

19
21



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

IMPORTANCIA DE LOS HAPLOTIPOS DEL COMPLEMENTO (COMPLOTIPOS) Y DEL GEN DE GLO I EN LA ETIOLOGIA DEL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

ADRIAN GARCIA SOTO

Director de Tesis: Dr. Julio Granados Arriola



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

. INTRODUCCION	1
. GENERALIDADES	3
. OBJETIVOS	35
. MATERIAL Y METODOS	38
MATERIAL	40
TIPIFICACION DEL fB DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.	44
TIPIFICACION DEL FACTOR C4 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.	48
TIPIFICACION DEL FACTOR C2 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.	51
TIPIFICACION DE LA ENZIMA ERITRO- CITICA GLIOXALASA I (GLO I)	56
. RESULTADOS	62
. DISCUSION	88
. CONCLUSIONES	94
. BIBLIOGRAFIA	97

I N T R O D U C C I O N

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune cuya etiología incluye factores tales como: componentes genéticos, inmunológicos, hormonales y factores del medio ambiente (medicamentos, radiación UV, infecciones virales) (5,6). El LEG se caracteriza por su desarrollo en mujeres jóvenes; se observa una relación 1:9 en favor del sexo femenino (6). La gran incidencia del Lupus familiar y la concordancia para el LEG en gemelos monogigotos apoya fuertemente la influencia genética (6,7,14,15,35). La posible asociación de marcadores genéticos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) ha sido estudiada ampliamente (24,30,54,62). Aunque ha sido de mostrado también que el análisis aislado del sistema HLA no basta para explicar la susceptibilidad al LEG, ya que probablemente otros genes unidos a este sistema, e incluso genes localizados en otros cromosomas, estén contribuyendo a la expresión de la enfermedad (30,63).

Dentro del MHC y en desequilibrio de unión con el sistema HLA, existen -- cuatro genes que codifican para tres proteínas del Sistema del Complemento (fB, C2 y C4) (1,11,13,17,19,42,43,47,51,53,57,58,66). Además a cinco -- centimorgans de distancia hacia el centrómero, se encuentra un gen que codifica para la enzima eritrocítica Glioxalasa I (Glo I), el cual se encuentra también en desequilibrio de unión con el MHC (32,66).

El presente estudio analiza si los marcadores del Sistema del complemento -- codificados dentro del MHC, junto con los alotipos de Glo I son herramientas útiles en la identificación de individuos susceptibles de padecer LEG, y en la definición de la etiología de esta enfermedad.

G E N E R A L I D A D E S

El sistema del complemento consta de 18 proteínas plasmáticas que sirven como efectores de diversos fenómenos inmunológicos (50). Estas proteínas existen normalmente en el plasma en forma inactiva o en un estado regulado de latencia (54). Cuando el sistema del complemento es activado mediante complejos antígeno-anticuerpo, agregados de inmunoglobulinas o superficies de ciertas bacterias o partículas, participa en una serie de reacciones proteolíticas que conducen a cambios en la permeabilidad vascular, atracción de leucocitos, aumento de la fagocitosis y finalmente al daño de las membranas celulares (21,22).

Si el complemento tiene algún papel directo o indirecto en la inmunidad celular no está claro, aunque la presencia de receptores en la superficie de una gran variedad de células para enlazar componentes del complemento, sugiere que tiene un papel en la respuesta inmune, a la vez que es el principal mecanismo efector de la inmunidad humoral (50).

El complemento es un sistema complejo con dos caminos de activación, clásico y alterno, y un camino efector común, en los cuales una serie de zimógenos proteolíticos son convertidos a proteasas activas que conducen a la formación de un complejo lítico capaz de lizar células bacterianas y animales (34, 50).

Los componentes del sistema del complemento y algunas de sus propiedades fisicoquímicas se enlistan en la tabla 1.

Las homologías funcionales y estructurales entre componentes de los dos caminos de activación, sugiere que ellos pudieran haber evolucionado a través de un proceso de duplicación genética (23,44,52). Las C3 convertidas del camino clásico y alterno son complejos bimoleculares (34).

TABLA 1. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS PROTEINAS
DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (29).

Nombre	Peso molecular	Concentración sérica (mg/ml)	Fragmentos
<u>Camino clásico</u>			
Clq	400,000	70	
Clr	95,000	35	
Cis	85,000	35	
C4	180,000	400	C4a, C4b, C4c, C4d.
C2	117,000	25	C2a, C2b.
<u>Camino alterno</u>			
C3	185,000	1,500	C3a, C3b, C3c, C3d.
B	95,000	250	
D	25,000	2	
P	220,000	25	
<u>Camino efector común</u>			
C3	185,000	1,500	
C5	200,000	85	C5a, C5b.
C6	128,000	75	
C7	121,000	55	
C8	153,000	55	
C9	80,000	200	
<u>Proteínas de Control</u>			
Inhibidor de C1	105,000	180	
Proteína que une C4 I (inactivador de -- C3b/C4b).	1.3 X 10 ⁶	250	
H (beta IH)	90,000	50	
	150,000	400	

Las subunidades catalíticas, C2a y Bb, tienen idénticos sustratos y similares composiciones de aminoácidos (44). Ambas derivan de proteínas codificadas por loci que están unidos cercanamente dentro del Complejo principal de Histocompatibilidad (MHC) (1,26,51). Estas proteasas funcionan solamente cuando están formando complejos con C4b y C3b, respectivamente. C4b y C3b están unidos por enlaces covalentes a complejos glucoprotéicos sobre la membrana celular. Aunque C3 y C4 no están genéticamente unidos en el humano, en el ratón C3 se localiza cerca al MHC, la región en la cual se codifican los genes para C4 (2,29). Dado que los péptidos de activación, C3a y C5a, tienen alrededor de un tercio de homología en la estructura primaria, las moléculas paternas parecen haber evolucionado por duplicación genética (2,23). La unión cercana entre C6 y C7 puede ser interpretada similarmente, los genes para ambas proteínas son duplicaciones de un precursor común; alternativamente, una proteína puede haber evolucionado de la otra (23,24).

IMPLICACIONES INMUNOBIOLOGICAS DE LA ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.

Las manifestaciones biológicas de la activación del complemento no están limitadas a eventos citolíticos. Las proteínas del complemento y fragmentos de estas proteínas participan en la contracción del músculo liso, liberación de histamina de las células cebadas y plaquetas, aumento de la fagocitosis, quimiotaxis y activación de linfocitos y macrófagos (Tabla 2) (21,22).

TABLA 2.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPONENTES DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (21).

<u>Componente</u>	<u>Actividad Biológica</u>
C1	Estabilización de complejos inmunes.
C2	Vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular.
C3	C3a.- Anafilotoxina y Quimiotaxis. C3b.- Adherencia inmune (opsonización). Activación de linfocitos.
C4	C4a.- Anafilotoxinas. C4b.- Neutralización viral
C5	C5a.- Anafilotoxina y Quimiotaxis
C5b, 6, 7 (Complejo)	Quimiotaxis

ESTADOS DE DEFICIENCIA DE COMPONENTES DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

Deficiencias genéticas de componentes individuales del sistema del complemento se han descrito en el hombre para todos los componentes del camino clásico y el complejo de ataque a la membrana, así como para el factor 1, Factor H y Properdina (8, 13, 28, 29, 33, 45, 49, 52).

Unicamente para los factores B y D del camino alterno no se conocen estados de deficiencia (29,33,52).

Los estados de deficiencia del complemento proporcionan la manera más directa de observar el papel del sistema del complemento "in vivo", enfatizando la importancia del complemento en la resistencia a infecciones bacterianas. Estudios in vitro han mostrado que el complemento realiza la fagocitosis y la inflamación (22).

Por otro lado se ha observado una fuerte asociación entre deficiencias del complemento y enfermedades por complejos inmunes (especialmente LEG), - síndromes semejantes al LEG y Angioedema Hereditario (24,25,33,55,59,62).

En la Tabla 3 se describen las enfermedades asociadas con estados de deficiencia del complemento (29,33).

POLIMORFISMO GENETICO DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

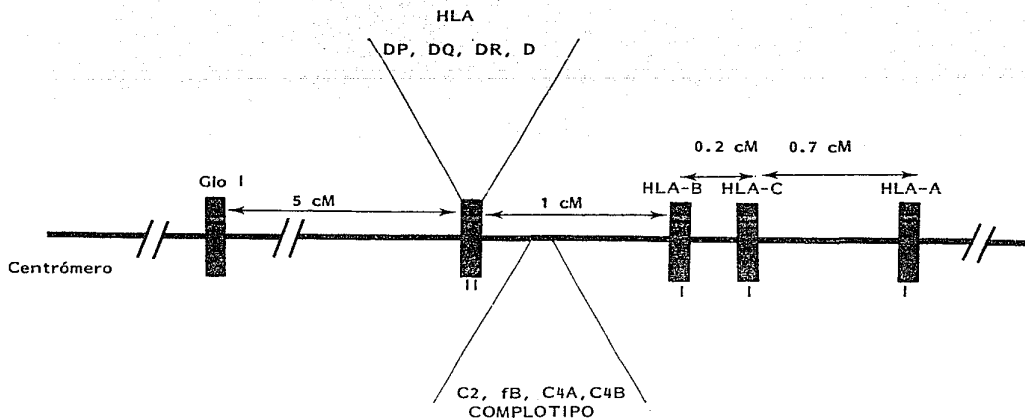
El término "polimorfismo genético" es usado cuando un locus cromosómico tiene más de un alelo con una frecuencia de más del uno por ciento en una población (51). Desde que en 1968 se describió el polimorfismo genético de C3 (2), otros polimorfismos han sido establecidos para los factores del complemento C₁, C₂, B, D, C₆, C₇ y C₈ (3,9,10,40,41,42,50).

Subsecuentemente se han llevado a cabo estudios de unión genética. Interesantemente, aquellos componentes que actúan como convertasas de C₃ en el sistema del complemento, C₂, C₄ y factor B, se encontraron unidos a la región HLA sobre el cromosoma 6 humano (1,26,57) (Fig. 1).

TABLA 3.- ENFERMEDADES ASOCIADAS CON DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO (29, 33).

<u>Componente</u>	<u>Enfermedad asociada</u>
Clq	Síndrome semejante al Lupus, Glomerulonefritis, Sépsis Crónica.
Clr	Síndrome semejante al Lupus, Glomerulonefritis, Lupus Discoide Crónico.
Cl _s	Lupus Eritematoso Generalizado.
C2	LEG, Lupus Discoide Crónico, Dermatomiositis, Vasculitis, Púrpura de Henoch-Schönlein, Infección Bacteriana Recurrente.
C4	LEG.
C3	Infecciones Bacterianas Recurrentes.
C5	LEG, Infecciones Bacterianas Recurrentes.
C6	Infecciones Bacterianas Recurrentes.
C7	Fenómeno de Raynaud con Esclerodactilia, -- LEG.
C8	Infecciones Bacterianas Recurrentes, LEG, -- Xeroderma Pigmentosa.
C9	Ninguna.
CI INH	Angioedema hereditario.
I	Infecciones Bacterianas Recurrentes.
P	Infecciones Bacterianas Recurrentes.

FIG. 1.- REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL MHC EN EL HOMBRE (17,19,45).



Mapa genético de la región MHC en el hombre, sobre el brazo corto del cromosoma 6. Los genes clase III que codifican las proteínas del complemento: C2, factor B (fB), C4A y C4B se encuentran entre los genes clase I: B, C y A, y los genes clase II: DP, DQ, DR y D. El gen de la glioxalasa (Glo I) se localiza entre DP y el centrómero.

Sistema HLA es el nombre con que se identifica a dos clases diferentes de moléculas pertenecientes al MHC humano (66).

Este sistema es una familia multigénica localizada sobre el brazo corto del cromosoma 6 humano que codifica moléculas importantes en la identificación de lo propio y lo no propio (66). Estas moléculas glucoprotéicas son de dos tipos. Aquellas codificadas por los genes denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C, llamadas moléculas clase I se expresan sobre todos los tipos de células nucleadas, excepto en trofoblastos (19,65).

El otro tipo de moléculas, las clase II, son codificadas por un grupo de genes en la región D/DR (D, DR, DQ, DP) (45). Las moléculas clase II, limitan su distribución a los linfocitos B, monocitos, células dendríticas y linfocitos T activados (19,66).

Ambos tipos de moléculas codificadas por el MHC, juegan un papel crítico en el rechazo de trasplantes de órganos y el control genético de la respuesta inmune (66).

En el hombre existen varios sistemas polimórficos, sin embargo, ninguno de ellos puede compararse con el extremo polimorfismo del MHC y particularmente, del sistema HLA del humano. Los siete loci que se han definido claramente hasta el momento para este sistema, presentan de 3 a 49 alelos condominantes, y el número de combinaciones alélicas posibles para éstos es de varios millones (19,45).

Los siete loci del sistema HLA, se encuentran unidos cercanamente sobre el brazo corto del cromosoma 6 humano (haplotipos del sistema HLA) (Fig. 1) (19,38). El orden que presentan estos loci del telómero hacia el centrómero es: HLA-A, C,B,D,DR, DQ y DP (45).

