (Ii).

- Expresión del complejo péptido-MHC I en la superficie celular.

La conformación estable del MHC I, se logra cuando este se encuentra unido al péptido. Este complejo se vehiculiza a través del ER y el Golgi hasta llegar a la membrana celular por vesículas exocíticas. Una vez ubicados en la membrana la molécula del MHC I puede ser reconocida por los Linfocitos T CD8+.

El origen de los péptidos unidos a las **moléculas de clase II** incluye, la degradación de las proteínas internalizadas en vesículas y la unión de los péptidos a las moléculas de clase II. Este mecanismo difiere en varios aspectos en referencia al procesamiento de los péptidos unidos a las moléculas de clase I, no solo por su mecanismo “vesicular” o “vacuolar”, si no además en la manera en que el péptido logra unirse a las moléculas de clase II

- Captura de proteínas extracelulares en compartimientos vesiculares por las APC.

Las células dendríticas y los macrófagos poseen una variedad de receptores que, permiten reconocer estructuras compartidas por muchos tipos de microorganismos, e inducen la fagocitosis.

Los macrófagos expresan “receptores de manosa”, quienes reconocen los residuos de manosa y fucosa de las glucoproteínas y glucolípidos bacterianos. Asimismo los “receptores de la porción Fc” de los anticuerpos, a través de los cuales pueden reconocer y fagocitar a los microorganismos o proteínas recubiertas de anticuerpos. Como también los “receptores para opsoninas”, por ejemplo, los receptores para el fragmento C3b del complemento.

Los Linfocitos B pueden reconocer y fagocitar antígenos proteicos a través del “receptor de las células B” (IgM junto con las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$).

Una vez que el antígeno fue reconocido, es internalizado en vesículas denominadas “endosomas”. Estos compartimientos intracelulares contienen un pH ácido y es rico en enzimas proteolíticas. La vía endosomal continúa con la posterior unión del endosoma a un lisosoma, quien posee un contenido enzimático aun mayor.

- Procesamiento de las proteínas en las vesículas endosómicas y lisosómicas.

Las proteínas son degradadas enzimáticamente generando péptidos, muchos de los cuales poseen las características estructurales para poder interactuar con las moléculas de clase II. Esta lisis proteica es llevada a cabo por proteasas que actúan a pH ácido. La “catepsina”, es

una proteasa de amplia especificidad de sustrato, y es la enzima endosomal y lisosomal más abundante.

- Biosíntesis y transporte de las moléculas del MHC II al endosoma.

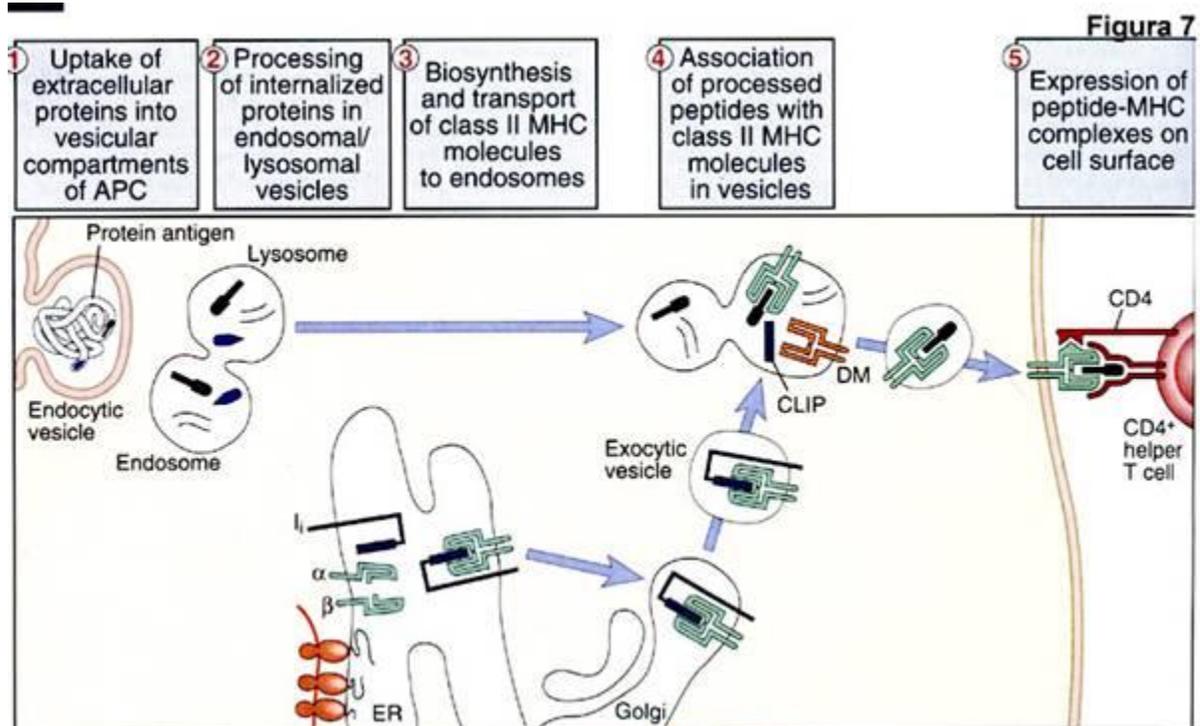


FIG. 7 PRESENTACION Y PROCESAMIENTO POR LA MOLECULA HLA II

Fuente. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

Las cadenas α y las cadenas β , son sintetizadas por separada y se asocian unas con otras en el ER, este proceso es facilitado por proteínas chaperonas residentes de este organelo, tales como la calnexina (al igual que en la vía del MHC I).

La molécula de clase II ensamblada, aun continua siendo inestable, por lo que se une al sitio de unión al péptido, una proteína denominada “cadena invariable” (Ii).

La Ii es una proteína no polimórfica compuesta por tres subunidades. Esta proteína se une a un heterodimero formado por las cadenas α y β , en su sitio de unión al péptido. De esta manera interfiere en la carga del péptido.

Gracias a la Ii las moléculas de clase II se estabilizan por completo en el ER y mantiene ocupado el sitio de unión al péptido dentro de esta organela impidiendo que los péptidos propios del ER se unan a las moléculas nacientes. Las Ii también favorecen el correcto plegamiento y su posterior transporte a las vesículas endosómicas.

Los segmentos de membrana del ER que contienen a las moléculas de MHC II, se separan del ER formando vesículas que son transportadas a la membrana celular. Pero durante este camino, las vesículas exocíticas se unen con los endosomas que contiene a los péptidos recién internalizados. El significado de esta vía vacuolar, consiste en que las moléculas de clase II se encuentren con los péptidos generados por proteólisis de las proteínas previamente fagocitadas.

Se han identificado endosomas ricos en moléculas de clase II, a los que se los llamo “compartimiento de clase II del MHC” o “MIIC” (MHC class II compartment). Se debe destacar que estas vesículas contienen todos los componentes para la asociación péptido-moléculas de clase II, incluyendo las enzimas que degradan las proteínas, la Ii y una molécula denominada HLA-DM.

- Asociación del péptido a las moléculas del MHC II en el MIIC

Debido que la Ii se encuentra bloqueando el sitio de unión al péptido, debe ser removido para que el péptido se una a las moléculas de clase II. Este evento se realiza en dos pasos. Primero, las mismas catepsinas que degradaron las proteínas, clivan al Ii, dejando como resultado una molécula de 24 aminoácidos en el sitio de unión al péptido llamada CLIP (péptido de cadena invariable asociado a clase II).

El segundo paso consiste en quitar al CLIP de la hendidura, esto es llevado a cabo por la molécula HLA-DM. Quien además facilita la entrada del péptido antigénico en su lugar. El gen que codifica la proteína HLA-DM se encuentra ubicado en la región II del MHC.

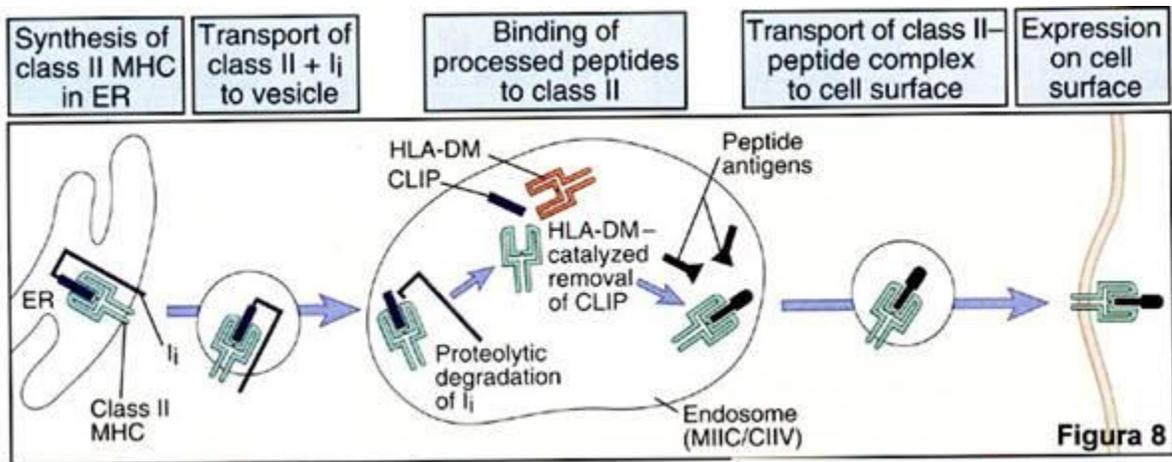


FIG. 8 Síntesis del Clip

Fuente. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

- Expresión del complejo péptido-MHC II en la superficie celular.

Una vez que el péptido se ha unido a la molécula de clase II esta se estabiliza y puede ser presentada en la membrana celular. Finalmente en la membrana los complejos péptido-MHC II pueden interactuar con los Linfocitos T CD4+.

Tal y como hemos descrito con anterioridad, el clásico rol de las moléculas de clase I es, unir los péptidos endógenos durante su maduración biosintética y luego transportarlos a la superficie celular para activar a los Linfocitos CD8+. En general los péptidos de origen exógeno se encuentran excluidos de esta vía.

Sin embargo, acumulada evidencia nos ha demostrado que esta dicotomía en la presentación del antígeno de origen endógeno y exógeno no es absoluta.

Se ha demostrado que la respuesta de los Linfocitos citotóxicos (CD8+) puede ser iniciada por antígenos exógenos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Existen al menos dos vías diferentes en este procesamiento alternativo de las moléculas del MHC I: una TAP dependiente o procesamiento alternativo citoplasmático del MHC I y la otra TAP independiente o procesamiento alternativo vacuolar del MHC I.

La primera de ellas involucra al acceso de péptidos exógenos a la vía normal del MHC I. Es decir, se ha observado que de alguna manera no descrita aun, los péptidos exógenos ubicados en los endosomas, pueden “escaparse” de estos e ingresar al citosol. Una vez en este, las proteínas TAP internalizan al péptido exógeno al ER y lo unen al MHC I.

La segunda vía involucra un mecanismo de procesamiento del antígeno exógeno en compartimientos vacuolares, sin que el péptido ingrese al citosol. Este mecanismo sugiere la unión del péptido a las moléculas del MHC I luego de que estas hayan abandonada el complejo de Golgi. En esta vía el péptido exógeno presumiblemente proviene de un endosoma o un lisosoma.

El espacio intracelular donde el péptido se une a las moléculas del MHC I en la vía vacuolar, aun se desconoce. Se cree que pudiera ser en algún compartimiento intracelular donde el procesamiento del MHC I se lleva a cabo, o luego del reciclaje de las moléculas del MHC I de membrana y su posterior exposición extracelular. Inicialmente se había pensado que las moléculas de clase I que participaban en esta vía se encontraban “vacías”, es decir que no se asociaban a ningún péptido, y por lo tanto un péptido exógeno podía ocupar la hendidura. Actualmente se sabe que esto no es así, y que la vía vacuolar incluye una disociación del péptido endógeno y luego un cambio por el péptido exógeno, proceso conocido como “disociación/cambio del péptido” (peptide dissociation/exchange). (Brandan. 2011)

Se ha observado que la disociación/cambio del péptido ocurre solo en medios ácidos tales como las vesículas post-Golgi de procesamiento de antígenos o los fagolisosomas.

Pero ¿Cómo las moléculas de clase I, que contienen péptidos endógenos en su hendidura, puedan disociarse de esto e intercambiarlos por péptidos exógenos? Una de las explicaciones de este fenómeno es que durante algún momento del tráfico vesicular que contenga moléculas de clase I, un grupo de estas se desvié de la ruta normal y se mezcle en

la ruta del MHC II. De esta manera, al ingresar en las vesículas de procesamiento de antígenos post-Golgi, que poseen pH ácido y además a los antígenos exógenos, los péptidos endógenos unidos a las moléculas del MHC I, se disocian y este queda con su hendidura vacía en un medio donde abundan péptidos exógenos. Esto trae como consecuencia que algunos de los péptidos exógenos que cumpla con los requisitos previamente mencionados se una al MHC I vacío.

