

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

**“IMPORTANCIA DEL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS”**

FACULTAD DE
QUIMICA



BIBLOTECA

**TESINA TEÓRICO - PRÁCTICA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA
MARCELA ESCOBAR ACOSTA**

QUÉRETARO, QRO., 3 DE MARZO DE 2000.

No. Adq. J56490

No. Título 249 QFB

Clas. TS 616.9

E 747

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESINA TÉCNICO - PRÁCTICA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BACHILLER
PRÁCTICA
LABORATORIO ESCUELA DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUIMICA
CARRERA QUIMICO FARMACÉUTICO BIOLOGO

**“IMPORTANCIA DEL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS”**

SINODALES

Q.F.B. CLAUDIA ALVARADO

Director

DR. CARLOS ARROYAVE HERNANDEZ

Sinodal

Q.F.B. GEMA MARTÍNEZ CABRERA

Sinodal

INDICE GENERAL

Indice general	i
Indice de cuadros y figuras	iii
Abreviaturas.....	iv
1. Resumen.....	v
2. Introducción.....	1
2.1 Inmunogenética	1
2.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	3
2.3.1 Moléculas ALH clase I	4
2.3.2 Moléculas ALH clase II.....	6
2.3.3 Mecanismos de presentación antigénica	8
2.4 Asociación de Antígenos Leucocitarios Humanos y enfermedades infecciosas	13
3. Antecedentes	
3.1 ALH asociado a enfermedades bacterianas	14
3.1.1 <i>Mycobacteria tuberculosis</i>	14
3.1.2 <i>Mycobacteria leprae</i>	15
3.1.3 <i>Chlamydia trachomatis</i>	17
3.1.4 <i>Burkholderia pseudomallei</i>	18
3.1.5 <i>Helicobacter pylori</i>	19
3.2 ALH asociado a enfermedades parasitarias.....	19
3.2.1 <i>Plasmodium falciparum</i>	20
3.2.2 <i>Leishmaniasis</i>	21
3.2.3 <i>Kala-azar</i>	22
3.2.4 <i>Tripanozoma cruzi</i>	23
3.3 ALH asociado a enfermedades virales	24
3.3.1 <i>Herpes sasimiri</i>	24
3.3.2 Virus de Dengue	25
3.3.3 Virus de inmunodeficiencia humana.....	26

3.3.4 Citomegalovirus	27
3.3.5 Hepatitis B y C	27
3.3.6 Virus Epstein –Barr	28
3.3.7 Papilomavirus	28
3.3.8 <i>Puumala hantavirus</i>	29
4. Objetivo General.....	30
5. Objetivos Específicos.....	30
6. Metodologías actuales para pruebas de antígenos leucocitarios humanos	31
7 . Resultados.....	38
8. Discusión.....	39
9. Conclusión.....	41
10. Bibliografía	42
Apéndice.....	45

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Molécula ALH clase I.....	6
Figura 2. Molécula ALH clase II.....	7
Figura 3. Cámara de Neubauer.....	35
Cuadro 1. Criterios de interpretación de la prueba de histocompatibilidad	37
Cuadro 2. Enfermedades asociadas Antígenos Leucocitarios Humanos	38

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	TERMINO ABREVIADO
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
ALH	Antígenos leucocitarios Humanos
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
CD	Racimo de diferenciación
CLIP	Péptido invariante de moléculas clase -II
CPA	Célula presentadora de antígenos
TCR	Receptor de Célula T
IFN	Interferón
ATP	Adenosin trifosfato
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
EDTA	Etilendiamintetraacetato
RE	Retículo endoplásmico
HTC	Células tipificadoras homocigotas
TAP	Transportador
LL	Lepra lepromatosa
TT	Lepra tuberculosa
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
CTL	Linfocitos T citotóxicos
PLT	Tipificación de linfocitos sensibilizados
PFRL	Polimorfismo del fragmento de restricción de longitud
CML	Linfólisis mediada por células

1. RESUMEN

El sistema inmune ha evolucionado para proteger al individuo de virus, bacterias y parásitos y mediante una discriminación entre antígenos hacia los cuales es benéfica una respuesta inmune y contra los cuales son nocivas.

Esta discriminación se obtiene a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH).

Como las moléculas CMH en un individuo moldean la respuesta inmune, se considera que deben ser importantes en la susceptibilidad, resistencia y manifestaciones a las enfermedades infecciosas.

Debido a esta importancia del CMH es que ha surgido el interés de algunos investigadores para estudiar la variabilidad genética entre individuos de diferentes orígenes étnicos.

En este trabajo se revisan datos obtenidos en algunas investigaciones realizadas en diferentes partes del mundo que señalan la importancia del CMH en la regulación de la respuesta inmune en enfermedades infecciosas.

Entre las enfermedades que se han estudiado se encuentra la tuberculosis y lepra (formas multibacilares) las cuales se han relacionado con ALH-DR2, lepra lepromatosa se ha asociado a ALH- DR2 y DQ1, tuberculosis paucibacilar con ALH-DR3. El virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) se ha asociado con ALH-DR13, DR2, DRB*1501 y DRB1*03011, hepatitis B se ha asociado con ALH-DR13, hepatitis C con ALH-A2y DR5 y virus Epstein-Barr con ALH-B35.01, A11 y B7. Respecto a las enfermedades parasitarias se ha relacionado la malaria con ALH-B53 y A11, leishmaniasis cutánea difusa con ALH-A11, B5, B7, leishmaniasis cutánea localizada se ha asociado con ALH-A28, Bw22, DQw8,DQw3, leishmaniasis visceral con ALH- A26 y esquistosomiasis con ALH-B5 y DR3.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Inmunogenética

A todos los procesos que constituyen la respuesta inmune con posible base genética, se le denomina inmunogenética. La definición actual de la inmunogenética, debe incluir todos los factores que controlan la capacidad de respuesta inmune del huésped ante elementos extraños, así como de transmisión de especificidades antigénicas de una generación a otra.

Gorer, en 1936 descubrió los antígenos principales de histocompatibilidad pero no fue hasta 1968 que McDevit y Tyan, demostraron que los genes de la respuesta inmune estaban unidos a los genes del CMH.

Seis años más tarde, Doherty y Zinkernagel reportaron que el reconocimiento de los antígenos por las célula T, estaba restringido por la molécula principal de histocompatibilidad (Stites, 1993).

Los mecanismos inmunes pueden considerarse como una serie de adaptaciones genéticas a medida que las especies van evolucionando y conforme cambian las influencias ambientales ejercidas sobre ellas. A esto se le ha denominado filogenia de la respuesta. A también la maduración de los mecanismos inmunes dentro del desarrollo se le ha denominado ontogenia de la respuesta inmune. En sentido más estricto, los controles genéticos pueden considerarse a nivel celular como la proliferación y diferenciación de una serie de tipos celulares en respuesta a un antígeno. La acción de los genes también puede estudiarse a nivel molecular en términos de la variabilidad ilimitada de estructuras de inmunoglobulina que viene codificada directamente en el *(ADN). La herencia de los propios antígenos, como los de grupo sanguíneo y los de histocompatibilidad, también se transmite en los cromosomas de las células germinativas. Finalmente, tiene gran importancia los recientes descubrimientos indicando que los genes que controlan la expresión de algunos antígenos celulares son casi idénticos a los que controlan la capacidad de la respuesta inmune.

El campo de estudio de la inmunogenética comprende la regulación genética y control del propio sistema inmune. Los genes que codifican para inmunoglobulinas, el CMH y los receptores de células T, así como los genes que codifican para otros

mediadores, interactúan regulando y estimulando una respuesta inmune eficaz (Zaragoza, 1995).

El sistema inmune es fundamental para el control de las enfermedades infecciosas. Las respuestas de este, son afectadas y controladas por productos de los genes del CMH. Muchas enfermedades están asociadas con Antígenos Leucocitarios Humanos (ALH), en algunas enfermedades infecciosas la reacción inmune la cual es responsable de la manifestación patológica de la enfermedad, ha sido correlacionada con ALH específicos.

Los ALH, pueden ser descubiertos por anticuerpos que se combinan con glucoproteínas de superficie celular que están codificadas por los genes alélicos de cada uno de los loci genéticos. El descubrimiento de la relación entre ALH y enfermedad resultó posible, al utilizar métodos de tipificación serológicos aplicados a poblaciones y familias. Tecnologías similares, se están utilizando actualmente para el diagnóstico, tratamiento y vigilancia de los procesos clínicos en casi todas las áreas de la medicina desde las infecciones hasta la oncología (Bellanti, 1986).

Se ha demostrado que los factores genéticos del huésped, influyen en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas en humanos, asociado a un alto grado de heredabilidad en cuanto a respuestas humorales y celulares frente a los antígenos patógenos y componentes del CMH. Con los estudios de genes se ha descubierto el polimorfismo inmunogenético en las enfermedades infecciosas. Las variaciones de ALH han sido asociadas con la susceptibilidad o resistencia a malaria, tuberculosis, lepra, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y virus de hepatitis. La variación en el gen promotor del factor de necrosis tumoral ha sido asociada también con diversas enfermedades infecciosas, y actualmente se está analizando el genoma de múltiples familias para identificar el loci asociado a la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Parece ser que la susceptibilidad a algunos microorganismos, esta determinada por un gran número de genes polimórficos y su identificación puede proporcionar un mejor entendimiento en la patogénesis y protección en las enfermedades infecciosas (Hill, 1998). La variabilidad genética entre los individuos puede ser determinante para la capacidad de responder a una vacuna o una infección natural.

Un hecho interesante es el que, los genes de respuesta inmune ligados a histocompatibilidad, fueron descubiertos cuando se valoraba la respuesta de un anticuerpo a pequeños péptidos determinantes. De acuerdo a estos resultados, los animales se dividieron en cepas que respondían intensamente y cepas que

respondían poco, según su capacidad de producir anticuerpos para péptidos sintéticos. Considerando esto, es posible que con el uso cada vez mas amplio de pequeños péptidos como vacunas , podría separarse a los individuos en un grupo de los que responden mucho y los que responden poco, debido a diferencias basadas en su fondo genético.

Estudios acerca de la asociación de antígenos ALH y algunas enfermedades sugieren, la probable existencia de " genes de susceptibilidad". Estas orientaciones, actualmente reforzadas y perfeccionadas por el uso innovador de sondas de ADN complementario (c-ADN) para descubrir secuencias genéticas únicas de ALH y el polimorfismo de fragmentos de enzima de restricción según su longitud en individuos susceptibles, preparan el camino para identificar "genes de susceptibilidad para enfermedad", inmunorreguladores a nivel de ADN, y abren el horizonte para comprender importantes mecanismos fisiopatológicos(Bellanti, 1986) .

El descubrimiento del CMH data de mediados de los 50's cuando fueron encontrados anticuerpos leucoaglutinantes en suero de pacientes que recibieron múltiples transfusiones y en sueros de 20% a 30 % de mujeres multíparas. En humanos, el complejo mayor de histocompatibilidad se denomina complejo ALH (Stites, 1993).

