

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO SELADIS**



Determinación de las frecuencias alélicas de los Loci HLA-DRB1* y DQB1* en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante las gestiones 2000 a 2005.

ELABORADO POR:

UNIV. AMERICO JULIO MALDONADO ALANOCA

TRABAJO DIRIJIDO PARA OPTAR AL TITULO LICENCIADO EN BIQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA

2007

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO SELADIS**



Determinación de las frecuencias alélicas de los Loci HLA-DRB1* y DQB1* en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante las gestiones 2000 a 2005.

ELABORADO POR:

UNIV. AMERICO JULIO MALDONADO ALANOCA

TUTOR INSTITUCIONAL:

DR. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA

TUTOR FACULTATIVO:

DRA. GIOVANNA DORIGO VARGAS

TRABAJO DIRIJIDO PARA OPTAR AL TITULO LICENCIADO EN BIQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA

2007

DEDICATORIA

A la memoria de mi recordada e inolvidable querida madre Yolanda Alanoca Solares que se alejo de este mundo y de mi vida cotidiana y siempre estará en mi corazón.

A mis hermanos: Eric, Edda y Lizette que me ayudaron durante los momentos difíciles.

A mi hija: Alejandra la luz de mi vida, que me dio las fuerzas, esperanzas e ilusión de seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Al Señor Nuestro Dios por haberme dado salud, bienestar y una razón de vivir para llegar a cumplir la meta establecida.

A mi asesor: Dr. Fernando Sosa Tordoya quien me brindo su amistad, su colaboración y sus conocimientos.

A la Dra. Giovanna Dorigo Vargas por compartir sus conocimientos y su ayuda incondicional durante mi formación en la casa de estudios.

A la Dra. Magali Paz quien me brindo su amistad y su colaboración durante los momentos difíciles.

A mis amigos: Marisol, Ximena, Vanessa, Chiara, Gianina y Eberth por sus conocimientos y valiosas experiencias durante esos años de formación, un sincero agradecimiento a mis catedráticos y ayudantes.

A mis compañeros de cursos quienes siempre me brindaron su amistad incondicionalmente.

Al personal de SELADIS, por la ayuda y apoyo prestado durante mi permanencia en esa institución.

RESUMEN

La esencia del trasplante como fenómeno biológico estriba en el conflicto que se establece entre el órgano o tejido trasplantado y el sistema inmune del receptor, que en un mayor o menor grado, casi siempre difiere en el orden inmunogenético, con excepción de los gemelos homocigóticos.

Los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad HLA, también denominadas antígenos de trasplante, ya que contra ellos se dirige especialmente la respuesta inmune del receptor, en caso de incompatibilidad genética con el donante.

Por esta razón, buscar la mayor compatibilidad posible entre donante y receptor para estos antígenos es un importante requisito que nos permite hoy en día poder utilizar las técnicas de tipificación a través de Biología Molecular para la compatibilidad y obtención de una mayor supervivencia del trasplante, particularmente a largo plazo.

La motivación de realizar este estudio en nuestro país ayudara a determinar cuales son los alelos HLA mas frecuentes en la población boliviana en general y la paceña en particular, para que estos resultados puedan servir a los equipos de trasplante de nuestro país para que puedan hacer una mejor selección de los donantes o determinar en que punto del país se podría encontrar un donante voluntario no relacionado que posea los mismos alelos que el receptor del órgano.

CONTENIDOS	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	2
III. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA	3
IV. MARCO TEÓRICO	6
A. Complejo mayor de histocompatibilidad y su descubrimiento	6
A.1 Localización de los genes de las moléculas de histocompatibilidad	8
A.2 Función de las moléculas de Histocompatibilidad	10
A.3 Estructura de los genes de las moléculas de histocompatibilidad	13
A.4 Estructura de los genes de las molécula de histocompatibilidad	15
A.5 Mecanismo de generación del polimorfismo	18
A.6 Polimorfismo de las moléculas HLA clase II	19
A.7 Expresión y Regulación de la molécula de histocompatibilidad	22
A.8 Expresión de la molécula de histocompatibilidad	24
B. Tipificación de la molécula de histocompatibilidad	26
B.1 Método Serológico	27
B.2 Método por Biología Molecular	28
B.3 Métodos Celulares	30
C. Historia del Trasplante	31
C.1 Variación genética entre Receptor y Donante	32
C.2 Variación de la inmunología	33

D.	Evaluación para un transplante renal	34
E.	Tipos de rechazo en el transplante renal	34
F.	Factores que influyen en el rechazo de órganos	35
V.	OBJETIVOS	37
V.1	Objetivos Generales	37
V.2	Objetivos Específicos	37
VI.	DISEÑO METODOLOGICO	38
A.	Población	38
B.	Tipo de Estudio	40
C.	Materiales, Equipos y Reactivos	40
C.1	Materiales	40
C.2	Equipos	40
C.3	Reactivos	41
D.	Métodos	41
D.1	Extracción de DNA genómico	41
D.2	Realización del PCR-SSP	43
E.	Métodos Estadísticos	45
VII.	RESULTADOS	46
A.	Análisis de las frecuencias alélicas HLA clase II	49
B.	Análisis de las frecuencias alélicas HLA clase II en la población paceña	52
C.	Análisis de las frecuencias alélicas HLA clase II en el resto de la población	55
D.	Frecuencias de asociación entre los Loci DRB1* y DRB*	58
E.	Frecuencias de asociación entre los Loci DRB1* y DQB1*	60

VIII.	DISCUSIÓN	64
IX.	CONCLUSIÓN	68
X.	BIBLIOGRAFÍA	69
XI.	ANEXOS	76

CONTENIDOS DE TABLAS

Pág.

Tab.1	Moléculas HLA clásicas y no clásicas	10
Tab.2	Relación HLA - Enfermedad	12
Tab.3	Números de alelos correspondientes al locus HLA I, II y III	22
Tab.4	Moléculas clase I expresadas en diferentes tejidos y células	25
Tab.5	Frecuencias alélicas del Locus DRB1* de la población general	50
Tab.6	Frecuencias alélicas del Locus DQB1* de la población general	51
Tab.7	Frecuencias alélicas del Locus DR* de la población general	52
Tab.8	Frecuencias alélicas del Locus DRB1* de la población paceña	53
Tab.9	Frecuencias alélicas del Locus DQB1* de la población paceña	54
Tab.10	Frecuencias alélicas del Locus DR* de la población paceña	55
Tab.11	Frecuencias alélicas del Locus DRB1* del resto de la población boliviana	56
Tab.12	Frecuencias alélicas del Locus DRQ1* del resto de la	57

población boliviana

Tab.13	Frecuencias alélicas del Locus DR* del resto de la población boliviana	58
Tab.14	Grado de asociación entre alelos privados HLA DRB1* y alelos públicos HLA DRB*	59
Tab.15	Asociación entre el locus DR – DQ de la población boliviana	61

CONTENIDOS DE FIGURAS

Pág.

Fig. 1	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	9
Fig. 2	Estructura de la molécula MHC clase I	14
Fig. 3	Estructura de la molécula MHC clase II	16
Fig. 4	Complejo Mayor de Histocompatibilidad HLA clase II, III, I	18
Fig. 5	Moléculas de Histocompatibilidad por métodos serológicos	26
Fig. 6	Fundamento del Test de microlinfocitotoxicidad	27
Fig. 7	Fundamento del tipificado por Biología Molecular	30

CONTENIDOS DE GRAFICOS

Pág.

Graf. 1	Números de pacientes atendidos según el lugar de origen	39
Graf. 2	Números de pacientes según edad de pacientes del programa Nacional de Transplante	47
Graf. 3	Números de pacientes según sexo de pacientes del programa Nacional de Transplante	48

I. INTRODUCCION

En los últimos años el estudio del Genoma Humano y en especial de la región HLA ha sido de gran interés para los genetistas. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) fueron inicialmente definidas como antígenos que estimulan a una respuesta inmunológica en el organismo hacia tejidos transplantados. En los años 40 George Snell demostró que el rechazo a trasplantes era una reacción inmunológica montada por el organismo del receptor contra los antígenos extraños que habían sido transplantados ⁽¹⁾.

El estudio del Sistema HLA es el elemento central en la compatibilización entre donante y receptor para el trasplante de órganos y tejidos debido a que a mayor compatibilidad a nivel de estos antígenos existiría una mayor supervivencia del injerto. Los antígenos HLA tienen una gran importancia en la selección y presentación de diferentes péptidos a células T, regulando de esta manera la respuesta inmune tanto a antígenos provenientes de microorganismos patógenos, como a antígenos propios, lo que reviste gran importancia para el desarrollo de vacunas de nueva generación. También este sistema debido a su extenso polimorfismo, cuyo conocimiento se ha ido incrementado con ayuda de los métodos moleculares, constituye una poderosa herramienta en la investigación de una serie de problemas relacionados con la biología molecular, la inmunogenética, susceptibilidad a las enfermedades y variabilidad inter e intrapoblacional.

En la mayor parte de los países del mundo se han hecho estudios para determinar las frecuencias antigénicas y génicas de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) esto con las finalidades primero desde el punto

vista antropológico, y también para que el equipo de transplantes conozca cual es la probabilidad de que un determinado receptor de órgano pueda encontrar un donante entre un grupo de donantes no relacionados.

Por ultimo sobre la aplicación de la tipificación por el método de biología molecular y su aplicación en la secuenciación directa del ADN, análisis del tamaño de los fragmentos de restricción del ADN y la reacción en cadena del ADN polimerasa, ya que ésta es la herramienta básica que se ha utilizado en este trabajo.

II. JUSTIFICACIÓN

Es bien conocido que la determinación de la compatibilidad de los tejidos a nivel del MHC es necesaria para la aceptación de los transplantes. También es sabido que el riesgo de rechazo se incrementa cuando el donante es heterocigoto y el receptor es homocigoto para el mismo locus HLA.

En nuestro medio se tropieza con el gran inconveniente de que la mayoría de los pacientes que ingresan al programa de transplante renal están recibiendo el servicio de hemodiálisis y casi todos han recibido por lo menos una transfusión que es un factor de sensibilización frente a antígenos HLA. Por otro lado gran parte de los pacientes que solicitan la tipificación HLA no cuentan con donantes relacionados (padres, hermanos u otros familiares) lo que dificulta que este paciente pueda encontrar un donante compatible entre la población de donantes no relacionados ya que el HLA humano es uno de los genes mas polimorficos de nuestro genoma. Ya que la compatibilidad HLA esta directamente relacionada con la sobrevida del injerto, se hace necesario realizar estudios para determinar cual es la frecuencia de las moléculas de

histocompatibilidad en nuestra población. Este estudio sería de utilidad para el equipo de transplantes, puesto que una vez conocida la tipificación de un determinado receptor podríamos saber la probabilidad de que este encuentre un donante compatible en el resto de la población de donantes no relacionados. Por otro lado este estudio nos permitirá conocer la característica genética de nuestra población al nivel HLA clase II y comparar esta con otras poblaciones de Latinoamérica para determinar el grado de similitud o de diferencia que tenemos entre estas poblaciones.

Por ultimo conocer las frecuencias antigénicas de las moléculas HLA en nuestra población nos permitirá conocer las características genéticas de nuestra población al nivel de los genes de histocompatibilidad, haciendo hincapié primordialmente en la determinación de las frecuencias antigénicas que son características de la población paceña.

III. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) representan al complejo principal de histocompatibilidad en humano. El HLA esta dividido en varios grupos. El HLA clase I (mayormente los loci A, B y Cw) están involucrados en el rechazo por la respuesta inmune celular debido a que estas glicoproteínas se presentan en todas las células nucleadas del organismo y el HLA clase II (representado por la región D que tiene como loci importantes al DRB1, DQB1 y a veces DPB1) cuyos productos glicoprotéicos se expresan en la superficie de los linfocitos B, linfocitos T y células endoteliales activadas, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Debido a que su función principal es la presentación antigénica a los linfocitos T se dice que pueden ser

tan polimórficos como polimorficos sean los microorganismos del planeta. Estas moléculas se heredan de forma co-dominante por lo que la mayoría de los individuos son heterocigotos ⁽²⁾. Este alto nivel de polimorfismo es de carácter protector porque incrementa la probabilidad de que un individuo pueda presentar a sus linfocitos un péptido antigénico de un determinado microorganismo y favorecer de esta manera nuestra supervivencia. ⁽³⁾

Hasta nuestros días en los talleres internacionales de histocompatibilidad se han reportado más de 1300 alelos diferentes de entre los 12 alelos HLA expresados por las células humanas, esto apoya a la teoría que no existe otro loci genético más polimórfico que el HLA como ejemplo se sabe que el HLA-B tiene más de 400 variantes alélicas conocidas. Este problema de la gran variabilidad ha llevado a los científicos a desarrollar métodos más sofisticados y precisos para realizar la tipificación HLA en los estudios de genética de poblaciones y compatibilidad para trasplante ⁽⁴⁾. En este trabajo nuestro interés en focalizarnos en lo referente a la compatibilidad para trasplantes.

Este extenso polimorfismo esta relacionado con la poca probabilidad de encontrar donantes compatibles entre individuos no relacionados y por ende se aumenta la probabilidad de que se produzca el rechazo del injerto en los primeros años de realizado el trasplante. Esto ocurre porque el 105 de los linfocitos T están capacitados para conocer el cambio de un aminoácido en la estructura del los HLA alogenitos ya durante el proceso de maduración tímica todos los linfocitos T se volvieron MHC restringidos ^(25,45)

Cuando se tiene un receptor de órgano que presenta un alelo que no se presenta frecuentemente en una población determinada el equipo de

transplante se ve en la necesidad de recurrir a las bases de datos de frecuencias HLA de los diferentes grupos étnicos o raciales de un país para determinar un área geográfica en la cual viven donantes voluntarios potenciales que puedan ser compatibles a nivel de ese aleo ⁽³¹⁾

En casi todos los países de Sudamérica se han realizado estos estudios de polimorfismos del loci HLA primero con fines antropológicos y después para estudios de asociación HLA-enfermedad y estos estudios se han visto en gran manera favorecidos por la abundante cantidad de datos que se obtiene a través de los bancos de donantes de órganos ⁽⁵⁾. Entre estos grupos de investigadores se puede citar a Morales ⁽⁶⁾ que realizó un estudio para determinar las frecuencias antigénicas de los pobladores de varias provincias del nor-este argentino. Paradoa y cols ⁽⁷⁾ en Cuba realizaron un estudio para determinar también las frecuencias antigénicas del HLA en esa población y compararon los resultados con otros grupos raciales de Norteamérica, Europa y África. En Brasil Rivera y cols ⁽³⁾ realizaron un estudio con las mismas características para determinar las frecuencias antigénicas del loci HLA entre grupos étnicos de ese país. Finalmente como ejemplo citamos a Cervantes y cols ⁽³⁴⁾ que realizaron una comparación entre las frecuencias antigénicas del loci HLA de ciudadanos peruanos frente a ciudadanos bolivianos y encontraron que entre las dos poblaciones existen diferencias en determinados alelos HLA que se encuentran más frecuentemente en la población peruana y otros en la población boliviana, pero es importante aclarar que la muestra analizada era poco significativa desde el punto de vista estadístico.

Estas experiencias de los investigadores de nuestro continente nos motivan a la realización de un estudio de similares características en nuestro país para determinar cuáles son los alelos HLA más frecuentes en la población

boliviana en general y la paceña en particular, otra motivación es que estos resultados puedan servir a los equipos de trasplante de nuestro país para que puedan hacer una mejor selección de los donantes o determinar en que punto del país se podría encontrar un donante voluntario no relacionado que posea los mismos alelos que el receptor del órgano.

IV. MARCO TEORICO

A. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y SU DESCUBRIMIENTO

Se comenzó a pensar en el MHC cuando en los años 20, utilizando técnicas clásicas para el estudio de rechazo de tumores y tejidos trasplantados, los investigadores notaron que los injertos de piel de un animal o entre animales de la misma cepa, habitualmente no eran rechazados y los injertos entre animales de diferente cepa eran rechazados con frecuencia, así se estableció la existencia de una base genética para el reconocimiento del injerto como un tejido extraño y a los genes responsables de este fenómeno se les denominó genes de histocompatibilidad⁽⁹⁾. En los humanos el equivalente del MHC que se denomina HLA “Human Leucocytes Antigens”, ya que originalmente fue descrito en células blancas de la sangre⁽⁸⁾. El sistema HLA constituye uno de los sistemas genéticos más fascinantes del hombre, capaz de codificar una serie de moléculas (moléculas del HLA tipo I y tipo II) presentes en las membranas de la mayoría de las células nucleadas del organismo implicadas en procesos vitales básicos, tales como la respuesta inmunológica, con el fin de mantener la integridad del individuo y de la especie. Considerado

inicialmente como un simple marcador genético, los esfuerzos en la búsqueda de su aplicación clínica están a la orden del día asociándose a diversas enfermedades sobre todo autoinmunes o con disfunciones inmunológicas⁽⁹⁾.