La otra posible explicación nos habla del reciclaje, donde moléculas de clase I de superficie, son endocitadas, y estas vesículas endocíticas son destinadas a su degradación. Pero existe un pequeño grupo, que intercepta la vía de procesamiento de moléculas de clase II. De esta forma las moléculas de clase I se disocian de los péptidos endógenos debido al pH ácido del endosoma y sigue una ruta similar a la previamente descrita.

En conclusión, queremos dejar en claro que además de las clásicas vías de procesamiento de las moléculas de clase I y II, existe una vía alterna para el MHC I: una TAP dependiente, y otra donde las moléculas de clase I, ya sea que provengan de la superficie celular o del ER, interceptan a la vía del MHC II y experimentan un proceso conocido como disociación/cambio de péptidos, donde pierden al péptido endógeno y se unen a uno exógeno (TAP independiente). Este cambio solo se da en medios ácidos. (Anaya, 2005)

7. HLA Y ENFERMEDAD

Desde hace varias décadas se sabe que el padecimiento de ciertas enfermedades se asocia con el incremento en la frecuencia de un determinado alelo HLA. Esta asociación cuando tiene un valor estadísticamente significativo, se viene considerando como un factor de susceptibilidad o un marcador de riesgo a padecer la enfermedad, que puede cifrarse estadísticamente como “riesgo relativo” (RR) y da una idea de la mayor o menor probabilidad que tiene un sujeto a padecer una determinada enfermedad si presenta dicho marcador o alelo HLA con respecto a aquellos individuos que no lo tienen. (Rodríguez, 2005)

A pesar del gran polimorfismo de las moléculas HLA y de la ampliación del número de subtipos alélicos de clase I y de clase II, hoy se conocen múltiples enfermedades que

están asociadas a clase I y otras a clase II. El número de enfermedades asociadas a alelos de clase I es menor que el de las asociadas a clase II.

Las causas de esta asociación HLA y enfermedad no son conocidas completamente. Por ejemplo en espondilitis anquilopoyética (EA), enfermedad invalidante y que afecta a las articulaciones de la columna principalmente, y en la que se ha descrito una fuerte asociación con HLA-B27, se ha podido observar que ciertos péptidos antigénicos de origen articular serían capaces de formar un complejo con HLA-B27 específicamente que induciría fenómenos de autoinmunidad, bien por generar en la molécula B-27 modificaciones conformacionales que la harían no ser reconocida como propia, bien por generar complejos HLA-péptido con cierta similitud con antígenos bacterianos que provocarían reacciones cruzadas autoagresivas en individuos HLA-B27, previamente sensibilizados a tales antígenos bacterianos. En el caso de la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), enfermedad que cursa con una destrucción selectiva de los islotes de Langerhans del páncreas, con infiltración linfocitaria, se considera que es el resultado de una respuesta autoagresiva frente a antígenos presentes en la membrana celular mediada por linfocitos T.

CUADRO. 2 ASOCIACION DE ENFERMEDADES-HLA

ENFERMEDADES	ASOCIACION CON HLA
ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNITARIA	B8
ANEMIA PERNICIOSA	B7, B8, B18, Bw15, DR4, DR2, DR3
ARTRITIS REUMATOIDE	DR4
CIRROSIS BILIAR PRIMARIA	B8, DR3
DIABETES MELLITUS TIPO I	B8, B15, DR3, DR4, B54 (Orientales)
ENFERMEDAD CELIACA	A1, B8, DR3, DR7
ENFERMEDAD DE BEÇHET	B5, DR59
ENFERMEDAD DE GRAVES	B8, DR3, Bw46 (Chinos), Bw35 (Japoneses)
ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO	DR2, DR4
ESCLEROSIS MÚLTIPLE	A2, B7, DR2
ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	B27
GRANULOMATOSIS DE WEGENER	DR2
HEPATITIS CRÓNICA AUTOINMUNITARIA	A1, B8, DR3
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	DR3, DR2
MIASTENIA GRAVIS	A1, B8, DR3
PÉNFIGO	A26, B38, DR4, DR6
PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA IDIOPÁTICA	B8, B12, DR2
SÍNDROME DE GOODPASTURE	B7, DR2
SÍNDROME DE SJÖGREN	DR3, B8, Dw52
SÍNDROMES POLIGLANDULARES AUTOINMUNITARIOS	DR3, DR4
TIROIDITIS DE HASIMOTO	B8, DR3

Fuente: Rodriguez Martha. HLA y Enfermedad.

<http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/ims051w.pdf>

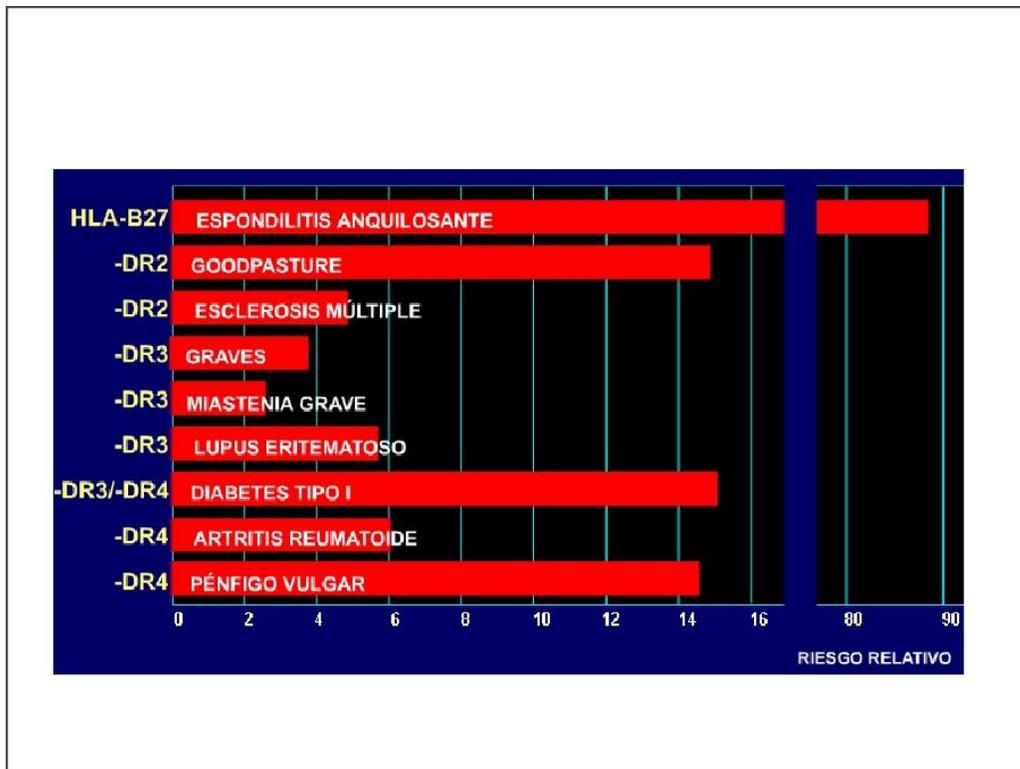


Fig. 9. HLA Enfermedad. Spobrevida de transplante renal, según # de HLA incompatible (mismatches, MM) vida media del injerto a menor número de MM. www.ctstransplant.org. Monday, October 4, 2010

8. MECANISMOS DE GENERACION DEL POLIMORFISMO

Los genes MHC se expresan de forma codominante. Esto quiere decir que los alelos (variantes) heredados de ambos progenitores se expresan de forma equivalente:

- Como existen tres genes Clase-I, denominados en humanos HLA-A, HLA-B y HLA-C, y cada persona hereda un juego de cada progenitor, cualquier célula de un individuo podrá expresar 6 tipos diferentes de moléculas MHC-I.
- En el locus de Clase-II, cada individuo hereda un par de genes HLA-DP (DPA1 y DPA2, que codifican las cadenas α y β), un par de genes HLA-DQ (DQA1 y DQA2, para las cadenas α y β), un gen HLA-DR α (DRA1) y uno o dos genes HLA-DR β (DRB1 y DRB3, -4 o -5). Así, un individuo heterocigoto puede heredar 6 u 8 alelos de Clase-II, tres o cuatro de cada progenitor.

El juego de alelos presente en cada cromosoma se denomina haplotipo MHC. En humanos, cada alelo HLA recibe un número. Por ejemplo, para un individuo dado, su haplotipo puede ser HLA-A2, HLA-B5, HLA-DR3, etc... Cada individuo heterocigoto tendrá dos haplotipos MHC, uno en cada cromosoma (uno de origen paterno y otro de origen materno).

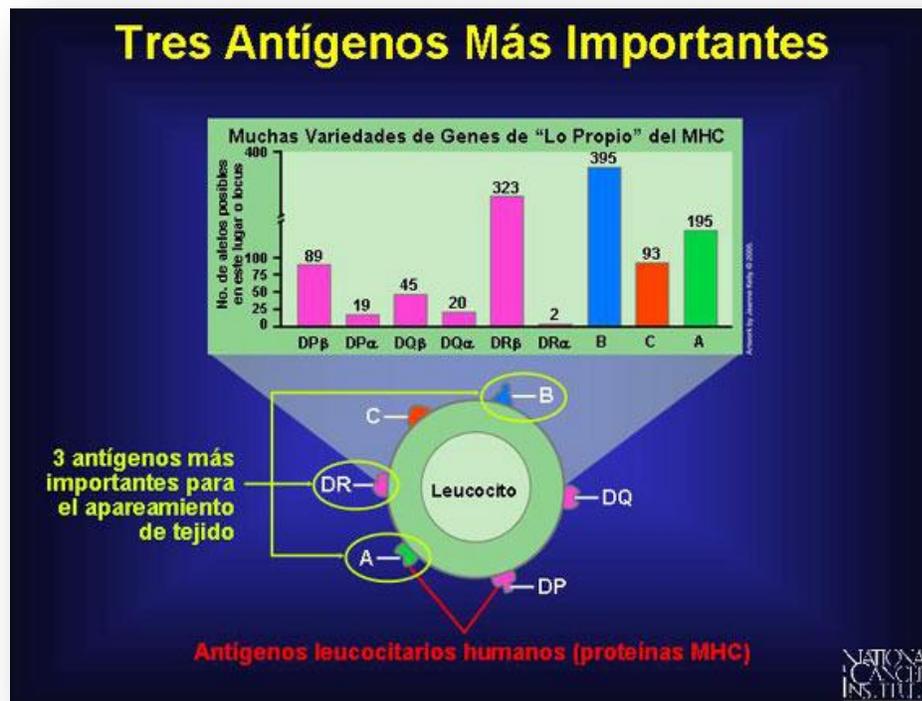


Fig 10. LA COMPLEJIDAD DEL MHC. Fuente. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

Los genes MHC son enormemente polimórficos, lo que significa que existen muchos alelos diferentes en los diferentes individuos de la población. El polimorfismo es tan grande que en una población mixta (no endogámica) no existen dos individuos que tengan exactamente el mismo juego de genes y moléculas MHC, excepto los gemelos idénticos.

Las regiones polimórficas de cada alelo se encuentran en la zona de contacto con el péptido que va a presentar al linfocito. Por esta razón, la zona de contacto de cada alelo de molécula MHC es muy variable, ya que los residuos polimórficos del MHC forman

hendiduras específicas en las que sólo pueden introducirse cierto tipo de residuo del péptido, lo cual impone un modo de unión muy preciso entre el péptido y la molécula MHC. Esto implica que cada variante de molécula MHC podrá unir específicamente sólo aquellos péptidos que encajen adecuadamente en la hendidura de la molécula MHC, que es variable para cada alelo. De esta manera, las moléculas de MHC tienen una especificidad amplia para la unión de péptidos, puesto que cada molécula de MHC puede unir muchos, pero no todos los tipos de péptidos posibles. Esta es una característica esencial de las moléculas MHC: en un individuo concreto, bastan unas pocas moléculas diferentes para poder presentar una vasta variedad de péptidos.