2.2 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El CMH, es la región donde se localizan los genes de respuesta inmune ligada a la histocompatibilidad. Estos genes que codifican para el CMH, en el hombre

ALHs, ocupan un segmento del brazo corto del cromosoma 6. El loci genético para ALH- A, -B, y -C determinan los antígenos de clase I. El loci genético para ALH- DR, -DP, -DQ determinan los antígenos de clase II. Los antígenos clase I se encuentran realmente en todas las células humanas; los antígenos clase II se encuentran principalmente en la superficie de células inmunocompetentes incluyendo macrófagos/ monocitos, excepto en linfocitos T, linfocitos T activados y particularmente linfocitos B.

Cada antígeno propio y no propio , es reconocido por las células T, sólo en unión con moléculas del CMH. Así las células T colaboradoras (CD4), reconocen antígenos en unión con las moléculas clase II del CMH, mientras que las células T citotóxicas (CD8) reconocen antígenos en unión con moléculas clase I del CMH.

Durante la embriogénesis, se presenta un proceso de "educación" de células T en el timo, donde se eliminan las células T que reconocen los antígenos propios en el contexto de moléculas de CMH, y las potencialmente capaces de reconocer antígenos extraños en el contexto de las moléculas CMH del propio individuo, se seleccionarán para su sobrevivencia.

Hacia 1973, se encontró que ciertos antígenos ALH estaban relacionados con enfermedades específicas en una alta proporción de los casos. También se descubrió la importancia de igualar estos antígenos para obtener éxito en trasplantes de órganos, lo cual llevó a estudiar los genes que determinan los ALH.

Las moléculas de ALH y los genes que las codifican, caen dentro de tres categorías: clases I, II y III. Las moléculas de clase I y II son glucoproteínas de superficie y miembros de la familia de las inmunoglobulinas, según se muestra por homología de aminoácidos. Las moléculas de clase I y II se pueden distinguir en razón de su estructura, distribución tisular y función. Las moléculas clase III abarcan los componentes 2 y 4 de la vía del complemento y el factor B de la vía alterna. Estas moléculas son solubles y no actúan como antígenos de trasplante y no presentan antígenos a las células T (Stites, 1993; Neville, 1999).

2.3.1 Moléculas ALH clase I

Estructura

Las moléculas ALH-A, -B, -C, consisten de una estructura de dos cadenas. La cadena pesada α es una glucoproteína polimorfa determinada por genes en el complejo ALH del cromosoma 6, y está unida en forma no covalente a una proteína no polimorfa de peso molecular 12,000, la β -microglobulina, determinada por un gene en el cromosoma 15.

Toda la molécula está anclada en la membrana celular por la cadena α de peso molecular 44,000. La cadena α contiene 338 aminoácidos y se puede dividir en tres regiones, iniciando por el extremo N-terminal, estas regiones son una transmembranal hidrofóbica, una región intracelular hidrofílica y una región extracelular se divide en tres dominios denominados $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$. La β_2 microglobulina y el dominio α_3 , tienen estructura de hoja plegada- β^* similar a

aquella de un dominio de inmunoglobulina, y forman la parte inferior la molécula. Los dominios α_1 y α_2 consisten cada uno de cuatro tiras β y una α hélice, y forman la parte superior de la molécula. Las ocho tiras β forman la hoja plegada- β que actúa como plataforma de apoyo para las 2 α hélices. Estas α hélices crean una fosa o hendidura que sirve como sitio de unión del antígeno, para aceptar un fragmento peptídico procesado en forma apropiada a partir de un antígeno mas grande (figura 1)(Stites, 1993) .

Función de las moléculas clase I

Las moléculas ALH clase I están presentes en todas las células nucleadas, lo que es apropiado para su función fisiológica. Para que un antígeno sea reconocido por un linfocito CD el antígeno deberá entrar en combinación con una molécula clase I. A este fenómeno se le denomina restricción ALH. Cuando por ejemplo, un virus infecta una célula, ciertos antígenos virales se metabolizan hasta fragmentos peptídicos que entonces se unen a la molécula clase I y se presentan a las células T citotóxicas CD8 (asesinas). El receptor para el antígeno de un linfocito T determinado, reconocerá un péptido viral sólo en el contexto de una molécula ALH de clase I en particular. Estos receptores, no reconocen un péptido particular unido a una molécula clase I diferente, un péptido viral diferente unido a la molécula clase I particular, o a la molécula clase I por sí misma. Una vez que ocurre el reconocimiento , el linfocito T destruye a la célula en diana que lleva el antígeno viral (Stites,1993).

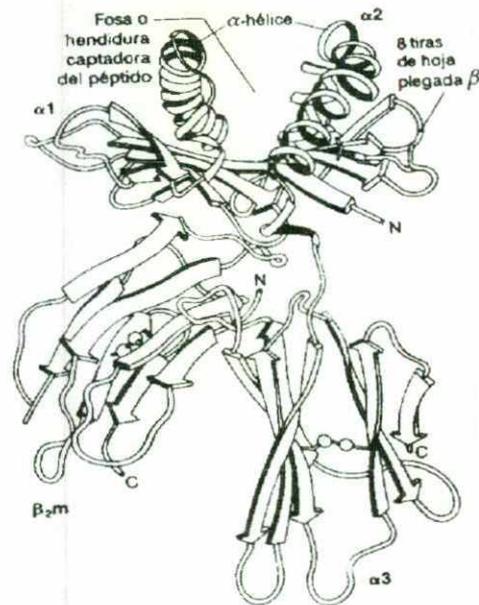


Fig 1. Molécula ALH clase I

2.3.2 Moléculas ALH clase II

Las moléculas clase II, ALH-DR, -DP -DQ, también son estructuras de dos cadenas. A diferencia de las moléculas I, ambas cadenas están codificadas por los genes dentro del complejo ALH

Estructura de las moléculas de ALH clase II

Cada molécula clase II es un heterodímero que consiste de dos cadenas de glucoproteína, una α (PM 34000) y una β (PM 29000) en asociación no covalente. Debido a que las estructuras de todas las clases de moléculas clase II son similares, la estructura detallada de la molécula clase II ALH-DR, se describe como un prototipo.

Las cadenas α y β , están compuestas de 229 y 237 aminoácidos respectivamente. Lo mismo que la cadena pesada clase I, las cadenas α y β consisten cada una de tres regiones. Una región extracelular hidrofílica, una región transmembranal hidrofóbica, y una región intracelular hidrofílica. Estas dos últimas anclan las cadenas en la membrana celular. La región hidrofílica de la cadena α contiene dos dominios, denominados respectivamente α_1 y α_2 . La región extracelular

hidrofílica de la cadena β también contiene dos dominios, denominados respectivamente β_1 y β_2 . Los dos dominios α_2 y β_2 tienen homología importante con los dominios de las regiones constantes de las inmunoglobulinas.

Las similitudes entre las estructuras de las moléculas clase I y clase II han permitido generar modelos hipotéticos de las estructuras clase II. Se piensa que los dominios α_2 y β_2 de la clase II, constituyen la porción de la molécula proximal a la membrana celular formada por los dominios α_1 y β_1 . Esta última porción es una estructura interactuante compuesta de ocho tiras β y dos α hélices, es muy parecida a la creada por los dominios α_1 y α_2 de la molécula de clase I. Las dos hélices y una porción plegada- β de las moléculas de clase II, también forman una hendidura o fosa.

En esta fosa se localiza el polimorfismo de las moléculas de clase II, lo que da como resultado diferentes sitios de captación de antígeno para cada molécula clase II. Así una molécula dada clase II, tan solo puede captar un número limitado de fragmentos peptídicos antigénicos. Por lo tanto este sitio de captación de la molécula clase II, muestra cierta selectividad para los antígenos, pero carece de la especificidad fina del sitio de captación de una inmunoglobulina (figura 2)(Stites, 1993).

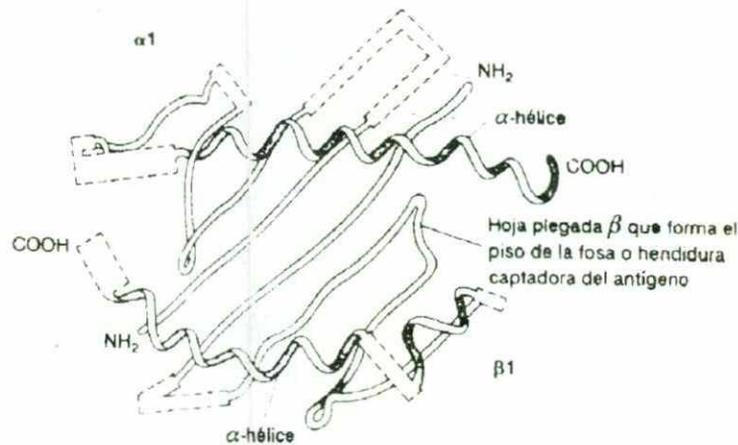


Fig 2 .Molécula ALH clase II

Función de las moléculas ALH clase II

Las moléculas clase II tienen distribución celular limitada. Se encuentran, principalmente sobre las células inmunocompetentes, linfocitos B, células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas) y, en humanos, células T activadas.

La función de las moléculas clase II es presentar los péptidos antigénicos procesados a los linfocitos T tipo CD4 durante la iniciación de las respuestas inmunes. Así, los linfocitos T tipo CD8 reconocen los péptidos solo en el contexto de una molécula clase I, los linfocitos T CD4 (colaboradores), reconocen los fragmentos peptídicos solo en el contexto de las moléculas clase II (Stites, 1993).

2.3.3 Mecanismos de presentación antigénica.

Las respuestas a la mayoría de inmunógenos proteicos, puede empezar sólo después de que el inmunógeno ha sido capturado, procesado y presentado por una célula presentadora de antígenos (CPA). La razón de esto es que las células T solo reconocen inmunógenos que están unidos a proteínas de CMH en las superficies de las células. El reconocimiento por parte del receptor de linfocito T lleva a la formación de un complejo ternario en el cual se postula que la primera y segunda regiones hipervariables (CDR1 y CDR2) de cada cadena del Receptor de células T (RCT) hacen contacto con las hélices α del CMH mientras que el CDR3, con la mayor variabilidad, interactúa con el péptido antigénico. Hay dos clases diferentes de proteínas de CMH, cada una de las cuales es reconocida por uno de los subgrupos principales de linfocitos T. Las proteínas de CMH clase I son expresadas por prácticamente todos los tipos de células somáticas y se usan para presentar sustancias a las células T CD8, la mayoría de las cuales son citotóxicas. Las proteínas de CMH clase II son expresadas únicamente por macrófagos y por algunos otros tipos celulares; son necesarias para la presentación de antígenos a células T CD4, subgrupo que incluyen a la mayoría de las células cooperadoras. Puesto que la activación de la célula cooperadora es necesaria para prácticamente todas las respuestas inmunes, las CPA de la clase II desempeñan una función fundamental en el control de tales respuestas. De hecho, aunque se utilice de otro modo, el término "célula presentadora de antígeno" solo

se refiere a las células especializadas que tienen proteínas de CMH clase II (Stites 1993; Roitt, 1991).

Se han establecido dos vías de presentación antigénica, la vía exógena o endocítica y la vía endógena o biosintética.

Vía endógena o biosintética.

