

3

EL ADN EN RELACION CON EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

* Fabiola Montoya

** Marcos Restrepo

RESUMEN

Los antígenos de histocompatibilidad o sistema HLA, son moléculas proteicas localizadas en las membranas de células nucleadas. El sistema se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en donde se codifican tres tipos de moléculas, llamadas clase I, II y III. Los genes clase I codifican para los antígenos HLA-A-B-C-E-F y G. Están compuestos de una glicoproteína polimórfica de cadena pesada y una liviana, la beta 2 microglobulina. Los genes clase II son heterodímeros compuestos de una cadena común alfa y una polimórfica beta. Cinco subregiones han sido bien definidas: el HLA-DR, DQ, DP, DO y DN. Los productos "no HLA" o clase III incluyen componentes del complemento, C2, Bf, C4A, C4B, 21 Hidroxilasa A y B, RD (dipéptido repetitivo), el HSP70 (Proteína Shock Térmico) BAT (copias asociadas a B) y el FNT alfa y beta (Factor de Necrosis Tumoral).

Dada la importancia del sistema, se describen las técnicas usadas en el laboratorio para su estudio así como los métodos de biología molecular, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos largos de restricción (RFLP).

Palabras clave: HLA, ADN, Histocompatibilidad, PCR.

* Licenciada en Bacteriología y Laboratorio Clínico, Corporación para Investigaciones Biológicas (C.I.B.), Apartado Aéreo 73-78, Medellín

** Médico. Corporación para Investigaciones Biológicas (C.I.B.), Medellín

SUMMARY

The histocompatibility antigens or HLA system, are proteic molecules which are localized on the nucleated cell membranes. The system is located on the short arm or chromosome 6 where types of molecules called class I, II and III molecules are coded. Class I genes code for antigens HLA-A-B-C-E-F and G. These genes are made up of one polymorphic glycoprotein heavy chain and one light beta 2 microglobulin chain. Class II genes are heterodimers composed of a common alpha chain and a polymorphic beta chain. Five well defined subregions have been described: HLA-DR, DQ, DP, DO and DN. The class III or "non-HLA" products include complement components C2, Bf, C4A and C4B, 21 hidroxylase A and B, the dipeptide repeat RD gene, the major heat shock protein HSP70, the B-associated transcripts BAT and the alpha and beta TNF (Tumor Necrosis Factor).

Because of the system importance, the laboratory techniques and the molecular biology methods used its study are described: Polymerase Chain Reaction (PCR) and restriction fragment lenght polymorphism (RFLP).

Key words: HLA, DNA, Histocompatibility, PCR

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (C.M.H.)

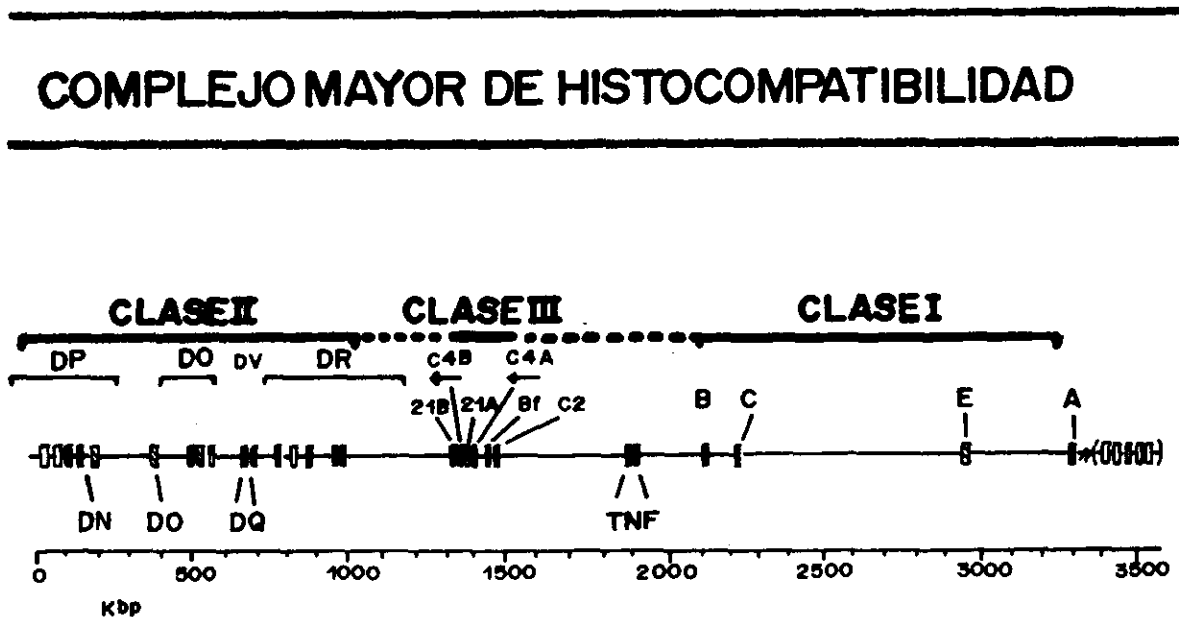
Los antígenos de histocompatibilidad son moléculas proteicas localizadas en la superficie de las membranas de las células nucleadas. Difieren genéticamente de individuo a individuo y se heredan según las leyes mendelianas en forma alélica. Estas proteínas cuando llegan a otro individuo, estimulan una respuesta inmune y por lo tanto son los responsables de los rechazos a los aloinjertos. El sistema está conformado por un grupo de genes que determina la formación de otro numeroso grupo de proteínas polimórficas que están en las membranas celulares. El primer antígeno del sistema HLA fue identificado por Dausset en el año de 1957 (1).