El polimorfismo del MHC es el resultado de un largo proceso de evolución a lo largo de miles de millones de años como consecuencia de la presión evolutiva ejercida por los agentes infecciosos. Para la generación de este elevado polimorfismo el MHC ha utilizado diferentes mecanismos que han contribuido de diferente forma a la creación de nuevos alelos. Así, algunos son el resultado de mutaciones puntuales mientras que otros proceden de la combinación de secuencias completas entre diferentes alelos, bien mediante un proceso de recombinación génica o bien mediante el proceso denominado conversión génica, según el cual una secuencia es reemplazada por otra semejante de un gen homólogo. La recombinación entre alelos del mismo locus parece ser el mecanismo más frecuentemente utilizado para la creación del polimorfismo y así muchos alelos diferentes pueden proceder de procesos de recombinación repetidos a partir de un pequeño número de genes ancestrales. La existencia de este proceso evolutivo apoya que el polimorfismo es esencial para la función de los antígenos de histocompatibilidad. (Bravo, 2005)

En el genoma humano los genes de la clase I y clase II, son los más polimorfos, sean descrito más de mil alelos para HLA clase I y más de 500 para clase II (Peña, 2005)

Cuadro 3. ALELOS DEL POLIMORFISMO HLA

Número de alelos HLA										
Alelos HLA clase I										6.705
Alelos HLA clase II										1.771
Alelos HLA										8.496
Otros alelos HLA										148
Número de alelos confidenciales										8
HLA clase I										
Gen	A	B	C	E	F	G				
Alelos	2.132	2.798	1.672	11	22	50				
Proteínas	1.527	2.110	1.200	3	4	16				
Nulos	102	92	44	0	0	2				
Pseudogenes HLA clase I										
Gen	H	J	K	L	P	T	U	V	W	X
Alelos	12	9	6	5	5	0	0	3	0	0
Proteínas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nulos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA clase II										
Gen	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DQA	DQB
Alelos	7	1.297	49	179	36	158	7	13	12	13
Proteínas	2	958	31	128	18	136	4	7	3	5
Nulos	0	27	1	1	0	3	0	0	1	0
Alelos DRB HLA clase II										
Gen	DRB1	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB
		2	3	4	5	6	7	8	9	
Alelos	1.196	1	58	15	20	3	2	1	1	
Proteínas	887	0	46	8	17	0	0	0	0	
Nulos	21	0	1	3	2	0	0	0	0	

<i>Otros Genes HLA</i>				
<i>Gen</i>	<i>MICA</i>	<i>MICB</i>	<i>TAP1</i>	<i>TAP2</i>
<i>Alelos</i>	84	40	12	12
<i>Proteínas</i>	67	26	6	5
<i>Nulos</i>	2	2	1	0

Fuente. HLA Nomenclatura@hla.alleles.org

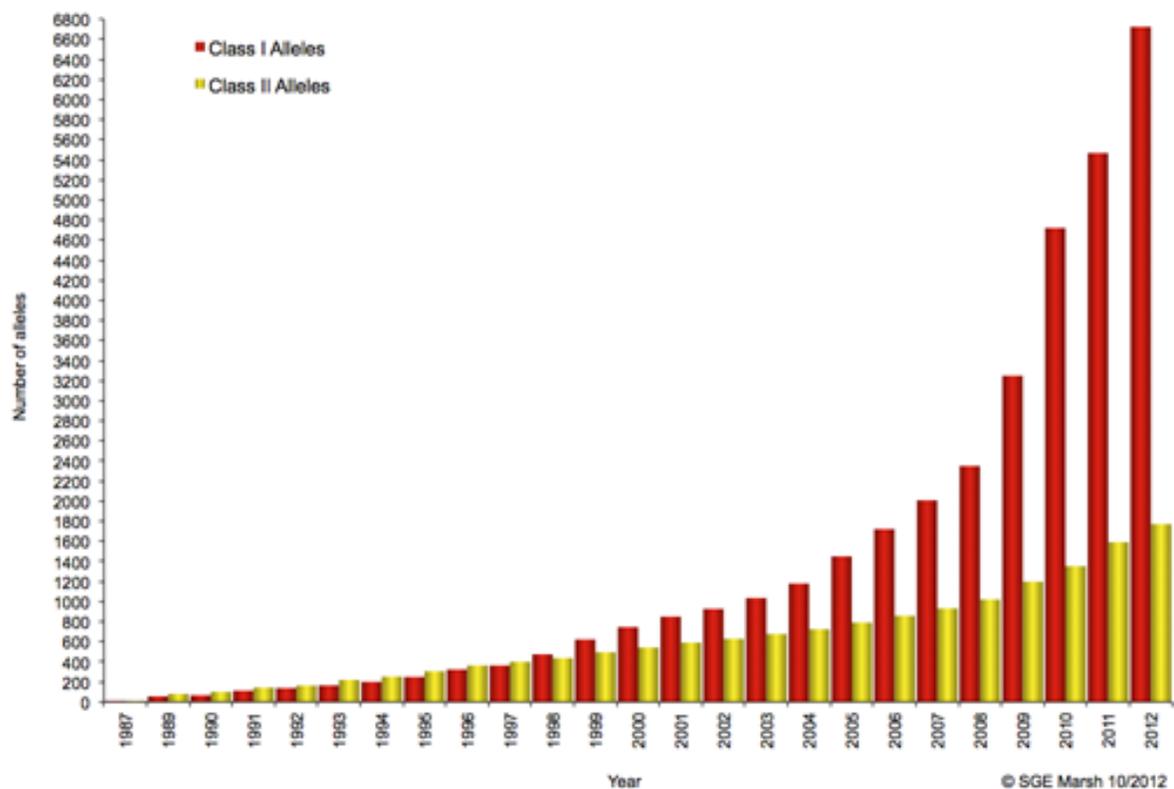


Fig 11. Graph showing numbers of alleles named by year from 1987 to October 2012.

Fuente. Nomenclatura@hla.alleles.org.

Las moléculas HLA –A, HLA-B Y HLA-C, son altamente polimorfas, lo mismo que las cadenas β de la clase II (en orden decreciente con el máximo para HLA-DR β , y luego HLA-DP β , y en tercer lugar, HLA-DQ β , y si bien en menor grado que las cadenas β , las cadenas α de HLA-DP y HLA-DQ, HLA-DR α y β_2 -microglubulina son invariables en lo

que respecta a la estructura. Los cambios de aminoácidos responsables de este polimorfismo están restringidos a los dominios α_1 y α_2 de la clase I y a los dominios α_1 y β_1 de clase II. La región MHC representa una mancha caliente (hotspot) que sobresale con tasas de mutación de dos órdenes de magnitud superior que la de los loci que no pertenecen al MHC. (Rodríguez, 2007)

Estas formas alélicas múltiples pueden generarse por una diversidad de mecanismos arriba nombrados. Sin embargo existe un gran número de pseudogenes dentro del MHC que puede representar una acumulación de reservas de información genética para la generación de diversidad polimórfica en las moléculas clase I y clase II “funcionales”.

La importancia adaptativa del polimorfismo del MHC en una población radica en el hecho de que tiende a proteger a la especie frente a numerosos agentes infecciosos, ya que amplía la variedad de antígenos que se pueden reconocer. Por lo cual cuando por alguna circunstancia, disminuye el grado de polimorfismo del MHC, aumentan los riesgos de enfermedades infecciosas en las poblaciones. Se ha demostrado por ejemplo que en la población actual de guepardo (amenazado de extinción) posee poca variedad de haplotipos de MHC, ya que proceden de un número limitado de animales progenitores.

9. REGULACION DEL MHC

Se sabe que los genes de MHC pueden ser regulados tanto de modo positivo como negativo.

El MHC-I aumenta su expresión ante IFN-gamma y TNF. Además, los interferones alfa, beta, gamma activan la transcripción de otros genes que también participan en las respuestas mediatizadas por el MHC: el gen de la β_2 -microglobulina (que no pertenece al complejo MHC) y los genes TAP, que aun estando dentro de la zona del MHC-II, codifican proteínas de transporte requeridas para introducir péptidos antigénicos en el interior del retículo endoplasmico rugoso. Esto permite aumentar la cantidad de moléculas MHC de clase I capaces de presentar péptidos derivados de algún parásito intracelular (como un virus), para que sean reconocidos por los linfocitos T CD8⁺.

El IFN-gamma (pero no el alfa ni el beta) induce aumento de la transcripción de los genes de clase II, por medio del llamado transactivador de MHC de clase II (abreviadamente, CIITA).

El MHC-I puede ver modificada su expresión ante productos de ciertos virus. El virus así es capaz de evadirse de la respuesta inmune, al disminuir la probabilidad de que las células infectadas presenten el antígeno a los linfocitos catalíticos.

- Una proteína del citomegalovirus (CMV), que se une a la beta-2-microglobulina, impidiendo que se transporten cadenas alfa desde el RER a la membrana.
- El virus de la hepatitis B (HBV) bloquea ciertos factores de transcripción de genes de MHC-I.

10. NOMENCLATURA

La nomenclatura de los genes HLA y alelos es llevada a cabo por el Comité de Nomenclatura de la Organización de la Salud (WHO). Los primeros antígenos nombrados fueron determinados serológicamente y se identificaron con el prefijo HLA, seguido del nombre del *locus* al cual pertenecen y el número asignado por el Comité de nomenclatura (i.e. HLA-A24, B35, DR4, etc.). Sin embargo, con la aparición de las técnicas moleculares para determinar la molécula del HLA el nivel de identificación fue aumentando su complejidad, debido al uso de técnicas moleculares cada vez más avanzadas.

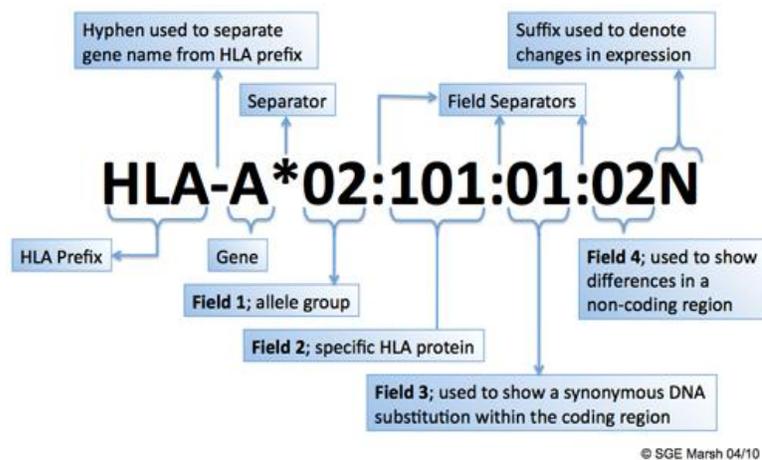


Fig. 12 Nomenclatura del Sistema HLA. <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

Los alelos determinados a nivel molecular también se identificaron con el prefijo HLA seguidos del locus del cual derivan, un asterisco (el cual es un separador entre el nombre del locus y la designación del alelo e indicativo de su determinación por métodos moleculares) y un número de cuatro dígitos. Los dos primeros identifican su relación con el antígeno determinado serológicamente y los dos siguientes, el subtipo específico asignado por el Comité de Nomenclatura.

Cuadro 4. NOMENCLATURA HLA

Nomenclatura	Significado
HLA-DRB1	Un determinado lugar HLA DRB1 es decir, la región HLA y prefijo para un gen HLA
HLA-DRB1*13	Un grupo de alelos que codifican una secuencia homóloga del gen del antígeno DR13 a DRB1*13 alelos
HLA-DRB1*13:01	Un Alelo HLA específico
HLA-DRB1*13:01:02	Un alelo que difiere por una mutación similar a DRB1*13:01:01
HLA-DRB1*13:01:01:02	Un alelo que contiene una mutación que se encuentra fuera de la región de codificación del DRB1*13:01:01:01
HLA-A*24:09N	Un alelo "Nulo", o alelo que no se expresa
HLA-A*30:14L	Un alelo que codifica una proteína con muy reducida de "baja expresión" en la superficie celular
HLA-B*44:02:01:02S	Un alelo que codifica una proteína que se expresa y se "secreta" como única molécula
HLA-A*24:02:01:02L	Un alelo que tiene una mutación que ya ha demostrado tener un efecto significativa en la expresión de la superficie celular, pero cuando esto no haya sido confirmada y su expresión sigue siendo cuestionable

Fuente <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/ims051v.pdf>

11. TIPIFICACION DEL MHC

1) REACCION DE LA POLIMERASA (PCR)

Las técnicas de biología molecular más usadas (no las únicas) para detectar polimorfismos en el ADN utilizan los métodos de:

- Secuenciación directa del ADN.
- Análisis del tamaño de los fragmentos de restricción del ADN (*RFLP restriction fragment length polymorphism*).
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*).

La secuenciación directa del ADN no es práctica para su uso rutinario. Actualmente son utilizadas técnicas de PCR-SBT en la que se secuencian los fragmentos amplificados mediante PCR.

Las técnicas que actualmente más se utilizan para realizar tipaje HLA son PCR-SSO y PCR-SSP. La PCR-SSO, que se basa en: amplificación de la zona polimórfica del ADN por PCR, hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) fijados a membranas de nylon. Con la técnica de PCR-SSP (Primers específicos de secuencia) sólo se consigue amplificación en aquellas muestras en las que los primers reconozcan el alelo para los que son específicos por lo tanto lo único que se hace es probar la existencia o no de los productos amplificados

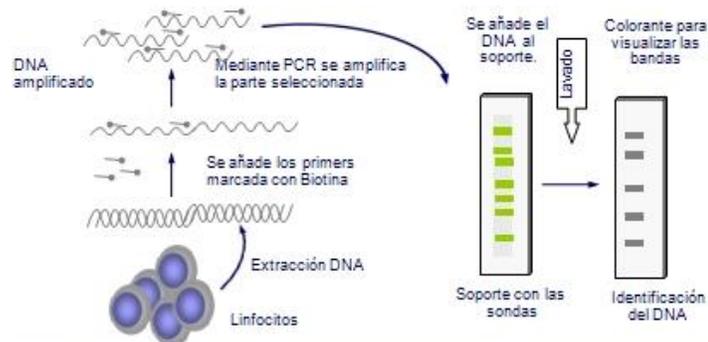
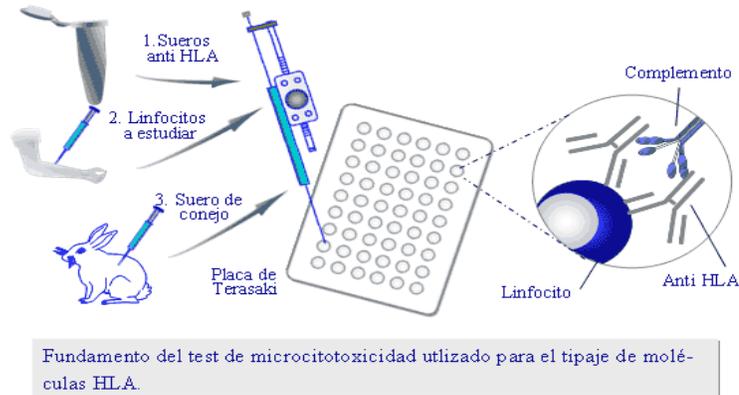


Fig. Tipaje Biología molecular. Fundamento del tipaje HLA por biología molecular mediante la técnica PCR-SSO.