Existen evidencias que sostienen que los péptidos presentados por moléculas de clase I para su reconocimiento por linfocitos T CD8 subpoblación citotóxica/supresora, son presentados por una vía denominada endógena o biosintética.

En general, se acepta que las moléculas de clase I presentan péptidos provenientes de la degradación de proteínas antigénicas extrañas (en el caso de células infectadas) o de proteínas propias de la célula. Los primeros estudios indicaron que los péptidos presentados por moléculas CMH clase I procedían de antígenos virales originados en el citosol y de proteínas que eran artificialmente introducidas en el citosol, por otro lado, se encontró que el uso de inhibidores de proteasas lisosomales no afectan la presentación antigénica por las moléculas clase I.

Estos resultados sugirieron que los péptidos presentados por las moléculas clase II son generados en un espacio extralisosomal, aunque no se excluye la participación de otras vesículas.

El mecanismo más importante en la degradación de proteínas en el citosol es dependiente de ATP y en este proceso las proteínas son hidrolizadas en oligopéptidos por un complejo multimérico llamado "proteosoma". Una forma del proteosoma encontrada en mamíferos, es la partícula cilíndrica 20S (700kDa), compuesta por 4 anillos, la cual está compuesta en el exterior por 7 subunidades α y en el interior por 7 subunidades β que forman el sitio catalítico. La proteólisis, ocurre en el núcleo acuoso del cilindro. Otra forma de proteosoma identificado, es la partícula 26S(1500kDa), la cual contiene en su núcleo proteolítico la estructura 20S asociada con otras subunidades que regulan su actividad.

Un paso inicial en la hidrólisis de muchas proteínas por el proteosoma, es la conjugación covalente con el polipéptido ubiquitina. En esta reacción, el residuo C-terminal de la ubiquitina se une a los grupos ϵ -amino en las lisinas del sustrato de otras ubiquitinas. Este paso requiere de ATP y varias enzimas (E1, E2 y E3),

que activan a la ubiquitina. La conjugación de los péptidos de la ubiquitina con el sustrato, promueve su rápida degradación por el proteosoma 26S y aunque los oligopéptidos producidos por el proteosoma no han sido extensamente analizados, se sugiere que los productos oligopéptidos tienen una longitud de 5-11 aminoácidos, posiblemente debido a las distancias entre los sitios activos del proteosoma, lo que concuerda con el tamaño óptimo de los péptidos presentados por las moléculas clase I.

Se han identificado 2 subunidades del proteosoma localizadas dentro de la región del CMH, LMP2 Y LMP7. Las subunidades LMP2 y LMP7 son miembros de la familia de las subunidades β del proteosoma. Aunque la mayoría de las células expresan niveles bajos de estos componentes, son inducibles por IFN- γ .

Los péptidos producidos en el citosol deben ser trasladados hacia el interior del retículo endoplásmico (RE) para su ensamblado con las moléculas de histocompatibilidad de clase I. En este proceso participan un transportador transmembranal dependiente de ATP denominado transportador asociado con la presentación antigénica (TAP). Los genes que codifican este transportador se localizan en la región del CMH y son homólogos a los miembros de la familia de las proteínas transportadoras ABC (ATP- binding cassette). El TAP se conforma por 2 subunidades, TAP1 (76kDa) y TAP2 (70kDa) los cuales se encuentran asociados por enlaces no covalentes.

El TAP sólo transporta péptidos mayores de 7 aminoácidos y su eficiencia disminuye drásticamente con péptidos mayores de 12 aminoácidos. Se ha observado que hay alguna especificidad para los residuos carboxilo-terminal de los péptidos y las moléculas CMH humanas muestran preferencia por unir péptidos con residuos C-terminales hidrofílicos o básicos.

Algunos péptidos que son expresados en el citosol de células que carecen del transportador TAP, son presentados por las moléculas clase I sin sufrir modificación en el RE. Varios experimentos han sugerido que los péptidos pueden tener otro procesamiento después de ser trasladados al RE. Sin embargo es difícil estimar la importancia del arreglo del péptido en el RE, ya que los proteosomas originan principalmente péptidos de aproximadamente 8 aminoácidos, por lo que es posible que la mayoría de los péptidos producidos no requieran nuevas proteólisis.

La cadena α y la β_2 - microglobulina son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y trasladadas hacia el lumen del RE. Se han propuesto dos secuencias

para el ensamblado de la moléculas clase I: 1) la asociación de la cadena α y β_2 - m y después de la adición del péptido; o 2) la unión del péptido con la cadena α seguida de la unión de la cadena β_2 - m. Ambos intermediarios (α y β_2 - microglobulina, α -péptido) son menos estables que el complejo maduro, in vitro ambas secuencias pueden producir un complejo maduro, pero la primera secuencia descrita podría ser la más importante en las células normales.

El proceso de ensamblado podría facilitarse por la formación de una serie de interacciones moleculares: la cadena α del complejo α - β_2 - microglobulina, es asociada con proteínas chaperonas y después el complejo se asocia con el TAP, el complejo permanece en el RE hasta su asociación con el péptido.

El primer chaperón asociado a la cadena α es el BiP, que es un miembro de la familia de las proteínas de choque térmico (HPS70), y participa en el plegamiento y retención de muchas proteínas en el RE.

La calnexina es una proteína transmembranal involucrada en el plegamiento, ensamblaje y retención de muchas glicoproteínas y complejos en el RE. La calnexina se une a la cadena α , favoreciendo su plegamiento, ensamblaje y reduciendo su degradación. Al disociarse la calnexina de la cadena α se forma el complejo α - β_2 - microglobulina, aunque este complejo es un inmaduro, es retenido en el RE hasta la unión con un péptido. La última proteína asociada a la molécula clase I en el RE es el TAP y la interacción parece involucrar el dominio luminal de la cadena α y el TAP1, presumiblemente al parecer facilita la unión del péptido al complejo. La molécula clase I une péptidos de 8-9 aminoácidos. La molécula clase I con sus proteínas chaperonas y el TAP reduce el número de moléculas libre liberadas a la superficie celular, aunque un pequeño porcentaje (menor a 5%) alcanzan la superficie en ausencia de péptido, siendo la vida media muy corta. Estas serían moléculas clase I capaces de captar péptidos directamente del exterior.

El complejo trimérico cadena α - β_2 - microglobulina- péptido, migra através del aparato de Golgi y alcanza la superficie celular.

El concepto de la función clásica de las moléculas clase I de presentar sólo antígenos endógenos, podría ser modificado ya que existen evidencias que demuestran que además de presentar péptidos endógenos, una subclase de CPA puede también presentar antígenos exógenos después de ser fagocitados por CPA.

Vía exógena o endocítica.

Las moléculas CMH-II se encargan de presentar péptidos generados en el compartimento endocítico/ lisosomal. Los antígenos extracelulares particulados o no, son internalizados por cualquier variante de endocitosis: fagocitosis o pinocitosis y son digeridos por enzimas generándose una variedad de diferentes péptidos que en algún lugar de la vía endocítica compiten entre sí por la unión con las moléculas CMH clase II que una vez cargadas de péptidos pueden ser trasladadas hacia la membrana. Una función esencial, ha sido propuesto por la catepsina D y también para la E en la reducción de los puentes disulfúricos necesaria para el desdoblamiento de ciertos antígenos requerido para la generación de ciertos péptidos.

Inmediatamente después de sintetizadas en el retículo endoplásmico, las subunidades α y β de las moléculas CMH clase II, se unen a la cadena constante (Ii) de una glicoproteína tipo II, formándose un heterodímero (α - β -Ii). De esta forma las moléculas CMH clase II son transportadas desde el retículo endoplásmico hacia la ruta endocítica.

La cadena Ii es codificada en un gen no polimórfico localizado en el cromosoma 5 en el humano y en el 18 en el ratón. A pesar de estar codificada en un cromosoma diferente, la expresión de los genes Ii y clase II α/β está regulada coordinadamente y al igual que α y β , está expresada constitutivamente sólo en las células presentadoras de antígeno.

La característica de la Ii como chaperona consiste en realizar varias funciones:

- Estabiliza el complejo α - β hasta su unión con el péptido.
- Como su unión es mutuamente exclusiva de la unión del péptido previene su adquisición prematura en el retículo endoplásmico.
- Dirige el tráfico de las moléculas CMH clase II

Una vez que el trímero α - β -Ii alcanza los compartimentos endocíticos lisosomales ocurre la proteólisis de la cadena invariante (la catepsina B parece jugar un papel esencial). Un fragmento de ésta cadena denominada CLIP (clase II- associated invariant peptide) permanece aún temporalmente asociado con CMH- α/β y su remoción final es facilitada por las moléculas DM, al parecer por un mecanismo competitivo puesto que dependerá de la afinidad relativa de las moléculas clase II por el CLIP o de las moléculas DM.

Ha sido muy investigado el lugar exacto donde se produce el intercambio del CLIP por el péptido (de 12 a 22 aminoácidos) en las moléculas clase II. Se ha considerado que se trata de un compartimento especializado, rico en DM y moléculas clase II al que han denominado MIIC (CMH clase II compartiment) o también vesículas clase II. Sin embargo, por los resultados de esas investigaciones, parece cada vez más claro que estos compartimentos son heterogéneos y no siempre distinguibles de los endosomas convencionales y los lisosomas. Los compartimentos donde se produce preferentemente la carga del péptido podrían ser incluso diferentes para distintas células presentadoras de antígenos diferentes.

Después de cargado el péptido, el complejo CMH-II α/β + péptido es dirigido a la membrana a través de vesículas exocíticas y es presentado al receptor del linfocito T-CD4. (Barrera, 1998)

2.4 Asociación de los Antígenos Leucocitarios Humanos y enfermedades infecciosas

El nivel de la respuesta inmune ante una infección, esta determinado por diversos factores: intensidad de la infección, factores relacionados a la intensidad de la respuesta inmunológica, estado de las células T, función de las células T y quizá más importante, los factores genéticos que interactúan con otros factores para determinar el curso de la enfermedad. Existe evidencia de que el sistema ALH-DR puede influir en la modificación del curso clínico de infecciones bacterianas, parasitarias y virales. Las investigaciones sobre enfermedades infecciosas, están enfocadas a marcadores genéticos tales como las formas alélicas de las moléculas ALH y su polimorfismo (Singh, 1997; Weatherall, 1998). Por ejemplo, los Amerindios del Sur, son una población con alto riesgo de contraer enfermedades infecciosas, pero tiene muy buenas respuestas contra polisacáridos pneumococicos, antígenos virales y otros inmunógenos. No se ha encontrado el antígeno ALH que pudiera asociarse con esta susceptibilidad, y se piensa que se debe al bajo nivel de polimorfismo de las moléculas lo cual trae como consecuencia la adaptación relativamente fácil del patógeno a esta población (Hill, 1998; Black, 1997).