El MHC es un sistema poligénico que contiene muchos genes estructural y funcionalmente relacionados y altamente polimórficos, puesto que en la población existen múltiples alelos para cada gen. Los distintos genes del complejo están además estrechamente ligados y tienden a heredarse como una unidad, como un complejo supergénico o haplotipo, entendiéndose como tal a una combinación particular de genes en un complejo génico o en un cromosoma. En la población de individuos de una especie existirán entonces teóricamente tantos haplotipos MHC como diferentes combinaciones de alelos de distintos genes del MHC.⁽¹⁰⁾

En los años 60s, se descubrió que los sueros de mujeres multíparas eran capaces de reconocer moléculas del MHC de sus esposos, desde entonces la identificación de los antígenos se ha realizado por técnicas de aglutinación y luego por microcitotoxicidad dependiente de complemento.

La importancia de las moléculas de MHC en la respuesta inmune se descubrió en 1974 cuando Zinkernagel y Doherty^(11,12) observaron que linfocitos T aislados de un ratón infectado podían reconocer células de otro ratón infectadas por el mismo virus solo en el caso de que ambos expresaran la misma isoforma de MHC, demostrando que en la activación de las células T intervienen tanto determinantes del antígeno como de las moléculas del MHC. Es lo que se conoce como restricción por el MHC.

Los fragmentos de longitud variable provenientes de moléculas extrañas o propias al organismo y que ingresan a la célula presentadora del antígeno, son procesados por la maquinaria celular. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular se ha incrementado considerablemente el conocimiento sobre la ubicación de genes y las regiones reguladoras del MHC, así como la tipificación por sondas alelo-específicas y por secuenciamiento^(13,14).

Así, los antígenos del MHC humano inicialmente identificados por técnicas serológicas, han sido luego subdivididos al disponer de sus correspondientes secuencias nucleotídicas

A.1. LOCALIZACIÓN DE LOS GENES DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El MHC se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Ocupa un segmento de aproximadamente 3500 kb (3.500.000 bases) de ADN. Dentro este complejo se ubica un conjunto de genes que codifican y controlan la síntesis de glicoproteínas de membrana celular, las cuales se expresan en las diferentes poblaciones de célula inmuno competentes. (Ver figura 1).

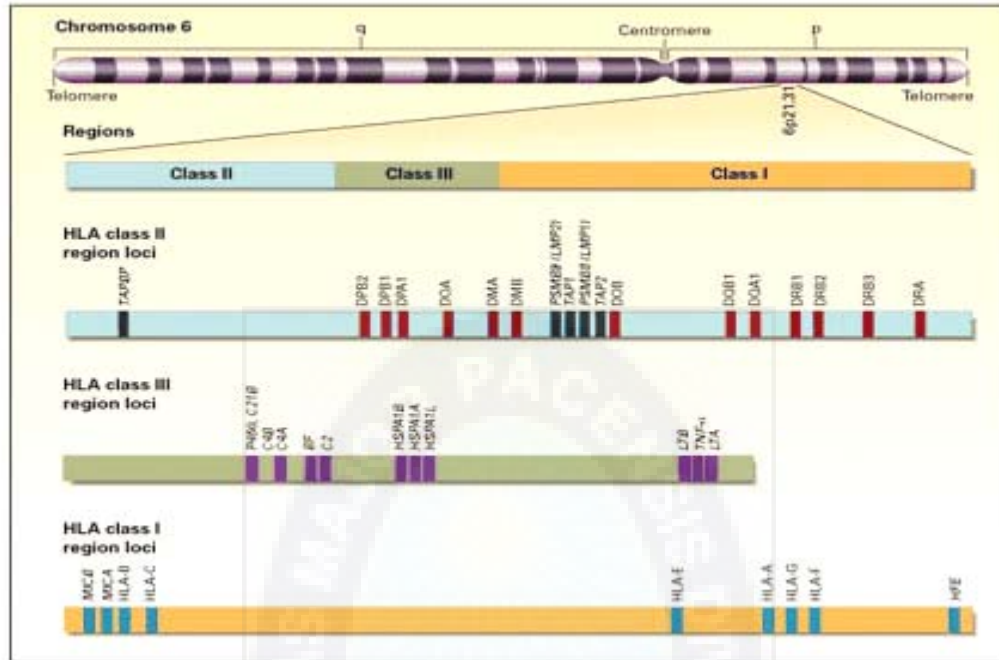


Figura.1. Fuente. Vásquez Gloria. Complejo Mayor de Histocompatibilidad y Autoinmunidad 1999. Localización cromosómica de los componentes del complejo principal de histocompatibilidad.

El sistema proteico HLA tiene una característica de suma importancia y es la presencia de un desequilibrio de enlace (ligamiento) entre alelos de un loci, lo cual se manifiesta en el hecho de que dichos alelos se hereden juntos en forma preferencial. El desequilibrio de enlace génico puede ser consecuencia de la selección natural entre una combinación génica específica. También puede ser debido al hecho de que la población esta en un estado de transición y no ha alcanzado aun equilibrio.

Estos genes codifican para la expresión de los Antígenos HLA clase I y HLA clase II denominados HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-D, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Igualmente se encuentran los genes

HLA clase III que gobiernan la síntesis de los factores del complemento como son C2, C4A y C4B de la vía clásica de activación y el factor Bf de la vía alterna⁽¹⁵⁾.

Moléculas HLA clásicas y no clásicas	
HLA	Formas
Clase I clásicas	A, B y Cw
Clase II no clásicas	E, F, G y CD1
Clase II clásicas	DR, DQ y DP
Clase II no clásicas	DM, DN y DO

Tabla 1. Fuente. Marti M. Procesamiento de antígenos. Se resaltan las moléculas HLA clásicas que tienen importancia para trasplante de médula ósea y órganos sólidos.

A.2. FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Las Moléculas MHC son esenciales para el reconocimiento inmunitario. Su principal función es unir fragmentos peptídicos de origen propio o extraño y presentarlo al complejo TDR-CD3 de los linfocitos T para su posterior reconocimiento.

Las células T citotóxicas “CD8+”, involucradas en el reconocimiento y el rechazo de células infectadas por virus y células tumorales, reconocen el antígeno unido a moléculas de clase I y las destruyen. Las células T cooperadoras “CD4+” reconocen el antígeno unido a moléculas de clase II en las células presentadoras de antígenos; entonces, pueden cooperar con los linfocitos B para inducir la producción de anticuerpos o por otro lado liberar

citocinas que ayudan a los macrófagos a destruir los microorganismos intracelulares.

Cuando un animal es infectado por un virus, sus linfocitos T citotóxicos quedan sensibilizados y destruirán las células infectadas por ese virus. Sin embargo, estos linfocitos no podrán destruir células infectadas con el mismo virus que tengan un haplotipo HLA distinto. Este fenómeno se conoce como citotoxicidad restringida por el haplotipo o restricción MHC, e implica un doble reconocimiento de un antígeno viral y una molécula HLA propia. De hecho, las moléculas de clase I son como marcadores de superficie que guían a las células citotóxicas hacia sus dianas.

La restricción MHC se aplica también a los linfocitos T cooperadores (Th), que reconocen el antígeno en los macrófagos y en los linfocitos B en asociación con moléculas de clase II.

En este caso, las moléculas de clase II actúan como señales de reconocimiento entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos.

Estas interacciones genéticamente restringidas son características de las reacciones inmunitarias en las que están involucradas las moléculas MHC.

En cuanto a la variación alotípica, es decir, el enorme polimorfismo dentro de las moléculas MHC, se ha propuesto que su función es impedir que los microbios puedan evadir al sistema inmune, ya que si existiera un número limitado de moléculas MHC, un microbio podría cambiar sus antígenos de superficie hasta conseguir una estructura que no pudiera unirse a ninguna

molécula de MHC, de manera que las células T no podrían reconocerlo; sin embargo, con muchas moléculas MHC disponibles dentro de un gran *pool* génico, es improbable que surja un antígeno que sea incapaz de unirse a ninguna de estas moléculas.

La "contrapartida" es que la posesión de determinados antígenos de histocompatibilidad hace que el individuo sea más susceptible a presentar determinadas enfermedades de tipo autoinmune.

Enfermedad	HLA	Riesgo Relativo
Síndrome de Reiter	B27	37
Espondilitis anquilosante	B27	106
Tiroiditis de Hashimoto	B47	15
Tiroiditis de Hashimoto	DR5	3
Esclerosis múltiple	DR2	5
Artritis reumatoide	DR4	4
Diabetes juvenil	DR3/DR4	3 – 6
Enfermedad celíaca	DR3/DR5/DR7	30

Tabla 2. Fuente Martha Pérez Rodríguez. HLA y enfermedad. Revista medica del IMSS suplemento 2005. Riesgo relativo (RR) es la fuerza de asociación de una enfermedad con un determinado antígeno o alelo HLA. El RR superior a 1 indica asociación positiva: el RR a 1 indica protección.

A.3. ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I

Estos genes codifican para la expresión de una serie de moléculas presentes en la superficie de las células nucleadas. Estas moléculas son Glicoproteínas de membrana (cadena pesada de peso molecular de 44k) que se asocian a un segundo polipéptido denominado beta 2-microglobulina (de peso molecular 12 K), la cual es codificada en el cromosoma 15. Cada cadena pesada puede ser dividida en regiones: tres dominios extracelulares (cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de largo), una región de transmembrana y una cola citoplasmática. Cada cadena pesada es inicialmente sintetizada con un péptido endógeno en su amino terminal (ver Figura 2). Este péptido es removido del polipéptido durante el transporte a la superficie celular y no se le encuentra en la proteína madura ⁽¹⁶⁾.

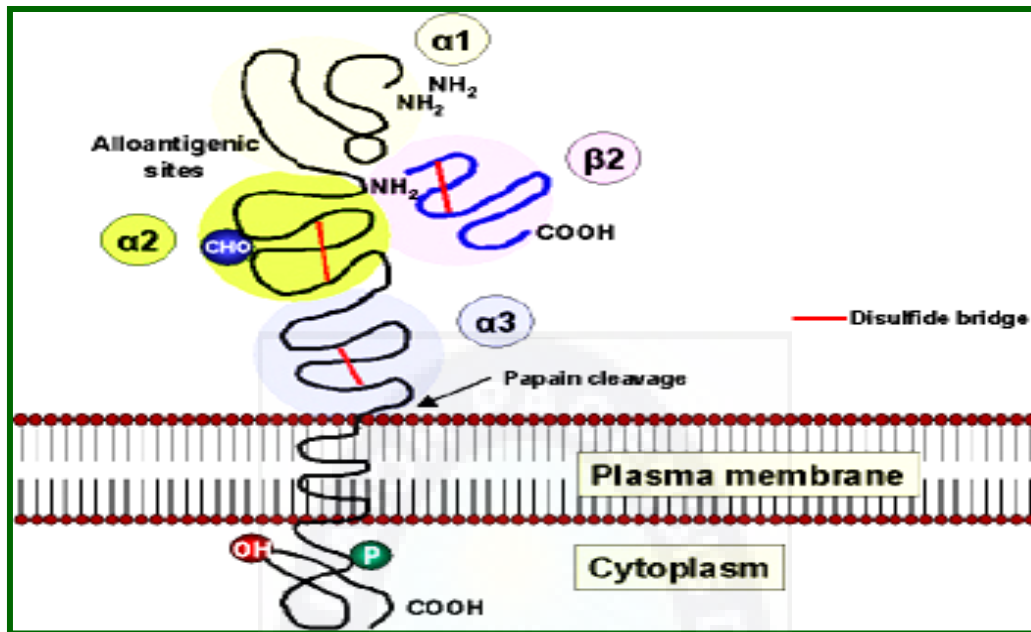


Figura 2. Fuente. Estupiñán Sandra y col. Complejo Mayor de histocompatibilidad y desarrollo de vacunas 2004. Estructura de la molécula de MHC clase I. La molécula de MHC clase I tiene tres dominios globulares alfa 1 (Amarillo), alfa 2 (verde) y alfa 3 (azul). El dominio alfa 3 está estrechamente relacionado con la beta 2 microglobulina (Rosado). Una conformación flexible y extendida, los extremos de esta hendidura están cerrados de manera que pépticos de mayor tamaño no pueden encajar.

Los loci de clase I son muy similares entre sí. Las secuencias que identifican un alelo del locus A de un alelo del locus B o Cw están localizados en el primer exón, o en los exones localizados en el 3' del gen (que codifican las regiones de transmembrana y citoplasmática) o en los intrones que separan a los exones.

Cada exón dentro de un gen codifica una región específica de la cadena pesada clase I. En los alelos de Clase I, los exones segundo y tercero que codifican el primer y segundo dominio de las cadenas pesadas, contienen la mayoría de las

diferencias alélicas. Existen tres moléculas de Clase I denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-Cw, las cuales presentan los péptidos a los linfocitos T CD8. Una característica fundamental de las moléculas de Clase I es su enorme polimorfismo poblacional. Actualmente el uso de métodos moleculares permite una mayor exactitud para la determinación de subalelos HLA. El comité de nomenclatura HLA de la Organización Mundial de la Salud realiza talleres internacionales de Histocompatibilidad para definir especificaciones para los diferentes Loci. La expresión de estas moléculas es codominante por lo que la mayoría de los individuos son heterocigotos. Cada célula de un individuo expresa por lo menos tres diferentes moléculas de clase I. HLA-A, HLA-B y HLA-C. Estas moléculas son muy similares entre si. Hay aproximadamente entre 0,5 a 1 millón de moléculas de clase I en la superficie de una célula. Es un loci altamente polimórfico. La designación es dada por números. Por ejemplo, A*0202 y A*0301 son alelos del locus HLA-A. B*2701 es un alelo del locus HLA-B. Existen alelos nulos o no expresados el cual se identifican con la letra “N” en el nombre del alelo, por ejemplo, A*2411N⁽¹⁷⁾.

A.4. ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LA MOLECULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE II

Los genes que codifican las cadenas α y β y de las proteínas de clase II están localizados uno cerca del otro, se ubican cerca al centrómero en la siguiente secuencia: DP, DQ y DR. Otros genes también ubicados en la misma región, no presentan productos génicos como los SX, DZ, DO, DX y DV⁽¹⁸⁾.

Estas glucoproteínas están constituidas por un heterodimero, con una cadena α de 229 aa (32-34 KD) y una β de 237 aa (28-29KD, unidas no covalentemente.

Cada cadena posee dos dominios globulares externos, con puentes de disulfuro intracaternarios en ambos dominios de la cadena α . Durante su síntesis y transporte intracelular, el dimero $\alpha - \beta$ se halla asociado de 31 KD llamada invariante.

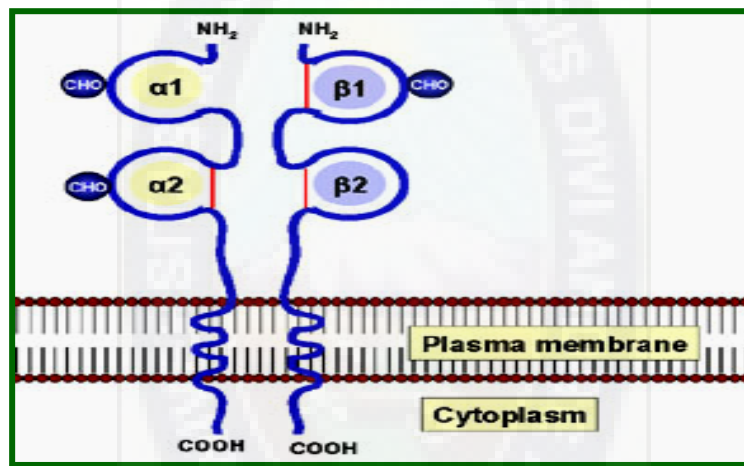


Figura 3. Fuente. Estupiñán Sandra y col. Complejo Mayor de histocompatibilidad y desarrollo de vacunas 2004. Estructura de la molécula MHC clase II La molécula de MHC clase II está compuesta por dos cadenas polipeptídicas diferentes (α y β) las cuales están asociadas de manera no covalente.

El complejo migra a través del aparato de Golgi y luego hacia los endosomas, en donde el pH ácido liberaría la cadena invariante. Cada cadena esta codificada por un gen respectivo en el sistema HLA, denominados DRA1/DRB1, DQA1/DQB1 y DPA1/DPB1. Algunos individuos expresan además productos denominados: DRw52, DRw53 o DRB51, donde la cadena

DRA es igual a la que esta presente en las moléculas HLA-DR y la cadena beta es producto de un gen denominado DRB3,DRB4 o DRB5.

La información de un gen en partículas no se localiza en una sola porción de pares de bases sino que se encuentra en múltiples segmentos de ADN de doble banda llamado exones. Estos segmentos, a su vez, son separados por segmentos de ADN interpuestos llamados intrones. El conjunto entero de exones que contiene la información codificante para una cadena polipeptídica completa constituye un gen.

La estructura dominante de las proteínas de clase II es un reflejo de arreglo exon/intron de los genes a nivel del DNA. Los genes de la cadena alfa contiene 5 exones, el primero codifica la señal de secuencia, el segundo el dominio extracelular alfa 1, el tercer exon codifica el dominio extracelular alfa 2, el cuarto la porción transmembrana y la citoplasmática y el quinto codifica la región 3'UT. Los genes de la cadena B tienen un arreglo idéntico excepto para la cola citoplasmática la cual es codificada por el exon 5 separada de la región 3'UT por 24 pb, cerca del exon 6⁽¹⁹⁾. Los genes alfa y beta de los diferentes subgrupos difieren significativamente en la longitud de sus intrones. La sub-región DR es única entre los antígenos HLA clase II, la organización de los genes de la cadena B no es la misma para todos los haplotipos.