Fig. 13 Tipaje Biología Molecular. Fundamento del tipaje HLA por Biología Molecular .
Fuente Peña José

2) METODO SEROLOGICO

La técnica de Microlinfocitotoxicidad utilizado para el tipaje de moléculas HLA



12

Fig.14. Técnica de Microlinfocitotoxicidad. Fuente. Peña José

La técnica de Microlinfocitotoxicidad se basa en la extracción de linfocitos, los cuales actuarán contra diferentes anticuerpos que reconocerán a moléculas específicas HLA, los cuales se demostrarán en lisis celular. La desventaja del método es que se necesitan muchas moléculas específicas además de sus alelos, sus sub alelos, la mayoría de los sueros no son monoespecíficos y además presentan reactividad cruzada con otros alelos, no se detecta homocigosis (en general se informa 1 alelo y el otro se informa como "blanco"), La técnica debe realizarse sin interrupción desde su inicio hasta su finalización, dado que se trabaja con células viables.

V. OBJETIVOS

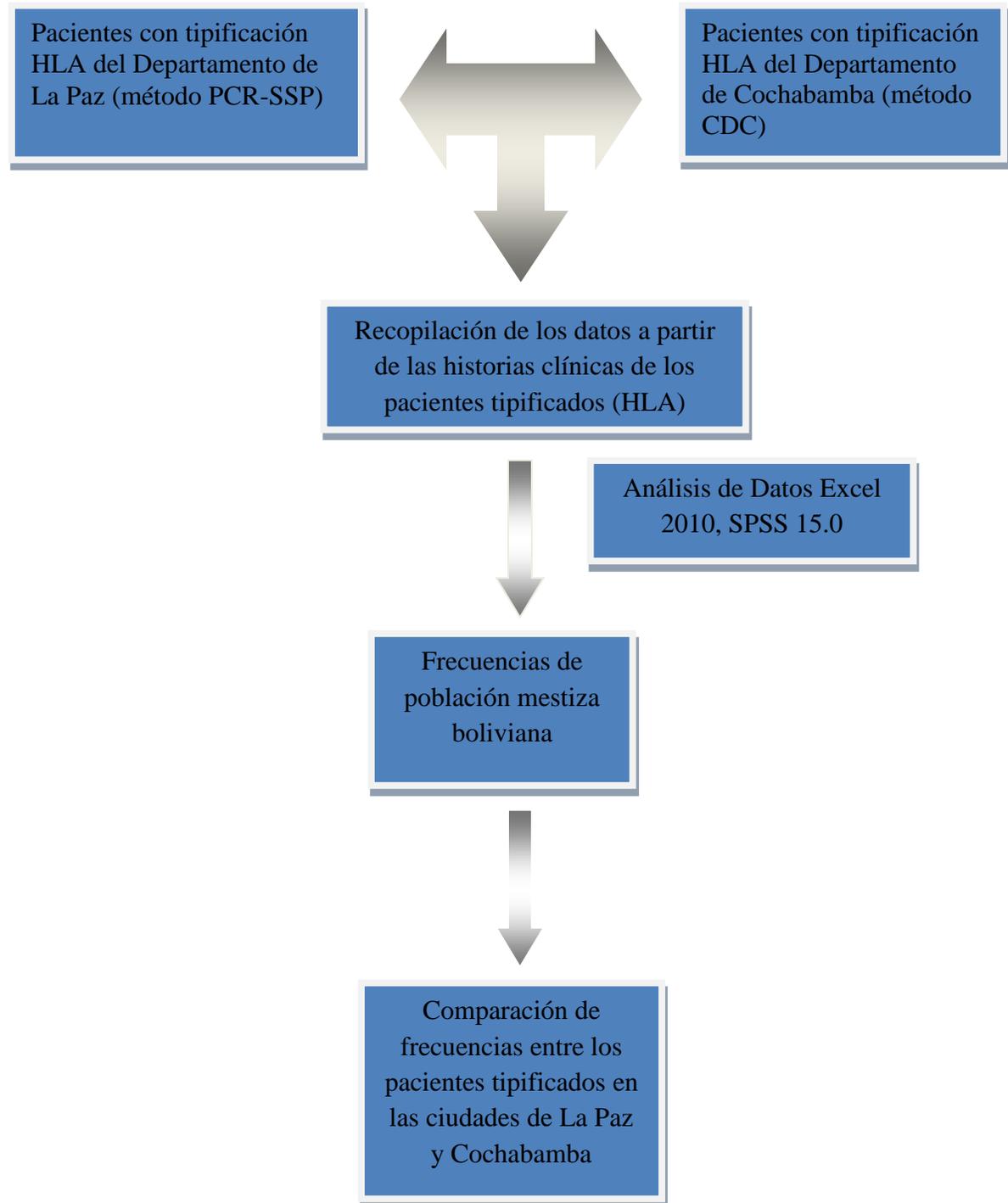
a) OBJETIVO GENERAL

Determinar el polimorfismo alélico, genotípico, haplotípico de los antígenos HLA clase I y clase II de la población mestiza tipificada en los departamentos de La Paz y Cochabamba

b) OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas de los Loci A, B, C y DR de la población mestiza boliviana.
- Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los Loci A, B, C y DR de la población mestiza boliviana del departamento de La Paz.
- Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los Loci A, B, C y DR de la población mestiza boliviana del departamento de Cochabamba.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas y haplotípicas de la pacaña frente a la población cochabambina.

VI. DISEÑO DE LA INVESTIGACION



a) POBLACION EN ESTUDIO

Pacientes de nacionalidad boliviana con tipificación HLA clase I (A, B y C) y HLA clase II (DR).

b) DESCRIPCION DE LA POBLACION

La población es estudio corresponde a todos los pacientes entre donantes y receptores que realizaron HLA clase I y HLA clase II en los laboratorios de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS de la ciudad de la Paz y el laboratorio DIANA de la ciudad de Cochabamba Bolivia.

c) TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de muestra estaba constituido por 909 resultados de tipificaciones HLA de los pacientes donantes y receptores que fueron tipificados en Instituto SELADIS de la ciudad de la Paz y el laboratorio DIANA de la ciudad Cochabamba Bolivia.

d) CRITERIOS DE INCLUSION

Para la determinación de las frecuencias alélicas, genotípicas, se incluirán todos los pacientes que cuenten con tipificación HLA clase I y HLA clase II

Para la determinación de las frecuencias haplotípicas se incluirán solamente pacientes familiares hasta un tercer grado de consanguinidad que cuenten con tipificación HLA clase I y HLA clase II

e) CRITERIOS DE EXCLUSION

Para la determinación de las frecuencias alélicas, genéticas, se excluirán todos los que tengan hasta un cuarto grado de consanguinidad

f) DISEÑO DE ESTUDIO

El estudio es de tipo Retrospectivo Descriptivo. Las frecuencias alélicas, haplotípicas y genotípicas se realizaron mediante el programa de análisis Estadístico SPSS versión 15.0

g) MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

1. MATERIALES

- ∴ Gradilla para tubos eppendorf
- ∴ Tubos eppendorf de 1.5 ml
- ∴ Tips de azules
- ∴ Tips de amarillos
- ∴ Micropipetas de 100-1000 μ l
- ∴ Micropipetas de 20-200 μ l
- ∴ Micropipetas de 0.5-10 μ l
- ∴ Cubetas de hielo
- ∴ Cronómetros

2. EQUIPOS

- ∴ Campana L.U.V. Mod. 14-1
- ∴ Microondas Edition I-Daewon
- ∴ Microcentrífuga
- ∴ Electrophoretic Gel System EC-350
- ∴ Heating Blot
- ∴ Transiluminador FBTI-88 Mod. Fisher Scientific

3. REACTIVOS

- ∴ Reactivo de lisis celular (tampón TE)
- ∴ Mix (One Lambda)
- ∴ Reactivo de lisis de núcleos (SDS)
- ∴ Trays para locus A,B,C y DR
- ∴ RNAasa
- ∴ Aceite mineral pesado
- ∴ Etanol absoluto
- ∴ Tampón TBE 10X
- ∴ Etanol al 70%
- ∴ Sybr green

h) METODOS

- **Método de la Reacción de la Polimerasa (PCR)**

Para obtención de DNA Se tomó 5 ml de sangre con EDTA.3K, se centrifugó 10 minutos a 3 000 rpm se tomó 400 µl de la interface en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añadió 900 µl de solución de lisis celular se centrifugó por 90 segundo a 14 000 rpm se decantó el sobrenadante y secó sobre un papel absorbente. Se añadió 400 µl de solución de lisis de núcleos con 3 µl de RNAasa. Se Incubó 30 minutos a 37 °C se añadió 150 µl de solución de lisis de proteínas, se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm se añadió 1 ml de etanol absoluto o 400 µl de isopropanol, se centrifugó 90 segundos a 14 000 rpm. Se añadió 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó 90 minutos a 14 000 se secó a 56°C durante 20 minutos se añadió 200 µl de solución de resuspensión, se guardó a 4°C si la PCR.

Para Tipificación de HLA por PCR-SSP. En el Cuarto Blanco se preparó el material en la campana de PCR se irradió con luz UV la campana de PCR durante 15 minutos, se atemperó el Mix correspondiente a cada locus, se añadió *DNA taq polimerasa* según el volumen establecido para cada locus. En el Cuarto Azul se atemperó los trays para cada locus (A, B, C y DR) se añadió 9 µl de la mezcla previamente homogenizado al tubo 1 de cada locus, se añadió 1 µl de la solución de resuspensión de la muestra de ADN a los tubos 1 de cada locus, se añadió los volúmenes correspondientes de ADN (concentración de 50ng) a cada tubo según el locus se añadió 10 µl de la mezcla a todos los tubos de cada tray se añadió una gota de aceite mineral pesado se llevó al termociclador previamente programado según marca. En el Cuarto negro se preparó agarosa al 2,5% según especificaciones de cada marca (con TBE al 1X y una dilución 1/100 de sybr green como revelador) se sembró el marcador de peso molecular en el primer pozo se sembró los amplicones en el tubo 1 de cada locus se realizó la corrida electroforética a 300 de mA y 150 voltios por un tiempo de 15 minutos se llevó al transiluminador y se anotó las bandas donde hubo amplificación.

- **Método Serológico**

Prueba de Microlinfocitotoxicidad de Terasaki, Se utilizó una suspensión de linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica con el método de gradiente de densidad, utilizando Fycoll-Hypaque (densidad 1.007 g/mL), se ajustó su concentración a 2 x 10⁶ células /mL se agregó 1 µl de linfocitos a cada pozo de la placa, la cual contiene antisueros. Se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 5 µl de complemento de conejo, se dejó incubar por 60 minutos a temperatura ambiente se agregó 5 µl de solución de eosina al 5% pH 7.2-7.4. Luego se agregó 5 µl de formol pH 7.2-7.4. Se dejó reposar al menos 20 minutos. Se dispuso a leer en microscopio invertido de contraste de fases. Se informó los resultados de acuerdo a normas internacionales (Bonet 2004).