Los genes que determinan los antígenos del CMH están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 del hu-

mano. En un segmento de este cromosoma se agrupan en tres clases: I, II y III. Estos genes determinan la formación de los antígenos que difieren entre sí en cuanto a su composición química, su función y la forma de detección (Figura No. 1). Las dos primeras clases conforman lo que clásicamente se denomina sistema HLA (Antígenos de los Leucocitos Humanos).

La nomenclatura del sistema HLA es asignada por un comité de expertos en los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad (2,3,4). El sitio donde está localizado un gen que se encuentra dentro del sistema HLA se llama locus y se designa con una letra mayúscula: por ejemplo: HLA-A, HLA-B. Cada antígeno que se encuentra en la membrana de las células se designa con la misma letra del locus seguido de un número, el cual no se repite en los locus HLA-A y HLA-B, así por ejem-

FIGURA 1: REGIONES DEL CROMOSOMA 6 DEL HUMANO DONDE ESTAN LOCALIZADOS LOS GENES DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD



Tomado de: PETER, J.B., HAWKINS, B.R. Ach Pathol Lab Med. 1992; 116: 11-15

plo: HLA-A1, HLA-B5 (no existe HLA-A5 ni HLA-B1). El comité de nomenclatura de 1987 modificó la designación de estos antígenos o especificidades, colocando después de la letra mayúscula correspondiente al locus, cuatro dígitos; los dos primeros números indican la especificidad y los otros dos definen la secuencia de nucleótidos para esta especificidad, por ejemplo: HLA-A*0204, lo cual dice que es un HLA-A2 y el 04 corresponde a una de las nuevas variantes encontradas en el HLA-A2. La letra "W" que significa "Workshop" y que precede al número en los locus diferentes al HLA-CW, indican que todavía no se le ha asignado totalmente su especificidad; la "W" desaparece cuando se define su identificación. El locus C está seguido de la letra W para distinguirlo de las distintas fracciones del complemento que se codifican dentro del mismo complejo, por ejemplo: CW1, CW2 y así sucesivamente.

La clase I comprende los locus que codifican los antígenos HLA, A, B, C. Se expresan en todas las células nucleadas y en las plaquetas. La estructura de cada molécula de los antígenos clase I está compuesta por dos cadenas polipeptídicas independientes, una de 43.000 de peso molecular o cadena pesada y otra cadena liviana de 12.000. Las diferencias entre los antígenos están a nivel de la secuencia de aminoácidos encontrados en los dominios alfa 1 y alfa 2. La cadena liviana es idéntica a la beta 2 microglobulina que es una proteína del suero y sus genes están localizados en el cromosoma 15. Tres genes se han adicionado a la clase I, el HLA E, F, G y H los cuales han sido bien identificados (5,6,7). Todos los locus de la clase I son altamente polimórficos. Los antígenos BW4 y BW6 están localizados en un epítipo de la molécula HLA-B y es diferente de los epítipos que expresan las otras espe-

cificidades del HLA-B, por eso llevan la "W". Cada uno de los antígenos del locus B pueden expresar bien sea el BW4 ó el BW6 y se denominan antígenos públicos.

La denominación de los locus de la clase II, llevan siempre la letra D, seguida por la letra R, P, Q, O y N, que corresponden a la subregión, por ejemplo: HLA-DR; los genes de las cadenas polipeptídicas alfa o beta se identifican con las mismas letras alfa o beta seguidas de un número, más los cuatro dígitos, por ejemplo: HLA-DQB1*0604 ó HLA-DQA1-0301 y otros. En el locus DW definidos celularmente se incluye la W para identificarlos de los otros locus clase II, identificados serológicamente. Los antígenos clase II se encuentran en los linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y en los linfocitos T activados. Las moléculas de la clase II son heterodímeros compuestos por una cadena común alfa y una polimórfica beta. Las especificidades del HLA-DR son definidas por un gen alfa que es constante y un gen beta polimórfico (8). Los productos del HLA-DQ resultan de dos genes alfa conocidos como HLA-DQA1 y HLA-DQA2, además dos genes beta, el HLA-DQB1 y HLA-DQB2. En cuanto al HLA-DP las especificidades son definidas por dos genes alfa y dos beta, así: HLA-DPA1, DPA2, DPB1 y DPB2. En la clase II, recientemente se han logrado clarificar los locus HLA-DO y DN.