La distancia en centimorgans entre HLA-A y HLA-B, es de aproximadamente 0.9 centimorgans y entre HLA-B y HLA-DR de 1 (19). En otras palabras, - las recombinaciones entre cromosomas homólogos involucrando los loci HLA-A y B ó HLA-B y DR, ocurren con una frecuencia ligeramente menor al 1% de meiosis. Sin embargo, en este sistema se observa un fenómeno particular, - que consiste en la asociación genética preferencial entre alelos de varios loci de el mismo sistema, a lo que se le ha llamado desequilibrio de unión (4, 12).

El elevado polimorfismo y el desequilibrio de unión que muestra este sistema son herramientas valiosas en estudios antropológicos y epidemiológicos así - como también en el estudio de la etiología de las enfermedades (4,61,65,67).

Entre los loci HLA-B y HLA-DR, se localizan cuatro loci que codifican otra serie de moléculas del MHC, denominadas moléculas de clase III, y que son realmente las proteínas que funcionan como convertasas de C3 en los caminos de activación del sistema del complemento, C2 y C4 (C4A y C4B) en la vía clásica, y fB en la vía alterna (53). Estos loci son también muy polimórficos, aún cuando lo son en un segundo grado en comparación con el locus B del sistema HLA (Tabla 4) (5,11,17,58).

POLIMORFISMO DE C2

El polimorfismo de C2 se demostró mediante electroenfoque combinado con - un ensayo funcional para la actividad de C2, consistente en una lisis dependiente de complemento, de un recubrimiento de eritrocitos de carnero sensibilizados y suero deficiente en C2 (31,42). Se observaron seis alotipos (diferencias fenotípicas entre los diferentes alelos pertenecientes a un locus) - para esta proteína.

TABLA 4.- POLIMORFISMO DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS FACTORES DEL COMPLEMENTO: fB, C2, C4A y C4B (5).

<u>fB</u>	<u>C2</u>	<u>C4A</u>	<u>C4B</u>
S	C	QO*	QO*
SI	B	1	1
F	QO*	2	2
FI	AI	3	3
Otros**	Otros**	4	Otros**
		5	
		6	
		7	
		Otros**	

* Alelos nulos.

** Alotipos con frecuencias menores a 0.01.

Dos de estos seis alotipos son observados más comúnmente, C2-B y C2-C (Fig. 2). El alotipo común es C2-C, con una frecuencia aproximada del 93-94%. Los heterocigotos, C2-BC se observan entre 6 y 7% (8,42,49).

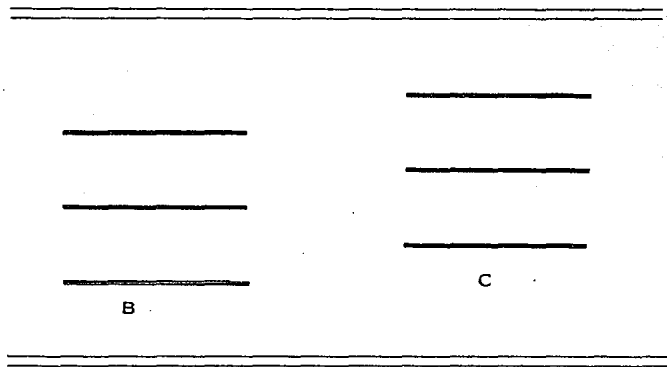
La frecuencia de homocigotos para C2-B es alrededor de 0.2%. Se ha demostrado que se hereda como un rasgo autosómico codominante que se encuentra unido al sistema HLA (26,51). El alelo común C2-C, y la variante rara C2-B, tienen niveles similares de actividad hemolítica (42). Se ha observado además un gen nulo o silente (28,49). Aunque la deficiencia de C2 es la más común dentro del sistema del complemento es difícil estimar su frecuencia génica. Sin embargo, los datos indican una frecuencia menor a 0.01 (49,51).

POLIMORFISMO DE FACTOR B (fB)

Mediante electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa, de suero completo, y subsecuente inmunofijación con un suero específico antifactor B (3), ó un ensayo funcional hemolítico para factor B (38), ha sido posible demostrar - por lo menos unas 20 variantes electroforéticas para esta proteína. Cuatro productos alélicos comunes han sido identificados; los dos más frecuentes - se denominan fB-F y fB-S y las dos variantes menos frecuentes fB-F1 y fB-S1 (Fig. 3) (3,40). La capacidad hemolítica observada para estos alotipos es igual para todos cuando se probó mediante una lisis de eritrocitos - de cuyo, mediada por el camino alterno (38,39).

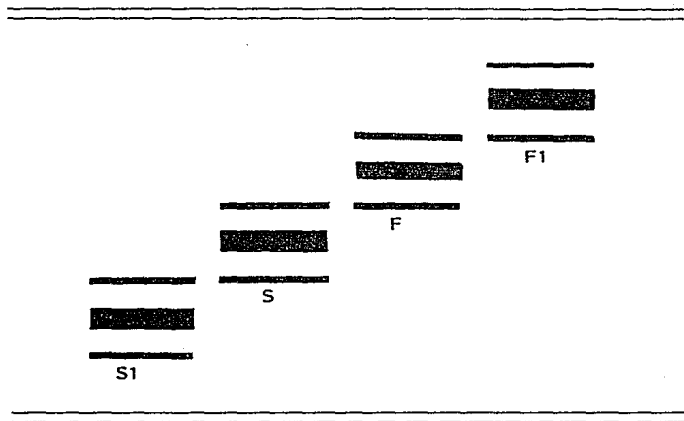
Esta proteína se hereda en forma autosómica codominante (3). No se ha descrito un gen nulo o silente, pero hay un alelo raro que dá niveles normales de factor B inmunoquímicamente, el cual sin embargo es disfuncional (39).

FIG. 1.- POLIMORFISMO DEL FACTOR C2 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO 42,65).



El fenotipo más frecuente para C2 son dos variantes electroforéticas constituidas por un patrón de tres bandas cada una.

FIG. 3.- POLIMORFISMO DEL FACTOR B (fB) DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (3,65).



El patrón electroforético para factor B corresponde a cuatro variantes que presentan tres bandas cada una: una banda central gruesa, que define la variante y dos bandas ténues localizadas (cada una) en la parte superior e inferior de la banda gruesa.

S: Variante lenta, F: Variante rápida, S1: Variante extra - lenta, F1: Variante extra rápida.

POLIMORFISMO DE C4

C4 presenta el polimorfismo más complejo observado para una proteína del sistema del complemento, con un sistema genético ya plenamente definido.

A principios de 1969, fueron observados patrones polimórficos para C4 -- usando electrofóresis prolongada de alto voltaje en gel de agarosa, con -- subsecuente electrofóresis cruzada en segunda dimensión e inmunofijación con anticuerpo específico para C4 (60). Se postuló (aunque la genética -- formal no era clara) un modo de herencia dominante, posiblemente gobernado por dos loci unidos muy cercanamente en el mismo cromosoma. En -- 1978, mediante el uso de un sistema de amortiguador discontinuo, se reveló por primera vez un patrón complejo de seis a ocho bandas para C4 por el método de inmunofijación (41). Un paso importante fué dado cuando -- se demostró que dos grupos sanguíneos comunes --Chido (Ch) y Rodgers (Rg)--, que se sabía estaban unidos al sistema HLA, representaban dos -- determinantes antigénicas de la fracción C4d de la molécula de C4 sobre los glóbulos rojos (27,43,47,48). Personas Rodgers positivo y Chido negativo, mostraron tener solamente las bandas de migración rápida (F), -- mientras que los sueros Chido positivo y Rodgers negativo, mostraban -- únicamente las bandas de migración lenta (S); el suero de un individuo deficiente de C4 fué negativo para ambos grupos sanguíneos. Estudios de absorción, posteriores, en los cuales la actividad de C4 era anulada del suero mediante un anticuerpo contra C4 humano, mostraron que esta proteína era capaz de neutralizar anticuerpos dirigidos contra los -- grupos sanguíneos Chido y Rodgers (46). Los estudios anteriores apo-yaron concluyentemente al modelo de patrón de herencia de dos loci -- para C4.

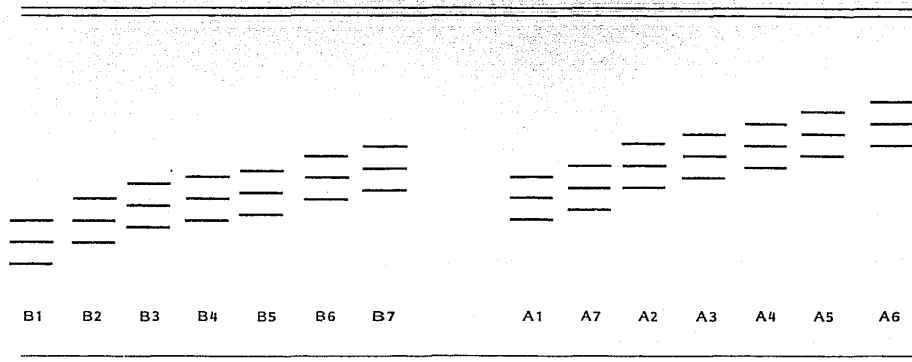
A pesar de que se había logrado establecer el polimorfismo para C4 en el modelo de dos loci, se presentaban serios problemas al no lograr identificar fácilmente todos los productos alélicos. Awdeh y Alper, introdujeron un procedimiento de desialización (eliminación enzimática del ácido siálico) previo a la electrofóresis en gel de agarosa e inmunofijación (9). Después de un tratamiento con neuraminidasa, los fenotipos de C4 se observan más espaciados al ser revelados inmunquímicamente distinguiendo entre los productos alélicos de ambos loci. Sin embargo, algunos patrones de bandas -- sobre todo aquellos con los alelos nulos, eran difíciles de definir por lo -- que por ejemplo, para distinguir los fenotipos Ff/SS, FF/SS, y FF/Ss, --- (f y s son alelos nulos). Es imperativo realizar electrofóresis en doble dimensión, o alternativamente, una evaluación densitométrica (10). Posteriormente se han logrado describir siete variantes para las bandas F, actualmente denominadas A, y siete variantes para las bandas S, llamados ahora B, incluyendo alelos nulos o silientes para ambos loci (9,16).

La figura 4 muestra las posiciones electroforéticas de las variantes de C4. Cada producto genético consiste en tres bandas. Puede notarse que algunas de las variantes de C4B corresponden muy cercanamente a la posición de las variantes de C4A, p.e. B7 y A2.

COMPLOTIPOS

Estudios llevados a cabo en familias informativas, en las cuales existió recombinación entre los loci HLA-B y HLA-DR, indican que estos cuatro loci (C2, fB, C4A y C4B), se encuentran más cercanos a la región de --- D/DR (no hubo ninguna recombinación entre D/DR y alguno de estos loci) (53).

FIG. 4.- POLIMORFISMO DEL FACTOR C4 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (5,65).



Al igual que en el sistema HLA los loci para estas proteínas presentan el fenómeno de desequilibrio de unión, sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en el sistema HLA, no se ha observado ninguna recombinación entre estos cuatro loci, heredándose, por lo tanto, codominantemente como una sola unidad genética (5,11,17,58). Estas unidades son llamadas complotipos (haplotipos del sistema del complemento) (5,11). Estudios de biología molecular han mostrado que el orden de estos genes, del telómero hacia el centrómero es C2, fB, C4A y C4B (5,11,17).

Debido al polimorfismo existente entre estos cuatro loci del sistema del complemento y su fuerte desequilibrio de unión mostrado, los complotipos se encuentran en segundo lugar después del sistema HLA-B, como un conjunto de marcadores genéticos extensamente polimórficos (58,66).

NOMENCLATURA

Un comité internacional ha estandarizado la nomenclatura de los alelos y haplotipos para estos genes (52,64).

Los alelos individuales se designan con el nombre de locus, un asterisco y un número o letra, o el símbolo "QO" si es nulo, por ejemplo C2*QO, C4A*2, C4B*QO, C4B*1. Los fenotipos de las proteínas se escriben en letras mayúsculas con un espacio entre el símbolo de locus y su variante, por ejemplo C4A 4, C4B 2 y C4B QO.

Los haplotipos se escriben de la siguiente forma C4A*2, C4B*1/C4A*1, C4B*1, C4A*2 C4B*QO/C4A*2 C4B*1.

Para fines prácticos, cuando nos refiramos a las variantes de éstos o a sus haplotipos, prescindiremos de los asteriscos, aclarando en su caso, si se trata del fenotipo o del genotipo.