(Ver Figura 4)

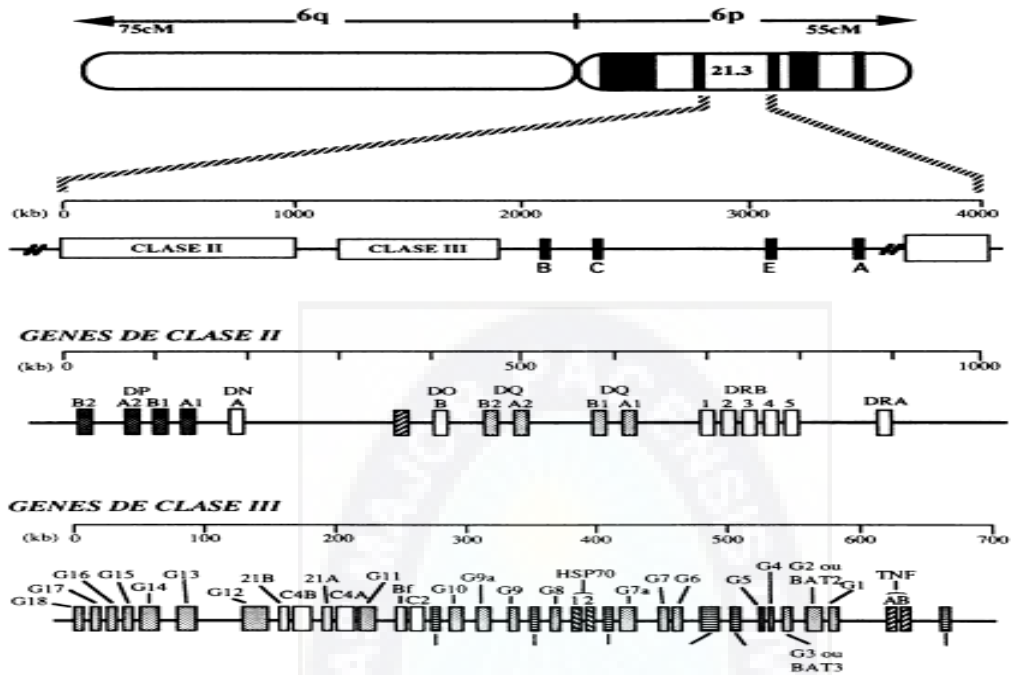


Figura 4. Complejo mayor de histocompatibilidad o complejo HLA, localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Del centrómero al telómero el sistema HLA consta de genes de clase II, III y I. El sistema HLA de clase II comprende tres familias principales de genes, DP, DQ y DR, que codifican para los antígenos de histocompatibilidad HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, así como otros genes de función mal conocida. El sistema HLA de clase III comprende los genes C2, C4B, C4A y Bf, entre otros, que codifican para ciertas proteínas del complemento. El sistema HLA de clase I se compone de los genes B, C y A, y otros de función desconocida, que codifican para sus correspondientes moléculas HLA B, HLA C y HLA A. Modificada de Billiard et al..

A.5. MECANISMOS DE GENERACIÓN DEL POLIMORFISMO

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⁽²⁰⁾.

A.6. POLIMORFISMO DE LAS MOLECULAS HLA CLASE II

El polimorfismo de los antígenos de HLA clase II tiene un significado fundamental en la función de las moléculas de HLA clase II con relación a la restricción inmune de las interacciones celulares. Los residuos polimórficos de los antígenos de clase II están principalmente localizados en el dominio externo NH₂-terminal de la cadena B. Codificada por el segundo exon. Las expresiones alélicas de los antígenos HLA-DR y DQ representan numerosas especificidades y están determinadas primeramente por las variaciones alélicas en el segundo exon de los genes DRB1 y DQB1 respectivamente^(20,21).

Más aun, los epitopes celulares definidos que contienen las especificidades HLA Dw están en la mayoría de los casos correlacionados con las variaciones alelicas en el mismo exon del gen DRB1 ⁽²¹⁾. Los alelos HLA clase II, se definen inicialmente por las letras de cada sub-región DR, DQ o DP, a continuación la letra alfa o beta de acuerdo a la cadena a la cual codifican. Luego los dos dígitos indican el subtipo y los dos siguientes indican el número cronológico respectivo.

El polimorfismo localizado en el exon 2 de los cuatro genes DRB expresados, están restringidos a tres regiones hipervariables en las posiciones de los aminoácidos 9-13, 26-33 y 67,74. Entre los genes de HLA clase II estas variaciones estructurales son la clave de las diferencias funcionales en el reconocimiento inmune, del fenómeno de presentación antigénica a lo que conlleva a la inmunomodulación a la respuesta inmune, al procesamiento y presentación de epitopes inmunogenicos y la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad ⁽²²⁾.

Las moléculas HLA clase II se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune como linfocitos B y macrófagos, (células presentadoras de antígenos que juegan un papel fundamental en el reconocimiento de antígenos foráneos). Cada célula del sistema inmune de un individuo expresa tres diferentes tipos de moléculas de clase II, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DQ.

Estas moléculas son similares entre si y se estima que hay entre 0,5 y 1 millón de moléculas de clase II en la superficie celular ^(22,23).

En la región HLA clase I de los alelos HLA-B se encuentran agrupadas en dos familias HLA-Bw4 y Bw6 que ellos residen sobre un heptope único sobre cada molécula clase HLA-B y son claramente diferentes del heptope que determina la especificidad de cada molécula HLA-B expresada en Bw4 o el sub-tipo de Bw6 además de una especificidad de HLA-B(privada) .

Especificidades de los alelos privados:

- *DR51* (DRB5): DR2 (DRB1*15/16)
- *DR52* (DRB3): DR3 (17/18; DRB1*03), DR5 (DRB1*11/12), DR6 (DRB1*13/14)
- *DR53* (DRB4): DR4 (DRB1*04), DR7 (DRB1*07), DR9 (DRB1*09)

De la misma manera los alelos HLA-DR también se encuentran asociadas con subtipos, sin embargo los subtipos de HLA-DR no son alélicos uno con el otro ellos se encuentran codificados por genes separados “(HLA-DRB3,-b4,-b5) y son moléculas distintas (HLA-DR52,-dr53,-dr51, respectivamente) (serología) Aunque todo el HLA-DR4 / 7 / 9 llevan el gen estructural HLA-DRB4, no todos ellos expresan la molécula HLA-DR4.

La expresión sin embargo es restringida al HLA-(B57): DR7 (Dw11): DQ9 esto debido por una sustitución de la Guanina en el sitio 3' al final del primer intron, cambiando a AG (Adenina y Guanina).(Ver Tabla 3).

Locus	Alelos DNA	Equivalentes Serologia
HLA-A	119	40
HLA-B	245	88
HLA-C	74	9
HLA-DRB1	201	80
HLA-DQB1	39	7
HLA-DPB1	84	(-)

Tabla 3. Fuente. Rhodes David and Trowsdale Jhonn. Genetics and Molecular Genetics of the MHC. Números de alelos correspondientes al Locus HLA-A, B, C, DRB1, DQB1*, DPB1*

A.7. EXPRESION Y REGULACION DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El ARN mensajero de cada cadena se traduce en ribosomas unidos al retículo endoplásmico rugoso. Tras la escisión del péptido líder y entrada del resto de la cadena al lumen del retículo endoplásmico, se produce la maduración al transitar el polipéptido desde este retículo al aparato de Golgi (adición de oligosacáridos); finalmente, el péptido madurado (que en su caso se habrá asociado con otros péptidos), viaja en vesículas membranosas que se fusionan con la membrana citoplásmica, lo que permite la inserción en esa membrana de las moléculas de MHC.

Las moléculas MHC no viajan solas desde el RE hasta la superficie, sino que requieren una serie de proteínas imprescindibles para su adecuado ensamblaje y para que se inserten los péptidos dentro del surco. ⁽²⁴⁾

Últimamente se está investigando bastante en los aspectos de regulación genética de los genes del complejo MHC. Los promotores están dotados de típicas "cajas TATA" y a menudo cuentan con secuencias de tipo CAAT. Se han identificado diversos intensificadores (*enhancers*) con secuencias conservadas que interaccionan con proteínas reguladoras específicas.

Se sabe que los genes de MHC pueden ser regulados tanto de modo positivo como negativo. Por ejemplo: El MHC-I aumenta su expresión ante interferón alfa y factor de necrosis tumoral (TNF). Además, los interferones alfa y beta, y el interferón no inmune 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 endoplásmico rugoso.

Obviamente, el significado adaptativo de este control genético positivo estriba en que permite aumentar la cantidad de moléculas MHC de clase I capaces de presentar péptidos derivados de algún microorganismo intracelular (como un virus), para que sean reconocidos por los linfocitos T CD8⁺.

El interferón alfa (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).^(23, 24, 25)

A.8. EXPRESION DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN DIFERENTES TEJIDOS

Las moléculas de clase I se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleares del organismo pero no en todas, dado que, en algunas localizaciones, su expresión es mínima o incluso nula, como sucede en el endotelio, glándulas de Brunner duodenales, trofoblasto veloso o neuronas del sistema nervioso central.

La expresión de las moléculas de clase II se encuentra fundamentalmente restringida a macrófagos, monocitos, linfocitos B y cuando están activados también en linfocitos T y NK.

Igualmente se encuentra expresado en alta densidad en otras células que actúan como presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas del bazo, epidérmicas de Langerhans o células endoteliales. También se encuentran en progenitores hematopoyéticos, células leucémicas y células de diferentes tipos de tumores. Esta distribución diferencial de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y II se encuentra directamente relacionada con la diferente función de cada tipo de moléculas⁽²⁶⁾. Los niveles relativos de las moléculas HLA en diferentes órganos y tejidos son muy variados. (Ver Tabla 4).

TEJIDO / CELULA	HLA clase I	HLA clase II
LINFOCITOS T	+++	Solo activos
LINFOCITOS B	+++	+++
MACROFAGOS	+++	+ / ++
CEL. DENDRITICAS	+++	+++
EPITELIO TIMICO	+	+++
NEUTROFILOS	+++	-
PARENQUIMA: HIGADO, MUSCULO.	+	-
NEURONAS	-	-
HEMATIES	-	-

TABLA 4. FUENTE: JANEWAY, CH. (.19) Las moléculas clase I están expresadas sobre todas las células nucleadas, sin embargo ellas están expresadas mayormente en las células hematopoyéticas. Las moléculas clase II normalmente se expresan solo por un subset de células hematopoyéticas y por células del estroma tímico, sin embargo ellas pueden ser expresadas por otros tipos celulares sobre la exposición de la citoquina inflamatoria Interferón-gamma. * En humanos las células T activadas expresan molécula MHC clase II, mientras en ratón, todas las células T son MHC clase II negativas. ** En el cerebro la mayoría de los tipos celulares son MCH clase II negativas pero en microglia, los que están relacionados con macrófagos, son clase II positivos.

B. TIPIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Se denomina tipaje HLA, al análisis llevado a cabo en el laboratorio para conocer los alelos HLA de un determinado individuo mediante métodos serológicos, análisis de genes por biología molecular (Figura 6). y métodos celulares. El tipaje HLA tiene especial interés en las siguientes situaciones:

- Estudio de la asociación con distintas formas clínicas de una enfermedad. Por ejemplo la diabetes insulino-dependiente está asociada a DR3 y DR4 y
- En trasplantes de órganos y medula ósea y
- Estudios de filiación familiar.

La mayoría de los genes del HLA son altamente polimórficos, como ya se explicó en el apartado anterior, y cada especificidad definida en la superficie celular representaría un alelo diferente a nivel geonómico. Así se han descrito numerosos alelos para los diferentes loci HLA.



Fig. 5 Fuente. R. Solana y Col. Moléculas de Histocompatibilidad métodos serológicos o bien mediante biología molecular

B.1. METODO SEROLOGICO

El *método serológico* más comúnmente utilizado es el *test de microlinfocitotoxicidad*, que se realiza enfrentando una población de linfocitos a una batería de sueros o anticuerpos monoclonales que son específicos para cada uno de los antígenos posibles. Posteriormente se añade complemento de tal manera que en los pocillos en los que se encuentre el antisuero específico para los antígenos de un individuo determinado, se producirá la lisis celular que podrá ser visualizada al microscopio. Para visualizar la lisis, actualmente se usan una técnica fluorescente con una mezcla de anaranjado de acridina y bromuro de etidio. El bromuro de etidio se fija al ADN de las células muertas (que aparecen de color rojo) y desplaza al anaranjado de acridina que tiñe a las células vivas de color verde brillante. Los cultivos se incuban y se hacen las lecturas de viabilidad celular.

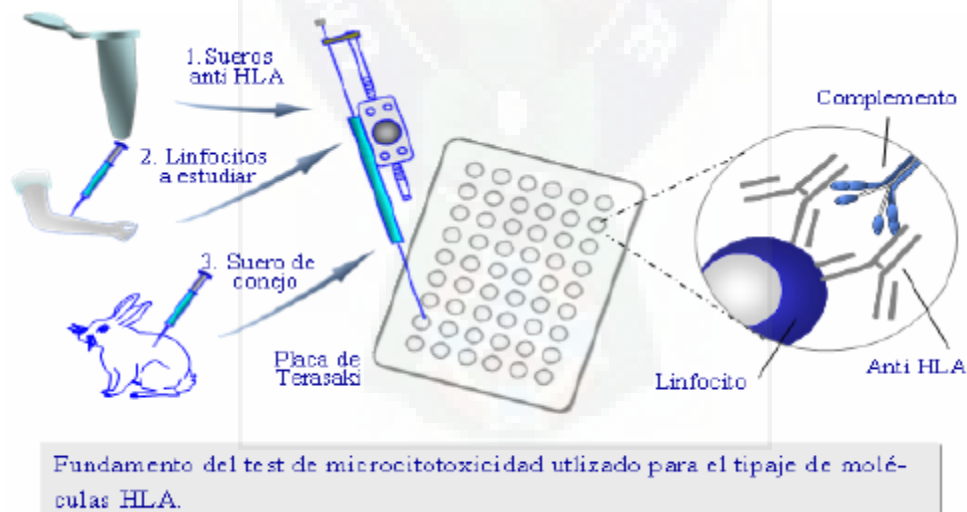


Fig.6. Fuente. R. Solana y Col. Fundamento del test de microlinfocitotoxicidad utilizado para el tipaje de moléculas HLA.

Para llevar a cabo la tipificación de los antígenos de clase II se utilizan poblaciones purificadas de linfocitos B, ya que en estas células los antígenos

de clase II se expresan más abundantemente que en los linfocitos T (de hecho, las células T expresan cantidades significativas de moléculas MHC de clase II sólo cuando están activadas). Los linfocitos B se separan haciendo pasar suspensiones de linfocitos totales a través de una columna empaquetada con fibra de nylon. Por sus propiedades adherentes, las células B se retienen en el nylon y posteriormente se despegan por manipulación mecánica de la columna de la que previamente se han eliminado, por lavado, las células no adherentes. Existe a su vez, otro método más utilizado y menos perjudicial para la separación de las células B que consiste en el uso de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos contra antígenos específicos de estas células (el antígeno CD19, por ejemplo). La sangre se mezcla con las esferas y luego éstas se separan en un campo magnético (con un imán) y se lavan para proceder a su tipificación por serología⁽²⁷⁾.

B.2. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

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

- a. Secuenciación directa del ADN.
- b. Análisis del tamaño de los fragmentos de restricción del ADN (*RFLP restriction fragment length polymorphism*).
- c. Reacción en cadena de la ADN 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.

La técnica de RFLP incluye la fragmentación del ADN con enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos, la transferencia de los fragmentos separados a membranas de nylon, la hibridación con sondas, de secuencias conocidas, marcadas con isótopos radiactivos o con enzimas y la detección del producto por autorradiografía, quimioluminiscencia o colorimetría.

La técnica de PCR permite amplificar segmentos particulares de ADN en pocas horas (ver capítulo sobre métodos inmunológicos).

Las técnicas que actualmente más se utilizan para realizar tipaje HLA son PCR-SSO y PCRSSP. 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.

(Ver Figura 7)

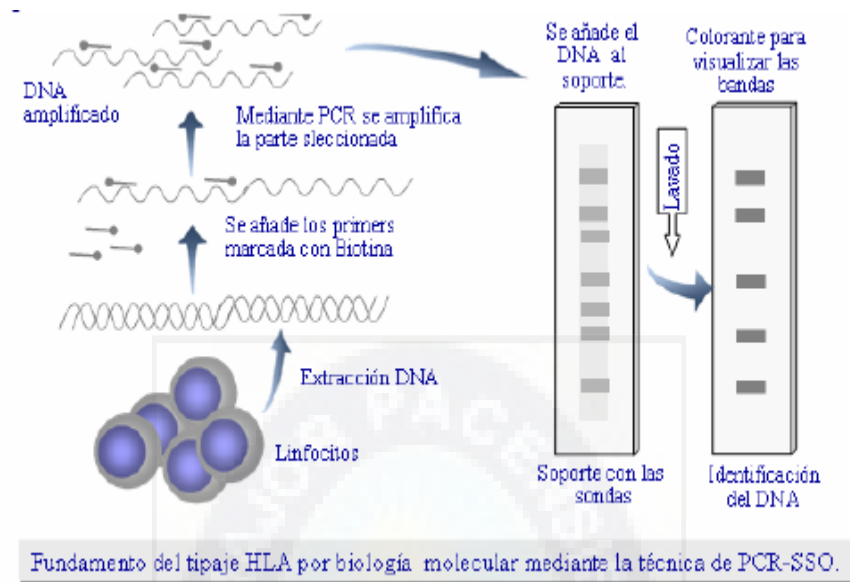


Fig.7 Fuente. R. Solana y Col Fundamento del tipificaje HLA por biología molecular mediante de PCR-SSO.