0 a 10 % - [1] Negativo

11 a 20 % ± [2] Negativo dudoso

21 a 50 % ± [4] Positivo débil

51 a 80 % ++ [6] Positivo

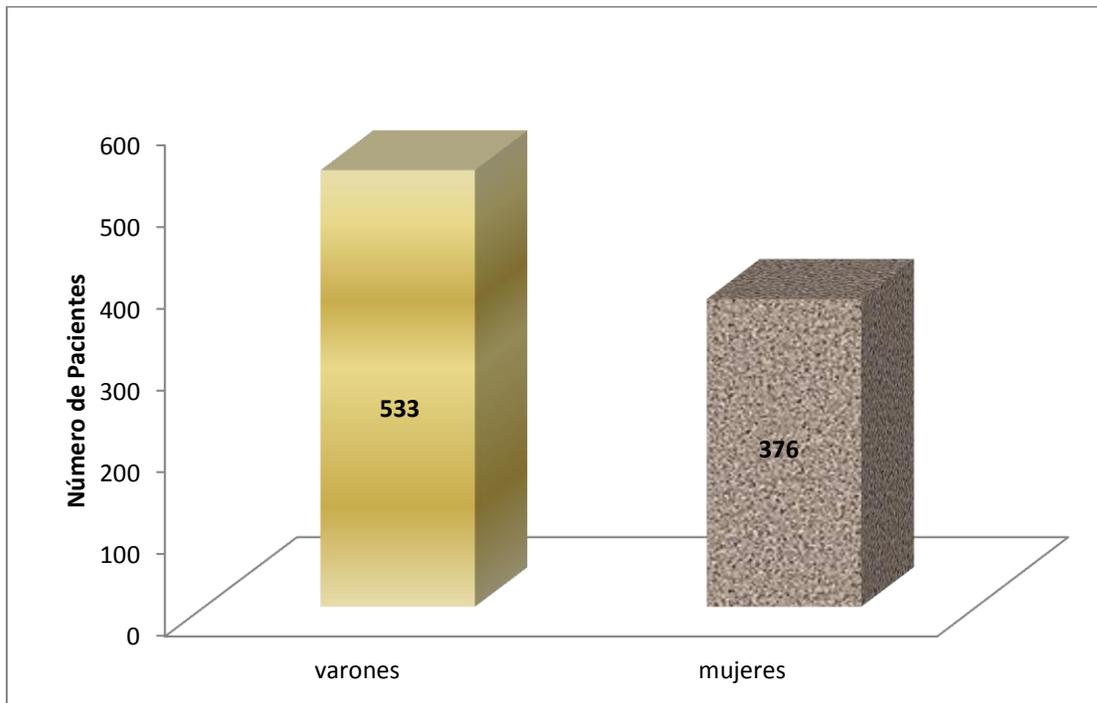
81 a 100 % +++ [8] Positivo intenso

[0] No definible

VII. RESULTADOS

A. RESULTADOS DE FRECUENCIAS ALELICAS

La determinación de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los loci HLA de la población mestiza de pacientes bolivianos atendidos en los laboratorios de Histocompatibilidad e Inmunogenética del instituto SELADIS y laboratorios DIANA fueron 909, de los cuales 533 (58,6%) fueron Varones, 376 Mujeres con un (41,4%).



A. Figura 15. Distribución según sexo del universo de pacientes que se realizaron tipificación HLA por métodos serológicos o moleculares en los laboratorios de Histocompatibilidad e Inmunogenética del instituto SELADIS y Laboratorios Diana.

En la Tabla N°1 se muestra que el 80 % de los pacientes estudiados son oriundos de departamentos de La Paz (40%) y Cochabamba (40%) y el restante 20 % de los pacientes provenían del resto de departamentos del país. El departamento del Beni es el que menor porcentaje de pacientes apporto al estudio.

1. TABLA N° 1 Resultados De Pacientes Mestizos Bolivianos Según El Departamento De Procedencia

PROCEDENCIA	N	(%)
LA PAZ	364	40,04
COCHABAMBA	363	39,93
SANTA CRUZ	51	5,61
POTOSI	44	4,84
CHUQUISACA	22	2,42
TARIJA	25	2,75
ORURO	16	1,76
BENI	2	0,22
PANDO	12	1,32
TOTAL	909	100

Para el locus HLA-A se determinó que en la población mixta boliviana se expresan 25 alelos diferentes (tabla 2), se estableció también que los alelos que se presentaban con mayor frecuencia eran: A2 (36,3%), A24 (14,3%), A68 (6,9%), A69 (5,8%). Existen alelos que se presentan en una frecuencia menor al 1% (alelos raros), ellos son: A19, A20, A32, A34, A36, A38, A39 y A66. También se observa un 3,6 % de alelos que no pudieron ser determinados sea por tipificación serológica o tipificación molecular (Alelo Blanco).

2. TABLA Nº 2 Frecuencia Alélicas del Locus A del sistema HLA en la población de pacientes mestizos bolivianos

Alelo HLA-A	Frecuencias Alélicas	
	N	(%)
A1	75	4,86
A2	560	36,31
A3	76	4,93
A9	1	0,06
A11	45	2,92
A19	1	0,06
A20	1	0,06
A23	42	2,72
A24	220	14,27
A25	16	1,04
A26	35	2,27
A28	41	2,66
A29	61	3,95
A30	65	4,21
A31	44	2,85
A32	14	0,91
A33	48	3,11
A34	4	0,26
A36	4	0,26
A38	2	0,13
A39	1	0,06
A66	5	0,32
A68	107	6,94
A69	90	5,84
A74	1	0,06
Blancos	57	3,6
TOTAL	1542	100

Al ser los departamentos de La Paz y Cochabamba los que al contar cada uno con el 40% de los pacientes tipificados, se realizó la comparación de la frecuencia del locus A en estas poblaciones. En la población de pacientes del departamento de La Paz se observa 21 alelos diferentes y en la población de pacientes de Cochabamba 25 alelos diferentes. En la tabla 3 se observa también que los alelos A2 y A24 son los alelos más frecuentes en estos aunque la frecuencia en la cual se presenta en cada grupo poblacional varía de una población a otra. Por otra parte, se observa que los tercer, cuarto y quinto alelos más frecuente varían en el tipo y la frecuencia en la que se presentan, a decir: A28 (4,3%) y A1 (6,9%) son el tercer alelo más frecuente en las ciudades de La Paz y Cochabamba respectivamente; A29 (4,1%) y A3 (6,7%) son el cuarto alelo más frecuente en las ciudades de La Paz y Cochabamba respectivamente, similar hallazgo se encontró para el resto de los alelos.

3. TABLA Nº 3. Comparación de las Frecuencias Alélicas del Locus A De Los Pacientes Mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de Cochabamba Y La Paz.

Alelo HLA-A	LA PAZ		Antígeno HLA-A	COCHABAMBA	
	Frecuencias Alélicas N	(%)		Frecuencias Alélicas N	(%)
A*01	18	3.1	A1	45	6,9
A*02	231	40.0	A2	197	30,2
A*03	21	3.6	A3	44	6,7
A 9	0	0.0	A9	1	0,1
A*11	14	2.4	A11	17	2,6
A19	0	0.0	A19	1	0,1
A20	0	0.0	A20	1	0,1
A*23	12	2.1	A23	28	4,3
A*24	97	16.8	A24	83	12,7
A*25	5	0.9	A25	10	1,5
A*26	8	1.4	A26	19	2,9
A*28	25	4.3	A28	5	0,8
A*29	24	4.2	A29	22	3,4
A*30	11	1.9	A30	42	6,4
A*31	12	2.1	A31	10	1,5
A*32	9	1.5	A32	2	0,3
A*33	8	1.4	A33	37	5,7
A*36	5	0.9	A34	3	0,5
A38	0	0.0	A38	2	0,3
A39	0	0.0	A39	1	0,1

A66	0	0.0	A66	4	0,6
A*68	54	9.4	A68	32	4,9
A*69	6	1.0	A69	10	1,5
Blancos	17	2.9	Blancos	36	5,52
TOTAL	577	100	TOTAL	652	100

* Tipificado por Biología Molecular

Para el locus HLA-B se determinó que en la población mixta boliviana se expresan 37 alelos diferentes (tabla 4), los cinco alelos más frecuentemente encontrados fueron: B35 (32,1%), B51 (8,6%), B15 (8,0%), B48 (7,2%), B40 (6,5%), Los alelos raros (frecuencia alélica menor al 1%) fueron: B5, B13, B16, B17, B34, y otros alelos que se muestran en la tabla 4. También se observó un 5 % de alelos blanco HLA-Bx que no pudieron ser determinados sea por tipificación serológica o tipificación molecular (Alelo Blanco).

4. TABLA Nº 4 Frecuencias Alélicas del Locus B del sistema HLA en la población de pacientes mestizos bolivianos

Frecuencias Alélicas		
Alelo HLA-B	N	%
B5	1	0,1
B7	41	2,6
B8	46	2,9
B13	9	0,6
B14	35	2,2
B15	123	8,0
B16	6	0,4
B17	10	0,6
B18	32	2,0
B27	28	1,8
B34	1	0,1
B35	500	32,1
B37	3	0,2
B38	12	0,8
B39	98	6,3
B40	102	6,5
B41	4	0,2
B42	2	0,1
B44	64	4,1
B45	10	0,6
B46	11	0,7
B47	1	0,1

B48	112	7,2
B49	24	1,5
B50	12	0,8
B51	134	8,6
B52	15	1,0
B53	1	0,1
B55	14	0,9
B56	2	0,1
B57	6	0,4
B58	10	0,6
B59	1	0,1
B66	1	0,1
B69	1	0,1
B70	3	0,2
B78	3	0,2
Blancos	78	5,0
TOTAL	1559	100

Al comparar las frecuencias alélicas del locus B en los pacientes paceños y cochabambinos, se observa que en el departamento de La Paz existen 28 alelos diferentes y en la población de pacientes de Cochabamba 35 alelos diferentes. En la tabla 5, se observa también que el alelo B35 es el más frecuente en estos departamentos, aunque la frecuencia en la cual se presenta en cada grupo poblacional varía de una población a otra 39,5% para La Paz y 26,7% para Cochabamba. Por otra parte, se observa que los demás alelos varían en la frecuencia de presentación de un departamento a otro, a decir: B48 (10,2%), B15 (8,7%), B40 (7,4%) y B51 (6,9) son el segundo al cuarto alelo más frecuente en La Paz; B51 (10,3%), B40 (7,7%), B39 (6,9%) y B15 (6,2%), son el segundo al cuarto alelo más frecuente en Cochabamba.

5. TABLA N° 5 Comparación de la frecuencias alélicas del locus B de los pacientes mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de La Paz y Cochabamba

Alelo HLA-B	LA PAZ		COCHABAMBA		
	Frecuencias Alélicas N	(%)	Antígeno HLA-B	Frecuencias Alélicas N	(%)
B5	0	0,0	B5	1	0,1
B*07	9	1,5	B7	15	2,2
B*08	14	2,3	B8	21	3,1
B*13	5	0,8	B13	3	0,4
B*14	12	2,0	B14	19	2,8
B*15	52	8,7	B15	42	6,2
B16	0	0,0	B16	6	0,9
B17	0	0,0	B17	10	1,5
B*18	18	3,0	B18	7	1,0
B*27	7	1,2	B27	12	1,8
B34	0	0,0	B34	1	0,1
B*35	236	39,5	B35	181	26,7
B*37	2	0,3	B37	1	0,1
B*38	5	0,8	B38	5	0,7
B*39	28	4,7	B39	47	6,9
B*40	44	7,4	B40	52	7,7
B*41	4	0,7	B41	0	0,0
B42	0	0,0	B42	2	0,3
B*44	16	2,7	B44	29	4,3
B*45	6	1,0	B45	2	0,3
B*46	2	0,3	B46	6	0,9
B*47	1	0,2	B47	0	0,0
B*48	61	10,2	B48	32	4,7
B*49	10	1,7	B49	9	1,3
B*50	0	0,0	B50	9	1,3

B*51	41	6,9	B51	70	10,3
B*52	7	1,2	B52	6	0,9
B*53	0	0,0	B53	1	0,1
B*55	1	0,2	B55	10	1,5
B*57	2	0,3	B56	1	0,1
B*58	3	0,5	B58	4	0,6
B*59	1	0,2	B66	1	0,1
B*69	1	0,2	B69	1	0,1
B*70	3	0,5	B70	3	0,4
B*78	1	0,2	B78	3	0,4
Blancos	5	0,8	Blancos	66	9,7
TOTAL	597	100	TOTAL	678	100

* Tipificado por Biología Molecular

Para el locus HLA-C se determinó que en la población mixta boliviana se expresan 11 alelos diferentes (tabla 6), los cinco alelos más frecuentemente encontrados fueron: C*04 (37,3), C*03 (13,1%), C*07 (13,9%), C*01 (11,9%) y C*08 (6,8%), Se determinó que C*16 (0,95%) es el que en menor frecuencia se presenta en nuestra población. También se observó un 2,2% de alelos blancos.

6. TABLA Nº 6 Frecuencias Alélicas del Locus C del sistema HLA en la población de pacientes mestizos bolivianos

Alelo HLA-C	Frecuencias Alélicas	
	N	%
C*01	87	11,9
C*02	15	2,0
C*03	96	13,1
C*04	274	37,4
C*05	26	3,5
C*06	37	5,0
C*07	102	13,9
C*08	50	6,8
C*12	10	1,4
C*15	13	1,8
C*16	7	0,9
Blanco	16	2,2
Total	733	100

* Tipificado por Biología Molecular

Al comparar las frecuencias alélicas del locus C entre los pacientes paceños y cochabambinos, se observa que en la población paceña existen 11 alelos diferentes y en la población cochabambina 10 alelos diferentes. En la tabla 7, para ambas poblaciones se observa que del segundo al cuarto alelo más frecuente que caracteriza a cada población varía entre los pobladores de los departamentos, ejemplo C*7, C*3 y C*1 representan del segundo al cuarto alelo más frecuente en La Paz, mientras que C*1, C*7 y C*3 lo son en Cochabamba.