GLIOXALASA I

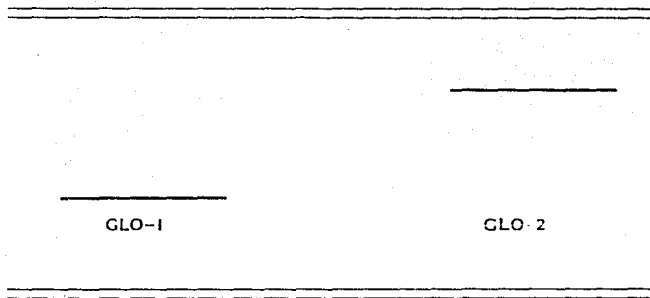
La Glioxalasa I (GLO I), es una enzima entrocítica cuya función es convertir el glutatión y metil glioxal a S-lactoil glutatión (32). El gen que codifica para esta enzima también se encuentra localizado sobre el brazo corto del cromosoma 6 humano, más cerca del centrómero que el MHC, y a una distancia de aproximadamente 5 centimorgans de este complejo (4,12). Aunque el locus para GLO I no pertenece al MHC, su importancia reside en que es también un locus polimórfico con dos alelos denominados 1 y 2 (fig. 5), heredados en forma codominante y en desequilibrio de unión con el sistema MHC (32,65).

COMPLOTIPOS - HLA - GLO I

Desde que el sistema HLA fué descubierto en 1958 por Dausset (18), se ha convertido en uno de los sistemas genéticos más fascinantes conocidos en el hombre. Contiene genes los cuales controlan una variedad de reacciones, y que además son muy polimórficos (19,66). Además de pertenecer al complejo principal de histocompatibilidad humano y constituir por lo tanto la mayor barrera a los trasplantes, una variedad de alelos HLA, están asociados con la susceptibilidad a varias enfermedades (61,65,67).

Estas asociaciones son por lo tanto, herramientas útiles para estudiar la genética de las enfermedades (61).

FIG. 5.- POLIMORFISMO DE LA ENZIMA ERITROCITICA GLIOXALASA I
(GLO I)



Se han identificado dos variantes electroforéticas de la enzima eritrocítica GLO I; GLO 1 y GLO 2, mostrando únicamente una banda cada uno de ellos.

Como marcadores del Complejo Principal de Histocompatibilidad, los --complotipos son de particular importancia debido al fuerte desequili--brio de unión mostrado con los loci del sistema HLA y a su cercanía con la región HLA-D/DR (12,53). Esta región en el hombre se considera que corresponde al área la, de respuesta inmune que existe en el ratón (66). Por lo tanto, los complotipos particularmente en conjunción con HLA-D/DR y HLA-B, pueden ser útiles en el estudio de susceptibilidad genética a las enfermedades.

Aunque menos polimórficos que HLA-B, los complotipos son más polimórficos que HLA-D/DR y su tipificación es relativamente sencilla --(5,45), con las ventajas de poder determinar con relativa facilidad -todas las variantes electroforéticas que ocurran y establecer clara--mente la existencia de alelos nulos, tanto en el estado homocigoto como en el heterocigoto (3,42,65).

La inclusión en el análisis del locus polimórfico para GLO I, como -un marcador más en los estudios del MHC, permite un mejor estudio de este segmento del cromosoma 6, que involucra a los loci del sistema HLA y los loci del complemento. Este segmento de aproximadadamente 7 centimorgans de longitud se hereda en forma codominante y prácticamente sin recombinación como una unidad genética (4,5,12). El hecho de que el locus para GLO I se encuentre tan alejado del -MHC y que segregue además en desequilibrio de unión con él, es --una gran herramienta que puede proporcionarnos información acerca de lo que pudiera ocurrir en el segmento desconocido entre el -MHC y GLO I.

COMPLITIPOS Y ENFERMEDAD

Los estudios de asociación entre alelos del MHC Y una variedad de enfermedades, han establecido que ciertos alelos del sistema HLA y de los complotipos ocurren más frecuentemente en pacientes (tienen un riesgo relativo significativamente positivo) (12,25,36,59,61,65,67). Se considera -- que el riesgo relativo de cada uno de ellos, cuando es positivo, de alguna información sobre la localización cromosómica de los genes de susceptibilidad unidos al MHC postulados para estas enfermedades. Para la mayoría de las enfermedades estudiadas, los riesgos relativos son mayores para HLA-D/DR, ó uno o más de los genes del complemento (61,65,67). Se ha pensado que los genes con riesgo relativo reducido sean protectores - (4).

Muchas de las enfermedades que se asociaron inicialmente con el sistema HLA, se encontraron posteriormente asociadas también con alelos de los loci pertenecientes a los complotipos, incluso pueden ser subdivididas en función de esta subsecuente asociación con los genes del complemento (59).

Algunas enfermedades para las cuales se ha encontrado asociación con - alelos de los complotipos son p.e. la Esclerosis Múltiple (EM) y la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID) (36,59). Para la Esclerosis -- Múltiple ha sido establecida la asociación entre dos haplotipos del sistema HLA y esta enfermedad: A3-B7-Dw-2/DR2 y A1-B8-Dw-3/DR3 (59, - 61,67).

En 1976 se demostró que niveles séricos bajos de C2 en pacientes con EM estaban ligados con el alelo Dw2 (59). El segundo haplotipo encontrado en estos pacientes es el más frecuente de los haplotipos caucásicos y se caracteriza por su asociación con varias enfermedades autoinmunes. Interesantemente, el alelo HLA-B8, está en fuerte desequilibrio de unión con alelos nulos para el locus C4-A (4,25).

En la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID), se ha encontrado asociación para un alelo raro del locus del fB, el fB-F1. En el VIII Congreso Internacional de Histocompatibilidad, efectuado en 1980 en -- los Angeles, se efectuó el análisis de más de 1,200 pacientes tipificados, comparados con más de 1,600 controles y se encontró que 22.5% de los pacientes con DMID eran portadores de alelo raro para el fB, el alelo fB-F1, una frecuencia muy por encima de la frecuencia de los controles (36).

Independientemente se había descrito en 1979, una incidencia inusualmente alta de fB-F1 de 22.6% en 106 pacientes blancos americanos de -- los Estados Unidos con DMID (59). El riesgo relativo para desarrollar la enfermedad fué de 15 para individuos sanos como portadores del -- alelo F1 del fB. otro estudio en 1979, mostró una marcada asociación entre el momento de inicio de la DMID y el fenotipo fB-F1 (5,58,59). Esto ocurrió en 19.1% de los pacientes, si en el momento de inicio de la enfermedad tenían 10 años o menos. En contraste, si los pacientes adquirían la enfermedad a los 20 años de edad ó más, se notaba una -- incidencia normal del 1.3%.

En la Nefropatía Membranosa Idiopática, el fB-FI se encontró también asociado y además en desequilibrio de unión con los alelos del sistema HLA, HLA-B8, Dw3 (59).

En la Hiperplasia Adrenal Congénita, enfermedad en la cual existe deficiencia de hidroxilasa 21, se encontró una fuerte asociación con el haplotipo A3, Bw47, Cw6, DR7, FCO,31-1 (25). Estudios de clonación de DNA posteriores, han demostrado que el gen que codifica para la hidroxilasa 21, se encuentra en desequilibrio de unión con los genes de C4A y C4B y que la existencia de alelos nulos para estos genes implica así mismo, la falta de locus genético para la enzima hidroxilasa 21 (15).

El desequilibrio de unión existente entre los loci del sistema HLA y los complotipos, la cercanía de éstos con la región HLA-D/DR, el gran polimorfismo que presentan y el hecho de que un gran segmento cromosómico más allá del MHC pueda ser estudiado gracias al desequilibrio de unión mostrado con el locus polimórfico de GLO I, justifican la importancia del estudio de los complotipos y GLO I en asociación con enfermedad.

LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG)

El LEG se caracteriza por su desarrollo en mujeres jóvenes; se observa una relación 1:9 a favor del sexo femenino (59). la mayoría de los casos se inician entre el segundo y cuarto decenios de la vida; los casos raros después de los 40 años suelen ser benignos con presentación atípica.

Es posible que las razas con piel oscura sean más afectadas por la enfermedad y parece ser común en nuestra población mestiza mexicana -- (35,56).

Se ha reportado frecuentemente la ocurrencia de LEG en más de un -- miembro de una familia nuclear (6,15,35). De hecho 7-12% de los pacientes con LEG tendrán un pariente en primero o segundo grado con la misma enfermedad. Conservando la predilección femenina del LEG, la mayoría de las combinaciones que se observan en la agrupación familiar son mamá-hija y hermana-hermana.

Sin embargo, existen reportes de mamá-hijo, papá-hija y entre hermanas. La proporción de hombres con LEG familiar es de aproximadamente 10% (35). Por otro lado, la expresión clínica y serológica del LEG familiar no difiere del LEG no familiar (6,7,15).

La etiología del LEG es desconocida, algunos factores importantes -- que participan en ésta son el genético, un trastorno inmunobiológico celular, las hormonas, el medio ambiente (medicamentos, radiación UV, infecciones virales (7,20,24,30,55,62,63).

La existencia de anticuerpos anti-ácidos nucleicos y contra los linfocitos en parientes sanos que tienen contacto cercano con los casos índice de LEG comparados con los parientes que viven en distintos lugares al enfermo, apoyan la influencia del medio ambiente (20).

Por otro lado, la alta frecuencia de esta anomalía serológica en los parientes que tienen poco o ningún contacto con los casos índice de LEG comparados con sujetos normales de la población general, apoya la influencia de factores hereditarios (6,7,15,56).

Además un mayor apoyo a la predisposición genética lo da la ocurrencia de 57% de concordancia para el LEG en gemelos monocigotos, una prevalencia que excede con mucho a los gemelos dicigotos y hermanos (14).

Inmunológicamente el LEG se caracteriza por linfopenia a expensas de linfocitos T, particularmente del tipo supresores, con hiperrespuesta secundaria de los linfocitos estimuladores. Esta alteración puede estar presente aún sin manifestaciones clínicas. También existen alteraciones en la respuesta de linfocitos T a mitógenos (in vitro), y a antígenos usados en pruebas cutáneas (in vivo), por lo que se infiere que los linfocitos T son funcionalmente anormales. Secundariamente ocurre una exagerada respuesta inmune humoral con desarrollo de autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos linfocitotóxicos (20,63).

Estas alteraciones inmunes son influenciadas por la situación hormonal y el sexo del paciente. Los estrógenos, especialmente el hidroxilado en el carbono 16, modifican la inmunoregulación produciendo aumento de la actividad T estimuladora y disminución de la función T supresora (63).

La posible participación de estímulos externos que actúan sobre un terreno inmunogénico apropiado en la expresión de LEG, se apoya en la observación de síndromes lupoides en individuos que ingieren medicamentos del tipo de los anticonvulsivos, la procainamida, la hidralacina entre otros. Se ha confirmado también que la luz ultra violeta produce cambios en el DNA, que le confiere propiedades inmunógenas, con lo que se puede desencadenar la enfermedad o exacerbarla (7,63).

Se ha confirmado que los monos al ser alimentados con alfalfa rica en aminoácido L-canavanina, desarrollan un síndrome típico del Lupus, el cual es reversible al retirar el estímulo (56).

MHC Y LEG

Los antígenos HLA-A, B y C, han sido estudiados en múltiples series de pacientes caucásicos con LEG sin demostrar asociación (30,63). Varios reportes sólo sugieren una débil asociación con HLA-B8 (30). Posteriormente especificidades HLA-D usando cultivo mixto de linfocitos y células tipificadoras homocigotas fueron técnicamente difíciles de interpretar, debido a la pobre viabilidad de los linfocitos de pacientes con LEG. Las investigaciones de HLA-DR, han sido más útiles en este locus. Se han encontrado frecuencias significativamente incrementadas de HLA-DR 2 (57% de pacientes contra 26% de controles) y HLA-DR 3 (46% contra 22% en sujetos controles), estos resultados se obtuvieron de 28 pacientes blancos con LEG (54).

Recientemente otros estudios han confirmado estas asociaciones: 75% de 24 pacientes blancos con LEG tuvieron DR2 ó DR3. Además, -- otros antígenos de la región D reportados con asociación son DQw1 (75% en pacientes con LEG y 14% en sujetos control), y DRw52 ---- (61% en pacientes con LEG vs. 37% en sujetos control) (63).

Los estudios efectuados en familias que presentan un solo miembro - afectado y en las familias con dos o más miembros afectados con LEG, no han mostrado que los haplotipos del sistema HLA segreguen con - la enfermedad. Además, el estudio familiar no difirió del patrón ge- nético mendeliano normal (Tabla 5). No obstante, HLA-DR2 y tal -- vez DR3, sin importar el resto del haplotipo, ocurren en exceso en miembros de familias con LEG (7).

TABLA 5.- HAPLOTIPOS HLA COMPARTIDOS POR 38 HERMANOS
CON LEG (7)

<u>Haplotipos compartidos</u>	<u>Dos</u>	<u>Uno</u>	<u>Ninguno</u>
Observado	8 (21%)	22 (58%)	8 (21%)
Esperados	25%	50%	25%

Varias deleciones genéticas de componentes del complemento parecen correlacionar claramente con un síndrome semejante al LEG. Estas incluyen C2 y C4 (62). La deficiencia de C2 es el defecto hereditario del complemento más común en el humano ocurriendo en estado heterocigoto en aproximadamente 1% de los individuos blancos normales y en forma homocigota en uno de 10,000 (28,49). El gen nulo de C2 se encuentra en desequilibrio de unión con el haplotipo HLA-A25, B18, DRw2, DR2 (8). Es prácticamente imposible la determinación de deficiencias de C2 mediante técnicas inmunológicas en pacientes con LEG activo en quienes varios componentes del complemento están siendo consumidos (52,62). En pacientes con bajo grado de activación del complemento puede oscurecer la detección de una deficiencia selectiva. Así, se requieren estudios familiares para determinar sin lugar a dudas las deficiencias selectivas de los componentes del complemento.