3.1 Antígenos Leucocitarios Humanos asociado con enfermedades bacterianas.

3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Las lesiones causadas por microorganismos del género *Mycobacterium*, han sido descritas desde la era precristiana. Esta enfermedad se transformó en un problema de salud pública en la era de la Revolución Industrial, asociada a la sobrepoblación, condiciones de trabajo, desnutrición y alcoholismo entre otros. En la actualidad, la infección causada por *M. tuberculosis* continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial a causa de los factores antes mencionados y de un incremento en la sobrevivencia de los pacientes con enfermedades que producen alteración del sistema inmune. Como ejemplo, tenemos a los enfermos de cáncer que reciben quimioterapia entre otros y la aparición y diseminación de la epidemia mundial del SIDA.

El género *Mycobacterium*, comprende microorganismos bacilares, inmóviles, no capsulados, anaerobios estrictos, que se tiñen con dificultad pero una vez teñidos resisten la decoloración con ácidos minerales fuertes y alcohol, siendo el *M. tuberculosis* el principal bacilo tuberculoso patógeno para el hombre. (Kumate, 1994)

Los seres humanos son muy susceptibles a la infección tuberculosa pero notablemente resistentes a la enfermedad tuberculosa. Aunque la prevalencia de la infección tuberculosa estimada por las pruebas tuberculina de las poblaciones estudiadas ha demostrado que tanto las características geográficas como socioeconómicas afectan el riesgo de infección, en todos los casos los factores de riesgo parecen estar relacionados con la posibilidad de entrar en contacto con un caso infeccioso. Otros factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad tuberculosa después de la infección, son principalmente características intrínsecas del individuo como edad, sexo, constitución del organismo y susceptibilidad genética (Joklik, 1997).

Diversos investigadores, han hecho estudios con poblaciones para determinar una asociación entre tuberculosis pulmonar y ALH específicos. Así, el ALH-DR2 está asociado con el desarrollo de formas multibacilares de tuberculosis pulmonar y leproso; subtipos moleculares de DR2 muestran que la mayoría de los alelos de los pacientes y controles fueron DRB1*1501 y DRB1*1502. La frecuencia de estos

subtipos moleculares de DR2 en pacientes no fue definida, sugiriendo esto que la molécula completa de DR2 o los genes cercanos ligados a ella, pueden gobernar la susceptibilidad del paciente a la tuberculosis pulmonar particularmente, la resistencia a las drogas utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Cuando la estructura tridimensional de la molécula ALH-DR es elucidada secuenciando los alelos de clase II de pacientes con tuberculosis pulmonar y tuberculosis pulmonar resistente a drogas, se puede identificar un residuo aminoácido crítico para la unión de un péptido o péptidos patógenos derivados del *M. tuberculosis* responsables del detrimento o mejora de la respuesta inmunológica. Las mutaciones que inactivan el receptor de interferón gamma incrementan la susceptibilidad a infecciones por mycobacterias e infección por BCG diseminada en niños.

Así mismo, se ha investigado la asociación de esta enfermedad con otros antígenos ALH y la frecuencia de dos alelos del gen del factor alfa de necrosis tumoral en individuos no relacionados con tuberculosis pulmonar (casos) comparados con pacientes que no presentan tuberculosis pulmonar (controles) en poblaciones de alta exposición a esta patología, con lo que se ha encontrado que el alelo ALH-DQB1*0503 esta asociado significativamente con la susceptibilidad a tuberculosis pulmonar en pacientes Camboyanos. Este el primer gene identificado y asociado al desarrollo de tuberculosis pulmonar (Goldfield, 1998).

3.1.2 *Mycobacterium leprae*

La lepra es la enfermedad causada por *Mycobacterium leprae*, altamente infecciosa pero de escasa patogenicidad; es la más crónica de las enfermedades infecciosas. El bacilo tiene selectividad por los nervios periféricos y en menor grado afecta a la piel, el sistema reticuloendotelial, la mucosa del árbol respiratorio superior y los endotelios capilares.

Las manifestaciones clínicas comprenden un espectro en formas polares, determinadas por la capacidad del huésped para operar reacciones de inmunidad mediada por células. El periodo de incubación es de tres a cinco años. La fase inicial es casi asintomática, pero en el curso de la evolución, dejada sin tratamiento, más de la mitad de los casos exhiben incapacidades neuromotoras importantes.

No se han identificado huéspedes intermediarios, no hay reservorios animales de importancia para la infección del hombre y no existen insectos vectores.

La intervención de factores genéticos es muy discutida; en la actualidad se postula una participación con base en : (1) la aparición de casos en grupos y no al azar; (2) la concordancia de la forma clínica de la lepra en 32/37 gemelos monocigóticos afectados simultáneamente; (3) evidencia reciente que personas con el haplotipo ALH-DR3 tiene mayor susceptibilidad a la forma tuberculoide y los ALH-Mti a la forma lepromatosa; (4) el que las formas clínicas tienen predilección por ciertas trazas, por ejemplo: lepra lepromatosa es más frecuente en Europa y América (más de 20% y en México más de 50 %), que en Asia (entre 5 y 20 %) y en Africa (al Sur del Sahara), con menos de 5% del total de enfermos y; (5) que en Venezuela la población de origen africano tiene lepra tuberculoide y la de origen caucásico padece la forma lepromatosa (Kumate, 1994).

Los alelos ALH también modulan la respuesta inmunológica que determina la forma en que la lepra (una enfermedad heterogénea causada por *Mycobacterium leprae*) que se desarrolla en cada paciente. En un extremo del espectro de lepra, están los pacientes con lepra lepromatosa multibacilar (LL), quienes son anérgicos a los antígenos de *M. leprae*, y en el otro extremo, están los pacientes con lepra tuberculosa paucibacilar (TT), que exhiben una buena respuesta inmune mediada por células. La inmunidad humoral esta presente a través del espectro pero parece no proveer protección . Entre los dos extremos existen pacientes con manifestaciones intermedias, en la línea lepromatosa, en la línea de lepra (BB) y en la línea de formas tuberculosas. Se han reportado incrementos en la frecuencia de ALH-DR2 y DQ1 en pacientes LL y de ALH-DR3 en pacientes TT. Estos antígenos, pueden ser posteriormente subdivididos en alelos definidos por sus secuencias de aminoácidos. Una sustitución de un sólo aminoácido puede dar lugar a alelos con diferentes propiedades. El alelo DRB1*1501 mostró una fuerte asociación con pacientes LL más que los pacientes con TT ($p < 0.00001$). Además, se encontró DQB1*0601 con mayor frecuencia en pacientes LL que en los controles ($p < 0.00001$); DQA1*0103 fue más frecuente en pacientes LL que en el grupo de pacientes con lepra tuberculosa; y DQA1*0102 se observó incrementado selectivamente en pacientes con lepra lepromatosa. Por otro lado, DRB1*0701, DQB1*0201 y DQA1*0201 disminuyeron en pacientes LL en comparación con pacientes TT y controles, y DQB1*0503 fue selectivamente disminuido en

pacientes TT sugiriendo que, estos alelos pueden modular la respuesta inmune que determina la forma de la lepra y el desarrollo en cada paciente (Singh, 1997).

3.1.3 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydiaceae es una familia de parásitos bacterianos intracelulares obligados, caracterizada por un ciclo de desarrollo único común a todos los miembros de la familia.

Las clamidias infectan a un amplio espectro de huéspedes vertebrados dentro de los tres nidos ecológicos mayores: pájaros, mamíferos y humanos. Las enfermedades comúnmente causadas por estos microorganismos, incluyen tracoma, conjuntivitis de inclusión, linfogranuloma venéreo y psitacosis. Los humanos también son infectados en forma ocasional con clamidias que normalmente se asocia con enfermedad de otros animales, como neumonitis de felinos.

Sólo se reconocen dos especie diferentes de clamidias: 1) *Chlamydia trachomatis* que es inhibida por sulfonamidas y no produce inclusiones que tiñen yodo, y 2) *Chlamydia psittaci*, que no es inhibida por sulfonamidas y no produce inclusiones que se tiñan con yodo, en vesículas citoplasmáticas.

La enfermedad reportada con mayor antigüedad asociada a *C. trachomatis* es tracoma, una enfermedad ocular descrita por los chinos y egipcios hace miles de años y continua siendo la principal causa de ceguera. En las últimas dos décadas se ha identificado también la infección genital por chlamidia como un problema de salud pública por que asociándose esta enfermedad con síndromes como uretritis gonocócica, cervicitis mucopurulenta, inflamación pélvica, embarazo ectópico e infertilidad.

En un estudio de 306 personas de comunidades endémicas por tracoma en Gambia, el ALH -A28 fue significativamente más común en casos de pacientes que los casos control. Particularmente el alelo A*6802 se encontró en la mayoría de los casos de pacientes con esta enfermedad. No hubo ningún tipo de ALH individual asociado a inmunidad protectora lo que sugiere que esta puede estar dada por un conjunto de ALH o por un complejo de respuestas de células T (Peeling, 1996).

3.1.4 *Burkholderia pseudomallei*.

Este microorganismo es un habitante común de los suelos en las regiones tropicales y subtropicales entre las latitudes 20 N y 20 S. Causa melioidosis, una enfermedad similar al muermo, en el ser humano, y en Tailandia se reportan mayor número de casos en temporada de lluvias. Ingresando el microorganismo a su huésped por inhalación, ingestión o a través de abrasiones cutáneas.

La enfermedad puede adoptar una de cuatro formas: aguda, subaguda, crónica o latente. En la forma aguda se produce septicemia por formación de abscesos en casi todos los órganos del cuerpo. Desde el punto de vista clínico, no puede diferenciarse de otros episodios sépticos, la mortalidad que continúa siendo del 30 % a pesar de la antibioticoterapia. La forma subaguda, se caracteriza por un curso prolongado, con formación de abscesos en diversos órganos, una bacteremia más leve y neumonía. La forma crónica, tiene un curso pulmonar benigno que simula una tuberculosis primaria o una infección micótica. La infección latente o asintomática, pueden reincidir después de muchos años. Esta reactivación puede ser desencadenada por el desarrollo de otras enfermedades, como un cáncer. Por esto es que se le ha dado el sobrenombre de enfermedad de *bomba de tiempo vietnamita* (Joklik, 1997).

La inmunidad celular esta postulada para ser un importante en la inmunidad para la melioidosis que puede estar influenciada por la severidad y desarrollo de la enfermedad. La tipificación de ALH -DRB1, -DQA1 y - DQB1 se puede llevar a cabo por PCR y PCR-SSO. Fue así como estudiaron étnica y geográficamente setenta y nueve casos con melioidosis y 105 casos control (sanos). Se identificaron en esta población alrededor de 24 alelos DRB1, 7 alelos DQA1 y 13 alelo DQB1, y se observó una asociación con melioidosis con DRB1*1602 en pacientes con esta infección (10.1%) comparado con los casos control (4.8%). Además, se observó un incremento significativo de alelo DRB1*1602 y un decremento de DQA1*03 en pacientes con melioidosis septicémica, la forma más severa de la enfermedad. Se reporta que hay una marcada asociación de DRB1*0701, DQA2*0201 y DQB1*0201 en casos reincidentes de melioidosis. En contraste, no se observó asociación alguna en melioidosis localizada o melioidosis en pacientes diabéticos. Estos hallazgos proporcionan una evidencia de la relación de las bases genética con ciertos aspectos de la melioidosis (Dharakul, 1998).