B.3. METODOS CELULARES

También existe la posibilidad de detectar los antígenos de histocompatibilidad por *métodos celulares* mediante el cultivo de *mezclas de linfocitos*, del donante y del receptor. Esta reacción que se conoce como CML (*cultivo mixto de linfocitos*), se basa en la propiedad que tienen los linfocitos de proliferar cuando se incuban en presencia de linfocitos portadores de antígenos HLA diferentes. Los linfocitos con antígenos idénticos no estimulan las respuestas proliferativas entre ellos. La proliferación celular se puede cuantificar utilizando diferentes técnicas, aunque la más común mide la incorporación de timidina tritiada (3HT) por las células proliferantes^(27, 28). En una variante de la reacción, denominada CML unidireccional, las células estimuladoras se tratan previamente con mitomicina C para inhibir su capacidad de división celular, sin modificar su viabilidad (la mitomicina se

combina con los husos cromáticos evitando la segregación cromosómica y la mitosis) y así las células sólo funcionan como antígeno. Los cultivos de células mezcladas se mantienen de 72 a 96 h antes de adicionar la timidina radiactiva. De 4 a 18 horas después las células se colectan, se lavan y se procesan para determinar la cantidad de radiactividad incorporada. La incorporación de ³H-T se establece midiendo la emisión de radiación beta en un contador de centelleo y los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm)⁽²⁹⁾

C. HISTORIA DEL TRANSPLANTE

La idea de reemplazar deficiencias congénitas, tejidos y órganos enfermos mediante la donación por parte de otros individuos sanos, es una aspiración antigua de la humanidad. Jabolus de Vorágine en la “Leyenda Dorada” escrita en el siglo XIII relata el trasplante del miembro inferior de un esclavo etíope para tratar de sanar a un noble de la iglesia primitiva, realizado por Santos Cosme y Damián.⁽³⁰⁾

Muchos enfermos destinados irremediablemente a una muerte segura o a llevar una vida sin calidad, han encontrado la solución a sus problemas, gracias a los progresos de la trasplantología médica en el actual contexto de la Revolución Científico- Técnica.

La era moderna en el trasplante surge en 1952 al ser descubierto el Sistema Principal de Histocompatibilidad, con el cual se conoce mejor la individualidad genética de cada persona, y en 1954 se realiza el primer trasplante renal por Joseph Murria, en el Hospital de Boston. Junto a esto fue necesario desarrollar la inmunosupresión, se pasó de los métodos físicos como las radiaciones (rayos x) a los biológicos, como el drenaje linfático del

conducto torácico o la esplenectomía hasta las drogas farmacológicas como la azathioprina y la prednisona.

La actividad del trasplante engendra un problema, porque si bien algunos órganos o funciones simples pueden ser sustituidos por equipos artificiales y alrededor de ello la ciencia y la técnica realizan un denodado esfuerzo, sin embargo, la mayor parte de las veces, ello resulta insuficiente o se hace imposible, entonces, se impone la necesidad del reemplazo por órganos y tejidos de familiares sanos.

En ocasiones se utilizan personas después de fallecidas, pero existen órganos como el corazón y el riñón que soportan mal la falta de suministro de oxígeno y sus células se dañan enseguida, por lo que en estos casos es preferible tomarlos de individuos que se encuentran en estado de muerte encefálica.⁽³¹⁾

La problemática de los enfermos renales adquiere hoy una importancia particular. El trasplante de riñón va siendo ya una práctica generalizada, que ha alcanzado un nivel de eficacia impresionante. Es la mejor solución para muchos pacientes cuya esperanza media de vida no sobre pasa los diez años, y que necesitan tres sesiones de hemodiálisis cada semana, durante cuatro o cinco horas, como condición indispensable para vivir. Esta situación, como es comprensible, no sólo dificulta la integración social del enfermo, sino que afecta también a otros niveles de su personalidad.⁽³²⁾

C 1. VARIACIÓN GENÉTICA ENTRE DONANTE Y RECEPTOR

La variación genética entre los individuos que causa diferencias de secuencia de proteína está en el corazón del problema de trasplante. En un esencialmente la especie como el Homo sapiens tiene un grado considerable de polimorfismo en sus alelos. Aún no tenemos una estimación exacta del

número promedio de proteínas cuya secuencia varía de un individuo al otro pero debe ser mayor que unos cien, posiblemente tan altos como varios miles. Obviamente la variación es aún mayor entre individuos de la especie diferente.

C.2 RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO DE LA VARIACIÓN.

Diferencias sin embargo genéticas entre el donante y el receptor son sólo de importancia en el trasplante si ellos causan la incompatibilidad. El trabajo temprano experimental sobre la transplatación realizado en ratones identificó una distinción muy clara entre una región cromosómica y el resto del genoma. La no identidad en esta región siempre conducía al rechazo muy rápido del tejido trasplantado, incluso si esto era la única diferencia genética entre el donante y el receptor. Esta región por lo tanto fue llamada el Complejo de Histocompatibilidad (MHC). Ahora sabemos que esta región existe en todos los vertebrados y que es sumamente polimorfo, de modo que en poblaciones de 2 individuos casi seguramente se diferencien en esta región a no ser que ellos sean monocigóticos.

Sin embargo la compatibilidad no es verdadera, incluso si es idéntico en el MHC, los trasplantes entre individuos probablemente son rechazados debido a lugares menores histocompatibilidad. En el ratón hay aproximadamente 50 lugares, en la gente probablemente más. La distinción clave es aquella que se encuentra en la región H, donde los lugares son 'menos fuertes' y en particular la fuerza varía entre diferencias alélicas. Por ejemplo, los ratones se diferencian sólo en el lugar h-1 por lo que rechazarán injertos de piel en 25 días si la piel de H-1b es trasplantada en recipientes de H-1c, pero en 100 días si el trasplante es hecho en la dirección inversa (por la comparación injertos MHC-DISPARES serán rechazados en 11 días en todos los casos).

D. LA EVALUACION PARA UN TRASPLANTE RENAL

La evaluación se inicia con un día completo de consultas iniciales entre el paciente nefrópata (Enfermo del riñón), los miembros de la familia, el cirujano de trasplantes, la enfermera de trasplantes, la nutricionista y la trabajadora social. Estas reuniones permiten que el individuo y los miembros de la familia hagan las preguntas necesarias y tengan una mejor comprensión con relación al trasplante^(31, 32).

Después de que se decide realizar el trasplante, la preparación se inicia. Los estudios se realizan generalmente sin la necesidad de internamiento. Sin embargo, ocasionalmente, los médicos interconsultantes podrán ordenar pruebas más extensas que requieran internamiento al hospital.

Inicialmente, se obtendrá sangre para determinar su tipo de sangre (A, B, AB o O) para ver la compatibilidad del tipo de sangre con el donador potencial. Los otros grupos sanguíneos no son tipificados para trasplante.

E. TIPOS DE RECHAZO EN EL TRASPLANTE RENAL

Dependiendo de la velocidad con la que se produzca, se distinguen 4 tipos de rechazo:

El *rechazo hiperagudo*, que se produce sólo horas o incluso minutos después de realizado el injerto, y el *rechazo acelerado* que se manifiesta durante los primeros días postrasplante se producen, en la mayoría de los casos, por la presencia de anticuerpos preexistentes en el suero del receptor frente a las

moléculas HLA del donante. El *rechazo agudo*, es aquel que se produce en el primer mes postransplante. No se conoce el mecanismo exacto por el que se produce un rechazo agudo, pero los hallazgos histológicos y la respuesta a la terapia inmunosupresora indican que en él intervienen tanto la inmunidad específica (humoral y celular) como otros mecanismos no específicos (respuesta inflamatoria con estimulación de polimorfonucleares, plaquetas y macrófagos, etc.). Por último, el *rechazo crónico*, se produce meses o años después del transplante y su etiología no se conoce con exactitud.

Debemos aclarar que este esquema es sobre todo válido en el caso del transplante renal, que al ser el más extendido, sirve de modelo general para el resto de los injertos ^(32, 33).

F. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RECHAZO DE ÓRGANOS

Nos hemos referido ya a que el éxito o el fracaso de un determinado transplante, depende en gran medida de la relación genética existente entre donante y receptor.

Pues bien, cada especie animal posee un conjunto de genes denominado genéricamente *Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)*, y en el caso de los humanos *sistema HLA* (del inglés *Human Leukocyte Antigens*), que codifica para una serie de moléculas presentes en la superficie de las células, que son las que determinan en gran parte el grado de compatibilidad o incompatibilidad en el transplante de órganos.

Es evidente que la función fisiológica de estas moléculas no es el rechazo de órganos o tejidos, pero el conocimiento que se tiene en la actualidad de ellas, proviene en gran medida de la influencia que ejercen en la inmunología del trasplante.

La presencia en los órganos injertados de moléculas HLA distintas a las del receptor (*situación de incompatibilidad HLA*) provoca en éste el desarrollo de anticuerpos y células T citotóxicas dirigidas frente a dichas moléculas, lo que conduce al rechazo de dicho órgano. Por el contrario, si las moléculas HLA presentes en el órgano injertado son iguales a las del receptor (*situación de compatibilidad HLA*), se reduce en gran medida la incidencia y la severidad del rechazo, aumentando por tanto la supervivencia del injerto.

En la prevención del rechazo (y de la GVHD en su caso) se puede actuar a diferentes niveles. Antes del trasplante, buscando la máxima compatibilidad posible entre el donante y el receptor y asegurándose de que, en todo caso, el receptor no tiene anticuerpos preformados contra los antígenos HLA del donante; y después del trasplante con el uso de una terapia inmunosupresora adecuada a cada caso^(33, 34).

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las frecuencias alélicas de los Loci HLA-DRB1* y DQB1* en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante las gestiones 2000 a 2005.

V.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar, la edad y el sexo que son más frecuentes en los pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar cuales son los Locus HLA-DR que son más frecuentes en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar cuales son los Locus HLA-DRB* que son más frecuentes en la población paceña de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar cuales son los Locus HLA-DQB1* que son más frecuentes en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.

- Determinar la frecuencia de la asociación entre los alelos privados del locus DR y sus respectivos alelos públicos pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar la frecuencia de asociación entre los alelos HLA - DR / HLA - DQ en la población pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.

VI. DISEÑO METODOLOGICO

A. POBLACION

La población en estudio fueron 172 pacientes donantes y receptores de ambos sexos y que comprendían de 0 a 80 años de edad provenientes de los distintos departamentos del país exceptuando el departamento de Pando que acudieron al instituto SELADIS con una orden medica para realizarse pruebas de tipificación HLA clase II durante las gestiones de 2000 a 2005.

No se incluyeron a 22 pacientes por no reportar el lugar de procedencia y la edad pero se obtuvo los datos del sexo del paciente.

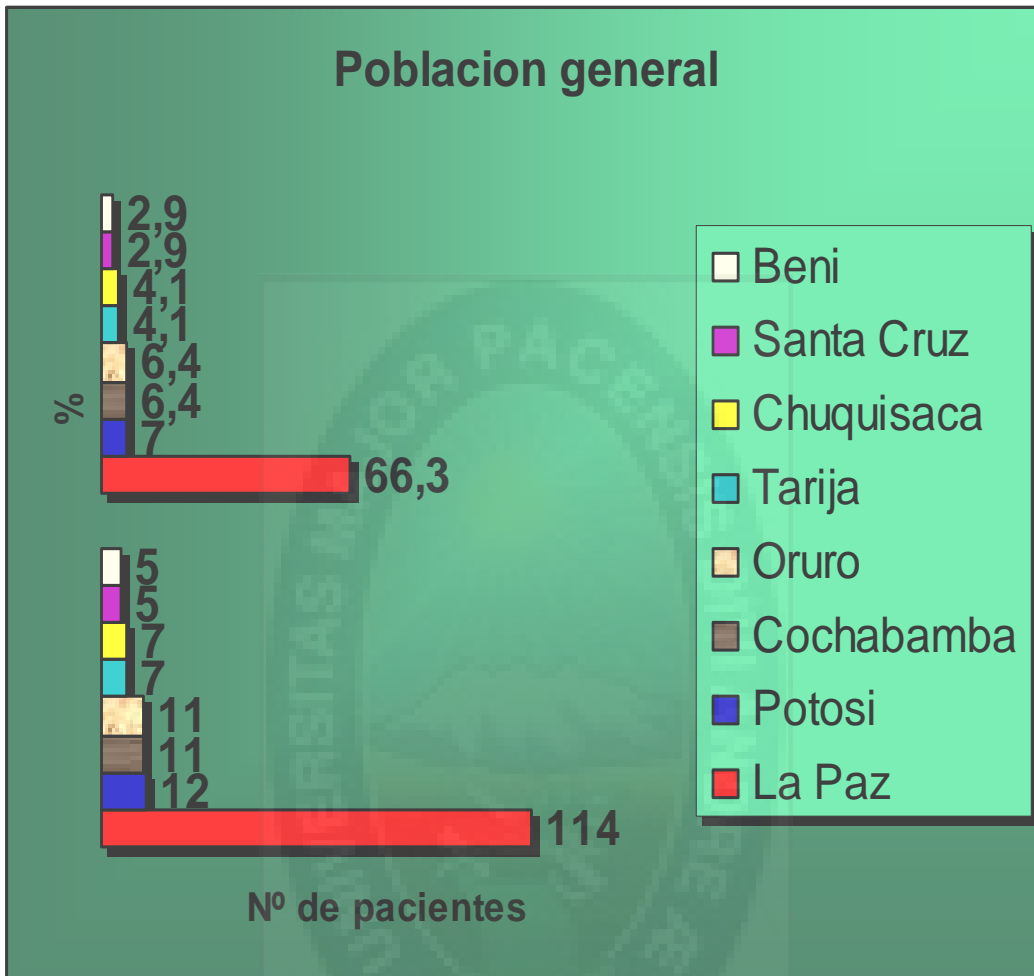


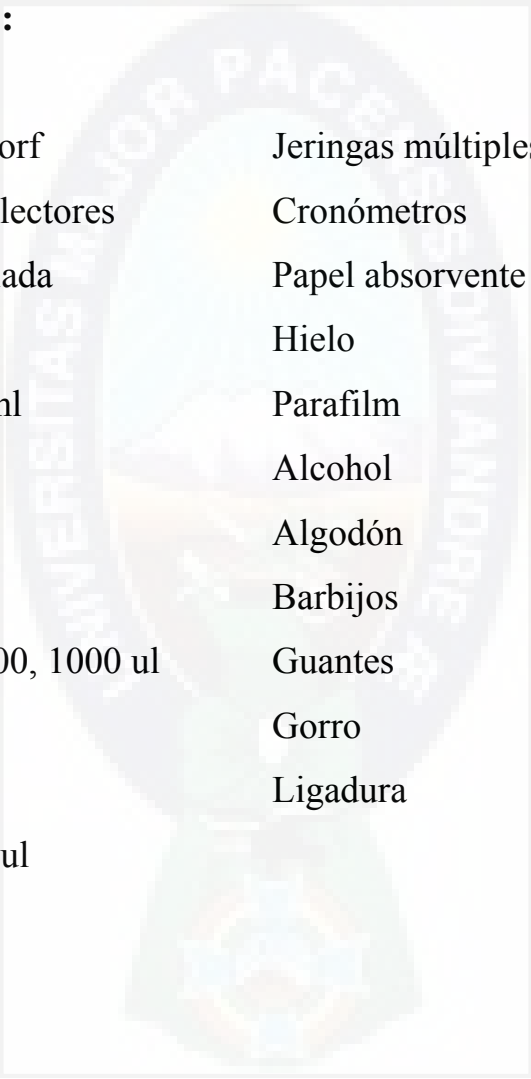
Grafico 1. Numero de pacientes atendidos según el lugar de origen del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS

B. TIPO DE ESTUDIO

Preliminar descriptivo de tipo transversal-retrospectivo y por conveniencia.

C. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

C.1. MATERIALES:



Gradillas para Eppendorf	Jeringas múltiples de 80 y 400 ul
Gradillas para tubos colectores	Cronómetros
Frascos con agua destilada	Papel absorbente
Tubos colectores	Hielo
Vaso precipitado 250 ml	Parafilm
Probeta 50 ml	Alcohol
Tubos Eppendorf	Algodón
Tray PCR	Barbijos
Micropipetas 20, 50, 200, 1000 ul	Guantes
Tips	Gorro
Jeringas de 10 ml	Ligadura
Jeringas simples de 80 ul	

C.2. EQUIPOS:

Campana L.U.V. Mod.14-1

Programmable Thermal Controller PTC – 100

Electrophoretic Gel System EC – 350

Micro ondas Edition – I Daewoo

Transiluminador FBTI – 88 Mod. Fisher Scientific

C.3. REACTIVOS:

EDTA K3	Bromuro de Etidio
RNAasa	H2O Inti
Isopropanol	Etanol 70 %
Buffer de resuspensión de DNA	Azul de metilo
Gel de Agarosa 2%	Taq DNA polimerasa (Promega)
Master Mix	Aceite mineral pesado
	TBE 0,5 X

D. METODOS

D.1 Extracción de DNA geonómico “Promega Wizard DNA genomic”.-

1. Se centrifugó 5 ml de la muestra de sangre periférica tomada en tubo Vacutainer con EDTA.K3 a 3000 rpm por 10 minutos
2. Se tomó 400 ul de la interfase y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, luego se agregó 900 ul de Buffer de lisis celular.
3. Se mezcló durante 20 segundos y se incubó durante 10 min. a 37°C en una estufa, luego se centrifugó a 14 000 rpm por 1,5 min.
4. Se desechó el sobrenadante y se secó el Eppendorf sobre papel absorbente.
5. Se agregó nuevamente al precipitado 900 ul de Buffer de lisis celular y repetimos los pasos 3 y 4.
6. Al precipitado se agregó 400ul de Buffer de lisis de núcleos y 1,5 de RNAsa, se mezcló con ayuda de una micropipeta hasta que las células agregadas se separaron lo más posible.

7. Se tapó con parafilm y se incubó a 37 °C durante 30 min. Luego atemperamos durante 2 min.
8. Se agregó 130 ul de Buffer de lisis de proteínas y mezclamos suavemente.
9. Centrifugamos a 14 000 rpm durante 10 min.
10. Transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo epenforf etiquetado con la ayuda de una micropipeta.
11. Se agregó 400 ul de Isopropanol y se mezcló suavemente por inversión (se noto el DNA precipitado). Luego se centrifugó a 14000 rpm durante 1,5 min.
12. Se desechó el sobrenadante y se secó el tubo en papel absorbente
13. Se agregó 1 ml de Etanol al 70 % se mezcló por inmersión y se centrifugó a 14 000 rpm durante 1,5 min.
14. Se volvió a repetir los pasos 12 y 13 por dos veces más (Total 3 lavados con etanol al 70 %).
15. Después se desechó el sobrenadante y se llevó a secar los tubos a un calentador (heating block) entre 50 y 75 °C durante 15 min.
16. Se resuspendió la muestra con el Buffer de resuspensión de DNA, tapamos el tubo con parafilm e incubamos en baño María a 65°C durante una hora
- 17.** Para observar la calidad del DNA extraído, realizamos una corrida electroforética en cámara de electroforesis horizontal a 150 V y 300 mA para este fin utilizamos 10 ul de la muestra.

D.2 Realización E del PCR-SSP “Dynal AllSet SSP – low resolution)

1. Se irradia con luz UV por 15 minutos todo el material necesario para la realización de la PCR: (Tips, micropipetas, aceite mineral pesado, hielo, guantes barbijos y gorros).
2. En el cuarto blanco se preparo el MIX en un tubo Eppendorf mezclando los siguientes reactivos: master mix, Taq DNA polimerasa (Promega).
3. En el cuarto azul se puso en contacto las muestras con los MIX, primeramente se resuspendió bien la muestra de DNA y se añadió al tubo Eppendorf que tenia el MIX preparado previamente.

	Master mix	Taq	Muestra	Vol. Final MIX
HLA DR	224,0 uL	2,24 uL	53,2 uL	279,44 uL
HLA DQ	80,0 uL	0,80 uL	19,0 uL	99,80 uL

4. Una vez mezclado todos los reactivos, se sembró en los tubos Tray PCR que venían con los primers para cada uno de los alelos HLA DR o DQ, el tray para HLA DR constaba de 24 tubos de 0,2 mL y el tray para HLA DQ constaba de 8 tubos de 0,2 mL. Se sembró en cada uno de los tubos 10 uL del MIX y se llevo al termociclador (Perkin Elmer 9600 o MJ PTC-100) para realizar el proceso de PCR. Tanto para el HLA DR como para el DQ los parámetros de ciclaje de PCR fueron los siguientes:

1	Desnaturalización	96 °C	2 min.	desnaturalización
2	10 ciclos	96°C 65°C	15 seg. 60 seg.	desnaturalización separación y extensión
3	20 ciclos	96°C 61°C 72°C	10 seg. 50 seg. 30 seg.	desnaturalización separación extensión

5. Mientras se realizaba el proceso de PCR se prepararon el gel de agarosa al 2% y el tampón TBE 0,5X (ver preparaciones en anexos).

6. Una vez finalizado el PCR se sembró 8 ul de los amplicones en los micropozos del gel de agarosa según el esquema proporcionado por el fabricante (ver anexos). Luego se realizó la electroforesis horizontal (150 V 300 mA por 10 minutos) utilizando el buffer TBE previamente preparado.

7. Terminada la electroforesis se llevo el gel al trasiluminador UV y se visualizaron las bandas de DNA.

8. Se saco fotografía de los geles para interpretar las bandas de DNA obtenidas según las recomendaciones del fabricante (ver anexos)

E. METODOS ESTADISTICOS

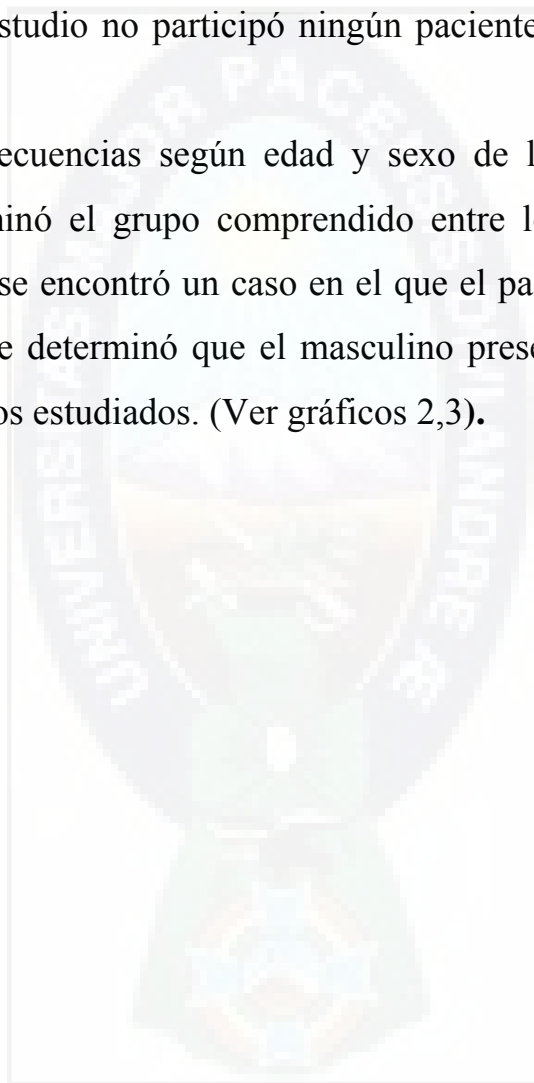
- Métodos estadísticos de aplicación en genética para determinar las frecuencias antigénicas y las frecuencias genéticas.
- La sistematización y análisis de los datos estadísticos se realizó manera automatizada con ayuda del paquete estadístico SSPS 12.0.



VII. RESULTADOS

Según el lugar de procedencia de los sujetos de análisis se determinó que en un 66,3% procedían del Departamento de La Paz y en un 7,0% del Departamento de Potosí, siendo los otros Departamentos de Bolivia menos frecuentes, en este estudio no participó ningún paciente del departamento de Pando.

Se analizaron las frecuencias según edad y sexo de los 194 pacientes. Se observó que predominó el grupo comprendido entre los 21 a 30 años que representan 24,4%, se encontró un caso en el que el paciente era menor a 10 años y según sexo se determinó que el masculino presentaba una frecuencia del 68,6% de los casos estudiados. (Ver gráficos 2,3).



NUMERO DE PACIENTES SEGUN EDAD

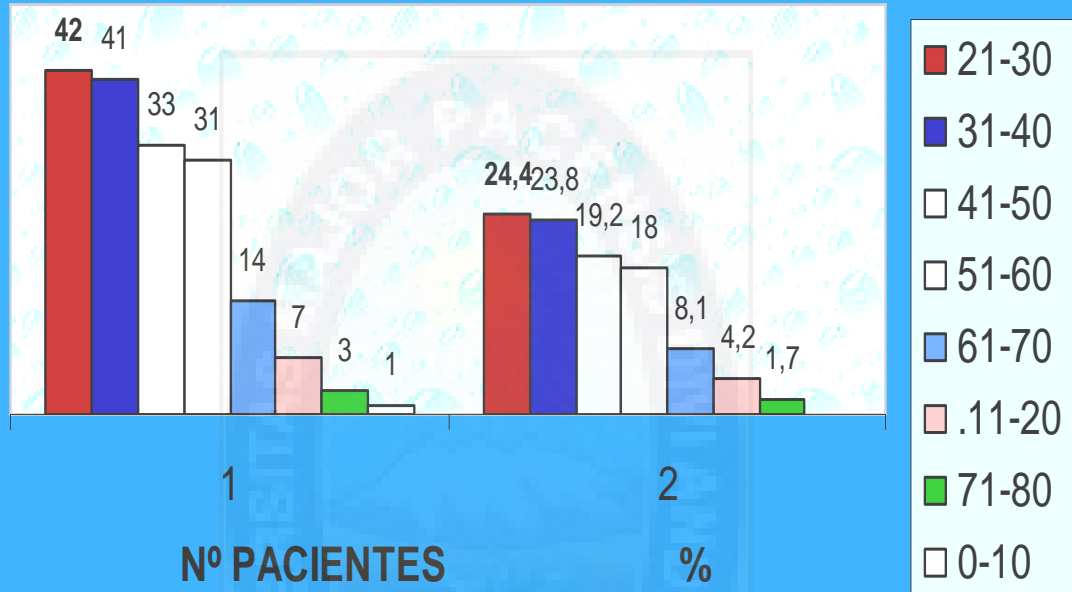


Gráfico. 2 Numero de pacientes según edad, obtenida de la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendido en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

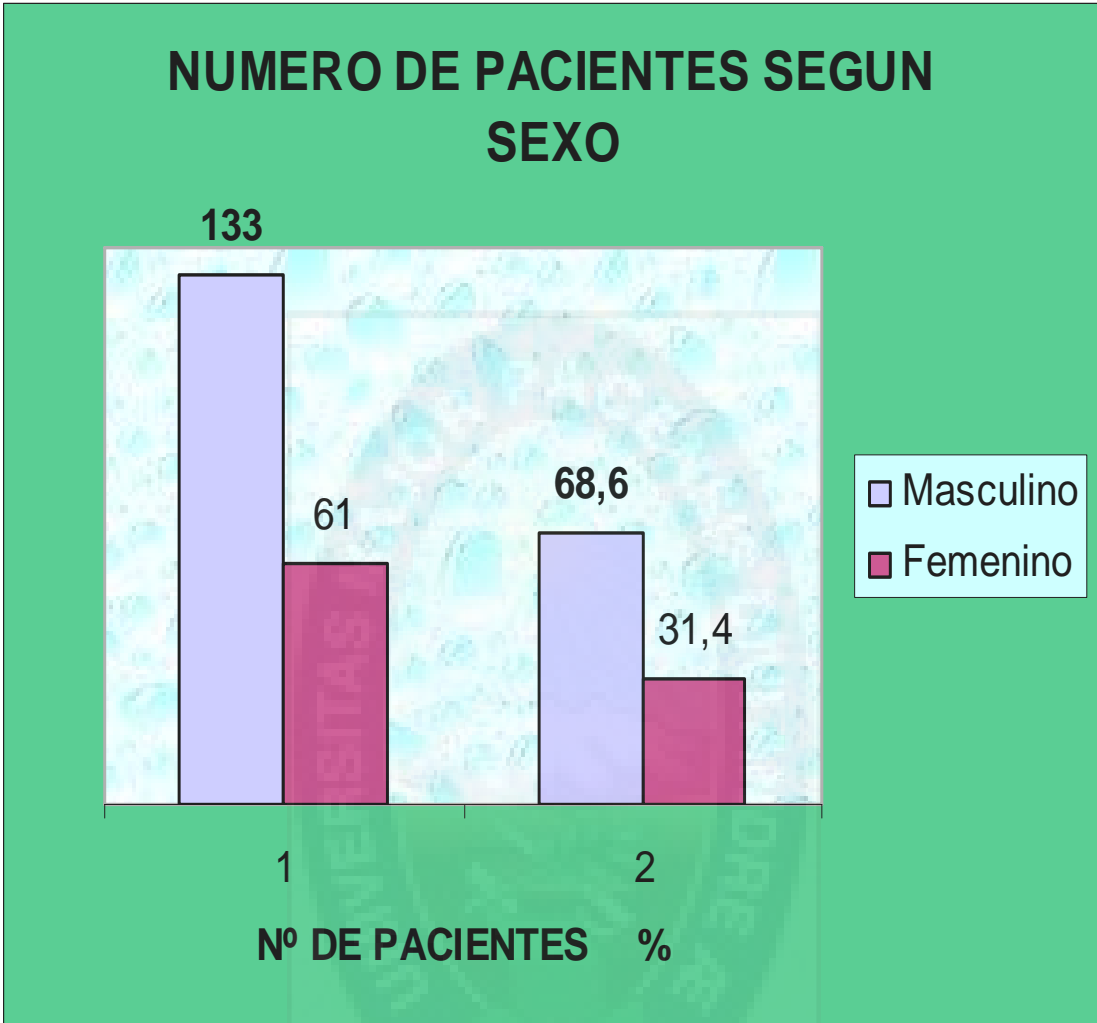


Grafico. 3 Numero de pacientes según sexo, obtenida de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

A. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA CLASE II EN LA POBLACIÓN GENERAL DE PACIENTES ATENDIDOS DURANTE EL PERIODO 2000 - 2005

En el análisis de las frecuencias alélicas de HLA clase II presente en los diferentes receptores y donantes, se observó que el loci DR y DQ más frecuentes son DRB1*04 (24,2%), el DRB1*08 (18,9%), el DQB1*301 (16,8%), el DQB1*302 (15,3%), el DRB4* (57,9%) y el DRB3* (35,0%) respectivamente.

Por el contrario los alelos menos frecuentes dentro la población general que se ha encontrado en este estudio corresponde a los siguientes: DRB1*10 (0,8%), DRB1*12 (0,5%), DQB1*12; 402; 505 (0,7%) DRB5* (7,1 %).

En las tablas 8, 9 y 10 se observan los alelos HLA clase II del locus DRB1*; DQB1*; y DRB* con los respectivos alelos y sus frecuencias alélicas a los cuales pertenece cada especificidad. (Ver tablas 5, 6,7).



Tabla 5. Frecuencias alélicas del locus DRB1* obtenidas de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB1*01	42	11,1

HLA DRB1*03	18	4,7
HLA DRB1*04	92	24,2
HLA DRB1*07	19	5,0
HLA DRB1*08	72	18,9
HLA DRB1*09	32	8,4
HLA DRB1*10	3	0,8
HLA DRB1*11	12	3,2
HLA DRB1*12	2	0,5
HLA DRB1*13	33	8,7
HLA DRB1*14	35	9,2
HLA DRB1*15	9	2,4
HLA DRB1*16	11	2,9
TOTAL	380	100,0

Tabla 6. Frecuencias alélicas del locus DQB1* obtenidas de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DQB1*	FRECUENCIA	(%)
HLA DQB1*01	12	9,2
HLA DQB1*02	9	6,9
HLA DQB1*03	3	2,3
HLA DQB1*04	15	11,5
HLA DQB1*05	10	7,6
HLA DQB1*06	9	6,9
HLA DQB1*07	4	3,1
HLA DQB1*12	1	0,7
HLA DQB1*201	2	1,5
HLA DQB1*301	22	16,8
HLA DQB1*302	20	15,3
HLA DQB1*303	15	11,5
HLA DQB1*401	2	1,5
HLA DQB1*402	1	0,7
HLA DQB1*505	1	0,7
HLA DQB1*5011	2	1,5
HLA DQB1*6011	3	2,3

TOTAL	131	100
-------	-----	-----

Tabla 7. Frecuencias alélicas del locus DR* obtenidas de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR*	ALELOS	FRECUENCIA (%)
HLA DR3*	75	35,0
HLA DR4*	124	57,9
HLA DR5*	15	7,1
TOTAL	214	100

B. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA CLASE II EN LA POBLACIÓN PACEÑA DE PACIENTES ATENDIDOS DURANTE EL PERIODO 2000 - 2005

En este estudio se tomaron en cuenta ciento catorce pacientes procedentes del departamento de La Paz, de los cuales la frecuencia alélicas de mayor frecuencia para el locus DR fueron; DRB1*04 (25,9%) y DRB1*08 (18,3%), (Ver tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias alélicas del locus DR obtenidas de la población paceña de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB1*01	27	12,1
HLA DRB1*03	17	7,6
HLA DRB1*04	58	25,9
HLA DRB1*07	8	3,6
HLA DRB1*08	41	18,3
HLA DRB1*09	18	8,0
HLA DRB1*10	3	1,3
HLA DRB1*11	8	3,6
HLA DRB1*12	1	0,5
HLA DRB1*13	18	8,0
HLA DRB1*14	15	6,7
HLA DRB1*15	5	2,2
HLA DRB1*16	5	2,2

TOTAL	224	100
-------	-----	-----

Para el locus DQ se determinó que los más frecuentes son; DQB1*301 (18,8%), DQB1*04 (12,2 %). De hecho el alelo representado por el Locus DQB1*301 en la población presenta la frecuencia más elevada, por el contrario los alelos menos frecuentes están representados por el locus; DQB1*201; 401; 402; 505; 6011 (1,4 %) respectivamente.