Parece ser que aproximadamente 40% de sujetos deficientes homocigotos para C2, desarrollarán un síndrome semejante al LEG. En 137 pacientes con LEG 6% fueron heterocigotos deficientes en C2 y un paciente fué deficiente homocigoto (28,62).

La deficiencia de C4 es genéticamente más compleja que la deficiencia de C2 y el estado homocigoto es más raro (10,47,59). Dado que la proteína para C4 es codificada por dos genes adyacentes (C4A y C4B), los homocigotos deficientes para C4 son raros, ya que requieren cuatro deleciones genéticas, mientras que un heterocigoto o deficiente parcial (uno, dos o tres genes nulos para C4), es relativamente común.

Genes nulos para el locus C4A, ocurren en 22% de individuos blancos normales y la delección para C4B en 28% de ellos (10).

Se ha reportado exceso de uno o más alelos nulos para C4 en pacientes con LEG (24,55,62). Por otro lado, en 17 individuos homocigotos deficientes para C4 descritos en todo el mundo, 13 tuvieron una enfermedad semejante al lupus (62,63). Debido a que delecciones en C4A y C4B muestran desequilibrio de unión con ciertos alelos adyacentes de HLA-DR, incluyendo DR2 y DR3, se ha sugerido que alelos nulos para C4, o bien, los complotipos, puedan ser los genes que confieren primariamente la susceptibilidad a la enfermedad y en forma secundaria el gen, más que DR (24). Otros estudios sin embargo, no han mostrado diferencias significativas en cuanto al número de alelos nulos (uno, dos o tres) ni el tipo de alelo (C4A ó C4B), entre parientes con LEG, con anomalías serológicas, parientes sanos o esposas, no relacionadas (55).

Para el gen que codifica la proteína activadora del camino alterno, fB, no ha sido demostrada ninguna deficiencia y ningún alotipo se ha encontrado asociado con el LEG (62).

Estos estudios indican que únicamente el estudio del sistema HLA no puede explicar la susceptibilidad al LEG; sin embargo, es probable que varios genes unidos al sistema HLA estén matizando la expresión clínica de esta enfermedad.

Las deficiencias hereditarias de componentes del sistema del complemento, especialmente C2 y C4, parecen predisponer a fenómenos -- autoinmunes y a una enfermedad semejante al LEG. No obstante, - parece ser poco probable que las deficiencias del complemento por - sí solas participen en la etiología de la mayoría de casos de LEG.

Los efectos del sexo, edad e influencias hormonales son claramente importantes (Tabla 6 y 7) y factores genéticos adicionales contribuyen a la expresión final de la enfermedad.

Dado que se han observado asociaciones de ciertos antígenos HLA-DR con LEG y teniendo en cuenta el desequilibrio de unión de estos genes con los complotipos, el estudio de ellos en familias con miembros afectados con LEG, puede dar información adicional de gran - importancia en cuanto a su patogénesis y su forma de herencia. Por otro lado, pueden examinarse las contribuciones relativas de los -- alelos del complemento a la expresión de la enfermedad de tales familias. La inclusión del locus polimórfico de Glo I permitirá un mejor análisis de este segmento cromosómico, dado el desequilibrio de unión que presenta con la región del complotipo.

Además, si las familias son suficientemente grandes puede llevarse a cabo el estudio genético formal, incluyendo estudios de unión que pueden definir mejor las bases de la herencia.

TABLA 6.- EFECTO DEL SEXO SOBRE LA EXPRESION DE AUTOINMUNIDAD EN 11 FAMILIAS (6,7).

<u>Estado de los parientes</u>	<u>Mujeres</u>	<u>Hombres</u>
LEG	17 (81%)	4
Otros desórdenes inmunes	17 (77%)	5
Parientes con autoanticuerpos	25 (76%)	8
Parientes sanos	53 (47%)	59
Total	112 (60%)	76 (40%)

TABLA 7.- EFECTO DEL INCREMENTO DE EDAD SOBRE LA EXPRESION DE FENOMENOS AUTOINMUNES EN 11 FAMILIAS (6,7).

<u>Grupos de edad</u>	<u>Individuos con Anormalidades inmunes</u>	<u>Individuos sanos</u>
14 años (n 14)	3 (21%)	11 (79%)
15 a 54 años (n 44)	59 (41%)	85 (59%)
55 años (n 30)	16 (53%)	14 (47%)

OBJETIVOS

El presente trabajo llevado a cabo en familias con por lo menos un miembro afectado con LEG, pretende analizar si estos marcadores son herramientas útiles en el estudio genético de la enfermedad y en la identificación de marcadores genéticos que puedan diferenciar individuos sanos de enfermos, -- sirviendo así como indicadores de riesgo de padecer la enfermedad.

El conocimiento de la susceptibilidad genética a la enfermedad y la identificación de los marcadores de riesgo, podría eventualmente detectar sujetos susceptibles y tratarlos racionalmente a tiempo, sobre todo inicialmente -- cuando algunas manifestaciones clínicas al parecer intrascendentes, pudieran corresponder a etapas preclínicas por naturaleza no floridas y no esperar hasta que el paciente se presente a requerir atención médica en un estadio en que las secuelas sean irreversibles.

Por lo anterior los objetivos planteados para el presente estudio son los siguientes:

- a) Establecer la importancia del estudio de los alotipos de las proteínas del Sistema del Complemento fB, C2 y C4 (haplotipos del complemento) y de la enzima eritrocítica Glioxalasa I (Glo I) en la etiología del Lupus Eritematoso Generalizado (LEG).
- b) Analizar si existe predisposición genética para padecer LEG, determinada por la forma de herencia de los haplotipos del complemento --- (complotipos) y Glo I, entre los casos índice y sus hermanos.

- c) Identificar marcadores genéticos del MHC (no HLA) que ayuden a caracterizar individuos con alto riesgo de padecer LEG.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

El presente estudio se realizó en 229 individuos de ambos sexos, 93 hombres (41%) y 136 mujeres (59%), pertenecientes a la primera generación de 50 familias no emparentadas entre sí, que presentan por lo menos un miembro enfermo con LEG. 7 familias tienen más de un individuo afectado con la enfermedad y las 43 familias restantes sólo un paciente.

En todos los individuos se tipificaron las variables fenotípicas (alotipos) - de las proteínas del complemento. fB, C2, C4A y C4B (complotipos), y de la enzima eritrocítica Glíoxala I (Glo I).

Con el objeto de conocer si existe predisposición genética del LEG familiar, se analiza la forma en que son compartidos los complotipos junto con los alotipos del gen Glo I, entre los casos índice y sus hermanos sanos y enfermos. Los complotipos de los padres de cada familia se incluyen - en el estudio, para la construcción del árbol genealógico.

De acuerdo a las leyes Mendelianas de la herencia, si los haplotipos (complotipos más el gen de Glo I) se han segregado en forma aleatoria, sin - preferencias, la probabilidad de que algún hermano compartá con el caso índice un haplotipo (1), ambos haplotipos (2), o ninguno de ellos (0), - será 50%, 25% y 25% respectivamente.

No es posible establecer si esto se cumple o no para cada unad de las - familias, debido a que los pocos miembros no darían resultados significativos. Por ello el análisis se hizo en un grupo constituido por todos -- los individuos de las cincuenta familias: 50 casos índice y 179 hermanos (86 mujeres y 93 hombres).

Además, en las familias con más de un enfermo se analiza también si existe alguna relación entre los haplotipos compartidos entre el caso índice y sus hermanos afectados con la misma enfermedad.

Por otro lado, para identificar los marcadores de riesgo para el LEG, el grupo se subdividió en mujeres enfermas, mujeres sanas y hombres y se analizaron las frecuencias fenotípicas de haplotipos, complotipos y alotipos de los marcadores estudiados, bajo la hipótesis nula de que no existe diferencia significativa entre cada subgrupo. Además, debido a que estos marcadores se heredan en forma codominante se evalúa la situación de que algunos pares de haplotipos pudieran estar asociados con el LEG.

El análisis estadístico de comparación entre grupos se realizó mediante el uso de tablas de contingencia de 2×2 y la significancia entre las diferencias observadas se evaluó mediante la prueba χ^2 (ji-cuadrada) y la prueba exacta de Fisher.

El riesgo relativo (RR) de los marcadores encontrados, se establece sólo para aquellos donde las pruebas de significancia indican que las diferencias observadas entre los subgrupos son estadísticamente significativas.

A) MATERIAL

1) MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Para la tipificación de los factores del complemento C2, fB y C4 (C4A y C4B), se requiere plasma fresco obtenido con EDTA como anticoagulante. Pueden emplearse también plasmas tomados en las mismas condiciones y almacenados a -70°C hasta por 2 años.

- b) Para la tipificación de la enzima eritrocítica Glo I, se requiere de un hemolisado de glóbulos rojos humanos, fresco. Los hemolisados pueden almacenarse a -70°C y hacer su determinación hasta dos años después.
- c) Solución de eritrocitos de carnero sensibilizados y ajustados a 10×10^6 células/ml. (ver tipificación de C2).
- d) Suero humano deficiente en C2.
(tratado a 50°C durante 20 minutos).

2) MATERIAL QUIMICO

- 1) Solución amortiguadora de Barbiturato, pH 8.6 con Lactato de Calcio (0.06%).
- 2) Solución amortiguadora de Barbiturato-Tris (2.26%), Glicina -- (2.81%), pH final 8.8.
- 3) Solución stock amortiguadora de Barbiturato, (VBS-Ca^{2+} , Mg^{2+}):
NaCl (0.83%), Barbiturato de sodio (0.1%), HCl 1N (0.35% V/V),
 MgCl_2 1.56 M (0.03% V/V), CaCl_2 2M (0.074% V/V), pH final 7.2.
- 4) Solución amortiguadora de Barbiturato: Tris (0.36%), Acido Barbitúrico (0.55%), Mercaptoetanol 0.1M (0.2% V/V), MgCl_2 (0.04% V/V), pH final 8.0.
- 5) Solución de EDTA 0.2M, pH 7.2.

- 6) Solución VBS-EDTA 0.01M: NaCl (0.83%), Barbiturato de Sodio (0.1%), EDTA 0.2M, pH 7.2 (5% V/V), HCl IN (0.35%).
- 7) Solución GBS²⁺: Solución VBS-Ca²⁺, Mg²⁺ (20% V/V) agarosa al 0.1%.
- 8) Solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.8 EDTA (1.25%).
- 9) Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.5.
- 10) Solución stock de acrilamida: acrilamida (6.67%) N,N, metil bis acrilamida (0.18%) - Taurina (3.34%). (Almacene a 4°C).
- 11) Solución de Riboflavina al 0.001%. (Almacene a 4°C hasta por 2 semanas).
- 12) Solución stock de yoduro en amortiguador de fosfatos: Yoduro de potasio (8.3%), Yodo (0.25%), amortiguador de fosfatos 0.5M pH 6 (40% V/V). (Consérvese a 4°C hasta una semana).
- 13) Solución salina 0.9%.
- 14) Solución amortiguadora Tris HCl 0.1M, pH 7.8.
- 15) Solución stock de Metiltetrazolio (MTT) al 0.5%. (preparar justo antes de usarse).
- 16) Solución para primera tinción (Glo I): Amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.5 (3.48 ml), Glutation (24 mg), Metilglioxal (0.2ml), solución -- stock de MTT (0.22 ml).

- 17) Solución de diclorofenol-indol 0.2%.
- 18) Solución de Agarosa para corrimiento de C4: Agarosa (Sea Kem ME: EEO) (0.75%), solución amortiguadora de barbiturato-Tris-Glicina (40% V/V), - solución de EDTA 0.2M (4% V/V).
- 19) Solución de azul de Coomasie al 0.25% en metanol-ácido acético-agua -- (9:2:9).
- 20) Solución desteñidora, metanol-ácido acético-agua (15:3:15).
- 21) Agarosa (Sea-Kem ME;EEO) (0.16-0.19).
- 22) Agarosa (Sea-Kem Marine Colloids Marine USA).
- 23) Antisuero específico anti-Factor B (Atlantic Antibodies; Sea-Borough 04074, USA).
- 24) Antisuero específico Anti-C4 (Atlantic antibodies).
- 25) Azul de Coomasie (Sigma Chemical USA).
- 26) Neuraminidasa (Sigma, Tipo VI).
- 27) Anfolina LKB, pH 5 a 7 (No. 1809-121).
- 28) Hemolisina comercial (1:1000).
- 29) Tolueno.