En el octavo reporte del comité de Nomenclatura se definieron: 24 especificidades HLA-A, 50 HLA-B, 11 HLA-C, 20 HLA-DR, 9 HLA-DQ, 26 HLA-D, 6 HLA-DP. La región "no HLA" localizada entre la clase I y II, está codificada para los productos clase III, la cual incluye componentes del complemento C2, Bf, C4A y C4B, 21 Hidroxilasa A, 21 Hidroxilasa B (9), el factor de necrosis tumoral (FNT) (10) alfa y beta, el RD (di-

péptido Repetitivo), el HSP70 (Proteína del Shock Térmico) (11) y el BAT (coplas asociadas a B) (12). Estos productos no tienen secuencias similares al HLA, sin embargo algunos genes guardan estrecha relación con el complejo; lo que sí está demostrado es su participación en la función inmunológica. Las funciones de algunos productos clase III no están esclarecidas aún; por ejemplo: HSP70, BAT y el RD.

DETERMINACION POR EL LABORATORIO

Los métodos de estudio para los genes y antígenos del sistema HLA son:

a) Detección serológica de los antígenos en la membrana celular de los linfocitos T para la clase I y en los linfocitos B para la clase II. Para detectar estos antígenos de la clase I y II se utilizan sueros de mujeres multíparas que contengan anticuerpos contra ellos. Estos anticuerpos se forman durante embarazos repetidos por sensibilización a los antígenos paternos presentes en el feto. También se pueden obtener de sueros de personas multitransfundidas, trasplantadas o sometidas a sensibilización con antígenos específicos de HLA. Últimamente se han producido en el laboratorio por el método de anticuerpos monoclonales (13,14).

La técnica de microcitotoxicidad que se emplea para definir serológicamente la clasificación, fue diseñada por Paul Terasaki (15,16,17). Está basada en la detección de los antígenos en las membranas de los linfocitos. Un antígeno ahí localizado reacciona con el anticuerpo específico. Al agregarle complemento sérico, se activa la vía clásica y daña los linfocitos en donde ocurrió la reacción antígeno-anticuerpo. La mejor fuente de complemento para esta reacción es el suero de conejo, libre de sustancias citotóxicas. El daño

de los linfocitos se visualiza por medio de colorantes vitales, que tiñen las células muertas dañadas por el complemento. Los linfocitos que no poseen el antígeno estudiado permanecen vivos y no son teñidos por el colorante.

b) Para analizar algunos de los antígenos del locus HLA-D también se emplea el cultivo mixto de linfocitos. Para ello se cultivan las células tanto del donante como del receptor; una de ellas corresponde a las respondedoras y las otras bloquean la capacidad mitótica. Se determina la actividad de la transformación blástica al cuantificar la incorporación de sustancias radioactivas (18,19,20,21).

c) Las técnicas bioquímicas o de biología molecular son importantes para definir la variabilidad alélica de los antígenos o especificidades. Por ejemplo, se debe recurrir a estos métodos para definir las 9 variantes alélicas que tienen el HLA-A2 y las 7 del HLA-B7. También es la forma de estudiar el HLA-DP, DQ, etc. (22,23,24,25).

d) Los antígenos de la clase III se definen serológicamente por medio de inmunofijación con anticuerpos o sistemas hemolíticos con eritrocitos sensibilizados, luego de esperar las fracciones por electroforesis (26,27,28).

Como los métodos de biología molecular se aplican cada vez más en las células humanas y en todos los otros seres vivos, es importante revisar los aspectos básicos del ADN y las técnicas que se aplican.

ESTRUCTURA DEL ADN

Se tiene conocimiento de la existencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) desde 1866 cuando Miescher (29) lo aisló por primera vez. En 1944 Avery (30) comprueba que esta proteína lleva la información genética durante la