Tabla 9. Frecuencias alélicas del locus DQ obtenidas de la población paceña de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DQB1*	FRECUENCIA	(%)
HLA DQB1*01	6	8,1
HLA DQB1*02	6	8,1
HLA DQB1*03	2	2,7
HLA DQB1*04	9	12,2
HLA DQB1*05	7	9,3
HLA DQB1*06	5	6,8
HLA DQB1*07	2	2,7
HLA DQB1*12	2	2,7
HLA DQB1*201	1	1,4
HLA DQB1*301	14	18,8
HLA DQB1*302	8	10,8
HLA DQB1*303	8	10,8
HLA DQB1*401	1	1,4

HLA DQB1*402	1	1,4
HLA DQB1*505	1	1,4
HLA DQB1*6011	1	1,4
TOTAL	74	100

Para el locus DRB* los alelos más frecuentes fueron; DRB4* (59,3%), DRB3* (33,3%), por el contrario el locus menos frecuente es; DRB5* (7,4%) respectivamente.

Tabla 10. Frecuencias alélicas del locus DRB* obtenidas de la población paceña de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DRB*	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB3*	41	33,3
HLA DRB4*	73	59,3
HLA DRB5*	9	7,4
TOTAL	123	100

C. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA CLASE II EN LA DEL RESTO DE LA POBLACIÓN BOLIVIANA DE PACIENTES ATENDIDOS DURANTE EL PERIODO 2000 - 2005

58 pacientes conformaban el restante de la población boliviana de pacientes que participaron en este estudio. El análisis del locus DR determinó que los

más frecuentes eran: el DRB1*04 (21,5%), y DRB1*08 (17,7%) y los alelos menos frecuentes eran: DRB1*15 (2,5 %) y DRB1*11(3,2 %).

(Ver Tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias alélicas del locus DR obtenidas el resto de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB1*01	16	10,4
HLA DRB1*03	9	5,7
HLA DRB1*04	34	21,5
HLA DRB1*07	10	6,3
HLA DRB1*08	28	17,7
HLA DRB1*09	12	7,5
HLA DRB1*11	5	3,2
HLA DRB1*13	14	8,8
HLA DRB1*14	20	12,6
HLA DRB1*15	4	2,5
HLA DRB1*16	6	3,8
TOTAL	158	100

Para el locus DQ se determinó que los más frecuentes fueron: DQB1*301 (17,6 %), y DQB1* 302 (15,8%), por el contrario los alelos menos frecuentes representado por su locus son; el DQB1* 03; 201; 401(1,7 %). (Ver tabla 12)

Tabla 12. Frecuencias alélicas del locus DQ obtenidas el resto de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DQB1*	FRECUENCIA	(%)
HLA DQB1*01	6	10,5
HLA DQB1*02	3	5,3
HLA DQB1*03	1	1,7
HLA DQB1*04	6	10,5
HLA DQB1*05	3	5,3
HLA DQB1*06	4	7,1
HLA DQB1*07	2	3,5
HLA DQB1*201	1	1,7
HLA DQB1*301	10	17,6
HLA DQB1*302	9	15,8
HLA DQB1*303	7	12,3
HLA DQB1*401	1	1,7
HLA DQB1*5011	2	3,5
HLA DQB1*6011	2	3,5

TOTAL	57	100
-------	----	-----

Para el locus DRB* se determinó que los más frecuentes fueron; el DRB4* (56,1 %), y DRB3* (37,3 %), por el contrario el alelo menos frecuente para el locus DRB* es; DRB5* (6,6%). (ver Tabla 13)

Tabla 13. Frecuencias alélicas del locus DR obtenidas el resto de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DRB*	ALELOS	FRECUENCIA (%)
HLA DRB3*	34	37,3
HLA DRB4*	51	56,1
HLA DRB5*	6	6,6
TOTAL	91	100

D. FRECUENCIAS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS LOCI DRB1* Y DRB*

Se hizo el análisis de las asociaciones entre los alelos privados HLA DRB1* con los alelos públicos HLA DRB*, este ejercicio se hizo para determinar los casos en los cuales los alelos privados no están asociados en la manera esperada con sus respectivos alelos públicos. En la tabla 17 se observa que el alelo DRB1*01 no presentó asociación con alelo público DRB5*. Los alelos DRB1*07 y DRB1*12 mostraron estar asociados en el 100% de los casos con sus respectivos alelos públicos DRB4* y DRB3* respectivamente. Los alelos

DRB1*03 (33,33%), DRB1*11 (25,00%), DRB1*13 (24,24%) y DRB1*14 (20,00%) mostraron que en la mayoría de los casos pueden no ir asociados a su alelo público DRB3*. También en los resultados se muestra que los alelos públicos DRB1*04 (15,22%) y DRB1*09 (3,12%) pueden no ir asociados a su alelo público DRB4*. En el caso del alelo público DRB5* se encontró que los alelos privados DRB1*16 (18,18%) y DRB1*15 (11,11%) también presentan casos en que no están asociados a su respectivo alelo público.

Tabla 14. Determinación del grado de asociación entre los alelos privados HLA DRB1* y los alelos públicos HLA DRB*. Se resaltan el DRB1*08 y 10 porque nunca van asociados alelos públicos.

Locus DR, DRB*	Numero de Combinaciones	Frecuencia	Frecuencia
HLA DRB1*01	42	-----	-----
HLA DRB1*03	6	33,33	33,33
HLA DR*03,DRB3*	12	-----	-----
HLA DRB1*04	14	15,22	15,22
HLADR*04,DRB4*	78	-----	-----
HLA DRB1*07	0	0,00	0,00
HLADR*07,DRB4*	19	-----	-----
HLA DRB1*08	72	-----	-----
HLA DRB1*09	1	3,12	3,12
HLADR*09, DRB4*	31	-----	-----
HLA DRB1*10	3	-----	-----
HLA DRB1*11	3	25,00	25,00

HLA DR*11,DRB3*	9	2,37	2,37
HLA DRB1*12	0	0,00	0,00
HLA DR*12, DRB3*	2	-----	-----
HLA DRB1*13	8	24,24	24,24
HLADR*13, DRB3*	25	-----	-----
HLA DRB1*14	7	20,00	20,00
HLA DR*14, DRB3*	28	-----	-----
HLA DRB1*15	1	11,11	11,11
HLADR*15, DRB5*	8	-----	-----
HLA DRB1*16	2	18,18	18,18
HLA DR*16, DRB5*	9	-----	-----
TOTAL	380		

E. FRECUENCIAS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS LOCI DRB1* Y DQB1*

Se hizo el análisis de los 66 pacientes que se realizaron tipificación HLA-DR y HLA-DQ. El análisis mostró que los alelos DRB1*04-DQB1*301 (4,8%), DRB1*04-DQB1*302 (4,8 %) y DRB1*14-DQB1*04 (4,8 %) son los que presentaron la frecuencia más representativa en la población analizada.

Otros alelos que mostraron tener una alta frecuencia en nuestra población fueron: DRB1*08-DQB1*04 (4,0%), y el DRB1*08-DQB1*07 (4,0%).

El resto de la combinación de alelos DR-DQ mostró tener una baja frecuencia para ser tomada en cuenta. (Ver Tabla 15).

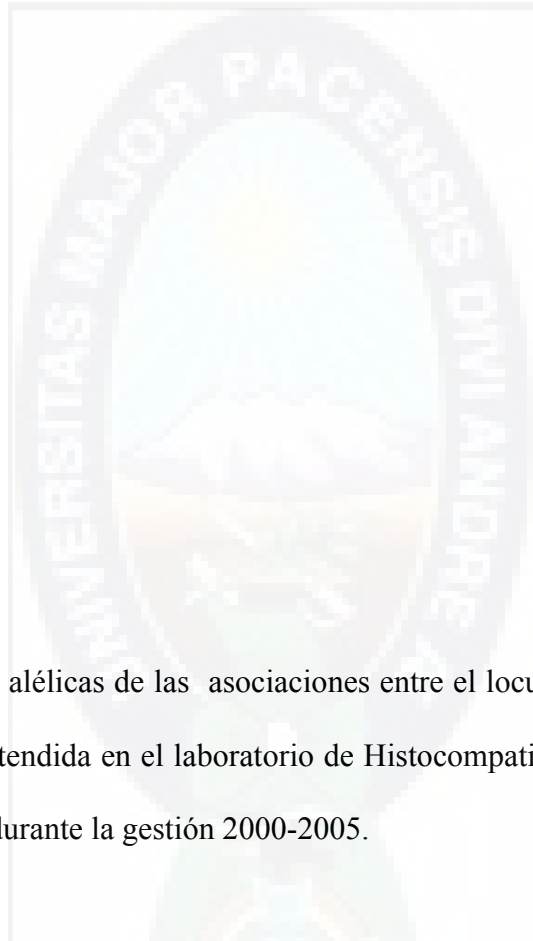


Tabla 15. Frecuencias alélicas de las asociaciones entre el locus DR - DQ obtenidas de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DRB1*,DQ	FRECUENCIAS	(%)
HLA DRB1*01,DQB1*01	2	1,6
HLA DRB1*01,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*01,DQB1*06	2	1,6
HLA DRB1*01,DQB1*301	1	0,8
HLA DRB1*01,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*01,DQB1*5011	2	1,6

HLA DRB1*03,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*03,DQB1*02	2	1,6
HLA DRB1*03,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*03,DQB1*301	1	0,8
HLA DRB1*03,DQB1*302	2	1,6
HLA DRB1*04,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*02	2	1,6
HLA DRB1*04,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*12	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*301	6	4,8
HLA DRB1*04,DQB1*302	6	4,8
HLA DRB1*04,DQB1*6011	2	1,6
HLA DRB1*07,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*02	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*201	2	1,6
HLA DRB1*07,DQB1*301	2	1,6
HLA DRB1*07,DQB1*302	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*02	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*04	5	4,0
HLA DRB1*08,DQB1*07	2	1,6
HLA DRB1*08,DQB1*301	5	4,0
HLA DRB1*08,DQB1*302	1	0,8

HLA DRB1*08,DQB1*303	3	2,4
HLA DRB1*08,DQB1*401	1	0,8
HLA DRB1*10,DQB1*04	2	1,6
HLA DRB1*10,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*09,DQB1*02	3	2,4
HLA DRB1*09,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*09,DQB1*05	1	0,8
HLA DRB1*09,DQB1*301	4	3,2
HLA DRB1*09,DQB1*302	2	1,6
HLA DRB1*09,DQB1*303	4	3,2
HLA DRB1*09,DQB1*505	1	0,8
HLA DRB1*11,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*11,DQB1*05	2	1,6
HLA DRB1*11,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*11,DQB1*301	2	1,6
HLA DRB1*11,DQB1*302	1	0,8
HLA DRB1*12,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*12,DQB1*301	1	0,8
HLA DRB1*13,DQB1*01	2	1,6
HLA DRB1*13,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*13,DQB1*05	3	2,4
HLA DRB1*13,DQB1*302	4	3,2
HLA DRB1*13,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*04	6	4,8
HLA DRB1*14,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*302	2	1,6
HLA DRB1*14,DQB1*303	1	0,8

HLA DRB1*14,DQB1*6011	1	0,8
HLA DRB1*15,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*15,DQB1*04	2	1,6
HLA DRB1*15,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*05	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*302	1	0,8
TOTAL	125	100

VIII. DISCUSION

En este estudio se analizaron las frecuencias alélicas HLA clase II de los loci DR y DQ de 194 pacientes provenientes de diferentes ciudades del país que acudieron al laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto de SELADIS de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas.

Para este estudio se tomaron en cuenta a todos los pacientes de nacionalidad boliviana, de estos el 66,3 % correspondía a la población paceña al restante 33,7% se los considero restante de la población boliviana. La edad más

frecuente que tenían los pacientes que asistieron al servicio de laboratorio estaba comprendida en el grupo de 21 a 30 años (24,4%), pero se hace notar que el grupo comprendido entre 31 a 40 años (23,8%) también tenía una frecuencia representativa. Es importante hacer notar que se ha tenido 17 casos en que los receptores estaban comprendidos entre las edades de 61 a 80 años de edad, siendo que la expectativa de vida en nuestro país es de 65,8 años de edad ⁽³⁵⁾ y que muchos clínicos son renuentes a realizar el transplante renal a personas mayores de 60 años ^(36, 37)

Los pacientes del sexo masculino (66,8%) son los que más frecuentemente se realizan las pruebas para transplante renal, estos valores son similares a los reportados por Muradás y Cols., ⁽³⁸⁾ en el cual en su estudio con 50 pacientes encontró que la frecuencia del sexo masculino era del 76%. Por otro lado Arancibia y Cols., ⁽³⁹⁾ en el año 2002 en el Hospital Comandante Pinares de San Cristóbal (España) determinó el predominio que el grupo comprendido entre los 40 a 49 años (42,4%) era el más frecuente, siendo el sexo masculino (71,4%) también el frecuente en la población estudiada.

Al analizar las frecuencias alélicas del locus DR se observó que en la población general de pacientes (población boliviana) los alelos más frecuentes eran el DRB1*04 (24,2%) y el DRB1*08 (18,9%). Se hizo una comparación entre las frecuencias alélicas de la población paceña que son más frecuentes DRB1*04 (25,9%) y DRB1*08 (18,3%) frente al resto de la población boliviana (excepto La Paz) DRB1*04 (21,5%) y DRB1*08 (17,7%), este análisis mostró que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos poblacionales. Sánchez ⁽⁴⁷⁾ en el año 2002 encontró que en la población boliviana la mayor frecuencia alélicas correspondía al DRB1*08 (21,2%), DRB1*04 (18,2 %) y el DRB1*07 (10,6 %). Otro estudio similar realizado

por Téllez y col⁽⁴⁸⁾ en el año 1998 encontraron que los mas frecuentes eran el DRB1*04 (15,0%), DRB1*09 (8,0%) en la población mestiza, DRB1*04 (38,8%), DRB1*08 (25,0%) en el oriente boliviano. Díaz Mendoza y col⁽⁴⁰⁾ en el año 2002 encontraron que en la población mexicana las frecuencias alélicas más frecuentes correspondían al DRB1*04, DRB1*08, DRB1*11 y el DRB1*15. Cervantes⁽⁴¹⁾ en su estudio en población peruana encontró que los alelos más frecuentes eran DRB1*11 y DRB1*13. En un estudio similar en la población brasileña de Sao Paulo Golberg y cols⁽⁴²⁾, encontraron que los alelos más frecuentes eran DRB1*13, DRB1*11 y DRB1*04. Es importante hacer notar que los alelos DRB1*11 y DRB1*04 se presentan como patrones característicos en estas poblaciones.

El análisis las frecuencias alélicas del locus DQ mostró que la población boliviana los alelos más frecuentes eran el DQB1*301 (16,8%) y el DQB1*302 (15,3%). Se hizo una comparación entre las frecuencias alélicas de la población paceña que mostró como los más frecuentes al DQB1*04 (12,2%) y DQB1*301 (18,8%) frente al resto de la población boliviana que mostró como los más frecuentes al DQB1*301 (17,6%) y DQB1*302 (15,8%), este análisis al igual que en el locus DR tampoco mostró una diferencia significativa entre ambos grupos poblacionales. Estos datos fueron diferentes a los reportados por Díaz. Mendoza y col⁽⁴⁰⁾, que encontraron en la población mexicana que las frecuencias alélicas más representativas eran: DQB1*04, DQB1*05. También el estudio realizado por Sánchez⁽⁴⁷⁾ encontró que en la población boliviana los mas frecuentes eran: DQB1*03 (43,9%) y el DQB1*04 (20,4%). Téllez y col.⁽⁴⁸⁾ en el año 1998 muestra que los mas frecuentes eran: DQB1*03 (17,0%), DQB1*01 (15,0%) y DQB1*02 (15,0%) en la población mestiza, DQB1*04 (38,8%) y el DQB1*03 (29,3%) en el oriente boliviano. Zuzet Martínez y col.⁽⁴³⁾ en el 2004 muestra que en la

población cubana presentaba los alelos: DQB1*301 y el DQB1*02. Minbacas y col⁽⁴⁴⁾ en el año 1998 encontró que la población uruguaya presentaba a los alelos DQB1*301 y DQB1*202 como los más frecuentes. Rojas N. y col⁽⁴⁵⁾ en 1995 encontró que la población colombiana presentaba a los alelos DQB1*02 (24,30%), DQB1*04 (21,26%) y el DQB1*05 (20,79%) como los más frecuentes. Estos trabajos nos muestran que la población latina presenta ciertos alelos que se conservan en la población pero también nos muestra que cada población se caracteriza por presentar determinada incidencia de alelos HLA.