3) EQUIPO

- Equipo general del laboratorio.
- Placas de vidrio de 26cm. x 12.5cm.
- Placas de vidrio de 17x15x0.3cm.
- Placas de plástico siliconizado de 26cm. x 12.5cm.
- Papel Whatman No. 1.
- Mask: Aplicador plástico para muestras de electrofóresis. (EMC Marine Colloids Division).
- Cámara de electrofóresis con sistema de refrigeración.
- Papel cromatográfico Whatman 3 MM.
- Clips metálicos para sujetar las placas (BACO).
- Lámpara de luz fluorescente.
- Equipo para Electroenfoque (C2).
- Hojas de acetato de celulosa conservadas en etanol al 30%, a 4°C. - (Chemetron, Milano, Italia).
- Fibra de nylon-lana.
- Membrana de celofán para diálisis.

B) METODOS

- 1) TIPIFICACION DEL FACTOR B (fB) DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (9,10,32,42,52,65).

Las variantes electroforéticas del Factor B (fB) son determinadas por inmunoprecipitación en gel de Agarosa, usando un amortiguador alcalino de barbital.

METODO:

A) PREPARACION DEL GEL:

- 1.- Las placas de vidrio deben ser perfectamente lavadas con detergente biológico y enjuagadas en agua destilada durante 30 mins. para -
últimamente enjuagarse con etanol.
- 2.- Se barniza uno de los lados de la placa con solución de agarosa ---
(Sea Kem) al 1% en agua destilada. Déjela secar a temperatura ambiente toda la noche.
- 3.- Se preparan 30ml. de agarosa al 1% (Sea Kem ME:EEO) en amortiguador para el gel (Sol. 1-Agua dest., 2:1) y se vierte cuidadosamente sobre la cara de la placa, cubierta anteriormente con agarosa al 1% en agua destilada. Asegúrese que la agarosa se distribuya uniformemente a través de toda la placa hasta tener un espesor de ---
aproximadamente 1 mm.
Deje solidificar a temperatura ambiente durante unos 15 mins.

B) APLICACION DE LAS MUESTRAS:

- 1.- Con papel filtro Whatman No. 1 se seca aproximadamente 3cm. del final del gel (a través de todo el gel) donde se aplican las muestras (Cátodo). Repetir el proceso 2 veces.
- 2.- Sobre el área seca se coloca un aplicador plástico que tiene perforaciones rectangulares para aplicar las muestras (MASK). En la primera y última perforaciones se colocan aproximadamente 10ul. -

de Hemoglobina A que sirve como indicador y en las demás perforaciones se coloca el mismo volúmen de cada muestra (alrededor de 10 muestras).

- 3.- Se espera hasta que las muestras se hayan absorbido en el gel (aproximadamente 15 min.). Se quita el exceso de muestra que no penetró con papel Whatman No. 1 y se retira el aplicador de plástico (MASK).

C) CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las placas se colocan sobre bases enfriadas por agua circulante entre 6 y 10°C. para evitar el sobrecalentamiento del gel de agarosa.

- 1.- El contacto entre el gel y el amortiguador electrodo (Sol. 1), se realiza mediante una "mecha" constituida por 4 hojas de papel filtro Whatman No. 1, (del mismo ancho que la placa de gel) perfectamente humedecida en el amortiguador electrodo (Sol. 1). Una de las puntas de la mecha se coloca exactamente atrás de las muestras y la otra a 1 cm. del final del gel.
- 2.- La superficie del gel se cubre con un plástico o vidrio para prevenir desecamiento y la electrofóresis se lleva a cabo a 350 V (75 mA) hasta que la hemoglobina haya emigrado hasta casi la segunda mecha.

Esto usualmente requiere 3 horas.

D) INMUNOPRECIPITACION:

- 1.- En las condiciones electroforéticas anteriores, las bandas del fB emigran en una zona de 3 a 6.5 cm. del origen. En esta zona - debe aplicarse el antisuero específico anti-fB humano.
- 2.- Se incuba el gel durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda horizontal.
- 3.- Se enjuaga posteriormente el gel con agua destilada y se cubre - completamente la superficie con papel Whatman, el cual ha sido - humedecido con agua destilada. Esto, se cubre ahora con apro- ximadamente 12 hojas de papel secante tipo toalla. Se coloca en cima una placa de plástico y un peso de aproximadamente 4 Kgs.
- 4.- Se remueve después de 10 min. y se quita el peso y el papel. Posteriormente el gel se enjuaga durante toda la noche en apro- ximadamente 1 litro de solución salina para remover restos de - proteínas inespecíficas.
- 5.- Enseguida, el gel se lava en agua destilada durante 20 min. Posteriormente se seca al aire, ya sea a temperatura ambiente o aplicando calor.
- 6.- Se tiñe la placa durante 10 min. con solución de Azul de Cooma sie (Sol. 19).

- 7.- Se destiñe la placa con la solución desteñidora hasta obtener el mejor contraste (Sol. 20).
- 8.- Se deja secar el exceso de metanol a temperatura ambiente.
- 9.- Se lee la placa.

Las variantes electroforéticas obtenidas se muestran en la figura 3. (Pag. 16).

TIPIFICACION DEL FACTOR C4 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (9, - 10, 32, 42, 52, 65).

El cuarto componente del sistema del complemento (C4) es controlado por dos loci cercanamente unidos entre sí y localizados entre los loci HLA-B y HLA-D/DR sobre el cromosoma 6 humano. La electrofóresis seguida de inmunoprecipitación y tinción de muestras de plasmas con EDTA, previamente tratados con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico, revela - que cada locus de C4 (C4A y C4B) es altamente polimórfico.

METODO

A) DESIALACION:

- 1) 10ul. de la muestra se mezclan con 2ul. de solución de neuraminidasa y se colocan en un sistema de diálisis contínuo durante - 18 horas a 4°C.

Solución de Neuraminidasa: 10ul. de Neuraminidas, más 0.20ml. de solución de EDTA 0.2M, pH 7.2.

B) PREPARACION DEL GEL DE CORRIMIENTO:

- 1) Se cubre una placa de vidrio de 26cm. x 12.5cm. con una solución de agarosa (Sea Kem) al 0.4% en agua destilada. Se deja secar.
- 2) Se forma un molde colocando encima de la placa anterior una segunda placa de plástico siliconizada y entre ellas un marco de plástico siliconizado de 1mm. de espesor (con sólo tres lados). Se mantienen juntas las placas mediante clips metálicos.
- 3) Se vierte la solución de agarosa de corrimiento para C4 (Sol.18), aún caliente, dentro del molde y se deja solidificar. Se sella perfectamente el molde con envoltura de plástico y se almacena en refrigeración hasta su uso.

C) COLOCACION DE LAS MUESTRAS:

- 1) Se reduce el exceso de agua del gel de corrimiento, colocando 2 veces sobre él una tira de unos 5 cm. de ancho de papel filtro Whatman No. 1.
- 2) Sobre la parte donde se ha quitado el exceso de agua, se coloca el aplicador plástico para muestras (MASK), de tal forma que las muestras queden a unos 2cm. del extremo final del gel.
- 3) Se colocan 7 a 10 ul. de muestras dializadas en cada ranura del aplicador.

- 4) Se coloca una muestra de HbS lenta al final y al principio del gel, como marcador visual.
- 5) Una vez que las muestras se han absorbido en el gel, retire el aplicador.

D) CORRIMIENTO ELECTROFORETICO:

- 1) Se coloca la placa con el gel en el equipo de electrofóresis, con las muestras en el lado del cátodo.
- 2) Se moja en conjunto 5 hojas de papel Whatman No. 1 (del tamaño de la placa de gel) en el amortiguador de corrimiento (Sol. 2) y se colocan en ambos extremos (ánodo y cátodo) de la placa de gel (2cm. antes del final).
- 3) Se cubre la placa para evitar desecamiento del gel y se ajusta la fuente de poder a una corriente constante de 65 mA (300-500 volts) y deje el corrimiento hasta que el marcador de Hb S ha alcanzado el extremo opuesto (4-5 hrs.).

E) INMUNOPRECIPITACION Y TINCION:

- 1) Se diluyen 0.4ml. de antisuero anti-C4 humano con 0.6ml. de solución salina.
- 2) Se distribuye la solución de antisuero en un área de unos 5cm. en el centro del gel.

- 3) Se incuba durante 1 hora en una cámara húmeda.
- 4) Se enjuaga cuidadosamente el gel bajo un chorro de agua corriente.
- 5) Se cubre el gel con una hoja de papel Whatman No. 1, humedecido con agua destilada, seguido de 10 hojas de papel absorbente tipo -- toalla y una placa de vidrio ó plástico. Se coloca encima un peso de 4 kgs. Se mantiene así durante 10 mins.
- 6) Se enjuaga el gel en solución salina durante toda la noche.
- 7) Se lava el gel en agua corriente durante 20 mins.
- 8) Se seca el gel.
- 9) Se tiñe el gel seco con solución de Azul de Coomasie 0.25% (Sol. 19).
- 10) Se destiñe hasta alcanzar un contraste óptimo (Sol. 20).

Los patrones de bandas obtenidos se observan en la Fig. 4 (Pág. 19).

TIPIFICACION DEL FACTOR C2 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (9,10, 32,42,52,65).

El polimorfismo del segundo componente del complemento puede ser detectado después del electroenfoque de muestras de plasma o suero en un gel de acrilamida seguido por la aplicación de un recubrimiento hemolítico funcional. La lisis por el complemento ocurre en el sitio que contiene eritrocitos de ---

carnero sensibilizados y todos los componentes del complemento, excepto C2; esa será la posición de C2 en el gel de electroenfoque.

METODO

A) PREPARACION DE LA SOLUCION DE ERITROCITOS DE CARNERO SENSIBILIZADOS.

- a) Se toman 20ml. de una suspensión de eritrocitos de carnero al 10%.
- b) Se lavan 4 veces con solución de VBS-EDTA 0.01 M (Sol. 6), a -- 2000 rpm. durante 10 mins.
- c) Se lavan 4 veces a 2000 rpm. durante 10 min. con solución de GVB²⁺ (agarosa-VBS²⁺) (Sol. 7).
- d) Se resuspende el paquete celular con GVB²⁺ (Sol. 7) (una parte de células a 10 partes con GBV²⁺).
- e) En una celda de espectrofotómetro se adicionan 0.1 ml. de la suspensión celular y 2.4 ml. de agua destilada (lisis celular).
- f) Se ajusta a cero con un blanco de agua destilada (2.5 ml.).
- g) Se lee la concentración de hemoglobina a una longitud de onda de -- 541 nm.
- h) Cuando la absorción es de 0.420, la concentración celular es de -- 1×10^9 células/ml. El rango de aceptación para la concentración es de 0.40 a 0.43 nm.

Para llegar a la concentración requerida se utiliza la siguiente fórmula:

Lectura obtenida x Volúmen total de la = Volúmen al que se debe
0.420 suspensión celular llegar para la concentra
ción deseada.

- i) Se incuba 15 min. a temperatura ambiente.
- j) Los eritrocitos sensibilizados se guardan a 4°C y pueden utilizarse en el trascurso de 2 semanas.

B) PREPARACION DEL GEL:

- 1) Se coloca sobre un vidrio de 20.5 cm. x 15 cm., un marco de plástico siliconizado de 1mm. de espesor y 0.5cm. de ancho. (El marco cubre 3 lados del vidrio). Encima de este último se coloca una placa de plástico siliconizado de las mismas dimensiones que el vidrio. Se mantienen las placas juntas con clips metálicos, de tal forma que se obtiene una cámara de 1mm. de espesor, con un extremo abierto.
- 2) Para hacer el gel se combina solución stock de acrilamida (Sol. 10), 26.5 ml. Anfolina, 1.5ml. solución de Riboflavina (Sol. 11), 7 ml.
- 3) Se vacía la mezcla con la ayuda de una pipeta de boca ancha y se deja polimerizar el gel bajo una lámpara de luz fluorescente durante una hora.

- 4) Para usarse, se separa cuidadosamente la placa de plástico silicónico y posteriormente el marco de plástico silicónico; el gel queda adherido a la placa de vidrio. El gel en su molde puede ser envuelto en plástico almacenado a 4°C. por varios días.

C) APLICACION DE LAS MUESTRAS:

- 1) Las tiras de papel cromatográfico Whatman 3MM. de 2cm. x 0.5cm. se colocan a 2cm. de distancia del final del gel, en el polo positivo y a través de todo el gel. La distancia entre cada tira de papel debe ser tal que permita colocar aproximadamente 20 tiras por gel.
- 2) Se pipetea 20 ul. de muestra sobre cada tira de papel.

D) CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS:

El aparato para electroenfoque se coloca en un cuarto frío a 4°C. o bien debe poseer un sistema de refrigeración.

- 1) Se coloca el electrodo positivo exactamente atrás de las muestras y el electrodo negativo aproximadamente 9cm. adelante de éstas. Debe tenerse cuidado que los electrodos estén en contacto con el gel.
- 2) Se ajusta la fuente de poder a 1.5 watts/gel, un voltaje máximo de 1000 y una corriente inicial de 6 mA/gel (media hora).

- 3) Se enfoca el gel durante 18 horas, o hasta que la corriente haya caído a 2 mA/gel.