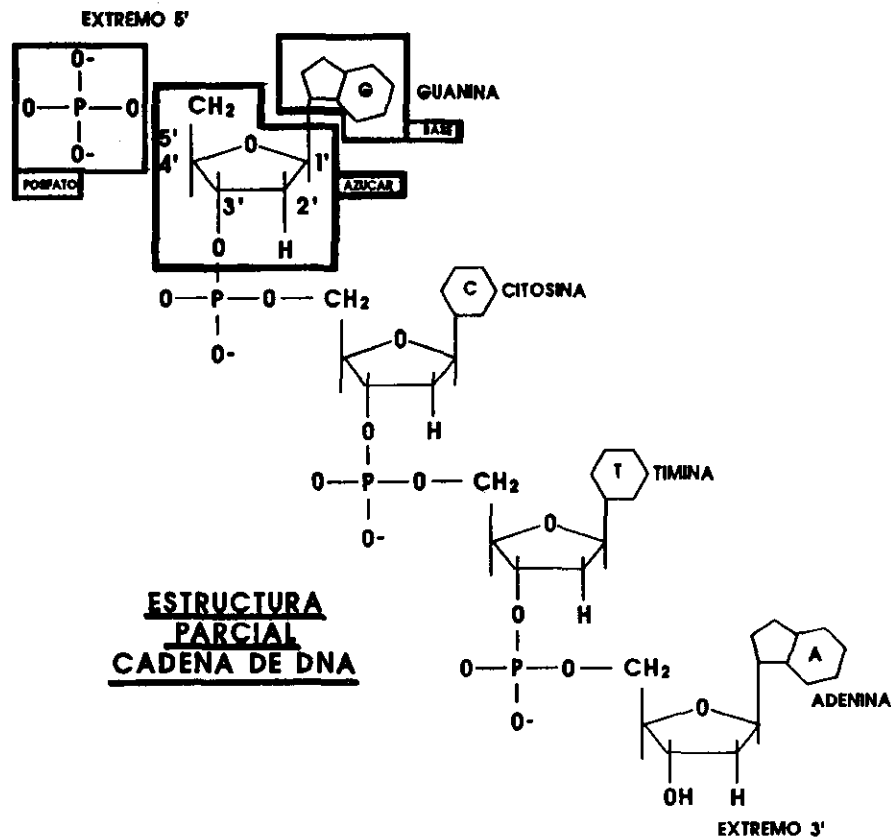
transformación bacteriana. Watson y Crick (31), en 1953 propusieron el modelo de doble hélice para representar la estructura del ADN; desde entonces, gran número de investigadores se han dado a la tarea de desarrollar y diseñar diferentes técnicas de clonación en el laboratorio, como también la secuenciación del ADN (32,33,34). En 1983, Mullis (35) describió la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ácido desoxirribonucleico es la molécula que lleva la información genética tanto en células procarlóticas como eucarlóticas. Cada molécula de ADN está formada por una cadena de nucleótidos compuesta por tres partes químicas diferentes: Azúcares, bases nitrogenadas y grupos fosfatos. La molécula de ADN tiene 4 azúcares que

son pentosas con un átomo de O2 en el vértice superior; a cada una se liga una base nitrogenada distinta: Adenina(A), Guanina(G), Timina(T) y Citosina(C). A la Adenina y a la Guanina se les denomina Purinas; la Timina y la Citosina se conocen como Pirimidinas. Las bases nitrogenadas se unen covalentemente al carbono 1' del azúcar para formar el nucleótido y son la desoxiadrenina, desoxiguanosina, desoxicitosina y desoxitimidina (31, 32, 33, 34, 35, 36).

A cada pentosa se le une un grupo fosfato que es un polímero del ácido nucleico. Cada grupo fosfato une dos nucleótidos entre sí formando un puente fosfodiéster entre el carbono 5' de uno de los azúcares y el 3' del otro azúcar. (Fig. No. 2).

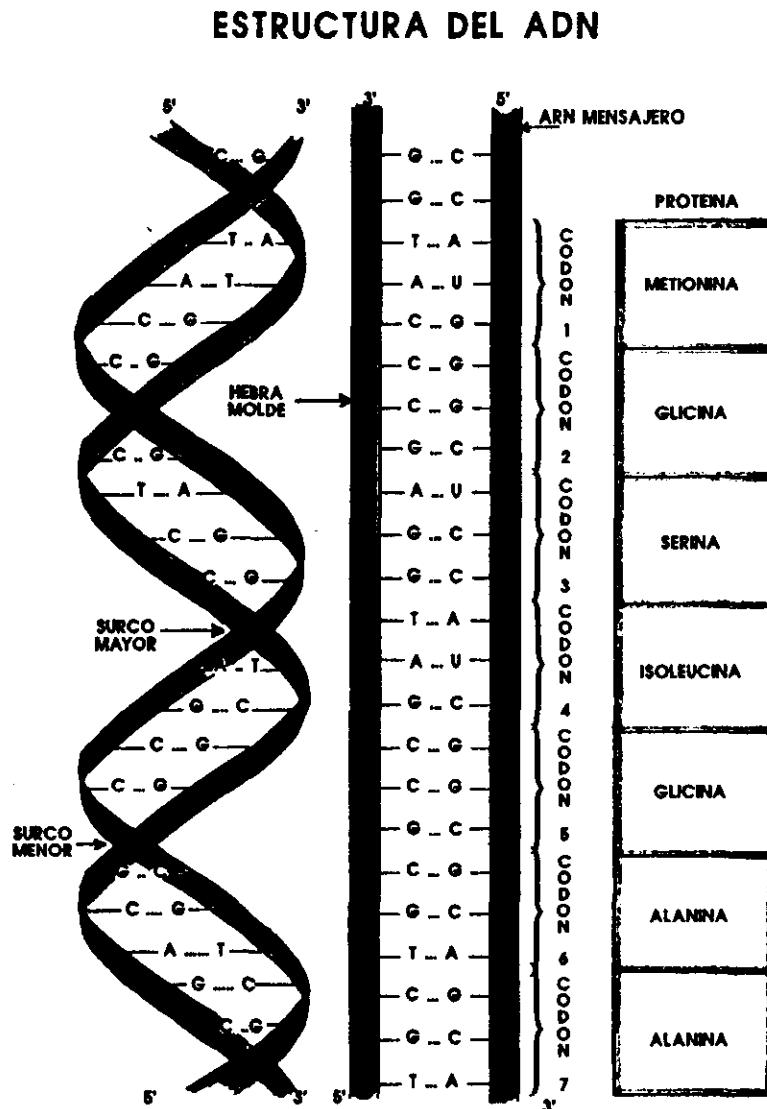
FIGURA 2: ESTRUCTURA DE LA CADENA DE DNA COMPUESTA POR UNA BASE, EL AZUCAR Y EL FOSFATO