Se hizo el análisis de las asociaciones entre los locus DR y DQ de 66 pacientes que correspondían a la población boliviana llegándose a determinar que los alelos que están más frecuentemente asociados en nuestra población en un 4,8% cada uno de los casos eran: DRB1*04/DQB1*301, DRB1*04/DQB1*302 y DRB1*14/DQB1*04. Golberg y Cols⁽⁴²⁾ encontraron en un estudio en población brasileña a los alelos DRB1*11/DQB1*0602, DRB13/DQB1*0301, DRB16/DQB1*0301, como las asociaciones de alelos más frecuentes. Sánchez⁽⁴⁷⁾ en el año 2002 encontró que en la población boliviana los más frecuentes eran: DRB1*04/DQB1*03 (19,6%) y el DRB1*08/DQB1*04 (12,2%). Entre tanto Piazza⁽⁴⁶⁾ en 1991 en la población española encontró que los alelos que se presentan más frecuentemente eran DRB1*04/DQB1*04, DRB1*07/DQB1*02, DRB1*03/DQB1*07. Estos resultados nos permiten inferir que nuestra población desde el punto de vista del sistema HLA tiene un gran componente español.

En este estudio se considero importante determinar la frecuencia en la cual los alelos públicos HLA-DRB3*, DRB4* y DRB5* pueden estar asociados a los alelos privados HLA-DRB1* ya que la bibliografía nos dice por ejemplo que los alelos privados HLA-DRB1*04, 07 y 09 están asociados con el alelo

público HLA-DRB4* y los mismo ocurre con los demás alelos privados excepto DRB1*08 y DRB1*10 que siempre van solos, lamentablemente no se tiene datos acerca de la posibilidad de encontrar a los alelos privados sin su respectivo alelo público. Como era de esperarse los alelos DRB1*08 y DRB1*10 no presentaron asociación con ninguno de los alelos públicos. Los alelos DRB1*07- DRB4* y DRB1*12- DRB3* mostraron que van juntos en el 100% de los casos analizados. Por el contrario se observó que los alelos DRB1*03 (33,33%), DRB1*11 (25,0%), DRB1*13 (24,24%) y DRB1*14 (20,0%) mostraron que no siempre pueden estar asociados a su alelo público DRB3*. En el caso del alelo público DRB4* se encontró que sus alelos privados DRB1*04 (15,2%) y DRB1*09 (3,12) también pueden no estar asociados. Similar hallazgo se encontró con los alelos privados DRB1*15 (11,11%) y DRB1*16 (18,18%) que mostraron casos en los que no estaban asociados al DRB5*. Este análisis mostró que el ligamiento de los alelos privados del DRB4* y DRB5* son más fuertes que los del DRB3*. Un hallazgo sorprendente fue el caso del DRB1*01 que no presento ninguna asociación con su alelo público DRB5*.

IX. CONCLUSION

Se logró determinar las frecuencias alélicas de los Loci HLA-DRB1* y DQB1* en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante las gestiones 2000 a 2005.

La edad más frecuente en la población atendida estaba comprendía entre los 21 a 30 años (24,4%), pero también presentó una frecuencia representativa el

grupo comprendido entre 31 a 40 años (23,8%), siendo el sexo masculino (68,6%) el más frecuente en la población estudiada.

Se determinó que las frecuencias de los locus HLA DR, DRB* y DQ más frecuentes en la población de pacientes atendidos fueron: HLA-DRB1*04 (24,2 %), DRB1*08 (18,9%), DRB3* (35,0%), DRB4*(57,9%), DQB1*301(16,8%) y DQB1*302 (15,3%).

Se determinó que no todos los alelos privados del locus DR van a ir asociados a sus respectivos alelos públicos (ver tabla 13) salvo las excepciones de los alelos DRB1*07- DRB4* y DRB1*12- DRB3* que mostraron que van asociados en el 100% de los casos con su alelo público.

Los alelos de los loci HLA-DR y HLA-DQ que más frecuentemente se encontraban asociados en la población de pacientes estudiados fueron: DRB1*04/DQB1*301 (4,8%), DRB1*04/DQB1*302 (4,8%) y DRB1*14/DQB1*04 (4,8%).

X. BIBLIOGRAFIA

1. SNELL G, et al. Expression of Major Histocompatibility Complex class II and costimulatory molecules in oral carcinomas in vitro. Caracas-Venezuela. 1ed. 2004
2. DOBROVOLNÁ M, VRANÁ M, BRDIČKA R, LOUDOVÁ M. National Referential Laboratory for DNA Diagnostics of the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic Stem Cells 145. N1.2006 pag

3. RIVERA S, et al. Caracterización molecular de los antígenos HLA-CLASE I de la población Barí del estado Zulia. Maracaibo: Editorial Ciencias Medicas. 2004.
4. WILLIAMS T. Human Leukocyte Antigen Gene Polymorphism and the Histocompatibility Laboratory. Mexico. 3ed. 2001
5. DEGIOANNI A, DARLU P, RAFFOUX C. Analysis of the French National Registry of unrelated bone marrow donors, using surnames as a tool for improving geographical localisation of HLA. European Journal of Human Genetics (2003) 11, 794–801
6. LAURA E, DIPIERRI J, GUTIÉRREZ N, VULLO C. Frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA en el Noroeste argentino. Argentina. 1Ed. 2000.
7. PARADOA M, MIDDLETON D, ACOSTA A, MARÍA E. SARMIENTO M. Genes HLA en una muestra de la población cuba. La Habana. 1ed. 1998
8. MARGNI, Ricardo. La respuesta inmune. In Revista de Divulgación Científica y Tecnología de la Asociación Ciencia Hoy. Vol 6, N° 36, 1997
9. BUYSE I, DECORTE R, BAENS M, CUPPENS H, SEMANA G, EMONDS MP, et al. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. Tissue Antigens 1993;41: 1-

10. PALOMO, Iván y Cols. Fundamentos de Inmunología. Talca: Editorial Universidad de Talca, 1998. 727 p.
11. ZINKERNAGEL R.M Doherty Pc. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis: Nature 1974; 215: 547-8
12. DOHERTY Pc, ZINKERNAGEL R. Enhanced immune surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Nature 1975; 256: 50-2
13. BUGAWAN TL, BEGOVICH AB, ERLICH HA. Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. Immunogenetics 1990;32: 231-41.
14. BUYSE I, DECORTE R, BAENS M, CUPPENS H, SEMANA G, EMONDS MP, et al. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. Tissue Antigens 1993;41: 1-14.
15. REVEILLI JD, SPENCER CH, RIVAS-CHACON R, MYONES B. HLA-DRB1, DQB1 and DPB alleles in children with Juvenile Arthritis From three Ethnic groups. Arthritis Rheum 40(9):S241,1997
16. WILLIAMS A, Peh CA, Elliott T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. Tissue Antigens 2002; 59(1): 3-17.

17. ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Cellular and molecular immunology. Filadelfia: W.B. Saunders 1994.
18. BROWS HJ, JARDETZKY TS, GORGA JC, STERN LJ, URBAN RG, STROMINGER JL et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 1993; 364: 33-39.
19. CARRASCAL Pérez M. Estudio de la vía de presentación por moléculas de histocompatibilidad de clase II mediante estrategias proteómicas (Tesis doctoral). Barcelona, Editorial: Científico – Técnica, 1999
20. MONACO,J.J. (1993): Structure and function of genes in the MHC class II region.Curr.Opin.Immunol., 5:17-20.
21. SOLANA R, FERNÁNDEZ N, GONZÁLEZ R, GARCÍA José, PEÑA J. Moléculas de Histocompatibilidad. Madrid. Editorial: Científica Medica,1999
22. O'CALLAGHAN,C.A. and Bell,J.I. (1998): Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. Immunol.Rev., 163:129-138.
23. ANDERSSON G, ANDERSSON L, LARHAMMAR D, RASK L, SIGURDARDÓTTIR S. Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. Immunology Today 1994; 15: 58-62-
24. ESTUPIÑÁN Sandra, TRUJILLO Esperanza. Complejo mayor de histocompatibilidad y desarrollo de vacunas. Bogotá. Editorial: Ciencias Medicas, 2004

25. ABBAS A, LICHTMAN A. Complejo principal de histocompatibilidad. En: Inmunología celular y molecular. España: McGraw Hill Interamericana; 2000. p: 66-81.
26. BOZON, JC, et al. Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase Chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. Tissue Antigens 1996; 47: 512-18
27. HORTON R, WILMING L, RAND V, LOVERING RC, BRUFORD EA, KHODIYAR VK, LUSH MJ, POVEY S, TALBOT CC Jr, WRIGHT MW, WAIN HM, TROWSDALE J, ZIEGLER A, BECK S. Gene map of the extended human MHC. Nat Rev Genet. 2004, 5: 889-99.
28. MORRIS CR, REBER AJ, PETERSEN JL, VARGAS SE, SOLHEIM JC. Association of intracellular proteins with folded major histocompatibility complex class I molecules. Immunol Res. 2004, 30:171-9.
29. WATTS C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. Nat Immunol. 2004, 5: 685-92.
30. MÁRMOL A, HERRERA VR, MORENO VD. Ética del trasplante. Reflexiones en el campo de la Nefrología. Bioética desde una perspectiva cubana. La Habana: Centro "Félix Varela" ; 1997: 246 – 53

31. HERRERA R, RAMÍREZ A. Los problemas éticos en el desarrollo de la Biología y la Medicina contemporánea. Filosofía y medicina. La Habana: Editorial de Ciencias Sociales. 1987
32. WEISINGER JR, MÍAN CL, BELLARIN – FONT E. Aspectos éticos, sociales y económicos en la diálisis y trasplante renal. Insuficiencia Renal Crónica. T1. 1997, vol2: 1833 – 37 HLA DRB*
33. DAAR AS, SALAHUDEEN AK, PINLE A. Ethics and commerce in live donor renal transplantation: Clasification of live donor. Transplantation Proceeding 1990;22:922-24
34. WATTS C. Xenotransplantation: Un nouvel espoir pour la transplantation d'organo. Hamburger J. Actualites Nephrologiques. Paris. Medicine-Sciences 1991: 351-363
35. HLA REVIEW, VERSION 2.5. ASHI procedure manual, 2000. http://www.indexmundi.com.90/es/bolivia/expectativa_de_vida_al_nacer.html
36. SAUDAN P, BERNEY T, et al. Trasplante Renal en Ancianos: Pronóstico a Largo Plazo. 1ed. España: 2000
37. Brandão de Carvalho AL, Galdino J, Cavalcante MV, López O. Medicina legal, Brasil: Editorial Ciencias Medicas, 1997
38. MURADAS R, GARCIA M. Diálisis peritoneal ambulatoria continua en el tratamiento de insuficiencia renal crónica. Rev Med 1986;21:336-341

39. ARANCIBIA L, RODRIGUEZ L, ARENCIBIA F, SERRANO A, CRUZ S. Factores de riesgo y complicaciones cardiovasculares en pacientes en diálisis peritoneal, 1ed. España 1999
40. DIAZ M, GONZALES A, CERDA R, ROJAS M. Frecuencias alélicas de HLA-DR y HLA-DQ en población mestiza del noreste de México. México. 1ed. 2000
41. CERVANTES M. HLA y enfermedades en la población de Lima. Perú. 1ed. 1995
42. GOLBERG P et al. Procedimiento de la búsqueda de donantes histocompatibles emparentados para el transplante renal en pacientes de la población de Sao Pablo. Brazil. 1ed. 1999
43. MARTINEZ Z et al. Frecuencia de antígenos HLA en la población cubana, según características étnicas. Cuba. 1 ed. 1998
44. Mimbacus A, González S, Cardoso H, Poggio R, Jwiel G, García S, Bueno M et,al. Alelos HLA-DQ y diabetes mellitus tipo I. Rev. Uruguay Salud publica/Ur Public Health 1998; 14 (216).
45. ROJAS N et al. Frecuencias genicas del sistema HLA clase I y II en una

población de la ciudad de Bogotá. Colombia. 1ed. 1995

46. PÍAZZA A, FAUCHET R, RICHIARDI P, CARCASSI C, CONTU L. Anthropology report: Begian, French, Italian, Portugese, Sardin and Spanish population. Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Worshop and Conference. 1 ed . EEUU., 1991.
47. SANCHEZ L. Introducción a la Histocompatibilidad Humana (Año Sabático) 2002. Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz.
48. TELLEZ M. Determinación de parámetros básicos en Histocompatibilidad, frecuencias de especificidades serologicas HLA, Haplotipicas y Desequilibrio de ligamiento en la población mestiza boliviana y asociación de parámetros en pacientes con patología renal Terminal de diversa etiología. (Tesis de grado) 1998. . Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz.

ANEXOS



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO SELADIS



Determinación de las frecuencias alélicas de los Loci HLA-DRB1* y DQB1* en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante las gestiones 2000 a 2005.

ELABORADO POR:

UNIV. AMERICO MALDONADO ALANOCA

Introduccion



Justificacion

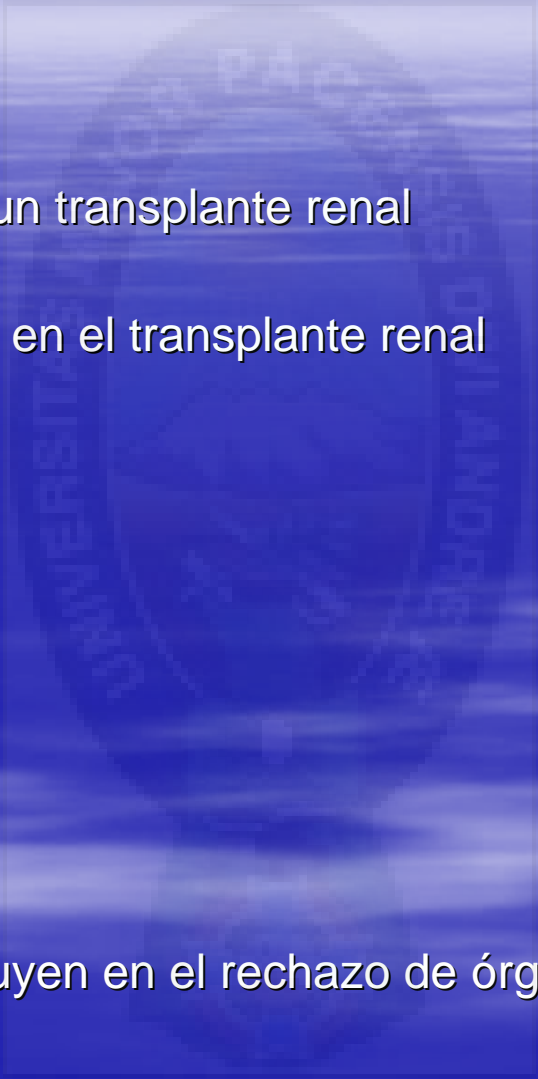


Antecedentes

- El sistema HLA se encuentra dividido en tres grupos
- Estudios realizados de la MHC en Sudamérica
- Estas investigaciones motivan a la realización de un estudio similar en nuestro país

Marco Teórico

- El descubrimiento de MHC
- Localización de los genes de MHC
- Estructura de los genes de MHC clase I y II
- Mecanismo de generación del polimorfismo
- Polimorfismo de la MHC clase II
- Expresión y regulación de MHC
- Tipificación de MHC por diferentes métodos
- Historia del transplante

- 
- Evaluación para un trasplante renal
 - Tipos de rechazo en el trasplante renal
 - Hiperagudo
 - Acelerado
 - Agudo
 - Crónico
 - Factores que influyen en el rechazo de órganos

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

1. Determinar las frecuencias alélicas de los Loci HLA-DRB1* y DQB1* en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante las gestiones 2000 a 2005.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar, la edad y el sexo que son más frecuentes en los pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar cuales son los Locus HLA-DR que son más frecuentes en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar cuales son los Locus HLA-DRB* que son más frecuentes en la población paceña de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.

- Determinar cuales son los Locus HLA-DQB1* que son más frecuentes en la población de pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar la frecuencia de la asociación entre los alelos privados del locus DR y sus respectivos alelos públicos pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.
- Determinar la frecuencia de asociación entre los alelos HLA - DR / HLA - DQ en la población pacientes del Programa Nacional de Transplante Renal atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS.