3.1.5 *Helicobacter pylori*.

Se han hecho estudios para observar la función del CMH clase I y clase II en la infección con *Helicobacter pylori* y la inmunización oral en vivo. Estas observaciones muestran que las células T CD4 después de la inmunización puede ser importante para generar una respuesta inmune protectora y que células T CD4(+), CD8(-) y células CD4(-) CD8(+) regulan la extensión de la infección de *H. pylori*. (Pappo, 1999)

3.2 **Antígenos Leucocitarios Humanos asociado con enfermedades parasitarias .**

Un análisis comprensivo de la asociación de ALH y enfermedades infecciosas ha permitido precisar los alelos relacionados con la susceptibilidad y la protección para las diferentes enfermedades infecciosas a lo largo de los diferentes orígenes étnicos. Estos estudios, además de ser de gran interés para el establecimiento de mecanismos moleculares para las enfermedades parasitarias, han permitido tener las bases genéticas para la identificación de personas con alto riesgo de contraer la infección. La prevalencia y frecuencia fatal de las enfermedades parasitarias como la malaria han mantenido ciertas frecuencias genéticas en áreas endémicas de esta enfermedad (Singh, 1997).

El polimorfismo del CMH es marcado por la existencia de líneas alélicas antiguas, que han pasado de una especie a otra. Estas líneas se caracterizan por presentar pequeñas secuencias las cuales han permanecido prácticamente sin cambio por más de 40 millones de años (Klein, 1994).

La asociación de ALH y enfermedades parasitarias, ha sido importante para explicar parte de su patogénesis. Las bases moleculares de esta relación, no se ha podido explicar, pero existe una hipótesis que establece que la asociación resulta de la habilidad de un tipo particular de ALH de presentar un péptido antigénico crítico. Recientemente la identificación de las características de la secuencia de los péptidos de las moléculas de ALH clase I, sugieren que el antígeno relevante debe ser identificado por la respuesta inmunológica celular a los péptidos que contienen esos antígenos incitadores que son candidatos para mediar la asociación enfermedad -ALH (Singh, 1997).

3.2.1 *Plasmodium falciparum*

El paludismo es producido por plasmodios, procedentes de anofelinos o sangre humana, que al reproducirse en los eritrocitos del huésped inoculado dan origen a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, la cual tiene un curso crónico. Los parásitos deben completar su ciclo en los mosquitos, para así poder transmitir la enfermedad a otros huéspedes susceptibles.

En México, se ha incrementado el número de casos anuales a partir de 1960 y también ha aumentado el área afectada del país. Para 1988, sólo existían cuatro entidades federativas libres de esta enfermedad.

El recrudecimiento del paludismo a nivel mundial (del que no se escapa México), al parecer se debe a tres factores: disminución en la intensidad de las campañas contra el paludismo, la aparición de vectores resistentes al DDT y la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina (Kumate, 1994).

Hay diferencias significativas en los genes ALH en el loci A y en el B entre las poblaciones expuestas a la malaria, de las no expuestas. El complejo ALH provee cierta protección a poblaciones en áreas endémicas de esta enfermedad, quienes están expuestas a los parásitos de la malaria. Los mecanismos adaptativos pueden ser expresados por asociación de los genes de ALH que controlan la respuesta inmune a los antígenos de la malaria. La asociación entre el antígeno e I ALH-B53 y la protección contra la malaria severa, ha sido bien establecida. Esta asociación puede estar mediada por linfocito T citotóxico restringido ALH clase I durante el paso del parásito por el hígado en su ciclo de vida. La protección asociada entre ALH-B53 y la malaria severa, fue investigada elucidando la secuencia de péptidos de esta molécula antes de probar posibles epítopes antigénicos del estadio preeritrocítico de *Plasmodium falciparum* en ensayos bioquímicos y celulares. Los linfocitos T citotóxicos ALH-B53 restringidos de la mayoría de los africanos malaria inmunes, reconocen específicamente un antígeno un nonamerpéptido que se conserva de uno del estadio hepático del parásito, pero no fueron identificados epítopes restringidos ALH-B53 en antígenos de otros estadios. Estos hallazgos indican una posible base para esta asociación ALH- enfermedad y sirve de soporte para el uso de este antígeno específico del estadio hepático, como un componente de la vacuna contra la malaria.

La asociación entre fenotipos ALH- DR/-DQ y la respuesta inmune a proteínas circunsporozoito del parásito de la malaria fueron investigadas en adultos Thai. Hay evidencias, que las respuestas de las células B y T humanas a la mayoría de antígenos de *P. falciparum* (Pf RESA), son reguladas genéticamente, sobre todo en personas con infecciones repetidas. Para asociar las respuesta de células T y la respuesta de anticuerpos con el donador de genotipo CMH clase II, se realizaron las tipificaciones de los antígenos leucocitarios ALH clase II, DQ de 145 donadores que viven en áreas endémicas de esta enfermedad en Africa.

Estos datos implican que el impacto de los productos de los genes de CMH clase II en respuestas inmunes específicas a epítopes Pf 155/ RESA es débil y difícil de demostrar en poblaciones abiertas naturalmente sensibilizadas por infección. La relación entre ALH clase II y el reconocimiento de tres antígenos para una vacuna de *P. falciparum* se investigó en personas con alelos extremadamente heterocigotos para ALH clase II, que viven en una zona endémica del Este de Africa. La mayoría de personas de esta población fue particularmente común encontrar una combinación clase II DQA -DQB, (serológicamente específica DQw2). Este haplotipo, fue significativamente asociado con niveles altos de anticuerpos más que con los niveles promedio para un péptido epítipo (EENV)6 de PfRESA (Joklik, 1997).

3.2.2 Leishmaniasis

Leishmaniasis, es el nombre genérico de las infecciones causadas por protozoarios intracelulares miembros del género *Leishmania*, y constituyen una de las seis enfermedades tropicales de más importancia para la Organización Mundial de la Salud. Se estima que estas zoonosis afecta a más de 12 000,000 de individuos en más de 80 países. La expresión de la enfermedad es variable, y depende de la especie de *Leishmania*, así como del estado inmune y respuesta del huésped. En este sentido, la infección en el hombre puede no manifestarse o no ser evidente o bien presentar manifestaciones que varían desde úlceras cutáneas, hasta compromiso extenso de la piel y mucosas, o presentar la característica de una enfermedad sistémica, con afectación generalizada del sistema reticuloendotelial.

La respuesta inmune celular, es el principal factor que interviene en el control y eliminación de la infección, siendo la inmunidad humoral únicamente un

modulador de la respuesta inmune. Así, estudios experimentales de leishmaniasis cutánea, demuestran que se generan anticuerpos incapaces de eliminar la infección. Esta inmunidad celular protectora, estaría mediada por linfocitos CD4 que producen citocinas, que entre otros efectos, activan macrófagos parasitados, incrementando su capacidad de lisar parásitos intracelulares, a través de la activación de los mecanismos microbicidas dependientes e independientes de oxígeno.

La asociación de ALH fue estudiada en pacientes leishmaniasis cutánea para evaluar el papel de los antígenos ALH como marcadores genéticos en la patogénesis de esta enfermedad parasitaria de la piel. Existe una asociación significativa entre el antígeno ALH- A11 y scabies, y entre antígenos ALH- A11, -B5, y -B7 y leishmaniasis cutánea difundida. En estudio de 24 familias con uno o más de los casos localizados con leishmaniasis cutánea, de una región endémica en Venezuela con alta incidencia de leishmaniasis cutánea, fue tipificada para antígenos ALH -A, -B, -C, -DR y - DQ y factores del complemento. Después de estudiar los haplotipos de padres de individuos sanos e infectados, se encontró de forma significativa una alta frecuencia de ALH-A28, -Bw22 o -DQw8 en infectados en comparación con pacientes sanos (control). Además, ALH-B15 se encontró una mayor frecuencia que los casos control. Los haplotipos Bw22, DR11, DQw7 han sido observados con más frecuencia en personas infectadas que en personas sanas. No se ha podido demostrar susceptibilidad genética putativa a leishmaniasis cutánea localizada asociada con algún ALH. Una comparación caso /control de 26 pacientes de leishmaniasis cutánea y personas sanas del mismo origen étnico, confirmaron la asociación de ALH- Bw22 y DQw3 con esta enfermedad. El riesgo relativo alcanzado fue de 12.5 para Bw22 y 4.55 para DQw3. ALH-DQw3 aparentemente hace la mayor contribución como factor de riesgo genético para leishmaniasis localizada a nivel de la población. En otro estudio, se encontró una significativa asociación entre leishmaniasis cutánea localizada y ALH-B5 , -DR3 (Singh, 1997; Joklik, 1997).

3.2.3 *Kala-azar*

La asociación de frecuencias de antígenos ALH clase I en 52 pacientes con kala-azar y 222 pacientes control sanos en Irán, mostró presencia de ALH-A26 en una mayor proporción en pacientes que en sanos con un valor estadísticamente

significativo ($p=0.004$). Esto nos indica un alto riesgo de contraer la enfermedad cuando el ALH- A26 es positivo y una remarcable influencia de este antígeno en la prevalencia del Kala-azar (Joklik, 1997).

3.2.4 *Trypanozoma cruzi*

Los miembros del género *Trypanosoma* pasan parte de su ciclo vital en vertebrados y otra parte en invertebrados. Las tres especies patógenas para el hombre son *T. gambiense* y *T. rhodesiense* en África y *T. cruzi* en América. Los tripanosomas son protozoarios fusiformes, pequeños, muy móviles, aplanados lateralmente, y que se desplazan con movimientos ondulatorios en espiral por medio del flagelo y la membrana ondulante. Se reproducen por fisión binaria.

La tripanosomiasis americana, es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi* que es transmitida al hombre y otros mamíferos por artrópodos hematófagos. La enfermedad descrita por Carlos Chagas a principios de siglo y se caracteriza por una fase aguda con signos locales y sistémicos y una fase crónica que afecta principalmente corazón, esófago y colón.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad exclusiva de la Región de las Américas. Aunque existen vectores y reservorios selváticos infectados, incluso en el sur de los Estados Unidos, la infección en el hombre se distribuye desde México hasta la Argentina. La mayor parte de los casos se presentan en zonas rurales y subrurales, en las cuales se mantiene la endemia debido a las precarias condiciones socioeconómicas de la población y a la naturaleza doméstica del vector. Así mismo, la migración de la población del campo a las ciudades, ha hecho que la transmisión por transfusión sanguínea sea un fenómeno que se observa ocasionalmente. La tripanosomiasis congénita ocurre en los países con alta endemicidad.

En México, se considera como área endémica probable el territorio que se encuentra de 1800 m sobre el nivel del mar, ya que dentro de esa altura es en donde se ha encontrado triatóminos infectados por el parásito. Los casos de enfermedad de Chagas que se han notificado, corresponden a los Estados de Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Edo. de México y Sonora.

En algunos estudios serológicos empleando diferentes técnicas, en los Estados de Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca se encontró una prevalencia

de casi 6% semejante a lo informado en otros países de América Latina que tienen una incidencia mucho más alta de esta enfermedad (Kumate, 1994).