El ADN completo está conformado por dos cadenas helicoidales de polinucleótidos con un orden determinado y enrolladas alrededor de un eje. Las bases de purinas y pirimidinas están en el interior de la hélice. Las unidades fosfato y desoxirribosa se colocan en el exterior. El diámetro de la hélice es de 20 aminoácidos. La estructura de la hélice

se repite en cada cadena después de 10 residuos, esto ocurre a intervalos de 34 aminoácidos. Las dos cadenas están unidas por puentes de H entre los pares de bases A-T y G-C. La orientación y distancia entre los enlaces de H son indispensables para que se produzca una interacción entre las bases (37). (Fig. No. 3).

FIGURA 3: ESTRUCTURA DE LA DOBLE HELICE DEL ADN



Toda la secuencia de bases transporta la información genética. Cada individuo tiene su propia secuencia de aminoácidos y esto hace posible que se puedan identificar en el laboratorio como una "huella digital" propia.

Para detectar y analizar un segmento determinado de ADN a partir de una muestra muy escasa en donde los métodos tradicionales no alcanzan a detectarlo, es necesario amplificar este segmento. Esto se obtiene a través de métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

El método consiste en aumentar un segmento específico de ADN, (38, 39, 40, 41) usando polimerasa, la cual es una enzima que se sintetiza en todas las células y tiene una actividad específica de: síntesis, reparación y capacidad para extender y acortar el ADN. También se requiere de otras enzimas llamadas de restricción, las cuales se extraen de bacterias, estas son capaces de cortar la molécula de ADN en secuencias específicas localizadas en distintos puntos de la doble hélice del ADN; así por ejemplo, la enzima Eco RI corta la secuencia de ADN en: la Guanina(G) de las dos cadenas opuestas G-ATTC
CTAA-G

Las enzimas establecen puntos de identificación en la molécula de ADN. Cortan la molécula en distintos segmentos, cada uno de estos posee de 100-1000 pares de bases. También separan los fragmentos de acuerdo con su tamaño o peso molecular, esto se detecta con análisis electroforético en geles de agarosa. Las enzimas de restricción hacen la secuencia completa de pares de bases que luego se tradu-

cen a secuencias de aminoácidos (aa).

La técnica requiere de cebadores-iniciadores ("primers") que son oligonucleótidos que se pegan a la molécula de ADN previamente separadas e inician la secuencia. El producto de cada ciclo sirve como molde para el siguiente y cada vez se duplican las copias (ver esquema). Los NTD-didioxinucleótidos (dd) trifosfatos son los que determinan la secuencia de ADN.

La Taq Polimerasa: es una enzima que se obtiene de la bacteria *Thermus aquaticus* cepa YT1, microorganismo eubacterial que crece de 70-76°C, con esta enzima se aumenta significativamente la especificidad.