7. TABLA N°7 Comparación de la frecuencias alélicas del locus C de los pacientes mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de La Paz y Cochabamba

Alelo HLA-C	LA PAZ		COCHABAMBA		
	N	%	N	%	
C*01	49	10,6	C*01	12	16,4
C*02	3	0,6	C*02	4	5,5
C*03	51	11,0	C*03	9	12,3
C*04	180	38,9	C*04	23	31,5
C*05	11	2,4	C*05	5	6,8
C*06	23	5,0	C*06	3	4,1
C*07	56	12,1	C*07	11	15,1
C*08	34	7,3	C*08	5	6,8
C*12	7	1,5	C*12	1	1,4
C*15	5	1,1	C*15	1	1,4
C*16	5	1,1	C*16	--	--
Blanco	12	2,6	Blanco	--	--
Total	436	100	Total	73	100

* Tipificado por Biología Molecular

Se determinó que en la población mixta boliviana el locus DR se expresa en 17 alelos diferentes (tabla 8), los cinco alelos más frecuentemente encontrados fueron: DR4 (25,6%), DR8 (16,4%), DR14 (8,2%) y DR9 (10,2%), Los que raramente se pueden encontrar en la población boliviana fueron: DR5, DR6, DR10, DR12. Se observó un 3,4% de alelos blanco para HLA-DR.

8. TABLA Nº 8 Resultado de Frecuencias del HLA-DR de Pacientes Mestizos Bolivianos

Frecuencias Alélicas		
Alelo HLA-DR	N	%
1	105	7,7
2	16	1,2
3	77	5,6
4	349	25,6
5	4	0,3
6	2	0,1
7	73	5,4
8	223	16,4
9	139	10,2
10	12	0,9
11	47	3,4
12	11	0,8
13	60	4,4
14	112	8,2
15	47	3,4
16	36	2,6
34	1	0,1
Blanco	47	3,4
TOTAL	1361	100

En la tabla 9 se observa que para el locus DR, en el departamento de La Paz existen 13 alelos diferentes y en la población de pacientes de Cochabamba 17 alelos diferentes. Por otra parte, se observa que DR4 y DR8 son el primer y segundo alelo más frecuente en La Paz y Cochabamba. Al igual que en los loci arriba mencionados, las poblaciones de La Paz y Cochabamba varía en el tipo y frecuencia en las que se presentan el tercer al cuarto alelo.

9. TABLA Nº 9 Comparación de la frecuencias alélicas del locus DR de los pacientes mestizos de nacionalidad boliviana de los departamentos de La Paz y Cochabamba

Alelo HLA-DR	LA PAZ		Antígeno HLA-DR	COCHABAMBA	
	N	%		N	%
*01	21	4,3	1	73	11,7
2	--	0,0	2	16	2,5
*03	21	4,3	3	45	7,2
*04	130	26,9	4	155	24,8
5	--	0,0	5	4	0,6
6	--	0,0	6	2	0,3
*07	14	2,9	7	43	6,9
*08	106	21,9	8	76	12,2
*09	68	14,1	9	51	8,2
*10	5	1,0	10	2	0,3
*11	16	3,3	11	19	3,0
*12	2	0,4	12	8	1,3
*13	13	2,7	13	35	5,6
*14	53	11,0	14	25	4,0
*15	14	2,9	15	27	4,3
*16	13	2,7	16	4	0,6
34	--	0,0	34	1	0,1
Blanco	7	1,4	Blanco	38	6,1
TOTAL	483	100	TOTAL	624	100

* Tipificado por Biología Molecular

B. RESULTADOS FRECUENCIAS GENOTIPICAS

Los genotipos más frecuentemente encontrados para el locus HLA-A en la población de pacientes mestizos bolivianos fue el genotipo A2,A2 (14,6%); A2, A24 (14,1 %); seguido de A2,A3 (5,7%); A2,A30(5,6%); A2,A29 (4,0%) y A2,A68(4,9%).

1. . TABLA 10. Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A en la población de pacientes mestizos bolivianos

Genotipo HLA-A	Frecuencia Genotípicas	
	N	(%)
A2A2	113	14,65
A2A24	109	14,14
A2A28	24	3,11
A2A1	32	4,15
A2A3	44	5,71
A2A11	14	1,81
A2A29	31	4,02
A2A30	43	5,58
A2A31	18	2,33
A24A31	14	1,81
A24A29	12	1,56
A2A68	38	4,93
A24A68	24	3,11
A24A24	23	2,98
Total	771	

La comparación de los genotipos del locus A entre del departamentos de La Paz y Cochabamba muestra que las frecuencias del departamentos de La Paz son A2,A2 (34,3%); A2,A24 (26,3%); A2,A68 (11,4%) y A2,A28(8,3%). En el departamento de Cochabamba se determinó que los genotipos más frecuentes son A2,A2 (4,3%); A2,A24 (10,1%); A2,A3 (8,9%) y A2,A1 (5,5%).

2. TABLA Nº 11 . Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A de las Ciudades de La Paz y Cochabamba

Genotipo	LA PAZ		Genotipo	COCHABAMBA	
	N	%		N	%
A*02,A*02	99	34,3	A2,A2	14	4,3
A*02,A*24	76	26,3	A2,A24	33	10,1
A*02,A*28	24	8,3	A2,A28	0	0,0
A*02,A*01	14	4,8	A2,A1	18	5,5
A*02,A*03	15	5,2	A2,A3	29	8,9
A*02,A*11	11	3,8	A2,A11	3	0,9
A*02,A*29	16	5,5	A2,A29	15	4,6
A*02,A*30	19	6,6	A2,A30	24	7,4
A*02,A*31	12	4,1	A2,A31	6	1,8
A*24,A*31	12	4,1	A24,A31	2	0,6
A*24,A*29	10	3,5	A24,A29	2	0,6
A*02,A*68	33	11,4	A2,A68	5	1,5
A*24,A*68	18	6,2	A24,A68	6	1,8
A*24,A*24	17	5,9	A24,A24	6	1,8
Total	289			326	

*Tipificado por Biología Molecular

Los genotipos más frecuentemente encontrados para el locus HLA-B en la población de pacientes mestizos bolivianos fue el genotipo B35,B35(16,8%), seguido de B35,B51 (7,3 %); B35,B15(7,2%); B35,B40(6,4%) y B35,B48(5,5%) .

3. TABLA. 12 Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus B en la población de pacientes mestizos bolivianos

Genotipo HLA-B	Frecuencia Genotípicas	
	N	(%)
B35,B35	131	16,79
B48,B48	8	1,03
B15,B15	11	1,41
B07,B35	12	1,54
B14,B35	16	2,05
B48,B15	10	1,28
B35,B15	56	7,18
B35,B48	43	5,51
B35,B51	57	7,31
B35,B39	37	4,74
B35,B40	49	6,28
B35,B44	15	1,92
B15,B39	7	0,90
B18,B35	7	0,90
B18,B44	5	0,64
B51,B48	5	0,64
B48,B40	7	0,90
B51,B40	7	0,90
Total	780	

La comparación de los genotipos del locus B entre del departamentos de La Paz y Cochabamba, muestra que las frecuencias del departamentos de La Paz B*35,B*35 (29,8%); B*35,B*48(14,0%); B*35,B*51 (11,7%) y B*35,B*39(6,7%). En el departamento de Cochabamba se determinó que los genotipos más frecuentes son B35,B35 (12,4%); B35,B15(8,3%); B35,B51 (6,5%) y B35,B39(5,0%).

4. TABLA Nº 13 . Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A de las Ciudades de La Paz y Cochabamba

Genotipo	LA PAZ		COCHABAMBA		
	N	%	N	%	
B*35,B*35	89	29,77	B35,B35	42	12,39
B*48,B*48	7	2,34	B48,B48	1	0,29
B*15,B*15	5	1,67	B15,B15	6	1,77
B*07,B*35	6	2,01	B07,B35	6	1,77
B*14,B*35	8	2,68	B14,B35	8	2,36
B*48,B*15	9	3,01	B48,B15	1	0,29
B*35,B*15	28	9,36	B35,B15	28	8,26
B*35,B*48	42	14,05	B35,B48	1	0,29
B*35,B*51	35	11,71	B35,B51	22	6,49
B*35,B*39	20	6,69	B35,B39	17	5,01
B*35,B*40	31	10,37	B35,B40	18	5,31
B*35,B*44	14	4,68	B35,B44	1	0,29
B*15,B*39	6	2,01	B15,B39	1	0,29
B*18,B*35	7	2,34	B18,B35	0	0,00
B*18,B*44	5	1,67	B18,B44	1	0,29
B*51,B*48	5	1,67	B51,B48	0	0,00
B*48,B*40	0	0,00	B48,B40	7	2,06
B*51,B*40	0	0,00	B51,B40	7	2,06
Total	299		Total	339	

*Tipificado por Biología Molecular

Los genotipos más frecuentemente encontrados para el locus HLA-C en la población de pacientes mestizos bolivianos fue el genotipo C*04C*04(22,3%), seguido de C*03C*04 (13,6 %); C*04C*07(12,8%); C*01C*04(9,5%) y C*04C*08(6,5%).

5. TABLA. 14 **Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus C en la población de pacientes mestizos bolivianos**

Genotipo HLA-C	Frecuencias Genotípicas	
	N	(%)
C*01,C*01	13	3,54
C*04,C*04	82	22,34
C*15,C*15	13	3,54
C*07,C*07	21	5,72
C*01,C*03	17	4,63
C*03,C*04	50	13,62
C*04,C*06	22	5,99
C*07,C*03	13	3,54
C*04,C*07	47	12,81
C*01,C*04	35	9,54
C*04,C*08	24	6,54
C*04,C*15	6	1,63
C*04,C*16	4	1,09
Total	367	

* Tipificado por Biología Molecular

La comparación de los genotipos del locus C entre del departamentos de La Paz y Cochabamba muestra que las frecuencias del departamentos de La Paz son C*04,C*04 (35,3%); C*03,C*04(20,6%); C*04,C*07 (19,7%) y C*01C*04(14,2%). En el departamento de Cochabamba se determinó que los genotipos más frecuentes son C*04,C*04; C*03,C*04; con el (13,5%),y C*04,C*07; C*01,C*04 con (10,8%).

6. TABLA N° 15. **Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus C de las Ciudades de La Paz y Cochabamba**

Genotipo	LA PAZ		COCHABAMBA	
	N	(%)	N	(%)
C*01,C*01	13	5,96	2	5,41
C*04,C*04	77	35,32	5	13,51
C*15,C*15	13	5,96	0	0
C*07,C*07	16	7,34	5	13,51
C*01,C*03	16	7,34	1	2,70
C*03,C*04	45	20,64	5	13,51
C*04,C*06	21	9,63	1	2,70
C*07,C*03	13	5,96	0	0,00
C*04,C*07	43	19,72	4	10,81
C*01,C*04	31	14,22	4	10,81
C*04,C*08	22	10,09	2	5,41
C*04,C*15	6	2,75	0	0
C*04,C*16	4	1,83	0	0
Total	218		37	

*Tipificado por Biología Molecular

Los genotipos más frecuentemente encontrados para el locus HLA-DR en la población de pacientes mestizos bolivianos fue el genotipo DR4,DR8(11,1%), seguido de DR4,DR4 (9,3%), DR8,DR8; DR4,DR7; DR9,DR4 y DR4,DR14 con (4,7%) .

7. TABLA N° 16 . **Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus DR en la población de pacientes mestizos bolivianos**

Genotipo HLA-DR	Frecuencias Genotípicas	
	N	(%)
DR4,DR4	62	9,10
DR8,DR8	32	4,70
DR1,DR4	28	4,11
DR4,DR7	32	4,70
DR4,DR8	76	11,16
DR7,DR8	8	1,17
DR8,DR9	27	3,96
DR9,DR4	32	4,70
DR4,DR13	18	2,64
DR4,DR14	32	4,70
DR9,DR14	22	3,23
DR4,DR16	10	1,47
DR14,DR13	14	2,06
Total	681	

La comparación de los genotipos del locus DR entre del departamentos de La Paz y Cochabamba muestra que en La Paz los genotipos DR*04,DR*04 (36,9%); DR*08,DR*09(17,4%); DR*09,DR*04 (14,5%) y DR*04,DR*14(12,8%). En el departamento de Cochabamba se determinó que los genotipos más frecuentes son DR4,DR4 (13,5%); DR7,DR8 (8,9%); DR9,DR4 (7,0%) .