Actualmente se está evaluando una vacuna con ratones infectados con *Tripanozoma cruzi* para inducir la inmunidad antiparasitaria y se están estudiando tanto el antígeno 1 de la superficie del tripomastigote como anticuerpos anti T. cruzi y moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad en linfocitos T CD8(+) citotóxicos, para usarlo como modelo para el diseño y desarrollo de vacunas con los componentes de ADN óptimos los cuales puedan ser utilizados para la prevención de la enfermedad de Chagas (Wizel, 1998).

3.3 Asociación de Antígenos Leucocitarios Humanos con enfermedades virales.

La asociación de enfermedades virales con alelos de ALH, no ha sido estudiada ampliamente. Sin embargo, los mecanismos por medio de los cuales las moléculas de ALH determinan la respuesta inmunológica a los péptidos virales, ha sido bien estudiada como parte de un esfuerzo para desarrollar vacunas seguras y eficaces. El éxito en el desarrollo de las vacunas contra infecciones virales, depende de la habilidad de vacunas con virus vivos o inactivados para producir la respuesta humoral y producir anticuerpos antiviral neutralizadores. Adicionalmente, las vacunas virales que inducen la respuesta inmune celular primaria para la destrucción de células infectadas con virus por CD8 + CTLs, pueden ser necesarias para dar protección contra algunas infecciones virales. CD +CTLs antiviral son inducidas por péptidos virales presentados con los péptidos unidos a las moléculas ALH de clase I en la superficie de las células infectadas. Estudios realizados en la última década han proporcionado una revisión en la presentación de péptidos virales por moléculas ALH clase I a células T CD8 (Kaslow, 1998).

3.3.1 Herpes saimiri

Herpesvirus saimiri, es un virus oncogénico, linfotrópico, gama herpes virus, transforma células T de humano, causando linfomas y leucemias en varias especies de primates del Nuevo Mundo. Una porción abierto de lectura del

genoma del *H. saimiri* codifica proteínas glicosiladas que son secretadas y unidas a heterodímeros CMH clase II, moléculas ALH- DR. Estos resultados indican que esta porción abierta de lectura puede funcionar como un inmunomodulador que contribuye a la inmunopatología de la infección por *H. saimiri* (McNicholl, 1998).

3.3.2 *Virus del dengue.*

Se han reportado células T citotóxicas que reconocen péptidos del virus del dengue. Los resultados de los análisis de haplotipos ALH clase I y péptidos restringidos demostraron que ALH- A2 y -A68 predominan en comparación con nonapéptidos ALH-A24, -B8 y -B53. La respuesta de las células T al virus del dengue esta restringida por el alelo ALH-DR15. En la actualidad se está desarrollado una propuesta para preparar antiviral CD8 +CTLs que pueden proporcionar una protección inmune celular contra la infección del flavivirus sin inducir la respuesta humoral asociada al síndrome del choque febril del dengue. La propuesta es usar péptidos sintéticos de flavivirus con un aminoácido incitador para formar con el péptido ALH clase I un grupo de haplotipos ALH prevalentes en la población dada en un área endémica de la enfermedad como inmunógeno. Este péptido viral sintético puede introducirse en la piel humana usando una loción que contiene los péptidos y sustancias capaces de facilitar la penetración a través de la piel de estos péptidos para alcanzar las células de Langerhans.

El péptido tratado unido a células de Langerhans, antígeno profesional presentador de antígenos, puede unir el péptido viral sintético con el péptido de unión de ALH clase I. Logrando así, que las células de Langerhans cargadas con antígenos pueden migrar e inducir la respuesta inmune en los nodos linfáticos (Singh, 1997).

El efecto bloqueador que posee el huésped permite la respuesta a los cambios de un agente infeccioso emergente y a su ambiente. Las características del huésped, especialmente aquellas que se encuentran bajo regulación genética y que no tienen el potencial para una rápida evolución epidemiológica, han creado la necesidad de desarrollar mecanismos genéticos en la respuesta del huésped. A través de la manipulación racional de los genes (Singh, 1997).

3.3.3 *Virus de Inmunodeficiencia Humana*

Desde los primeros años de la epidemia del VIH, se han observado diferencias en los grados de progresión en personas infectadas por VIH. La importancia que pudieran tener los genes que codifican para ALH, se ha examinado, como determinantes en el curso de la enfermedad, desde infección hasta la presentación de un cuadro clínico de SIDA. Diversos haplotipos para ALH parecen tener influencia en la progresión de la enfermedad, pero los efectos son complejos y pueden depender también de la interacción con otros genes del huésped (Roitt, 1991).

La transmisión del virus de inmunodeficiencia 1 (VIH-1) de una mujer infectada a su progenie durante la gestación y nacimiento, está influenciada por los alelos CMH clase II DRB1 del infante. Se han encontrado varios casos de infantes infectados con VIH (15.2%) e infantes serorrevertidos (31.7%) con alelos DR-13 incluyendo DRB1*1301, 1302 y 1303. Esta asociación se vio influenciada por el origen étnico de los pacientes. Examinando otras asociaciones con DR12, el DRB1*1501 fue asociado con seroreactivos en infantes caucásicos entre estos infantes, el alelo DRB1*03011 fue positivamente asociado con la infección por VIH (Tomiyama, 1999).

Se han encontrado seis epítopes de VIH-1 de CTL presentados por ALH-B*5101, sugiriendo que la CTL específica para estos epítopes, juega un papel importante en el reconocimiento de células infectadas por VIH-1. Estos epítopes serán útiles para analizar la respuesta de CTL en individuos infectados por VIH-1.

Se han utilizado moléculas que imitan o simulan moléculas del huésped, las cuales parecen ser importantes también en la asociación de moléculas de ALH como con enfermedades virales. La similitud molecular también parece ser un mecanismo importante en la asociación de moléculas ALH con infecciones virales. La similitud molecular entre proteínas mensajeras VIH y moléculas ALH puede activar la autoinmunidad contra células T+ CD4 expresando moléculas clase II. Han establecido que ambos VIH-1 gp 120 y proteínas de adhesión de *Mycoplasma genitalium* comparten un área de significativa similitud con CD4 unido al sitio de las proteínas CMH de clase II. La interacción de esta triada podría contribuir a la disfunción de células T, depleción de células T, intercambio de células Th1-Th2, proliferación de células B hiperglobulinemia y disfunción en la presentación de antígenos (Singh, 1997).

3.3.4 *Citomegalovirus*

Los citomegalovirus, pertenecen al grupo de los virus herpes, suelen permanecer latentes después de la primoinfección, ocasiona recidivas con frecuencia y tienen potencial oncogénico. Probablemente son la causa más frecuente de infección congénita y perinatal en seres humanos, y la mayoría de las infecciones son asintomáticas. Ocasionan enfermedad grave cuando infecta al ser humano in útero y a individuos inmunodeprimidos. En adultos inmunocompetentes, es causa de un síndrome semejante a la mononucleosis infecciosa (Kumate, 1994).

El ALH-DR ha sido evaluado como un marcador para la respuesta inmune relacionada a infecciones con citomegalovirus. Este virus, juega un papel en la reacción inflamatoria crónica y en la inflamación abdominal por aneurisma aortico. Las células infectadas con citomegalovirus y células ALH-DR positivas, se encuentran frecuentemente en la fibrosidad de este aneurismas, más que en el aneurisma aterosclerótico y casos control (Singh, 1997).

3.3.5 *Hepatitis B y C*

Un estimado de aproximadamente 250 millones de personas en el mundo son constantemente infectadas por virus de Hepatitis B, la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular, en áreas endémicas de la enfermedad. Los antígenos ALH clase I, contienen péptidos virales que son importantes tarjetas para hepatocitolisis inmune mediada por CD8 +CTLs en la infección por virus de hepatitis B. Se ha demostrado que ALH-DR13, esta asociado con cierta resistencia a la infección por virus de hepatitis B. El genotipo ALH-DRB1*0701; ALH-DQB1*0202 se ha asociado con un declinamiento de anticuerpos anti-HB y se encontraron con frecuencia en aquellos individuos que no tuvieron una respuesta efectiva a la vacuna.

El pronóstico puede ser diferente entre pacientes infectados con virus de hepatitis C: ocurre una enfermedad crónica del hígado en la mitad de los pacientes, mientras que la otra mitad no exhibe signos de progresión histológica de daño hepático. La respuesta inmune de cada huésped puede jugar un papel importante en la recuperación o salida de la enfermedad. Para identificar los epítopes CTL en la región NS3 del virus de hepatitis C, se modifico un acercamiento utilizando proteínas recombinantes y la capacidad de los péptidos

cortos para unirse a moléculas ALH de clase I. Se identificó un epítotope presentado por ALH - A2 de células T citotóxicas en la región NS3 del virus de hepatitis C. Otros estudios establecen que el antígeno ALH- DR5, aparece como factor protector contra infecciones de virus de hepatitis C.

Durante el curso de las infecciones virales como aquellas causadas por citomegalovirus, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de varicella-zoster y VIH-1, el nivel de antígenos ALH clase I en suero aumentan significativamente. Durante la infección con VIH-1 el nivel de antígenos ALH clase I correlacionado con los estadios de la enfermedad representa un buen marcador del progreso de la enfermedad (Singh, 1997; Black 1995).

3.3.6 *Virus Epstein- Barr*

Uno de los miembros de la familia de los herpesvirus el virus Epstein- Barr, ha sido asociado con replicación viral (mononucleosis infecciosa) en el carcinoma nasofaríngeo, linfoma de células B, y enfermedad de Hodgking asociado a latencia viral. Se han identificado dos epítotope específicos para el virus Epstein- Barr en el alelo ALH- B7 de CTL restringidas (Singh, 1997).

3.3.7 *Papilomavirus*

Hay evidencia de que existe un vinculo entre el CHM y células escamosas en el carcinoma de cervix (SCCC), y diferentes patrones de asociación en diferentes pacientes. Para estudiar esto en la población española, se tipificaron serológicamente para ALH clase I y -II y ALH- DQB1 oligogenotipos de 142 pacientes y 138 personas sanas como control. Un análisis comparativo de los fenotipos DR2-DQ3, demostró una fuerte asociación entre DR2 y DQ3 en el carcinoma cervical. Sin embargo, no se observó interacción entre los dos factores ALH, lo que parece que pudieran conferir dos riesgos independientes. De esta manera, fenotipos con DR2 y/o DQ3 (79% de los pacientes, 60% de controles) se presentaron, mientras que la minoría DR2/DQ3 negativos, fenotipos con antígenos ALH clase I - A2 parece conferir mayor riesgo de carcinoma de cervix. Un análisis comparativo de la frecuencia de alelos revela dos fuertes incrementos muy significativos, uno para DQB1*0301 en displacias bajas a moderadas y otro para DQB1*0402 en displacias severas in situ con un marcado incremento de

DQB1*0302 entre displacia severa in situ y carcinoma de cervix invasivo. La frecuencia de DQB1*0603 registra un fuerte decremento en displacias menores y carcinoma invasivo indicando un efecto protector.

No se ha podido establecer una asociaci3n significativa entre ALH y el estado infeccioso del papilomavirus humano, por lo que el papel del alelo DQB en la modificaci3n del curso de la enfermedad causada por el papilomavirus humano no puede ser excluido (Montoya, 1998) .