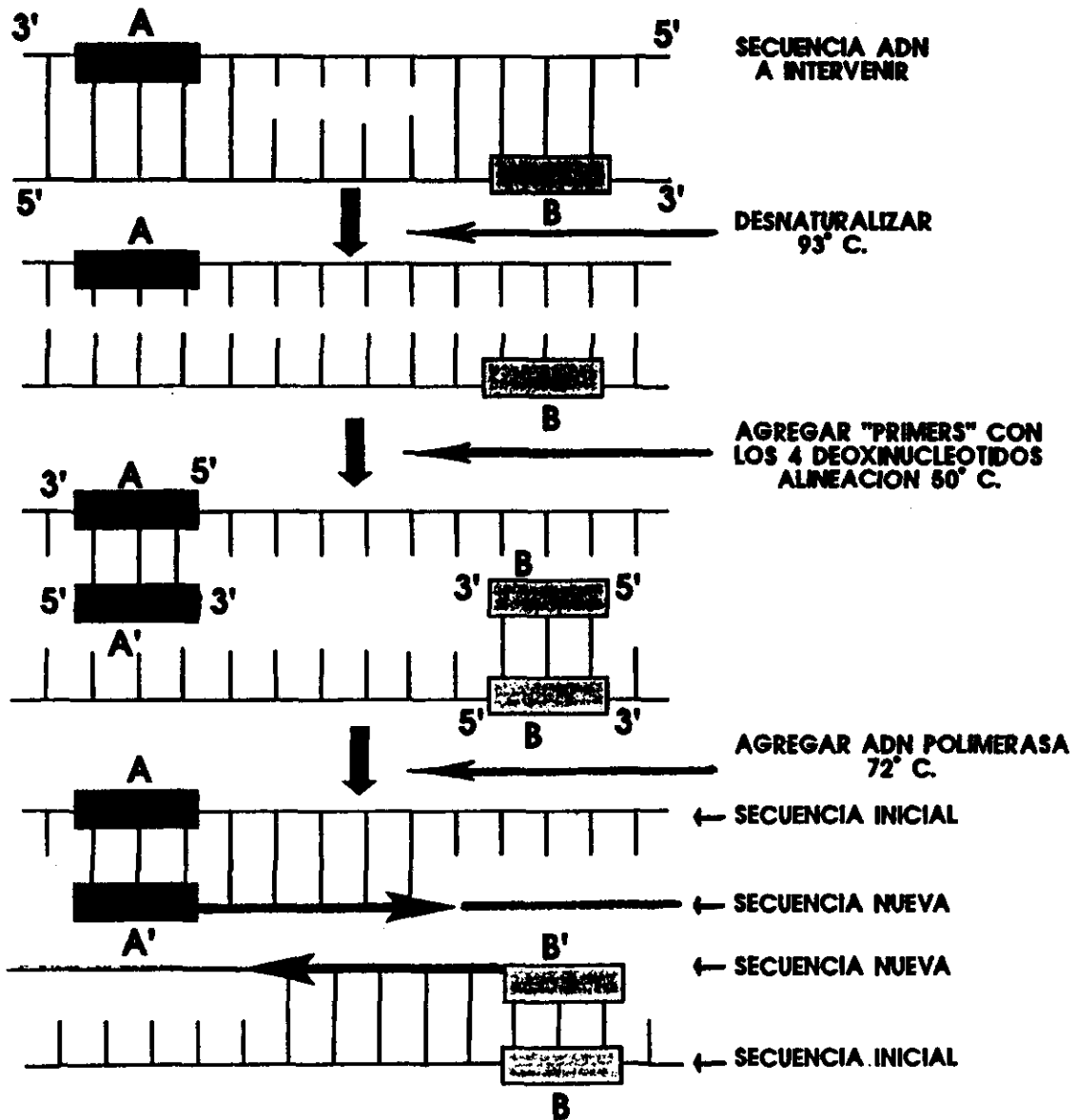
Sondas: Son secuencias de aminoácidos construidos artificialmente para identificar los diferentes genes.

Lo primero que se hace para aplicar la técnica de la PCR en el estudio de la HLA, es obtener sangre con anticoagulante EDTA. Luego se realiza la extracción del ADN. Después de obtener el ADN puro se hace el procedimiento de la PCR que está basado en tres reacciones de ciclos repetitivos: lo único que varía son las temperaturas de incubación, los pasos que siguen son:

1. El ADN que contiene la secuencia conocida es desnaturalizado a 94°C para separar las 2 cadenas de ADN (Fig. No. 4).
2. Los "primers" juntos y los cuatro deoxynucleótidos son agregados, se baja la temperatura a 50°C, lo que ocurre aquí es que cada "primer" se une al molde.
3. Se agrega la ADN polimerasa que extiende la secuencia en 2 bandas complementarias usando una simple cadena como molde. La tempera-

FIGURA 4: SECUENCIA DE LOS PASOS PARA AMPLIFICAR UN SEGMENTO DEL ADN POR LA REACCION DE LA PCR.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)



tura que se requiere para que esto ocurra es de 72°C. Así obtenemos cuatro bandas. La amplificación de nuevos productos de ADN es geométrica, los ciclos son repetidos hasta 30 veces.

Con esta metodología se consigue aumentar la cantidad de ADN. Para visualizar esta amplificación se hace la técnica de electroforesis.

Después se pasa el ADN con la secuencia específica a una membrana de nylon siguiendo la técnica del Dot-blot. Se hibridiza con una sonda marcada, bien sea con ³²P. con estreptavidina o biotina. Posteriormente se hace una autoradiografía a -70°C por toda la noche. Luego se revela y se detectan las manchas que identifican la presencia del gen marcado radioactivamente.

APLICACIONES DE LA TECNICA PCR

La técnica de la PCR en cuanto al sistema HLA tiene varias aplicaciones (42, 43, 44, 45):

1. Detección de micropolimorfismo para DR, DQ y DP.
2. Permite complementar la tipificación serológica para una mejor precisión e identificación de subtipos, y lograr conocer diversas regiones del genoma humano.
3. Identificar nuevos alelos del sistema HLA clase II y mejorar la tipificación para trasplantes, especialmente el de médula ósea, con clase I y II serológicamente idénticos para los no relacionados.
4. Los análisis de la PCR permiten un mejor entendimiento de las bases moleculares en la autoinmunidad. Posibilitan identificar nuevas secuencias alélicas que pueden ser importantes en la búsqueda de nuevos residuos. Es-

tos podrán conferir susceptibilidad o resistencia a algunas de las más importantes enfermedades autoinmunes.