Diseño Metodológico

- Población en estudio
- Métodos
- Extracción de DNA geonómico “ Promega Wizard DNA geonomic “
- Realización del PCR- SSP “ Dynal AllSet SSP-low resolution”

Resultados

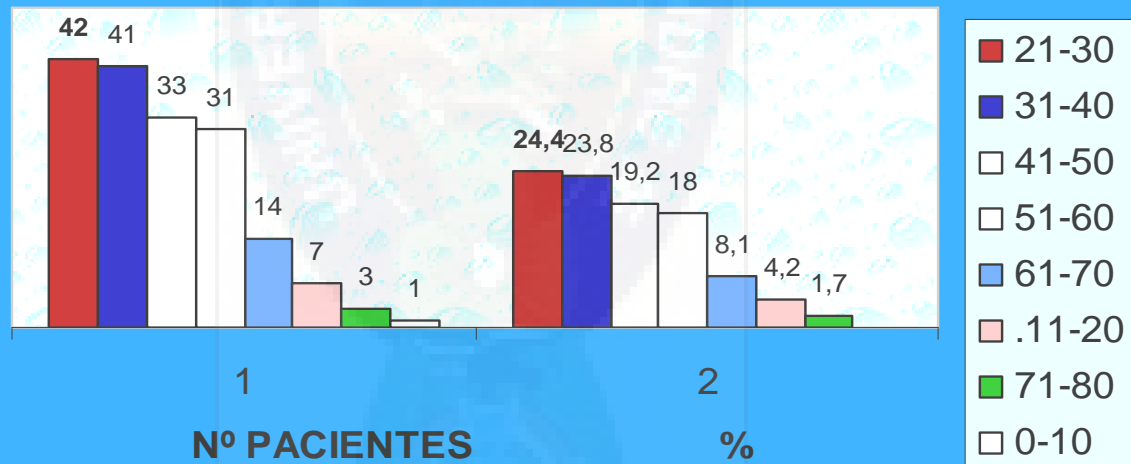
- Según Lugar de procedencia
 - La Paz 63.3 %
 - Potosi 7.0 %
- Se analizaron frecuencia según edad y sexo
 - Entre 21 – 30 años (24.4 %)
 - El sexo masculino representa 68,6%

Población General

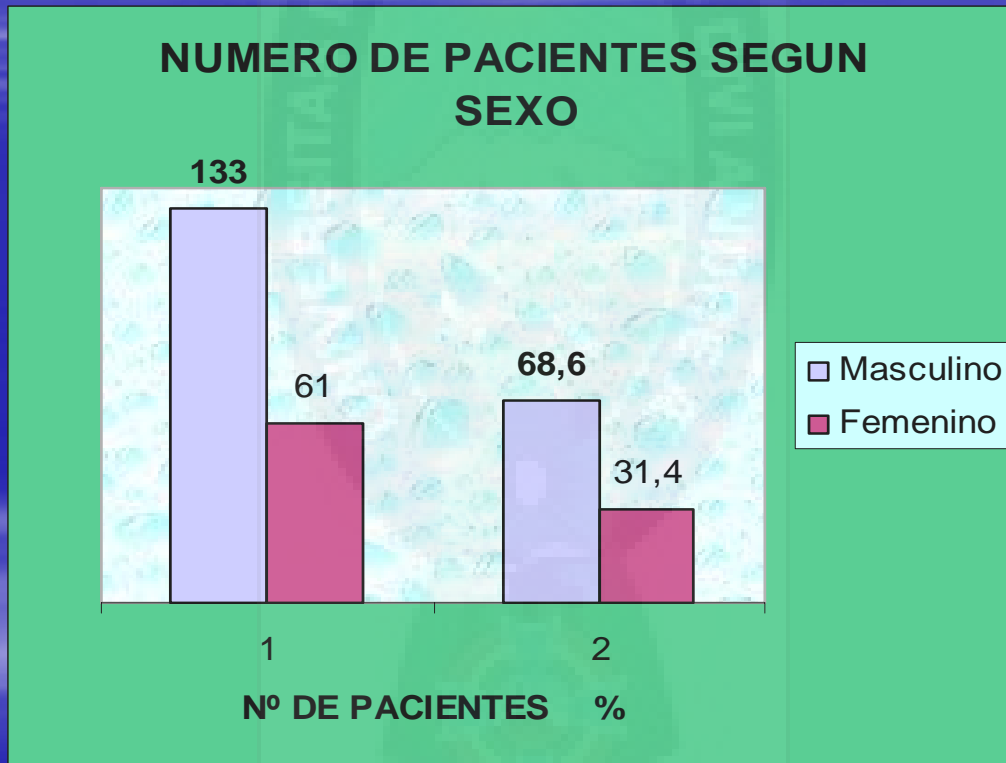


Pacientes según edad

NUMERO DE PACIENTES SEGUN EDAD



Pacientes según sexo



Análisis de las frecuencias alélicas HLA clase II en la población general

- Entre los mas representantes entre donantes y receptores fueron:
 - DRB1*04 (24,2%) y el DRB1*08 (18,9%)
 - DQB1*301 (16,8%) y el DQB1*302 (15,3%)
 - DRB4* (57,9%) y DRB3* (35,0%)
- Los alelos menos frecuentes fueron:
 - DRB1*10 (0,8%) y el DRB1*12 (0,5%)
 - DQB1*12; 402; 505 (0,7%)
 - DRB5* (7,1%)

Frecuencias alélicas del locus DRB1* obtenidas de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB1*01	42	11,1
HLA DRB1*03	18	4,7
HLA DRB1*04	92	24,2
HLA DRB1*07	19	5,0
HLA DRB1*08	72	18,9
HLA DRB1*09	32	8,4
HLA DRB1*10	3	0,8
HLA DRB1*11	12	3,2
HLA DRB1*12	2	0,5
HLA DRB1*13	33	8,7
HLA DRB1*14	35	9,2
HLA DRB1*15	9	2,4
HLA DRB1*16	11	2,9
TOTAL	380	100,0

Frecuencias alélicas del locus DQB1* obtenidas de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DQB1*	FRECUENCIA	(%)
HLA DQB1*01	12	9,2
HLA DQB1*02	9	6,9
HLA DQB1*03	3	2,3
HLA DQB1*04	15	11,5
HLA DQB1*05	10	7,6
HLA DQB1*06	9	6,9
HLA DQB1*07	4	3,1
HLA DQB1*12	1	0,7
HLA DQB1*201	2	1,5
HLA DQB1*301	22	16,8
HLA DQB1*302	20	15,3
HLA DQB1*303	15	11,5
HLA DQB1*401	2	1,5
HLA DQB1*402	1	0,7
HLA DQB1*505	1	0,7
HLA DQB1*5011	2	1,5
HLA DQB1*6011	3	2,3
TOTAL	131	100

Frecuencias alélicas del locus DR* obtenidas de la población general de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR*	ALELOS	FRECUENCIA (%)
HLA DR3*	75	35,0
HLA DR4*	124	57,9
HLA DR5*	15	7,1
TOTAL	214	100

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA-DRB1* CLASE II EN LA POBLACIÓN PACEÑA DE PACIENTES ATENDIDOS DURANTE EL PERIODO 2000 - 2005

- Se tomaron en cuenta 114 pacientes
- Los mas frecuentes fueron:
 - DRB1*04 (25,9%) y DRB1*08 (18,3%)
- Los menos frecuentes fueron:
 - DRB1*12 (0,5%)

Frecuencias alélicas del locus DR obtenidas de la población paceña de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB1*01	27	12,1
HLA DRB1*03	17	7,6
HLA DRB1*04	58	25,9
HLA DRB1*07	8	3,6
HLA DRB1*08	41	18,3
HLA DRB1*09	18	8,0
HLA DRB1*10	3	1,3
HLA DRB1*11	8	3,6
HLA DRB1*12	1	0,5
HLA DRB1*13	18	8,0
HLA DRB1*14	15	6,7
HLA DRB1*15	5	2,2
HLA DRB1*16	5	2,2
TOTAL	224	100

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA-DQB1* CLASE II EN LA POBLACIÓN PACEÑA DE PACIENTES ATENDIDOS DURANTE EL PERIODO 2000 - 2005

- Entre los mas frecuentes fueron:
 - DQB1*301 (18,8%)
 - DQB1*04 (12,2%)
- Entre los menos frecuentes fueron:
 - DQB1*201; 401; 402; 505; 6011 (1,4 %) respectivamente.

Frecuencias alélicas del locus DQ obtenidas de la población paceña de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DQB1*	FRECUENCIA	(%)
HLA DQB1*01	6	8,1
HLA DQB1*02	6	8,1
HLA DQB1*03	2	2,7
HLA DQB1*04	9	12,2
HLA DQB1*05	7	9,3
HLA DQB1*06	5	6,8
HLA DQB1*07	2	2,7
HLA DQB1*12	2	2,7
HLA DQB1*201	1	1,4
HLA DQB1*301	14	18,8
HLA DQB1*302	8	10,8
HLA DQB1*303	8	10,8
HLA DQB1*401	1	1,4
HLA DQB1*402	1	1,4
HLA DQB1*505	1	1,4
HLA DQB1*6011	1	1,4
TOTAL	74	100

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA-DRB* CLASE II EN LA POBLACIÓN PACEÑA DE PACIENTES ATENDIDOS DURANTE EL PERIODO 2000 - 2005

- Los alelos más frecuentes fueron:
 - DRB4* (59,3%), DRB3* (33,3%)
- Los alelos más frecuentes fueron:
 - DRB5* (7,4%) respectivamente.

Frecuencias alélicas del locus DRB* obtenidas de la población paceña de pacientes atendidos en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DRB*	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB3*	41	33,3
HLA DRB4*	73	59,3
HLA DRB5*	9	7,4
TOTAL	123	100

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA DR CLASE II EN LA DEL RESTO DE LA POBLACIÓN BOLIVIANA

- 58 pacientes conformaban el restante de la población boliviana
- El análisis del locus DR determinó que los más frecuentes fueron:
 - DRB1*04 (21,5%), y DRB1*08 (17,7%)
- Los alelos menos frecuentes son:
 - DRB1*15 (2,5 %) y DRB1*11(3,2 %)

Frecuencias alélicas del locus DR obtenidas el resto de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DR	FRECUENCIA	(%)
HLA DRB1*01	16	10,4
HLA DRB1*03	9	5,7
HLA DRB1*04	34	21,5
HLA DRB1*07	10	6,3
HLA DRB1*08	28	17,7
HLA DRB1*09	12	7,5
HLA DRB1*11	5	3,2
HLA DRB1*13	14	8,8
HLA DRB1*14	20	12,6
HLA DRB1*15	4	2,5
HLA DRB1*16	6	3,8
TOTAL	158	100

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA DQ CLASE II EN LA DEL RESTO DE LA POBLACIÓN BOLIVIANA

- Para el locus DQ se determinó que los más frecuentes fueron
 1. DQB1*301 (17,6 %), y DQB1* 302 (15,8%)
- Los alelos menos frecuentes representado por su locus son:
 1. DQB1* 03; 201; 401(1,7 %)

Frecuencias alélicas del locus DQ obtenidas el resto de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DQB1*	FRECUENCIA	(%)
HLA DQB1*01	6	10,5
HLA DQB1*02	3	5,3
HLA DQB1*03	1	1,7
HLA DQB1*04	6	10,5
HLA DQB1*05	3	5,3
HLA DQB1*06	4	7,1
HLA DQB1*07	2	3,5
HLA DQB1*201	1	1,7
HLA DQB1*301	10	17,6
HLA DQB1*302	9	15,8
HLA DQB1*303	7	12,3
HLA DQB1*401	1	1,7
HLA DQB1*5011	2	3,5
HLA DQB1*6011	2	3,5
TOTAL	57	100

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS HLA DRB* CLASE II EN EL RESTO DE LA POBLACIÓN BOLIVIANA

- Para el locus DRB* se determinó que los más frecuentes fueron:
 1. DRB4* (56,1 %), y DRB3* (37,3 %)
- El alelo menos frecuente para el locus DRB* es:
 1. DRB5* (6,6%).

Frecuencias alélicas del locus DR obtenidas el resto de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DRB*	ALELOS	FRECUENCIA (%)
HLA DRB3*	34	37,3
HLA DRB4*	51	56,1
HLA DRB5*	6	6,6
TOTAL	91	100

FRECUENCIAS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS LOCI DRB1* Y DRB*

- Asociaciones entre alelos privados HLA DRB1* con los alelos públicos HLA DRB*
- No hubieron asociación entre el DRB1*01 con el DRB5*
- Entre el DRB1*07 con el DRB1*12 mostraron estar asociados en el 100 % de los casos con sus alelos públicos.
- Los alelos DRB1*03, 11, 13, 14, mostraron que no pueden ir asociados a su alelo publico DRB3*
- Los alelos DRB1*04, 09, mostraron que no pueden ir asociados a su alelo publico DRB4*
- Los alelos DRB1*16, 15, mostraron que no pueden ir asociados a su alelo publico DRB5*

Determinación del grado de asociación entre los alelos privados HLA DRB1* y los alelos públicos HLA DRB*. Se resaltan el DRB1*08 y 10 porque nunca van asociados alelos públicos.

Locus DR, DRB*	Numero de Combinaciones	Frecuencia	Frecuencia
HLA DRB1*01	42	-----	-----
HLA DRB1*03	6	33,33	33,33
HLA DR*03,DRB3*	12	-----	-----
HLA DRB1*04	14	15,22	15,22
HLADR*04,DRB4*	78	-----	-----
HLA DRB1*07	0	0,00	0,00
HLADR*07,DRB4*	19	-----	-----
HLA DRB1*08	72	-----	-----
HLA DRB1*09	1	3,12	3,12
HLADR*09, DRB4*	31	-----	-----
HLA DRB1*10	3	-----	-----
HLA DRB1*11	3	25,00	25,00
HLA DR*11,DRB3*	9	2,37	2,37
HLA DRB1*12	0	0,00	0,00
HLA DR*12, DRB3*	2	-----	-----
HLA DRB1*13	8	24,24	24,24
HLADR*13, DRB3*	25	-----	-----
HLA DRB1*14	7	20,00	20,00
HLA DR*14, DRB3*	28	-----	-----
HLA DRB1*15	1	11,11	11,11
HLADR*15, DRB5*	8	-----	-----
HLA DRB1*16	2	18,18	18,18
HLA DR*16, DRB5*	9	-----	-----
TOTAL	380		

FRECUENCIAS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS LOCI DRB1* Y DQB1*

- Se realizaron la asociación entre HLA-DR y HLA-DQ este análisis mostró que los alelos mas frecuentes y representativos fueron:
 1. DRB1*04-DQB1*301 (4,8%), DRB1*04-DQB1*302 (4,8%)
- Otros alelos con alta frecuencia fueron :
 1. DRB1*08-DQB1*04 (4,0%), DRB1*08-DQB1*07 (4,0%)

Frecuencias alélicas de las asociaciones entre el locus DR - DQ obtenidas de la población boliviana atendida en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS durante la gestión 2000-2005.

LOCUS DRB1*,DQ	FRECUENCIAS	(%)
HLA DRB1*01,DQB1*01	2	1,6
HLA DRB1*01,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*01,DQB1*06	2	1,6
HLA DRB1*01,DQB1*301	1	0,8
HLA DRB1*01,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*01,DQB1*5011	2	1,6
HLA DRB1*03,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*03,DQB1*02	2	1,6
HLA DRB1*03,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*03,DQB1*301	1	0,8
HLA DRB1*03,DQB1*302	2	1,6
HLA DRB1*04,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*02	2	1,6
HLA DRB1*04,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*12	1	0,8
HLA DRB1*04,DQB1*301	6	4,8
HLA DRB1*04,DQB1*302	6	4,8
HLA DRB1*04,DQB1*6011	2	1,6
HLA DRB1*07,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*02	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*03	1	0,8

HLA DRB1*07,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*201	2	1,6
HLA DRB1*07,DQB1*301	2	1,6
HLA DRB1*07,DQB1*302	1	0,8
HLA DRB1*07,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*02	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*04	5	4,0
HLA DRB1*08,DQB1*07	2	1,6
HLA DRB1*08,DQB1*301	5	4,0
HLA DRB1*08,DQB1*302	1	0,8
HLA DRB1*08,DQB1*303	3	2,4
HLA DRB1*08,DQB1*401	1	0,8
HLA DRB1*10,DQB1*04	2	1,6
HLA DRB1*10,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*09,DQB1*02	3	2,4
HLA DRB1*09,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*09,DQB1*05	1	0,8
HLA DRB1*09,DQB1*301	4	3,2
HLA DRB1*09,DQB1*302	2	1,6
HLA DRB1*09,DQB1*303	4	3,2
HLA DRB1*09,DQB1*505	1	0,8
HLA DRB1*11,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*11,DQB1*05	2	1,6
HLA DRB1*11,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*11,DQB1*301	2	1,6
HLA DRB1*11,DQB1*302	1	0,8
HLA DRB1*12,DQB1*06	1	0,8

HLA DRB1*12,DQB1*301	1	0,8
HLA DRB1*13,DQB1*01	2	1,6
HLA DRB1*13,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*13,DQB1*05	3	2,4
HLA DRB1*13,DQB1*302	4	3,2
HLA DRB1*13,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*04	6	4,8
HLA DRB1*14,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*302	2	1,6
HLA DRB1*14,DQB1*303	1	0,8
HLA DRB1*14,DQB1*6011	1	0,8
HLA DRB1*15,DQB1*03	1	0,8
HLA DRB1*15,DQB1*04	2	1,6
HLA DRB1*15,DQB1*06	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*01	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*04	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*05	1	0,8
HLA DRB1*16,DQB1*302	1	0,8
TOTAL	125	100

DISCUSSION







CONCLUSION

- La edad más frecuente en la población atendida estaba comprendida entre los 21 a 30 años (24,4%)
- Otra frecuencia representativa fue del grupo comprendido entre 31 a 40 años (23,8%)
- El sexo masculino (68,6%) es el más frecuente en la población estudiada.
- Las frecuencias de los locus HLA DR, DRB* y DQ más frecuentes en la población de pacientes atendidos fueron:
 1. HLA-DRB1*04 (24,2 %), DRB1*08 (18,9%), DRB3* (35,0%), DRB4*(57,9%), DQB1*301(16,8%) y DQB1*302 (15,3%)
- Se determinó que los alelos DRB1*07- DRB4* y DRB1*12- DRB3* que mostraron que van asociados en el 100% de los casos con su alelo público.
- Los alelos de los loci HLA-DR y HLA-DQ que más frecuentemente se encontraban asociados en la población de pacientes estudiados fueron:
 1. DRB1*04/DQB1*301 (4,8%), DRB1*04/DQB1*302 (4,8%) y DRB1*14/DQB1*04 (4,8%).

GRACIAS