E) ENSAYO HEMOLITICO FUNCIONAL:

- 1) Después del electroenfoque, se enjuaga el gel en una solución de yoduros (Sol. 12) durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 2) Se vacía la solución de yoduro y se enjuaga el gel durante 30 mins. a temperatura ambiente en 500ml. de la solución de --- VBS - Ca^{2+} , Mg^{2+} (Sol. 3).
- 3) Después de enjuagar la placa con el gel, se coloca un marco de 2mm. de espesor y un vidrio de 20.5cm. x 15cm. y se fija con clips.
- 4) Se hace la siguiente mezcla y vaciela en la cámara anterior:
Solución de VBS- Ca^{2+} Mg^{2+} (Sol. 3), 7.5 ml. Agarosa (Sea Kem ME:EEO) al 2% (60-70°C) 7.5 ml. , Solución de eritrocitos sensibilizados 0.75ml., suero humano deficiente en C2 (0.2ml.).
- 5) Se incuba el gel durante 1 hora a 4°C. y después a 37°C. (durante 2 a 4 horas) hasta que las bandas de lisis aparezcan.
- 6) Se separa cuidadosamente los vidrios que formaban la cámara - y se coloca el gel en un vidrio limpio.

- 7) Se obtiene solamente la capa de eritrocitos y se lava en una solución que contiene 300ml. de PBS y 3ml. de glutaraldehído. Se enjuaga durante 30 minutos. Se deja secar a temperatura ambiente.

Los patrones obtenidos pueden verse en la Fig. 2 (Pág. 15).

TIPIFICACION DE LA ENZIMA ERITROCITICA GLIOXALASA (GLO I).

Glioxalasa (GLO I) es una enzima eritrocítica que cataliza la conversión de metilglioxal y glutatión a S-lactoil glutatión; el polimorfismo de esta enzima se puede observar por medio de electrofóresis del lisado de glóbulos rojos y posterior tinción con metilglioxal más glutatión.

METODO

A) OBTENCION DEL LISADO DE GLOBULOS ROJOS (GR).

- 1) Se toman 10ml. de sangre venosa con Na_2EDTA como anticoagulante.
- 2) Se centrifuga a 2000 rpm durante 10min. y se separa el plasma (para la tipificación de fB, C2 y C4).
- 3) Se lava el paquete de GR 3 veces con solución salina.
- 4) Se adiciona agua destilada y tolueno en una cantidad equivalente a la mitad y a la cuarta parte del volúmen de GR respectivamente. Se agita en un vortex durante no menos de 30 seg.
- 5) Se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm.

- 6) Se obtiene el lisado de GR ayudándose con una pipeta Pasteur. El lisado se puede almacenar a -70°C . hasta su tipificación.

B) APLICACION DE LAS MUESTRAS:

- 1) Se enjuaga con agua destilada, durante 10 min. la hoja de acetato de celulosa.
- 2) Se saca del agua y se seca con hojas de papel secante tipo toalla.
- 3) Se enjuaga nuevamente la hoja de acetato de celulosa durante 5 mins. en 500 ml. de solución amortiguadora de corrimiento (Sol. 4).
- 4) Se seca nuevamente con hojas de papel secante tipo toalla.
- 5) Se coloca la hoja de acetato de celulosa en el equipo de electroforesis y se conecta la fuente durante 10 min. a 300 v. y 10 mA. Los compartimientos de la cámara deben llenarse con 500 ml. de buffer de corrimiento (Sol. 4).
- 6) Se aplican tres microlitros del lisado de GR en la hoja de acetato de celulosa con una separación de 0.5 cm. entre cada muestra, - de tal forma que las muestras quedan en el extremo catódico.

C) ELECTROFORESIS:

- 1) Se corren las muestras a 300 V. durante 2 horas a temperatura ambiente. La electrofóresis se completa cuando la hemoglobina - ha migrado aproximadamente 3cm. del origen.
- 2) Se corta la hoja de acetato de celulosa a nivel del puente anódico y en el extremo catódico justo atrás de la hemoglobina.

D) TINCION:

- 1) Se tiñe la hoja de acetato de celulosa sobre una placa de vidrio, colocando la porción absorbente hacia abajo sobre la tinción número 1, durante dos mins. (Sol. 16).
- 2) Se transfiere la hoja de acetato de celulosa a la tinción número 2 y se mantiene en ella durante 2 mins. (Sol. 17).
- 3) Se coloca la hoja de acetato en una cámara húmeda con el lado teñido hacia arriba. Se mantiene la cámara húmeda en la oscuridad y se lee después de 30 mins.

Los patrones de bandas obtenidos se observan en la Fig. 5 (Pág.22).

2) ANALISIS ESTADISTICO.

La comparación entre dos grupos de estudio en función a dos características independientes, se efectúa generalmente mediante tablas de contingencia de 2 X 2 (67).

		Grupo A	Grupo B	
Característica	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
		a+c	b+d	N=a+b+c+d

Para conocer la probabilidad de que ambos grupos difieren uno del otro en forma significativa, y que su variación no haya sido sólo debido al azar, la tabla de 2 X 2 se evalúa mediante la prueba estadística χ^2 (ji-cuadrada) (65,67).

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

Si el valor obtenido de la prueba χ^2 , implica un valor de "p" menor a 0.05, la hipótesis nula que dió origen a la comparación se rechaza. Un valor de "p" menor a 0.05 significa que en menos de 1 en 20 casos se comete error al rechazar la hipótesis nula.

El valor de "p" se obtiene al interpolar en tablas de distribución ji-cuadrada el valor numérico de χ^2 en función de los grados de libertad de la prueba. Para todas las tablas de contingencia 2X2 se considera un grado de libertad.

Si a, b, c ó d (celdas) fueran menores a 5, la prueba χ^2 deja de tener validez y debemos utilizar entonces la prueba exacta de Fisher.

$$f = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a! b! c! d! N!}$$

El valor obtenido con esta fórmula es el correspondiente a "p".

Cuando a , b , c ó d son diferentes de cero, efectuamos para la tabla de 2×2 original un primer cálculo de p (p_1). A continuación efectuamos nuevamente el cálculo disminuyendo en una unidad el valor numérico de la celda más cercana a cero (p_2) y así sucesivamente hasta alcanzar el valor de cero para esa celda. Cada valor de p obtenido, debe sumarse para obtener el valor total de p . Debe tenerse en cuenta que la suma de individuos por grupo o característica no debe alterarse, es decir, si por ejemplo, la celda a se disminuye en una unidad (por ser la más cercana a cero), la celda b deberá aumentarse en una unidad, la celda d disminuirse en una unidad y la celda c aumentarse en una unidad. De esta forma $(a+b)$, $(c+d)$, $(a+c)$, $(b+d)$ y por consecuencia N no alterarán su valor.

Si alguna característica se presenta significativamente incrementada o disminuida en alguno de los grupos de estudio, el riesgo relativo (RR) de esa característica puede calcularse tomando como base los datos de la tabla de contingencia 2×2 (65).

Ejemplificando en nuestro caso con un grupo de enfermos con LEG y un grupo de control, donde se analiza la asociación con un marcador del MHC.

		LEG	Control	
Marcador	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
		a+c	b+d	N=a+b+c+d

$$RR = \frac{(\text{Ind. enfermos con el marcador}) (\text{Ind. sanos sin el marcador})}{(\text{Ind. sanos con el marcador}) (\text{Ind. enfermos sin el marcador})}$$

$$RR = \frac{(a) (d)}{(b) (c)} \quad (\text{según el orden de las celdas en la tabla de contingencia } 2 \times 2)$$

Si a, b, c ó d fueran igual a cero, tendríamos que utilizar una derivación de esta fórmula (65):

$$RR = \frac{(a+0.5) (d+0.5)}{(b+0.5) (c+0.5)}$$

El riesgo relativo indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos portadores del marcador respecto de los que carecen de éste. Cuando el marcador es más frecuente en los pacientes que en los individuos sanos, el RR es mayor a la unidad e indica un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad, en tanto que si la frecuencia de un marcador disminuye en un grupo de pacientes, el riesgo relativo (RR) es menor a la unidad, o sea que el riesgo de padecer la enfermedad decrece. Cuando no hay diferencias entre enfermos y sanos, el riesgo es igual a la unidad (61).

El RR debe apoyarse en el hecho de que las diferencias estadísticas observadas en los grupos de estudio sean significativas. El riesgo relativo puede llegar a estar elevado pero no ser significativo (cuando el número de pacientes y/o controles es bajo) y a la inversa, un riesgo que difiere sólo ligeramente de la unidad puede ser altamente significativo desde el punto de vista estadístico cuando se han estudiado un gran número de individuos.

La desviación del RR de la unidad puede decir algo acerca del significado biológico de la asociación; cuanto más se desvía, mayor es su importancia (61, 65, 67).

R E S U L T A D O S

Se identificaron las variables fenotípicas (alotipos) de los genes que codifican para las proteínas de los factores del complemento fB, C2, C4A y C4B (complotipos) y del gen de la enzima eritrocítica Glóxalasa I (Glo I), en cada uno de los 229 individuos comprendidos en el estudio. Además, fué posible establecer perfectamente los cuatro haplotipos (complotipos más la variable fenotípica de Glo I) de las cincuenta familias analizadas, y conocer asimismo la forma en que segregan en el caso índice y sus hermanos (Tabla 8).

Todas las familias incluídas tienen por lo menos un miembro enfermo (caso índice) y siete de ellas presentan más de un miembro afectado por LEG); éstas son las primeras siete familias en la Tabla 8. Absolutamente todos los enfermos fueron mujeres: 50 casos índice y 11 hermanos de éstos.

SEGREGACION DE HAPLOTIPOS

Como ya se anotó anteriormente, esperamos que el 50%, 25% y 25% de los hermanos del caso índice compartan con éste 1, 2 ó 0 haplotipos respectivamente. El análisis de esta hipótesis nula no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los resultados observados y los esperados (Tabla 9), lo que indica que se han segregado aleatoriamente, de acuerdo a las leyes Mendelianas.

Sin embargo, de las 11 mujeres enfermas hermanas de los casos índice, 6 (55%) comparten ambos haplotipos con éstos, 4(36%) comparten sólo uno y 1(9%) no comparte ningún haplotipo con el caso índice.

Esto contrasta con el grupo de mujeres sanas, ya que aquí solamente 8 comparten ambos haplotipos con el caso índice (11%), mientras que los que comparten uno ó ninguno son 46 (61%) y 21 (28%) mujeres respectivamente (Tabla 10).

El análisis estadístico de los datos anteriores indica que aunque los haplotipos segregan en las familias de acuerdo a las leyes Mendelianas de la herencia, las mujeres sanas comparten preferentemente uno ó ningún haplotipo con el caso índice, pero rara vez ambos (diferencia estadísticamente significativa). Así, el riesgo relativo (RR) de que una mujer hermana de una enferma con LEG padezca la enfermedad, si comparte ambos haplotipos es de 10.52 ($p < 0.005$).

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS, COMPLITIPOS Y ALOTIPOS EN EL GRUPO DE ESTUDIO.

FRECUENCIA DE COMPLITIPOS:

De los 200 cromosomas obtenidos en las cincuenta familias, se identificaron 23 diferentes complotipos, 14 de ellos con una frecuencia mayor ó igual al 1%. La Tabla 11 los registra indicando además su frecuencia fenotípica en mujeres sanas, mujeres enfermas y su frecuencia fenotípica en hombres.

Seis diferentes complotipos aparecen sólo en mujeres sanas, mientras que cuatro complotipos también diferentes entre sí aparecen sólo en enfermas, indicados por uno o dos asteriscos respectivamente en la Tabla 11.

TABLA 8.- ARBOL GENALOGICO DE CADA UNA DE LAS FAMILIAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

FAM.	M.	H.	H A P L O T I P O S		M U J E R E S						H O M B R E S		
			Caso Índice	Otros	Sanas			Enfermas			Sanos		
					0	1	2	0	1	2	0	1	2
1	4	2	a) SC42-2 c) SC01-2	b) SC31-1 d) SC30-2	-	1 bc	-	-	-	2 ac	-	2 bc	-
2	3	3	a) SC31-2 b) SC01-2	c) SC31-2 d) SC31-2	-	-	-	-	2 bc	-	-	2 bc	1 ab
3	3	0	c) FC30-1 a) SC01-1	b) SC02-1 d) SC71-1	1 bd	-	-	-	-	1 ac	-	-	-
8	2	1	a) FC30-2 d) SC31-2	c) SC02-1 b) SC31-2	-	-	-	-	-	1 ad	-	1 dc	-
11	4	4	c) SC01-1 a) SC31-1	b) FC31-2 d) SC31-2	-	1 bc	-	-	1 bc	1 ac	3 bd	-	1 ac
16	4	4	a) SC30-2 c) FC31-2	b) SC31-2 d) SC31-1	1 bd	-	-	1 bd	1 ad	-	1 bd	3 bc	-
94	4	6	a) SC42-2 c) FC31-2	b) SC31-2 d) SC31-2	1 bd	1 ad	-	-	-	1 ac	1 bd	3 2bc 1ad	2 ac
T O T A L:					1	4	6						

Para la construcción del árbol genealógico familiar se considera arbitrariamente a y b como los haplotipos heredados del padre y c y d como los haplotipos heredados de la madre.