FRAGMENTOS LARGOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Es otro tipo de marcador genético que permite conocer las posiciones de un gen. Este método fue desarrollado en 1980 y es una técnica analítica (41, 46, 47).

La digestión con endonucleasas de restricción, producen fragmentos específicos de ADN que son polimórficos, los cuales se hibridizan con sondas homólogas de ADN genómico y después de la separación de las bandas por electroforesis se transfieren a una membrana de nitrocelulosa usando la técnica de Southern-blot (48).

Esta técnica es de gran utilidad en el análisis del sistema HLA, por la habilidad para demostrar variación alélica entre especificidades que no muestran esta variación a nivel serológico.

REFERENCIAS

1. Dausset, J. and Brecy, H. Identical Nature of the Leukocyte Antigens Detectable in Monozygotic Twins by Means of Immune Isoleukoagglutinins. *Nature* 180: 1430-1432, 1957.
2. Who-HLA Nomenclature Committee. Nomenclature for Factor of the HLA System, 1987 *Vox Sang.* 1988; 55: 119-126.
3. Committee on Leukocyte Antigens (Who-IUIS). Nomenclature for Factors of the HLA System, 1987 *Biotest Bull* 1989, 4: 53-60.
4. Bodmer J.G., Marsh Sge, Parham P, et al. Nomenclature for Factor of the HLA System, 1989. *Immunobiology* 1990; 180: 278-292.

5. Koller, B.H., Geraghty, D.E., Shimizu, Y., De Mars, R. Orr, H.T. HLA-E; a Novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J. Immunol.* 1988; 141: 897-904.
6. Geraghty, D.E., Koller, B.H., Orr, H.T. A human Major Histocompatibility Complex Class I Gene that Encodes a Protein with a Shortened Cytoplasmic Segment. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.* 1987; 84: 9145-9149.
7. Geraghty, D.E., Wei, X.H., Orr H.T., Koller, B.H. Human Leukocyte Antigen F (HLA-F): an Expressed HLA Gene Composed of a Class I Coding Sequence Linked to a Novel Transcribed Repetitive Element. *J. Exp. Med.* 1990; 171: 1-18.
8. Kappes, D., Strominger, J.L. Human Class II major Histocompatibility Complex Genes and Proteins. *Ann Rev Biochem*; 57: 991-1028.
9. Carroll, M.C., Belt K.T., Palsdottir, A., Yu Y. Molecular Genetics of the Fourth Component of Human Complement and Steroid 21-Hydroxylase. *Immunol Rev.* 1985; 87: 39-60.
10. Inoko H. Trowsdale J. Linkage of TNF Genes to the HLA-B Locus. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15: 8957-8962.
11. Sargent CA. Dunham I. Trowsdale J., Campbell R.D. Human Major Histocompatibility Complex Contains Genes for the Major Heat Shock Protein HSP70. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 1989;86: 1968-1972.
12. Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A New Cluster of Genes Within the Human Major Histocompatibility Complex. *Science* 1989; 243: 214-217.
13. Zachary, E.A., Murphy, N.B., Smerglia, A.R. Braun, W.E. Screening for HLA antibodies. En: Rose, NR, Friedman H. Fahey, J.L. *En Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3a. ed. Washington: Am Soc Microbiol. 1986, 824-834.
14. Marsh S.G.E., Bodmer, J.G. HLA-DR and DQ Epitopes and Monoclonal Antibody Specificity. *Immunol Today*, 1989; 10:305-312.
15. Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G. and Iwaki, Y. Microdotlet Testing for HLA-A, B, C and D Antigens. *Am J Clin Pathol*, 1978; 69: 103-119.
16. Boyum, A. Separation of Leucocyte from Blood and Bone Marrow. *Scand. J Clin Lab Invest.* 1968; 204: 998-1000.
17. Terasaki, P.I. ed. *Histocompatibility Testing 1980*. Los Angeles. California: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1980.
18. Dubey, D.P., Yunis, I., Yunis, E.J. Cellular Typing: Mixed Lymphocyte Response and Cell Mediated Lympholysis. En: Rose NR, Friedman H., Fahey J.L. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3a. ed. Washington: Am. Soc Microbiol. 1986; 847-858.
19. Termijtelen, A., Bradley, B.A. Mixed Lymphocyte Reaction and Primed Lymphocyte Typing (MLR and PLT) En: *Histocompatibility Techniques*. Ed. Dick, H.M., Kiss-Meyer-Nielsen, F. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 1978; pag. 59.
20. Bradley, B.A., Festenstein, H. Cellular Typing, *Br Med Bull* 1978; 34: 223-232.
21. Shimizu, Y. Geraghty D.E., Koller B.H., Orr H.T. De Mars R. Transfer and Expression of three Cloned Human non HLA-A, B, C class I Major Histocompatibility complex genes in Mutant Lymphoblastoid Cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1988; 85: 227-231.
22. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. Structure of the Human Class I Histocompatibility Antigen, HLA-A2. *Nature (Lond)* 1987; 329: 506- 512.
23. Choo, S.Y., Antonelli, P., Nisperos, B., Nepom, G.T., Hansen, J.A. Six Variants of HLA-B27 Identified by isoelectric focusing Immunogenetics. 1986; 23: 24-29.