3.3.8*Puumala hantavirus*

Otra infecci3n viral en la que se encontr3 relaci3n entre ALH y la enfermedad es la causada por Puumala hantavirus la cual es transmitida por roedores y causa enfermedades pulmonares, renales y puede producir hasta la muerte. Personas que expresan ALH-B8, tiene un cuadro m3s severo de la enfermedad, presentan baja presi3n sanguinea, creatinina alta, y se ha encontrado la presencia del virus en orina y sangre. Personas con ALH-B27 tienen reacciones intermedias (McNicholl 1998).

4.OBJETIVO GENERAL

Conocer la importancia en relación al complejo principal de histocompatibilidad con la susceptibilidad y manifestaciones de las enfermedades infecciosas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICO

Resaltar la importancia de la variabilidad genética entre los individuos como determinante en la capacidad de responder a una vacuna o infección natural.

Relacionar ciertos alelos ALH con la susceptibilidad del huésped a ciertas enfermedades infecciosas.

Relacionar ciertos alelos ALH con el desarrollo y manifestaciones de la enfermedad en el huésped.

Conocer una técnica de tipificación para descifrar los alelos del huésped y la relación de estos con las enfermedades infecciosas.

Asociar los alelos ALH con enfermedades bacterianas, parasitarias y virales en algunas zonas endémicas.

Material biológico:

20 ml de sangre con anticoagulante (EDTA o heparina)

Material y equipo

Tubos Falcon de polietileno de 50 ml

Pipetas Pasteur

Gradilla para tubos Falcon

Tubos Fisher de poliestireno de 1 ml

Gradilla para tubos Fisher

Pipetas automáticas de 100, 200 y 1000 μ l

Bulbos

Contenedor para eosina, complemento y PBS

Cajas de tipificación de moléculas ALH con antisuero específico

Cámara de Neubauer

Micropipetas Hamilton con dispensadores individuales y múltiples de 1 y 5 μ l respectivamente

Puntas para pipetas automáticas

Cronómetro

Centrífuga Fisher 59A

Centrífuga para tubos Falcon

Congelador de -70 °C, para conservar las cajas con antisueros, el complemento y los linpho-kwiks (I y II)

Refrigerador de - 4 °C

Microscopio compuesto

Teclado para leer células

Reactivos

EDTA Na₂ 5 mM o heparina

PBS

AKC

Eosina Y al 5%

Formalina al 40 %

Ficoll radialar o Ficoll-Hypaque o cualquier otro Ficoll comercial

Medio de cultivo celular RPMI o McCoy

Linfo-kwik y Linfo-kwik II (anticuerpos monoclonales para la separación de linfocitos B)

Complemento de conejo.

Procedimiento

1. Tomar 20 ml de sangre, anticoagularla (con EDTA o heparina), colocarla en un tubo Falcon de 50 ml, y diluir PBS hasta 30 o 35 ml.
 2. Colocar una pipeta Pasteur en el tubo anterior y a través de ésta agregar con otra pipeta poco a poco el Ficoll, de manera que este quede en la parte inferior del tubo, formando dos fases; se agregan aproximadamente 5 ml por cada 10 ml de sangre.
 3. Centrifugar a 350 G durante 30 min.
 4. La capa de mononucleares (linfocitos y monocitos) que quedan en la interfase del Ficoll y el plasma con PBS se extrae con pipeta Pateur y se coloca en otro tubo Falcon, se agrega PBS hasta 50 ml con la finalidad de lavar las células,
 5. Centrifugar de 400 a 500 G durante 10 min.
 6. Decantar el sobrenadante y resuspender el paquete de mononucleares en 1 ml aproximado de medio RPMI o McCoy. Transferir la suspensión celular a un tubo Fisher.
 7. Centrifugar dicho tubo por un segundo a velocidad 7 (4500 G) en una microcentrifuga Fisher 59A . En este paso se sedimentan los granulocitos y monocitos contaminantes, en el sobrenadante están resuspendidos los linfocitos y las plaquetas.
 8. Colocar en otro tubo Fisher el sobrenadante. Centrifugar 1 min. a velocidad 1.5 (1000 G). Debido a las diferencias de densidad entre los linfocitos y las plaquetas, los primeros se sedimentan quedando en el fondo del tubo y las plaquetas resuspendidas en el sobrenadante.
 9. Quitar el sobrenadante (plaquetas) y regresarlo al tubo anterior (en caso de perder los linfocitos, de este tubo se pueden obtener más).
- Nota: en caso de que el botón de linfocitos obtenido, esté contaminado con eritrocitos se realizan los siguientes pasos: se resuspende el botón de linfocitos en 1 ml aproximadamente de AKC, incubar durante 5 min. a 37 °C, centrifugar 2 min. a

velocidad 4 (2500 G), desechar el sobrenadante, agregar 1 ml aproximadamente de PBS, resuspender el botón de linfocitos, centrifugar 2 min. a velocidad 4, y por ultimo desechar el sobrenadante.

10. Resuspender el botón de linfocitos en medio RPMI o McCoy, la cantidad de medio es proporcional al tamaño del botón.

NOTA. Si se va a tipificar ALH-A, B, C y D entonces separar 200 μ l de la suspensión celular (este volumen es suficiente para sembrar las placas de ALH-ABC)

11. Contar en la cámara de Neubauer o hematocitómetro los cuadros que se señala en la figura 3.

Realizar los cálculos de ajuste celular de la siguiente manera: si por ejemplo se contaron 60 células en los 5 cuadros negros (cada cuadro negro consta de 16 cuadritos) que se leyeron, se convierten a cél/ mm³:

$$\begin{array}{l}
 60 \text{ cél} \cdot 0.02 \text{ ml} \\
 \times \quad -1 \text{ ml} \\
 \hline
 \times \quad = 3000 \text{ cél/ ml}
 \end{array}$$

Con la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$, ajustar a 2000 cél/ml. Si utilizamos 1000 μ l de medio de cultivo para resuspender el botón de linfocitos, tenemos entonces que:

DATOS	FORMULA	SUSTITUCIÓN
$V_1 = X$	$V_1C_1 = V_2C_2$	
$C_1 = 3000 \text{ cél/ml}$	$V_1 = V_2C_2/C_1$	$V_1 = (1000 \mu\text{l})(2000 \text{ CEL/ml})/3000 \text{ cél/ml}$
$V_2 = 1000 \mu\text{l}$		$V_1 = 666.67 \mu\text{L.}$
$C_2 = 2000 \text{ cél/ml}$		

Entonces se agregan 666.67 μl de la suspensión celular, se colocan en otro tubo Fisher y se llevan a un volumen final de 1000 μl con un medio de cultivo. Así, se tienen 1000 μl de una suspensión de 2000 cél/ μl .

12. Proceder a sembrar las placas ALH ABC con 1 μl de la suspensión celular e incubar durante 30 a 60 min (el tiempo es opcional) a temperatura ambiente. Después continuar con el paso 21 de está técnica. Para tipificar ALH-DR continuar con el siguiente paso.

13. Al resto de la suspensión de linfocitos centrifugar 2 min, a velocidad 4, desechar el medio de cultivo y agregar 0.8 ml del reactivo Linpho-kwik I.

14. Incubar durante 60 min a 37 °C

15. Después de la incubación agregar una capa de PBS de 200 μl , para formar un gradiente de dos fases y centrifugar 2 min. a velocidad 5.

16. En la interfase se observa un anillo de células muertas. Se descarta el sobrenadante junto con la interfase dejando sólo el botón de linfocitos en el fondo.

17. Agregar 0.5 ml de reactivo de Linpho-kwik II y centrifugar 2 min. a velocidad 5 (3500 G).

18. Descartar el sobrenadante, agregar 1 ml aproximadamente de PBS, resuspender y centrifugar 2 min. a velocidad 4.

19. Descartar el sobrenadante y resuspender los linfocitos B aislados en 200 μl medio de cultivo - la cantidad de medio varía según el tamaño del botón. - Ajustar la concentración a 2000 cél / ml.

20. Sembrar 1 μl de la suspensión en cada pocillo de la placa DR y DQ e incubar durante 60 min. a temperatura ambiente.

21. Agregar 5 μl de complemento a cada pocillo e incubar una hora para las placas ABC y 2 horas para las DQ y DR.

22. Agregar de 2 a 5 μ l de eosina Y al 5% a cada pocillo. Incubar durante 3 min. a temperatura ambiente.
23. Agregar 5 μ l de formalina al 40% a cada pocillo, con la finalidad de fijar.
24. Dejar reposar durante 20 min. o toda la noche en cámara húmeda en el refrigerador de 4 °C.
25. Leer en un microscopio invertido con objeto de 10 X
26. Interpretar resultados siguiendo los criterios que a continuación se exponen en el cuadro 1. (Ramírez, 1996)

Cuadro 1.

Criterios de Interpretación de la prueba de histocompatibilidad

Calificación	% de células lisadas	Interpretación
1	0-10	Negativa
2	11-20	Dudosa
4	21-50	Debilmente positiva
6	51-80	Positiva
8	81-100	Fuertemente Positiva

6. RESULTADOS

En el cuadro 2 se pueden observar los resultados de diversas investigaciones en donde se ha descubierto la asociación que existe entre un tipo en particular de molécula ALH y determinada enfermedad.

CUADRO 2 .
ENFERMEDADES ASOCIADAS A ANTIGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS

Enfermedad	ALH asociado
Bacterianas	
Espondilitis alquilosante	B27
Enfermedad de Reiter	B27
Uveitis anterior aguda	B7
Tuberculosis y lepra	DR2
(Formas multibacilares)	(DRB1*1501,1502)
Lepra lepromatosa	DR2 y DQ1
Tuberculosis multibacilar	DR3
Virales	
Fiebre virus del dengue	DR15
Virus de inmunodeficiencia humana	DR13, DR2, (DRB1*1501), DRB*03011
Hepatitis B	DR13
Hepatitis C	A2,DR5
Virus Epstein- Barr	A11, B35.01,B7
Parasitarias	
Malaria	A11,B53
Leishmania cutanea difusa	A11,B5, B7
Leishmania cutanea localizada	A28, Bw22, DQw8 DQw3
Esquistosomiasis	B5, DR3
Leishmaniasis visceral	A26

7. DISCUSION

El síndrome de Reiter , espondilitis alquilosante y Chlamydia ha sido asociada con ALH-B27, la presencia de este alelo en el huésped ha sido relacionada con mayor susceptibilidad estas enfermedades. En personas que han presentado ataques de uveitis anterior aguda, una enfermedad ocular se han encontrado los alelos ALH- B27 y -B7, asociados a esta patogénesis (Singh, 1997).

Los factores genéticos pueden controlar la respuesta del huésped para *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha descubierto una asociación entre tuberculosis pulmonar y leprosa (formas multibacilares) y ALH-DR2. Los subtipos encontrados en pacientes y controles fueron DRB*1501 y DRB*1502. La lepra lepromatosa ha sido asociada a DR2 y DQ1 y la tuberculosis paucibacillar con DR3, lo cual sugiere que estas moléculas o los genes ligados a ellas puedan gobernar la susceptibilidad a estas infecciones y su resistencia a las drogas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad (Singh, 1997).