CONTINUA TABLA 8.-

FAM.	M	H	H A P L O T I P O S		S A N O S			S			
			Caso	Índice	Otros	Mujeres			Hombres		
						0	1	2	0	1	2
9	5	4	a) SC01-2 c) SC31-2	b) SC42-2 d) FC31-1	-	4 3ad 1bc	-	1 bd	3 2bc 1ad	-	
18	2	3	a) SC01-2 c) SC42-2	b) SC42-2 d) SC31-2	-	1 bc	-	-	1 bc	2 ac	
21	3	0	a) SC01-1 c) SC31-2	b) SC31-2 d) S1C11-1	1 bd	1 ad	-	-	-	-	
23	2	3	a) SC31-1 c) SC31-2	b) SC31-2 d) SC40-2	-	1 ad	-	1 bd	2 ad	-	
26	4	0	a) SC01-1 c) SC31-2	b) SC42-2 d) SC31-1	2 bd	1 bc	-	-	-	-	
27	2	2	a) SC31-2 c) SC30-2	b) SC21-2 d) SC31-2	-	1 ad	-	2 bd	-	-	
36	3	1	a) SC30-2 c) SC31-2	b) FC30-2 d) SC31-1	-	2 bc	-	1 bd	-	-	
39	2	3	a) SC01-2 c) FC31-2	b) SC31-2 d) SC21-2	1 bd	-	-	1 bd	2 bc	-	
43	5	4	a) SC30-2 c) FC01-2	b) SC31-2 d) FC31-2	2 bd	2 bc	-	1 bd	3 2ad 1bc	-	
52	2	1	a) SC31-2 c) SC01-1	b) SC02-2 d) SC42-2	1 bd	-	-	-	1 ad	-	
56	1	1	a) SC31-2 c) SC42-2	b) SC42-2 d) SC31-2	-	-	-	-	1 bc	-	
58	2	2	a) SC32-1 d) SC31-1	c) SC42-2 b) SC31-2	-	1 ac	-	-	1 ac	1 ad	
69	4	0	a) FC31-1 c) SC31-2	b) SC01-2 d) SC31-2	-	2 ad	1 ac	-	-	-	
81	1	2	a) SC21-2 c) SC31-2	b) SC01-2 d) SC01-2	-	-	-	-	1 bc	1 ac	
82	2	1	a) SC31-2 c) SC31-2	b) SC42-2 d) SC01-1	-	1 ad	-	-	1 bc	-	

CONTINUA TABLA 8.-

FAM.	M	H	H A P L O T I P O S		S A N O S			M u j e r e s			H o m b r e s		
			Caso	Índice	Otros	0	1	2	0	1	2	0	1
83	6	5	a) FC30-2 c) SC31-1	b) FC31-2 d) FC31-1	2 bd	2 ad	1 ac	-	2 ad	3 ac			
85	3	3	a) SC33-2 c) SC31-1	b) SC42-2 d) SC42-2	2 bd	-	-	-	3 bc				
86	3	0	a) SC31-1 c) SC31-2	b) SC42-2 d) SC01-1	-	2 1bc 1ab	-	-	-	-			
87	2	1	a) SC30-2 c) SC31-2	b) SC01-2 d) SC31-2	-	1 ad	-	1 bd	-	-			
88	3	3	a) SC30-1 c) SC31-1	b) SC31-2 d) SC31-1	-	2 1ad 1bc	-	1 bd	1 ad	1 ac			
90	2	3	a) SC31-2 c) SC31-2	b) SC31-2 d) SC31-1	-	1 bc	-	-	3 2ad 1bc				
92	4	1	a) FC31-2 c) FC31-2	b) SC42-2 d) SC31-1	2 bd	1 bc	-	1 bd	-	-			
93	5	2	a) SC61-2 c) SC21-2	b) SC31-1 d) SC03-1	2 bd	1 bc	1 ac	-	2 1bc 1ad				
95	2	1	a) SC01-2 d) FC31-1	c) SC01-2 b) SC31-2	-	-	1 ad	-	-	1 ad			
96	4	3	a) F1C30-2 c) SC20-2	b) FC31-2 d) SC2.21-1	1 bd	1 ad	1 ac	-	3 bd				
98	1	3	a) SC51-1 c) SC31-2	b) SC31-1 d) SC31-1	-	-	-	-	3 2ad 1bc				
99	2	0	a) SC42-1 c) FC31-2	b) SC31-2 d) SC31-2	-	-	1 ac	-	-	-			
100	3	0	a) SC32-2 c) SC31-1	b) SC01-1 d) SC31-1	1 bd	1 ad	-	-	-	-			

CONTINUA TABLA 8.-

FAM.	M	H	H A P L O T I P O S		S A N O S			Hombres		
			Caso Índice	Otros	Mujeres	0	1	2	0	1
102	3	0	a) SC31-1 d) SC41-2	c) SC42-2 b) SC31-2	-	2	-	-	-	-
						ac				
104	2	2	a) SC31-2 c) SC20-2	b) SC01-1 d) SC31-2	1	-	-	1	1	-
					bd			bd	bc	
105	2	1	a) SC31-2 c) SC31-2	b) SC01-2 d) SC30-2	-	-	1	1	-	-
							ac	bd		
106	3	2	a) SC31-2 c) SC31-2	b) SC21-2 d) F1C30-2	-	1	1	-	1	1
						bc	ac		ad	ac
107	2	3	a) FC31-2 c) SC31-2	b) FC01-1 d) SC42-2	-	1	-	1	1	1
						ad		ad	bc	ac
108	1	1	a) SC30-1 c) SC31-1	b) SC31-1 d) SC31-1	-	-	-	1	-	-
								bd		
110	5	1	a) FC31-2 c) SC31-2	b) FC01-2 d) SC30-1	-	4	-	-	1	-
						3ad			bc	
						1bc				
112	2	1	a) SC31-1 c) SC04-1	b) SC42-2 d) SC42-2	-	1	-	-	1	-
						ad			bc	
114	1	2	a) FC01-2 c) SC33-2	b) SC31-2 d) FC30-2	-	-	-	1	1	-
								bd	bc	
118	2	0	a) FC31-2 c) S1C21-2	b) SC31-1 d) FC30-1	-	1	-	-	-	-
						bc				
119	1	1	a) SC31-2 c) SC31-2	b) SC30-1 d) SC31-1	-	-	-	-	1	-
									ad	
120	2	0	a) SC31-2 c) SC31-2	b) FC01-1 d) SC31-2	-	1	-	-	-	-
						bc				
121	1	2	a) SC01-2 c) SC31-2	b) SC31-1 d) SC61-2	-	-	-	-	1	1
									bc	ac
124	3	0	a) SC31-1 c) SC31-2	b) SC01-1 d) SC42-2	-	2	-	-	-	-
						1bc				
						1ad				
142	2	5	a) SC31-2 c) SC31-2	b) FC01-1 d) SC30-1	-	1	-	-	4	1
						bc			2ad	ac
									2bc	
TOTAL	136	93	50		21	46	8	20	56	17

**TABLA 9.- FORMA EN QUE SON COMPARTIDOS LOS HAPLOTIPOS
ENTRE EL CASO INDICE Y SUS HERMANOS.**

HAPLOTIPOS COMPARTIDOS OBSERVADOS	MUJERES (n=86)			HOMBRES (n=93)		
	0	1	2	0	1	2
ESPERADOS	22(26%)	50(58%)	14(16%)	20(22%)	56(60%)	17(18%)
	22(25%)	42(50%)	22(25%)	23(25%)	47(50%)	23(25%)

	MUJERES		
	2	0, 1	
OBS.	14	72	86
ESP.	22	64	86
	36	136	172

$$\chi^2 = 1.72$$

No significativa

	HOMBRES		
	2	0, 1	
OBS.	17	76	93
ESP.	23	70	93
	40	146	186

$$\chi^2 = 0.80$$

No significativa

TABLA 10.- FORMA EN QUE SE COMPARTEN LOS HAPLOTIPOS. ENTRE LOS CASOS INDICE Y SUS HERMANAS SANAS Y ENFERMAS.

HAPLOTIPOS	MUJERES (n = 86)		
	0	1	2
COMPARTIDOS			
SANAS	21 (24%)	46 (54%)	8 (9%)
ENFERMAS (LEG)	1 (1%)	4 (5%)	6 (7%)

	HAP. COMP.			
	2	0, 1		
LEG	6	5	11	$x^2 = 10.52$
SANAS	8	67	75	$p < 0.005$
	14	72	86	$RR = 10.05$

A excepción de dos de ellos, todos estos últimos complotipos tienen frecuencias genotípicas menores al uno por ciento.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre mujeres sanas y enfermas para los complotipos SC42 y SC01. SC42 se encuentra disminuido en el grupo de mujeres enfermas, mientras que SC01 se encuentra aumentado en este mismo grupo, con riesgos relativos de 0.37 para SC42 y 2.33 para SC01, ($p < 0.05$ para ambos), (Tabla 12).

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS:

Al analizar los complotipos junto con el alelo del gen de *Glo 1* con el que segregaron, obtenemos 32 haplotipos diferentes y su análisis muestra diferencias con respecto al de complotipos. En este caso 18 haplotipos tienen una frecuencia genotípica mayor o igual al 1% y 14 haplotipos menor al 1% (Tabla 13a y 13b).

El haplotipo SC42 con el alelo 2 de *Glo 1*, muestra en este análisis diferencias estadísticamente significativas entre mujeres sanas y enfermas y además, a excepción de dos mujeres, todas las mujeres y hombres con el complotipo SC42, son la excepción es una mujer sana y una enferma (hermanas) cuyo fenotipo es SC42-1.

Por otro lado, SC42-2, al igual que FC31-1, se encuentran disminuidos en las mujeres enfermas en relación a su frecuencia en mujeres sanas (0.06 - vs. 0.15, y 0.02 vs. 0.07, respectivamente).

TABLA 11.- FRECUENCIA DE COMLOTIPOS EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS

Comlotipo	MUJERES		Hombres	Genot.	FRECUENCIA			RR (p <)
	Sanas	LEG			MUJERES		Hombres	
					Sanas ****	Enfer. ****		
1.- SC31	56	53	84	0.44	0.37	0.43	0.45	
2.- SC01	11	19	15	0.12	0.07	0.16	0.08	2.33 (0.05)
3.- SC42	24	8	21	0.10	0.16	0.07	0.11	0.37 (0.05)
4.- FC31	23	13	24	0.08	0.15	0.11	0.13	
5.- SC30	5	8	7	0.06	0.03	0.07	0.04	
6.- FC01	5	2	6	0.03	0.03	0.02	0.03	
7.- FC30	5	5	7	0.03	0.03	0.04	0.04	
8.- SC21	4	2	5	0.02	0.03	0.02	0.03	
9.- SC02*	2	0	1	0.02	0.01	----	0.01	
10.- SC33**	0	2	1	0.01	----	0.02	0.01	
11.- SC61	1	1	1	0.01	0.01	0.01	0.01	
12.- F1C30	2	1	1	0.01	0.01	0.01	0.01	
13.- SC20	1	2	4	0.01	0.01	0.02	0.02	
14.- SC32	2	2	2	0.01	0.01	0.02	0.01	

* Comlotipos que aparecen sólo en mujeres sanas.

** Comlotipos que aparecen sólo en mujeres enfermas.

*** El riesgo relativo (RR) sólo se indica en aquéllos casos en que existe diferencia significativa entre la frecuencia del comlotipo en mujeres sanas y su frecuencia en mujeres enfermas.

**** Frecuencia fenotípica.

CONTINUA TABLA 11.- FRECUENCIA DE COMLOTIPOS EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

Comlotipo	MUJERES		Hombres	FRECUENCIA				*** RR (p <)
	Sanas	LEG		Genot. ****	Sanas ****	Enfer. ****	Hombres ****	
15.- S1C11*	2	0	0	0.005	0.01	----	----	
16.- SC40 *	1	0	3	0.005	0.01	----	0.02	
17.- SC03 *	2	0	1	0.005	0.01	----	0.01	
18.- SC51 **	0	1	2	0.005	----	0.01	0.01	
19.- SC41 **	0	1	0	0.005	----	0.01	----	
20.- SC71 *	1	0	0	0.005	0.01	----	----	
21.- SC2.21*	2	0	0	0.005	0.01	----	----	
22.- SC04 **	0	1	1	0.005	----	0.01	0.01	
23.- S1C21	1	1	0	0.005	0.01	0.01	----	

* Comlotipos que aparecen sólo en mujeres sanas.

** Comlotipos que aparecen sólo en mujeres enfermas.

*** El riesgo relativo (RR) sólo se indica en aquéllos casos en que existe diferencia significativa entre la frecuencia del comlotipo en mujeres sanas y su frecuencia en mujeres enfermas.

**** Frecuencia fenotípica.

TABLA 12.- COMPLITIPOS QUE MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE MUJERES SANAS Y ENFERMAS.