24. Vega M.A., Bragado, R., Ivanyi P., Peláez J.L., López de Castro J.A. Molecular Analysis of a Functional Subtype of HLA-B27. A Possible Evolutionary Pathways for HLA-B27 Polymorphism. *J. Immunol.* 1986; 137: 3557-3565.
25. Calvo V., Rojo S., López D., Galocha B., López de Castro J.A. Structure and Diversity of HLA-B27 Specific T Cell Epitopes. *J. Immunol.* 1990; 144: 4038-45.
26. Raum D.D., Awdeh Z.L., Glass D., Yunis E., Alper CA. The location of C2, C4 and Bf relative to HLA-B and HLA-D. *Immunogenetics.* 1981; 12: 473-483.
27. Campbell, R.D., Bentley, D.R. The Structure and Genetics of the C2 and Factor B Genes. *Imm. Rev.* 1985; 87: 19-37.
28. Hobert, M.J., Lachman, P.J. Allotypes of Complement Components In Man. *Transplant Rev.* 1976; 32: 26-32.
29. Miescher, J.F. The Eighth Day of Creation by Horaco Freeland Judson (A Touchstone Book) 1980 Published by Simon and Schuster. New York. Pag. 27 Capítulo 1.
30. Avery, O.T. MacLeod, C.M. y McCarty, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *J Exp Med* 1944, 79: 137-158.
31. Watson, J.D., y Crick, F.H.C. Molecular Structure of Nucleic Acid. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953, 171: 737-738.
32. Fiddes J.C. The Nucleotide Sequence of a Viral DNA *Sci Amer* 1977; 237: 54-67.
33. Hamilton H.O. Nucleotide Sequence Specificity of Restriction Endonucleases. *Science* 1979; 205: 455-622.
34. Bauer, W.R., Crick, F.M.C. y White, J.H. Supercoiled ADN. *Sci Amer* 1980; 243: 118-133.
35. Mullis, K.B. The Unusual Origen of the Polymerase Chain Reaction. *Scient Amer.* 1990; 56-65.
36. Cantor, C.R. y Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry* 1980. Freeman.
37. Stryer, L. *Bioquímica* 2da. ed. Editorial Reverte S.A. Barcelona 1982; 511-547.
38. Salki, R.K., Gelfand D.H., Stoffel, S., Scharf S., Higuchi R.H., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich HA. Primer- Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
39. Scharf S.J., Horn GT., Erlich HA. Direct Cloning and Sequences Analysis of Enzymatically Amplified Genomic Sequence. *Science* 1986; 223: 1076-1078.
40. Vaugham, R.W., Lanchbury J.S.S., March, S.G.E., Hall, M.A., Bodmer, J.G. and Welsh, K.I. The Application of Oligonucleotide Probes to HLA Class II Typing of the DRB Sub-region. *Tissue Antigens* 1990; 36: 149-155.
41. Wordsworth, P.B., Allsopp, C.E.M., Young, R.P. and Bell, J.I. HLA-DR Typing Using DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction and Sequential Hybridization to Sequence-specific Oligonucleotide Probes. *Immunogenetics.* 1990; 32: 413-418.
42. Higuchi R., Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Edlich HA. DNA Typing from Single Hairs. *Nature* 1988; 332: 543-6.
43. Olerup O. HLA Class II Typing by Digestion of PCR Amplified DNA with Allele-specific Restriction Endonucleases will Fail to Unequivocally Identify the Genotypes of Many Homozygous and Heterozygous Individual. *Tissue Antigens.* 1990; 36: 88-92.
44. Inoko H. PCR-RFLP Method Holds Great Promise of Complete HLA Class II Genotyping. *Tissue Antigens* 1990; 36: 88-92.

45. Uryu N., Maeda M., Ota M., Tsuji K., Inoko H. A Simple and Rapid Method for HLA-DRB and DQB Typing by Digestion of PCR- amplified DNA with Allele Specific Restriction Endonuclease Tissue Antigens 1990; 35: 20-31.
46. Huik., Festenstein H., de Klein A., Grosveld, G., Grosveld, F. HLA-DR Genotyping by Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. Immunogenetics. 1985; 22: 231-239.
47. Smouse P.E., Chakraborty R. The Use of Restriction Fragment Length Polymorphism in Paternity Analysis. Am J Hum Genet. 1986; 38: 918-939.
48. Southern, E.M. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. J Mol Biol. 1975; 98: 503-517.