8. TABLA N° 17. Resultados de Frecuencias Genotípicas del Locus A de las Ciudades de La Paz y Cochabamba

Genotipo	LA PAZ		COCHABAMBA		
	N	(%)	Genotipo	N	(%)
DR*04,DR*04	89	36,93	DR4,DR4	42	13,46
DR*08,DR*08	7	2,90	DR8,DR8	1	0,32
DR*14,DR*14	5	2,07	DR14,DR14	6	1,92
DR*01,DR*04	6	2,49	DR1,DR4	6	1,92
DR*04,DR*07	8	3,32	DR4,DR7	8	2,56
DR*04,DR*08	9	3,73	DR4,DR8	1	0,32
DR*07,DR*08	28	11,62	DR7,DR8	28	8,97
DR*08,DR*09	42	17,43	DR8,DR9	1	0,32
DR*09,DR*04	35	14,52	DR9,DR4	22	7,05
DR*04,DR*13	20	8,30	DR4,DR13	17	5,45
DR*04,DR*14	31	12,86	DR4,DR14	18	5,77
DR*09,DR*14	14	5,81	DR9,DR14	1	0,32
DR*04,DR*16	6	2,49	DR4,DR16	1	0,32
DR*14,DR*13	7	2,90	DR14,DR13	0	0,00
Total	241			312	

*Tipificado por Biología Molecular

La comparación de los Haplotipos entre del departamentos de La Paz y Cochabamba muestra que en La Paz los genotipos frecuentes son A*02,B*35,DR*04 (15,9%); A*24,B*35,DR*04 (3,6%); y A*02,B*15,DR*04 (2,7%) y en Cochabamba. A2, B35, DR4 (17,9%); A2, B35, DR1 (2,7%) y A24, B35, DR4 (2,5%),

9. TABLA N° 18. **Resultados de Frecuencias de Haplotipos de los locus A,B,DR, de las Ciudades de La Paz y Cochabamba**

Haplotipo	LA PAZ		COCHABAMBA		
	N	%	Haplotipo	N	%
A*02,B*15,DR*04	10	2,75	A2B51DR4	8	2,20
A*02,B*35,DR*04	58	15,93	A2B35DR4	65	17,91
A*24,B*35,DR*04	13	3,57	A24B35DR4	6	1,65
A*29,B*35,DR*04	4	1,10	A2B48DR1	3	0,83
A*02,B*15,DR*08	7	1,92	A24B35DR4	9	2,48
A*02,B*35,DR*09	6	1,65	A2B35DR1	10	2,75
A*02,B*35,DR*08	9	2,47	A2B35DR8	4	1,10
A*68,B*35,DR*09	6	1,65	A68B35DR4	5	1,38
A*02,B*35,DR*08	9	2,47	A2B35DR2	3	0,83
A*24,B*35,DR*08	4	1,10	A24B35DR8	4	1,10
Total	364			363	

* Tipificado por Biología Molecular

VIII. DISCUSIONES

El elevado polimorfismo del sistema genético HLA en humanos provee al sistema inmune de una poderosa herramienta para reconocer la amplia variedad de antígenos de microorganismos, células propias y sustancias potencialmente patógenas. Este polimorfismo también es útil para caracterizar desde el punto de vista genético a las poblaciones humanas; debido a que un alelo de un locus en particular puede ser característico de un grupo racial y la frecuencia en la que este alelo se presenta entre grupos humanos de un mismo grupo racial puede variar de una población a otra. (Tellez y Col. 1998)

El presente estudio se realizó a partir de los 909 resultados de tipificación HLA de la población de pacientes mestizos bolivianos tipificados en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés y los pacientes mestizos oriundos del departamento de Cochabamba tipificados en el unidad de Histocompatibilidad e Inmunogenética del laboratorios Diana de la ciudad de Cochabamba.

Un hallazgo relevante obtenido de los datos estadísticos del estudio, es haber determinado que la población cochabambina se caracteriza por tener mayor polimorfismo alélico con relación a la población paceña, esto se evidencia por el hecho que para los loci HLA A, B, C y DR la población paceña presentó 21(HLA*A), 28(HLA*B), 11(HLA*C), 13(HLA*DR) alelos diferentes, mientras que la población cochabambina presentó 25(HLA-A), 35(HLA-B), 10(HLA-C), 17(HLA-DR) alelos diferentes. Esta diferencia se podría deber a que la población paceña ha sido tipificada utilizando un método molecular y la cochabambina ha sido tipificada mediante un método serológico. Si bien, para uniformar los resultados las tipificaciones serológicas fueron convertidas a su equivalente molecular, en algunos casos, este el antígeno

serológico no pudo ser convertido debido a que un determinado antígeno HLA podía corresponder a más de un alelo HLA. Como ejemplo, el antígeno DR2 definido serológicamente puede corresponder a los alelos DRB1*15 o DRB1*16, por lo cual para fines del estudio se lo consideró simplemente como DR2 (Sosa, 2007), contribuyendo de esta manera en el grado de polimorfismo de la población estudiada. Otro aspecto que no debe descartarse es que cada departamento, por las condiciones medioambientales, turísticas, y socioeconómicas que los caracteriza favorecen un flujo migracional en particular, sea de pobladores de otros departamentos o de extranjeros lo cual contribuye a la expresión de determinados alelos HLA (Mamani, 2012).

Rodríguez LM y cols., hace mención a que estos alelos son los más frecuentes y los que caracterizan a las poblaciones humanas de origen latino. Hecho que queda confirmado con los hallazgos del presente estudio.

Interesantemente, a partir de los datos del estudio, se ha evidenciado que en la población boliviana en general, para cada uno de los loci genéticos estudiados existe un gran número de alelos que no han sido identificados siendo reportados con una “x”. Un ejemplo claro para los loci: HLA-Ax (3,6%), HLA-Bx (5,0%), HLA-Cx (2,18%) HLA-DRx (3,45%) y HLA DQx (9,73%). Los alelos blanco pueden deberse a homocigosis alélica, heterocigosis a nivel de alelo, a alelos nuevos característicos de la población boliviana o simplemente a falta de especificidad de los reactivos comerciales utilizados para realizar las tipificaciones HLA. Se deben realizar estudios poblacionales diseñados para dar respuestas a estas interrogantes que a su vez utilicen reactivos de mayor poder de resolución como ser los basados en secuenciación. No se debe dejar de lado que, la población boliviana se caracteriza por poseer 36 naciones indígenas originarias que podrían aportar alelos HLA aún no definidos en la bases de datos internacionales, por lo cual, no se cuenta con reactivos con especificidad necesaria para su identificación. Considerando que las tipificaciones realizadas en el departamento de La Paz fueron realizadas mayoritariamente por métodos moleculares y las realizadas en Cochabamba mayoritariamente por métodos serológicos, se observó que en el departamento de la paz existieron menor cantidad de alelos blanco reportados [(Locus A 2.9% (La Paz), 5.5

(Cochabamba); locus B 0.8% (La Paz), 9.7% (Cochabamba); locus DR 1.4% (La Paz), 6,1% (Cochabamba). La tendencia emitir más tipificaciones indeterminadas (blancos) por las tipificaciones serológicas con respecto a las tipificaciones moleculares ha sido documentada por varios investigadores tal como J tan y col. 2003. Indica que si bien las tipificaciones serológicas fueron rápidas y sencillas, mostró que para el antígeno HLA-A que constaba de 21 variantes antigénicas, se produjo un 9 % de asignaciones erróneas y se asignó 26 antígenos blancos (HLA-Ax), para el antígeno HLA-B de 39 antígenos evaluados el 12,2 % fueron interpretados erróneamente, además se reportó 35 antígenos blanco (HLA-Bx), los antígenos en los cuales hubo divergencia fueron tipificados nuevamente por PCR-SSP, demostrando ser esta técnica más precisa, fiable y reproducible..

Se observó que la población boliviana en general para el locus HLA-A tiene como alelos más frecuentes a: A2 (36,31%), A24 (14,27%). Estos datos reafirman los hallazgos del estudio Cruz A, en el 2011 quien determinó que los alelos más frecuentes de la población mixta boliviana eran A2 (33,9%), A24 (14,4%). El tamaño muestral de Cruz A., era menor. El presente estudio ha incluido 363 datos de tipificaciones de pacientes cochabambinos lo cual para algunos alelos (ver tabla N°1) ha afectado significativamente las frecuencias alélicas.

Al comparar las frecuencias alélicas del locus A entre las poblaciones de La Paz y Cochabamba, se observó que la población cochabambina es más polimórfica a nivel de los alelos del locus A ya que presentó 4 alelos más que la población paceña (tabla 3). También, que los alelos A2 y A24 son los alelos más frecuentes en ambas poblaciones aunque la frecuencia en la cual se expresan estos varía de una población a otra. Por los datos obtenidos se establece que la población paceña y cochabambina se diferencian en el tipo de alelo y frecuencia del mismo a partir del tercer alelo más frecuente de cada población como ejemplo A28 (4,3%) y A1 (6,9%) son el tercer alelo más frecuente en las ciudades de La Paz y Cochabamba respectivamente. Estas diferencias pueden deberse al flujo migracional que caracteriza a cada departamento, a genes propios de cada población o a procesos de selección mediados por los patógenos propios del área

geográfica (Elergonismo.2012) de los departamentos en estudio. Para confirmar o descartar estas interrogantes se debe realizar un estudio con un mayor número poblacional que además utilice un método de tipificación de mayor resolución.

Con respecto del locus HLA-B se observó la población boliviana en general para el locus HLA-B tiene como alelos más frecuentes a B35 (32,1%), B51 (8,6%), B15 (8,0%), B48 (7,2%), B40 (6,5%). Estos resultados difieren con las frecuentes recientemente reportadas para la población boliviana por Cruz A, en el 2011 quien determinó que los alelos más frecuentes de la población mixta boliviana eran B*35 (30,9%), B*48 (8,2%), B*15 (8,0%), B*51 (7,2%). En presente estudio incluye 363 pacientes de la ciudad de Cochabamba, el estudio de Cruz incluía solo 56 pacientes cochabambinos, esta diferencia explica la variación en las frecuencias de alelos reportadas, siendo estos datos más representativos de la población cochabambina y muestra de mejor manera el polimorfismo genético de la población boliviana.

Al comparar las frecuencias alélicas del locus B entre las poblaciones de La Paz y Cochabamba se observó que la población cochabambina es más polimórfica a nivel de los alelos del locus B ya que presentó 7 locus más que la población paceña (tabla 5). También, que el alelo B35 es el más frecuente en ambas poblaciones aunque la frecuencia en la cual se expresan estos varía de una población a otra. Por los datos obtenidos se establece que la población paceña y cochabambina se diferencian en el tipo de alelo y frecuencia del mismo a partir del segundo alelo más frecuente de cada población como ejemplo B48 (10,2%), B15 (8,7%), B40 (7,4%) y B51 (6,9%) son el segundo al cuarto alelo más frecuente en LP; B51 (10,3%), B40 (7,7%), B39 (6,9%) y B15 (6,2%), son el segundo al cuarto alelo más frecuente en Cochabamba. Para confirmar o descartar estas interrogantes se debe realizar un estudio con un mayor número poblacional que además utilice un método de tipificación de mayor resolución.

Para el locus HLA-C se determinó que en la población boliviana en general presentó como alelos más frecuente a C*04 (37,4), C*03 (13,1%), C*07 (13,9%), C*01 (11,9%) y C*08 (6,8%). Una vez comparadas las frecuencias alélicas del locus C entre las

poblaciones de La Paz y Cochabamba se observó que la población paceña y cochabambina se diferencian en el tipo de alelo y frecuencia del mismo, esta diferencia se establece a partir del segundo alelo más frecuente, para La Paz en orden de importancia son más frecuentes C*7, C*3 y C*1), mientras que para Cochabamba lo son C*1, C*7 y C*3.

En población mestiza boliviana, el locus HLA-DR muestra como alelos más frecuentes a DR4 (25,6%), DR8 (16,4%), DR14 (8,2%) y DR9 (10,2%). La comparación de las frecuencias del locus DR a nivel de La Paz y Cochabamba muestra que estas poblaciones se diferencian a partir del tercer alelo en adelante tanto en el tipo como en la frecuencia (tabla 9). Al ser este hallazgo similar a los otros loci HLA antes analizados se puede afirmar que estas poblaciones tienen alelos que se expresan uno más frecuentes que otros lo cual permite diferenciarlas desde el punto de vista genético. Si bien, A2, B35, C4 y DR4 muestran ser los alelos más frecuentes en estas poblaciones, no se descarta la posibilidad de que ambas poblaciones se diferencien a nivel de la variante alélica, esta última afirmación se la realiza considerando que el departamento de La Paz se caracteriza por tener población mayoritariamente de origen Aimara y el departamento de Cochabamba por tener población mayoritaria de origen Quechua (Bolivia.com).

Mediante el análisis de los genotipos más frecuentes de la población boliviana se determinó que los genotipos A2,A2; A2,A24; A2,A3 lo son para el locus HLA-A, para el locus HLA-B B35,B35; B35,B51; B35,B15, para el locus HLA-C C*04,C*04; C*03,C*04; C*04,C*07 y para el locus HLA-DR DR4,DR8; DR4,DR4; DR8,DR8; Estos datos difieren a los reportados por de Cruz A. en el 2011 quien determinó que las frecuencias genotípicas de la población mixta boliviana eran para el locus HLA-A A*02,A*02; A*02,A*24; A*02,A*68. Para el locus HLA-B: B*35,B*35; B*35,B*48; B*35,B*51; para el locus HLA-C: C*04,C*04; C*03,C*04; C*04,C*07 y para el locus HLA-DR: DR*04,DR*08; DR*04,DR*04; DR*04,DR*14. Estas diferencias se deben principalmente al aporte que han significados los resultados de las tipificaciones HLA reportadas por el laboratorio Diana de Cochabamba. Lo cual, demuestra una vez más, la

importancia de realizar un estudio multicéntrico en el cual se recolecten los resultados de tipificación HLA de todos los laboratorios o unidades de Histocompatibilidad e Inmunogenética del estado plurinacional y se construya una base de datos que permita con mayor significancia estadística conocer las frecuencias alélicas genéticas y haplotípicas de la población mixta boliviana.