Otra enfermedad bacteriana que se ha estudiado es la causada por *Burkholderia pseudomallei* que se ha asociado a DR*1602 que se presentó en pacientes con melioidosis septicémica que es la forma más severa de la enfermedad y DR1*0701, DQA2*0201 y DQB1*0201 en pacientes reincidente con melioidosis (Dharakul, 1998).

Entre las enfermedades de origen viral asociadas a ALH se encuentran el virus del Dengue , en los pacientes con esta enfermedad se han encontrado los alelos -A2 y A68. Pero la respuesta de las células T está estrechamente asociada a ALH -DR15 (Singh, 1997).

En el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), se han encontrado los alelos DR13 , DR12 y los subtipos DRB1*1301, 1302, 1303, DRB1*1501 asociados a la infección, esta asociación se vio influenciada por el origen étnico de los pacientes estudiados (Singh, 1997; Tomiyama, 1999).

El virus de la hepatitis ha sido asociado al alelo ALH-DR13, el cual se cree confiere cierta resistencia a la infección a los pacientes contra este virus. Para la hepatitis C se encontraron el alelo ALH-A2 y que se relaciona con mayor

susceptibilidad de los pacientes a la infección y el alelo DR5 que aporta protección al paciente (Black, 1995; Singh, 1997).

En los estudios realizados para papilomavirus se han asociado los alelos DR2 y DQ3 con carcinoma cervical además los pacientes que presentaban el alelo -A2 presentaron también mayor riesgo de contraer esta enfermedad. El alelo DQB1*0301 se ha asociado a displacias bajas a moderadas, el DQB1*0402 se ha asociado a displacias severas, el DQB1*0302 a carcinoma de cervix invasivo, mientras que el alelo DQB1*0603 esta asociado con efecto protector (Montoya, 1998).

Para el caso del hantavirus este se ha asociado con el alelo ALH-B8 presentando los pacientes un cuadro severo de esta enfermedad, y el -B27 para cuadros intermedios (McNicholl, 1998).

Para la malaria se ha encontrado una asociación entre el antígeno ALH- B53 que confiere cierta protección en el paciente contra la malaria (Singh, 1997).

En el caso de la leishmaniasis cutánea difusa esta se ha relacionada con ALH-A11, -B5 y B7, como marcadores genéticos en la patogénesis de esta enfermedad parasitaria de la piel. Para leishmaniasis cutanea localizada se han asociado ALH-A28, -Bw22, DQw8, DR11, DQ7, DQw3, aunque no se pudo comprobar la susceptibilidad genética de la leishmaniasis cutánea a un ALH específico (Wizel, 1998).

Se ha establecido una hipótesis para explicar la asociación del CMH y las enfermedades infecciosas que supone que la asociación resulta de la habilidad de un tipo particular de ALH de presentar un péptido antigénico crítico, lo cual se ha investigado y para la mayoría de las enfermedades asociadas este antígeno es desconocido.

Algunas personas montan respuestas inmunes efectivas frente a infecciones, mientras que otras responden poco o casi nada con estas (Singh, 1997).

8. CONCLUSION

Se ha encontrado que efectivamente existe una relación entre CMH y las enfermedades infecciosas, tanto en animales como en el ser humano.

Entre los diferentes factores genéticos que afectan y controlan las respuestas inmunes ante enfermedades infecciosas, se encuentran las moléculas ALH, producto de los genes del CMH.

En algunas enfermedades, la reacción del huésped ante el agente infeccioso que es responsable de las manifestaciones patológicas de la enfermedad se ha correlacionado a especificidades ALH. Estas molécula juegan un papel importante controlando la resistencia y susceptibilidad a las enfermedades.

La intensidad de la respuesta inmune es diferente para los diversos grupos étnicos. Esto nos indica como la variabilidad genética juega un papel importante para determinar la capacidad de responder a las infecciones en diversas etnias.

Existe evidencia de que el sistema ALH puede influir en la modificación del curso clínico de infecciones bacterianas, parasitarias y virales. Las investigaciones sobre enfermedades infecciosas están enfocadas en marcadores genéticos tales como las formas alélicas de las moléculas ALH y su polimorfismo.

10. BIBLIOGRAFIA

- Barrera A B, (1998): Marcadores genéticos en una población otomí de San Ildefonso Tultepec, Amealco, Estado de Querétaro.
- Bellanti J A, (1986): Inmunogenética en Principios de Inmunología 3a. Ed. Ed. Interamericana, México. P: 59-83.
- Black F L, Pinheiro F, Hierholzer, W J, Lee R V (1997) : Epidemiology of infectious disease: the example of measles. *Ciba Found Symp*49:115-30.
- Black F L, Schiffman G, Pandey J P, (1995): HLA, Gm and Km polymorphisms and immunity to infectious disease in South Amerinds. *Exp Clin Immunogenet* 12 (3): 206-216.
- Dharakul T, Vejbaesya S, Chaowagul W, Luangtrakool P, Stephens H A, Songsivilai S, (1998): HLA- DR and -DQ associations with melioidosis. *Hum Immunol* 59 (9): 580-586.
- Goldfield A E, Delgado J C, Thim S, Bozon M V, Uglialoro A M, Turbay D, Cohen C Yunis E J, (1998): Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA* 279 (3): 226-228.
- Hill A V, (1998): The immunogenetics of human infectious disease. *Annu Rev Immunol* 16: 593-617.
- Joklik W K, Willett H PH, Amos D B, Wilfert CM (1997): Mycobacterias, Plasmodium falciparum, Leishmania, Kala azar, Trypanosoma cruzi, Herpes virus, Hepatitis B y Hepatitis c, Virus Epstein- Barr, Citomegalovirus, Varicela zoster, Papiloma virus, Puumala Hantavirus, Escherichia coli, Salmonella, Melioidosis, Burkholderia pseudomallei. *Microbiología Zinsser*. 20ª. Ed. Ed. Panamericana. P. 691,711,718,737,763,737,750,792,1167,1281,1296-1298,1391-1393.
- Kaslow A R, (1997): Host genes and HIV infection: Implications and Applications. *Emerg Infect Dis* 4(1): 152-156.
- Klein J, O'Huigin C. (1994): MHC polymorphism and parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 346 (1317): 351-358.
- Kumate J, Muñoz O, Gutiérrez G, Santos J I, (1994): Tuberculosis, Lepra, Paludismo, Leishmaniasis, Tripanosomiasis, Citomegalovirus, Herpes, Epstein-Barr. *Manual de Infectología*. 14ª. Ed. Ed. Mendez Editores. P. 65—70, 103-104, 225-230,404, 442, 525-526, 547, 611-665.

McDermott A B, Madrigal J A, Sabin, C A, Zuckerman J N, Cohen S B(1999): The influence of host factors and immunogenetics on lymphocyte responses to Hepagene vaccination. *Vaccine* 17 (11-12):1329-1337.

McNicholl J.(1998): Host genes and infectious disease. *Emerg Infect Dis* 4(3): 423-426.

McNicholl M J, Smith D K, Qari S H y Hodge T,(1997): Host genes and HIV: The role of the chemokine receptor gene CCR5 and Its alleles. *Emerg Infect Dis* 3 (3): 267-271.

Montoya L, Saiz I, Rey G, Vela F, Clerici-Larradet T.(1998): Cervical carcinoma: human papillomavirus infection and HLA- associated risk factors in the Spanish population. *Eur J Inmunogenet* 25(5):329-337.

Neville M J, Campbel R D,(1999): A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase G subunit are among predicted products of novel genes close to TNF locus in the human MHC. *J Immunol* 162 (8): 4745-4754.

Pappo J, Torrey D, Castriotta L, Savinainen A, Kabok Z, Ibraghimov A (1999): *Helicobacter pylori* in immunized mice lacking major histocompatibility complex Class I and Class II functions. *Infect Immun* 67 (1): 337-341.

Peeling R W, Bruham R C,(1996): *Chlamydiae* as Pathogens: New species and new issues. *Emerg Infect Dis* 2(4): 307-319.

Ramírez S E, (1996) *Inmunogenética Evaluación y manejo previo al trasplante renal.*

Rodríguez T A, (1997) *Manual de Inmunología.*

Roitt (1991), *Complejo principal de histocompatibilidad, Inmunidad frente a virus, bacterias y hongos en Inmunología* , Ed. Salvat. México. P 4.1-4.11, 16.1-16.15.

Singh N, Agrawal S, Rastogi A K,(1997): Infectious disease and immunity : special reference to a major histocompatibility complex. *Emerg Infect Dis* 3(1): 41-49.

Stites P D, Terrr A I (1993) *Complejos de antígeno leucocitario y de histocompatibilidad mayor humanos en Inmunología Básica y Clínica 7a. Ed, Ed. Manual Moderno. México. P. 47-63.*

Taylor G M, Dearde S, Payne N, Ayres M, Gokhale D A, Birch J M, Blair V, Stevens R F, Will A M, Eden O B, (1998) : Evidence that an HLA- DQA1-DQB1 haplotype influences susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia in boys provides further support for an infection related aetiology. *Br J Cancer* 78 (5): 561-565.

Tomiyama H, Sakaguchi T, Miwa K, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi, M, (1999): Identification of multiple HIV-1 CTL epitopes presented by HLA-B*5101 molecules. *Hum Immunol* 60 (3): 177-186.

Weatherall D J, Bell J I, Clegg J B, Flint J, Higgs D R, Hill A V, Pasvol G, Thein S L, (1998): Genetic factors as determinants of infectious disease transmission in human communities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 321:327-348.

Wizel B, Garg N, Tarleton R L, (1998): Vaccination with trypanosome surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 66(11): 5073-81.

Zaragoza PO, Sánchez M T, Barrera R R, Madrid M V, (1995): Estructura y Función de antígeno de linfocito T y su papel en enfermedades infecciosas. *Rev Invest Clin* 48: 69-79. 1995.

APENDICE

REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TIPIFICACIÓN DE ALH DE CLASE I Y II

Ficoll- Radialar

Ficoll tipo 400 (Sigma)	45.0 g
Radialar (Solución I.V. al 60%)	150.0 ml
Agua destilada	630.0 ml
Ajustar densidad a 1.077 g/ml	

Disolver el Ficoll en el sobre un agitador magnético (apartar aprox. 100 ml de agua para el ajuste). Agregar la solución de radialar, mezclar y ajustar densidad (con densitómetro) utilizando el resto del agua destilada.

Formalina al 40%

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.1725g
NaH ₂ PO ₄	0.30 g
Formol al 40%	100 ml
Ajustar el pH= 7.4	

Nota : se pueden omitir las sales.

AKC

NH ₄ Cl	8.29g
K ₂ CO ₃	1.34g
Agua destilada	1.0L

PBS

NaCl	7.66g
Na ₂ HPO ₄	3.80g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Ajustar el pH a 7.4	

Eosina Y al 5%

Eosina Y	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Calentar en una placa térmica hasta su disolución. Filtrar con papel filtro. Colocar en frasco ámbar y conservar a temperatura ambiente.