La comparación de las frecuencias genotípicas permitió evidenciar que en el locus HLA-A La Paz y Cochabamba se diferencian a nivel de sus haplotipos y en la frecuencia en los que estos se presentan (tabla 12). En La Paz A2,A2 y A2,A24 son los más frecuentes en Cochabamba son A2,A24 y A2,A3. Este fenómeno se observa en los genotipos restantes. Al comparar las frecuencias genotípicas del locus HLA-B, se observó que el genotipo B35, B35; es el más frecuente en ambas poblaciones aunque la frecuencia en la cual se expresan estos varía de una población a otra. Recién a partir del segundo alelo más frecuente estas poblaciones se diferencian, ejemplo B*35,B*48; B*35,B*51 y B*35,B*39 son el segundo al cuarto genotipo más frecuente en La Paz; B35,B15; B35,B51 y B35,B39; estos son el segundo al cuarto mas frecuente en Cochabamba. Para el locus HLA-C no se puede hacer una diferenciación precisa para la posterior comparación de las frecuencias haplotípicas entre ambas poblaciones, esto se debe a que solo se tienen 37 resultados de tipificaciones HLA-C mientras que para La Paz se tienen 218 tipificaciones, aunque se observó que ambas las poblaciones comparten los mismos genotipos (C*04,C*04; C*03,C*04; C*04,C*07; C*01,C*04) pero, la frecuencia en la cual se expresan estos varía de una población a otra. En cuanto al locus DR, se observó que el genotipo más frecuente en ambos departamentos es DR4,DR4. Con todos estos resultados, se establece que la población paceña y cochabambina se diferencia en el tipo de genotipo y frecuencia del mismo principalmente a partir del segundo genotipo más frecuente de cada población. Desde el punto de vista de trasplante de órganos, esto sería una ventaja para aquellos receptores de órganos que no son propios de la población donde viven, que al tener un alelo o genotipo de alta frecuencia les facilitaría el conseguir un donante de órganos con uno o dos alelos compatibles para un determinado locus del sistema HLA. Lo cual a su

vez repercutiría en la sobrevida del injerto si es que se da el trasplante de órgano.
(Fulgencio Maria.2011)

Al estimar las frecuencias haplotípicas de la población boliviana, se pudo observar que tanto en la población paceña y cochabambina existe una mayor frecuencia del haplotipo A2, B35, DR4 aunque al igual que los casos anteriores frecuencia en la cual se presenta en cada grupo poblacionales varia de una población a otra. En el caso particular que nos concierne el conocimiento de la frecuencia en la cual puede presentarse un haplotipo determinado podría permitirnos conocer la probabilidad que tiene un receptor de medula ósea o un receptor de trasplante sensibilizado contra moléculas HLA de que consiga un donante compatible o un donante que no posea los alelos HLA contra los cuales está sensibilizado.

IX. CONCLUSION

Se determinó los polimorfismos alélicos, genotípicos y haplotípicos de los loci HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DR, en la población de pacientes mestizos bolivianos tipificados en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés de la ciudad de La Paz y los pacientes mestizos oriundos del departamento de Cochabamba tipificados en el unidad de Histocompatibilidad e Inmunogenética del laboratorio Diana de la ciudad de Cochabamba. A partir de los resultados obtenidos del estudio se concluye que:

- Los alelos A*02, B*35, C*04 y DR*04, son los más frecuentes tanto en la población paceña como en la cochabambina. Los genotipos más frecuente en la ciudad de La Paz son A2, A2; B35, B35; C*04, C*04; DR4, DR4 y de la ciudad de Cochabamba son A2A24; B35, B35; C*04, C*04; C*03, C*04; DR4, DR8. Se determinó que el haplotipo más frecuente tanto de la población paceña y cochabambina en general es A*2, B*35, DR*4, siendo este un haplotipo propio de población latina.
- En la población mestiza boliviana se determinó que A2 (36,3%), B35 (32,1%), C4 (37,4%) y DR4 (25,6%) son los alelos más frecuentes, A2,A2 (14,6%); A2, A24 (14,1 %); B35,B35(16,8%); B35,B51 (7,3 %); C*04,C*04(22,3%); DR4,DR8(11,1%); DR4,DR4 (9,3 %) son los genotipos más frecuentes.
- Las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas de los loci A,B,C,DR de la población mestiza boliviana del departamento de La Paz son: A*02 (40.0%), B*35 (39,5%), C*04 (38,8%), DR*04 (26,9%); A*02A*02 (34,3%), B*35B*35 (29,7%), C*04C*04 (35,3%), DR*04DR*04 (36.9%); A*02B*35DR*04 (15,9%).
- Las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas de los loci A,B,C,DR de la población mestiza boliviana del departamento de Cochabamba son: A2(30.2%),

B35(26.7%), C*04(31.5%), DR4(24,8%); A2A24(10.1%), B35B35(12.4%), C*04C*04(13.5%), DR4DR4(13.5%); A2B35DR4(17.9%).

- Las población de pacientes estudiada del departamento de La Paz y Cochabamba si bien comparten como alelos más frecuentes a A2, A24; B35, B51; C*04, DR4, DR8, la frecuencia en la que estos se presentan en cada población varía. También se determinó que a partir del tercer alelo más frecuentes en estas poblaciones se diferencian tanto en el alelo como en la frecuencia en la cual se presenta. Este aspecto también se ha observado al analizar las frecuencias genotípicas y haplotípicas

X. RECOMENDACIÓN

A partir de este estudio se debe impulsar la realización un estudio multicéntrico en nuestra población que permitan una mejor caracterización las frecuencias del sistema HLA de la población mestiza boliviana y que a su vez tome en cuenta cual es el aporte que hacer los alelos provenientes de las naciones indígenas originarias que habitan en cada departamento. Además estos estudios deben realizarse por métodos de alta resolución permitiendo así caracterizar alelos blanco o alelos nóveles propios de nuestra población.

Una vez conocidas las frecuencias alélicas del sistema HLA en nuestra población deben realizarse estudios de asociación HLA-enfermedad que nos ayuden a predecir o descartar la posibilidad de afectación con enfermedades infecciosas endémicas de una determinada área geográfica en casos de colonización de territorios vírgenes, susceptibilidad a cáncer, enfermedades autoinmune entre otras.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Roit I, Brostoff J, Male D.; Inmunología 10 ma ed. 2010
2. Rodríguez LM, Giraldo MC, García N, et al.; Frecuencia alélicas, genotípicas y haplotípicas. *Biomédica*; 27:537-47 2007
3. Bravo,C. Genes que determinan el rechazo o éxito del trasplante,2005.
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lis/bravo_a_gd/capitulo1.pdf
4. De leo Cervantes, Claudia. Prueba de Histocompatibilidad en el Trasplante Renal. Mexico, 2005. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762005000200006&script=sci_arttext
5. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. 2012.
http://es.wikipedia.org/wiki/Complejo_mayor_de_histocompatibilidad
6. R.Solana, N.Fernandez, R. Gonzales, M. Jose Garcia, J. Peña. Moléculas de Histocompatibilidad. 2005. <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema05/etexto05.htm>
7. Abbas, AK. Lichtman A.; *Cellular and Immunology. Philadelphia PA: 5 ed.* Editorial Saunders 2002.
8. Anaya JM, Shoenfeld Y, Correa P, García-Carrasco M, Cervera R.; Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune: 1era edición 2005
9. Desequilibrio y Equilibrio de Ligamiento.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g-poblaciones/clases/pdf/s/ligamiento.pdf
10. Rodriguez, Martha . HLA y Enfermedad. 2005.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/ims051w.pdf>
11. Rojas William, Inmunología. Colombia. 13 Ed. Pg 122-123
12. Venegas,Evaristo. Venegas, L. FRECUENCIA DE ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN PABLACION DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CRONICA Y DIABETES MELLITUS TIPO II . WorkShop 1-2 Sept,2011 pg 31
13. Fernando Sosa , Sanchez L,Maldonado A, FRECUENCIAS ALELICAS DEL SISTEMA HLA EN LA POBLACION DE PACIENTES ATENDIDOS EN EL LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INMUNOGENETICA DEL INSTITUTO DE SELADIS-FCFB-UMSA. I Encuentro de Investigacion, UMSA-2007,Memoria DIPGIS, pg 125-127
14. Humberto Ossa, Andrea Manrique, Sonia Quintanilla, Alejandro Peña. POLIMORFISMO DEL HLA (LOCI A*,B*, y DRB1* EN POBLACION DE COLOMBIA. 2007.
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA7_25_30.pdf

15. Villalobos, Maria del Carmen. FRECUENCIAS ALELICAS DE TRES MARCADORES GENETICOS POLIMORFICOS EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION DEL NORESTE DE MEXICO. Tesis de Maestria.1999
<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080095014/1080095014.PDF>
16. Cervantes Jorge. DIFERENCIAS GENETICAS ENTRE POBLACIONES MESTIZAS DE BOLIVIA Y PERU
<http://www.ifeanet.org/publicaciones/boletines/32%281%29/213.pdf>
17. *Gustavo Piccinell; Crai Sur. INMUNOLOGIA DEL TRANSPLANTE.*
<http://www.cucaiba.gba.gov.ar/Inmunologia%20del%20trasplante.htm>
18. Eduardo Porter Cano. INSUFICIENCIA RENAL CRONICA. COMPLICACIONES CRONICAS. 2003.
<http://www.reeme.arizona.edu/materials/Insuficiencia%20Renal%20Cronica-Complicaciones%20Aguda.pdf>
19. Cruz, Ana. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO ALÉLICO, GENOTÍPICO, HAPLOTÍPICO DE LOS ANTÍGENOS HLA CLASE I (HLA-A, HLA-B Y HLA-C) Y CLASE II (HLA-DR), EN LA POBLACIÓN DE DONANTES Y RECEPTORES DE ÓRGANOS, ATENDIDOS EN EL LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD. 2011
20. Garavito Gloria.. LOCALIZACION DE LOS GENES HLA . ASOCIACION HLA Y ARTRITIS REUMATOIDEA JUVENIL. Klein J. Sato A. The HLA system. First of two parts. N Eng J Med 2000;343:702'9
21. Brandan. Nora. Aquino. Jose. Fortuni. Lisandro. LA COMPLEJIDAD DEL MHC. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>
22. Peña Martinez Jose. LA MOLECULA HLA. 2011
http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=67%3Ahistocompatibilidad&catid=40%3Ahistocompatibilidad&Itemid=126&limitstart=5
23. Penacino. Gustavo. INVESTIGACION E IMPLEMENTACIÓN DE SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, CON ESPECIAL REFERENCIA A LOS ESTUDIOS POST-MORTEM. <http://www.wwiecorp.com/tesis.html>
24. Perez de Castro. Ignacio. HERRAMIENTOS GENÉTICO-MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES.
http://www.psiquiatria.com/congreso_old/mesas/mesa23/conferencias/23_ci_a.htm
25. One Lambda. ADVANCIG TRANSPLANT DIAGNOSTIC.
<http://www.onelambda.com/group.aspx?c1=serology&c2=terasaki-hla-tissue-typing-trays&c3=1&c4=1>
26. Instituto Nacional Del Cancer. EE. UU. ENTENDIDO AL CANCER Y TEMAS RELACIONADOS.

<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/entendiendo/trasplante-celulas-madre/AllPages>

27. HLA nomenclature. [Nomenclatura@hla.alleles.org](http://www.hla.nimr.nih.gov/nomenclature/)
28. Tellez Pericon M. Sanchez G. Teran M. Chavez R, Badani H. Duchén C, Carvajal R. FRECUENCIA DE ESPECIFICIDADES SEROLÓGICAS HLA EN POBLACIÓN BOLIVIANA. 1998.
<http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa98060605.pdf>
29. Mamani, Julio. VIVA MI PATRIA BOLIVIA. 2010.
<http://luzfanny2010.blogspot.com/2010/11/36-etnias-de-bolivia.html>
30. Arrazola. Maria. TIPIFICACION DE LOS ALELOS HLA I Y II. 2005.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/ims051x.pdf>
31. Rosello Lissette, Cordova Suset, LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS Y MOLECULARES EN LA TIPIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS LEUCOCITOS HUMANOS. 2004.
<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/576/57629404.pdf>
32. Elergonismo. INMUNIDAD FRENTE A MICROORGANISMOS.
<http://www.elergonomista.com/patologia/in.html>
33. Geografía Humana. <http://www.bolivia.com/geografiadebolivia/cap3.htm>
34. Mehrnaz Narouei-Nejad y Col. POLYMERASE CHAIN REACTION-SEQUENCESPECIFIC PRIMER (PCR-SSP) VERSUS SEROLOGY IN TYPING OF HLA-A, -B AND -C IN IRANIAN PATIENTS.(2003).
<http://www.ams.ac.ir/AIM/0261/0261023.pdf>
35. Fulgencio Guzman Maria. TRANSPLANTE Y RECHAZO.
<http://epidemiologiamolecular.com/trasplante-rechazo/>
36. Tan J. Tang X, Xie T. COMPARISON OF HLA CLASS I TYPING BY SEROLOGY WITH DNA TYPING PCR-SSP.
http://www.researchgate.net/publication/11559701_Comparison_of_HLA_class_I_typing_by_serology_with_DNA_typing
37. Bonet R. Lizett. Martínez C. Zuzet. LOS METODOS SEROLOGICOS Y MOLECULARES EN LA TIPIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE LEUCOCITOS HUMANOS. 2004.
<http://www.redalyc.org/redalyc/pdf/576/57629404.pdf>