	SC42	Otros	
LEG	8	114	122
SANAS	24	126	150
	32	240	272

$$x^2 = 4.9$$

$$p < 0.05$$

$$RR = 0.37$$

	SC01	Otros	
LEG	19	103	122
SANAS	11	139	150
	30	242	272

$$x^2 = 3.85$$

$$p < 0.05$$

$$RR = 2.33$$

TABLA 13a.- FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS

Haplotipo	MUJERES		Hombres	Genot.	FRECUENCIA			*** RR (p <)
	Sanas	LEG			MUJERES		Hombres	
					Sanas ****	Enferm. *****		
1.- SC31-2	35	38	56	0.30	0.23	0.31	0.30	
2.- SC31-1	21	15	28	0.14	0.14	0.12	0.15	
3.- SC42-2	23	7	21	0.10	0.15	0.06	0.11	0.35
4.- SC01-2	5	11	12	0.06	0.03	0.09	0.06	(0.05)
5.- FC31-2	12	11	19	0.06	0.08	0.09	0.10	
6.- SC01-1	6	8	3	0.05	0.04	0.07	0.02	
7.- SC30-2	1	6	3	0.04	0.01	0.05	0.02	7.71
8.- FC01-1 *	2	0	4	0.02	0.01	----	0.02	(0.05)
9.- FC30-2	3	3	6	0.02	0.02	0.02	0.03	
10.- FC31-1	11	2	5	0.02	0.07	0.02	0.03	0.21
11.- SC21-2	4	2	5	0.02	0.03	0.02	0.03	(0.025)
12.- SC30-1	4	2	4	0.02	0.03	0.02	0.02	
13.- FC30-1	2	2	1	0.02	0.01	0.02	0.01	
14.- FC01-2	3	2	2	0.01	0.02	0.02	0.01	
15.- SC33-2 **	0	2	1	0.01	----	0.02	0.01	
16.- SC61-2	1	1	1	0.01	0.01	0.01	0.01	
17.- F1C30-2	2	1	1	0.01	0.01	0.01	0.01	
18.- SC20-2	1	2	4	0.01	0.01	0.02	0.02	

* Ha plotipos que aparecen sólo en mujeres sanas.

** Ha plotipos que aparecen sólo en mujeres enfermas.

*** El riesgo relativo (RR) sólo se indica en aquéllos casos en que existe diferencia significativa entre la frecuencia del haplotipo en mujeres sanas y su frecuencia en mujeres enfermas.

**** Frecuencia fenotípica.

TABLA 13b.- FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS

Haplótipo	MUJERES		Hombres	Genot.	FRECUENCIA			RR (p<)
	Sanas	LEG			MUJERES		Hombres	
					Sanas ****	Enfer. ****	****	
19.- SC32-1	1	1	2	0.005	0.01	0.01	0.01	
20.- SC02-1	1	0	1	0.005	0.01	----	0.01	
21.- S1C11-1 *	2	0	0	0.005	0.01	----	----	
22.- SC40-2 *	1	0	3	0.005	0.01	----	0.02	
23.- SC02-2 *	1	0	0	0.005	0.01	----	----	
24.- SC03-1	2	0	1	0.005	0.01	----	0.01	
25.- SC51-1 **	0	1	2	0.005	----	0.01	0.01	
26.- SC42-1	1	1	0	0.005	0.01	0.01	----	
27.- SC32-2	1	1	0	0.005	0.01	0.01	----	
28.- SC41-2 **	0	1	0	0.005	----	0.01	0.01	
29.- SC71-1 *	1	0	0	0.005	0.01	----	----	
30.- SC2.21-1*	2	0	0	0.005	0.01	----	----	
31.- SC04-1 **	0	1	1	0.005	----	0.01	0.01	
32.- S1C21-2	1	1	0	0.005	0.01	----	----	

* Haplotipos que aparecen sólo en mujeres sanas.

** Haplotipos que aparecen sólo en mujeres enfermas.

*** El riesgo relativo (RR) sólo se indica en aquéllos casos en que existe diferencia significativa entre la frecuencia del haplotipo en mujeres sanas y su frecuencia en mujeres enfermas.

**** Frecuencia fenotípica.

De forma diferente, SC30-2 tiene una frecuencia mayor en mujeres enfermas que en mujeres sanas, 0.05 vs. 0.01.

Los riesgos relativos para los anteriores haplotipos son: SC42-2, 0.35, ---- ($p < 0.05$); FC31-1, 0.21 ($p = 0.025$) y SC30-2, 7.71 ($p = 0.033$) (Tabla 14).

El haplotipo SC01-2 tiene el doble de frecuencia en mujeres enfermas que en las mujeres sanas (0.09 vs. 0.04), no obstante, la diferencia de este haplotipo en estos grupos no es estadísticamente significativa.

FRECUENCIA DE ALOTIPOS

El análisis de la frecuencia fenotípica en mujeres sanas, mujeres enfermas y hombres, para los alotipos de los factores del complemento (fB, -- C2, C4A y C4B) y los dos alotipos para el gen de Glo I se muestra en la Tabla 15.

No existen diferencias significativas en las frecuencias fenotípicas observadas para los alotipos del gen de Glo I y factor B entre estos grupos.

La situación para los alotipos de los genes que codifican las proteínas de C4 es diferente. La variable fenotípica C4A-4 está significativamente disminuida en mujeres enfermas respecto a las sanas (0.07 vs. 0.16), de igual forma que la variable fenotípica C4B-2 (0.08 vs. 0.17), con riesgos relativos de 0.42 ($p < 0.05$) y 0.43 ($p < 0.05$) respectivamente. (Tabla 16).

TABLA 14.- HAPLOTIPOS QUE MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
ENTRE MUJERES SANAS Y ENFERMAS.

	SC42-2	Otros	
LEG	7	115	122
SANAS	22	128	150
	29	243	272

$$\begin{aligned} \chi^2 &= 4.73 \\ p &< 0.05 \\ RR &= 0.35 \end{aligned}$$

	FC31-1	Otros	
LEG	2	120	122
SANAS	11	139	150
	13	259	272

$$\begin{aligned} f_1 &= 0.021 \\ f_2 &= 0.004 \\ f_3 &= 0.003 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} p &= 0.025 \\ RR &= 0.21 \end{aligned}$$

	SC30-2	Otros	
LEG	6	116	122
SANAS	1	149	150
	7	265	272

$$\begin{aligned} f_1 &= 0.03 \\ f_2 &= 0.003 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} p &= 0.033 \\ RR &= 7.71 \end{aligned}$$

TABLA 15.- FRECUENCIA DE ALOTIPOS DEL COMPLEMENTO Y DE GLO I
EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

Alelo	MUJERES		Hombres	FRECUENCIA FENOTIPICA			RR (p<)
	Sanas	LEG		MUJERES		Hombres	
				Sanas	Enfer.		
fB							
S	112	100	148	0.75	0.82	0.80	
F	33	20	37	0.22	0.16	0.20	
SI	3	1	0	0.02	0.01	----	
FI	2	1	1	0.01	0.01	0.01	
Glo I							
1	55	33	52	0.37	0.27	0.28	
2	95	89	134	0.63	0.73	0.72	

CONTINUA TABLA 15.-

Alelo	MUJERES		Hombres	FRECUENCIA FENOTIPICA			* RR (p<)
	Sanas	LEG		MUJERES		Hombres	
				Sanas	Enfer.		
C4A							
0	20	22	25	0.13	0.18	0.13	
1	2	0	0	0.01	----	----	
2	6	5	9	0.04	0.04	0.05	
2.2	2	0	0	0.01	----	----	
3	94	84	126	0.63	0.69	0.68	
4	24	9	23	0.16	0.07	0.12	0.42 (0.05)
5	0	1	2	----	0.01	0.01	
6	1	1	1	0.01	0.01	0.01	
7	1	0	0	0.01	----	----	
C4B							
0	14	16	22	0.09	0.13	0.12	
1	108	93	138	0.72	0.76	0.74	
2	26	10	23	0.17	0.08	0.12	0.43 (0.05)
3	2	2	2	0.01	0.02	0.01	
4	0	1	1	----	0.01	0.01	

* El riesgo relativo (RR) sólo se indica en aquellos casos en que existe diferencia significativa entre la frecuencia del alotipo en mujeres sanas y su frecuencia en mujeres enfermas.

TABLA 16.- ALOTIPOS DEL COMPLEMENTO CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE MUJERES SANAS Y ENFERMAS.

	C4A-4	Otros	
LEG	9	113	122
SANAS	24	126	150
	33	239	272

$$\chi^2 = 3.92$$

$$p < 0.05$$

$$RR = 0.42$$

	C4B-2	Otros	
LEG	10	112	122
SANAS	26	124	150
	36	236	272

$$\chi^2 = 4.13$$

$$p < 0.05$$

$$RR = 0.43$$

COMBINACIONES DE PARES DE HAPLOTIPOS.

En la tabla 17 se registran las combinaciones de los diferentes haplotipos como se obtienen de la información familiar presentada en la Tabla 8.

Existe una gran heterogeneidad en la distribución de las mujeres enfermas a través de las diversas combinaciones de los haplotipos. Sin embargo, - resaltan algunas de estas combinaciones.

Como ya se observó en la Tabla 13a, 6 de las 7 mujeres que portan el haplotipo SC30-2, se encuentran enfermas con LEG y provienen de 5 familias no emparentadas entre sí (fam. 16,27,36,43 y 87). La familia 16 tiene otro miembro afectado con LEG que comparte solamente el haplotipo SC30-2 con el caso índice.

SC30-2 se combina con cinco diferentes haplotipos encontrándose que 4 de las 7 mujeres (3 enfermas) con este marcador, tienen la combinación SC30-2/SC31-2. La mujer sana (fam. 87), tiene los haplotipos SC30-2/SC31-2, el caso índice de esta familia es SC30-2/SC31-2, pero el haplotipo SC31-2 no ha sido heredado del mismo progenitor. Las demás combinaciones para este haplotipo sólo presentan una mujer enferma (SC31-1, FC31-2 y FC01-2).

El haplotipo SC01-2 se combina con 6 diferentes haplotipos. Cuando se ha heredado en combinación con los haplotipos SC42-2 (fams. 1 y 18), SC31-2 (fams. 2,9 y 121), todas las mujeres presentes en estas combinaciones están enfermas con LEG (4 y 5 mujeres respectivamente).

La familia 1 con la combinación SC01-2/SC42-2 tiene 2 miembros enfermos con LEG, además del caso índice y que comparten ambos complotipos con este último.

En la combinación SC01-2/SC31-2, la familia 2 también presenta dos miembros enfermos además del caso índice, compartiendo en este caso sólo el haplotipo SC01-2.

Contrastantemente, la combinación con FC31-1 muestra 4 individuos sanos y sólo un enfermo (todas mujeres). Una de las mujeres sanas comparte ambos haplotipos con el caso índice y ambos son miembros de la misma fa familia.

Por otro lado, el haplotipo SC01-1 muestra a su vez combinaciones donde aparecen mujeres enfermas, aunque en menor número que SC01-2. SC01-1/SC31-1 tiene 2 mujeres enfermas y una sana; las mujeres enfermas son el caso índice de una familia y su hermana, con quien comparte ambos haplotipos. La combinación con SC31-2 muestra 3 mujeres con LEG y 3 sanas, pertenecientes todas a diferentes familias. Cuando SC01-1 se combina -- con FC30-1 las dos mujeres observadas tienen LEG (ambas son hermanas y comparten ambos haplotipos). La combinación SC01-1/FC31-2 tiene una mujer sana y una enferma.

El haplotipo con mayor frecuencia en el grupo de estudio es SC31-2 y es asimismo el que muestra un mayor número de combinaciones diferentes. Dos de las combinaciones relevantes han sido ya analizadas. De las 12 mujeres homocigotas para este haplotipo, 7 están enfermas con LEG, pertene-

cientes a siete diferentes familias (82,90,105,106,119,120 y 142). De las cinco mujeres sanas, 2 comparten ambos complotipos con el caso índice y ambas son de diferentes familias (38 y 39).

Otras combinaciones de haplotipos en homocigocia se dan para FC31-2 -- (una mujer enferma y ninguna sana) y para SC31-1 (un hombre y ninguna mujer). Interesantemente la combinación SC42-2/SC42-2 presenta sólo mujeres sanas (tres).

La combinación SC31-1/SC31-2 muestra una relación de cuatro mujeres enfermas y dos sanas. Las mujeres enfermas pertenecen a las familias 16,23,25,86 y 124; una de las enfermas proviene de una familia con más de una enferma (fam. 16), sin embargo, es el único caso en el cual la enferma no comparte ningún haplotipo con el caso índice (el fenotipo del caso índice es SC30-2/FC31-2).

Resumiendo, las combinaciones que sobresalen por su mayor frecuencia en mujeres enfermas son: SC30-2/SC31-2, SC01-2/SC42-2, SC01-2/SC31-2, SC31-2/SC31-2 y SC31-2/SC31-1. De éstas, únicamente SC01-2/SC42-2 y SC01-2/SC31-2, muestran diferencias estadísticamente significativas entre el número de mujeres sanas y enfermas, con RR de 11.82 ($p=0.038$) y 14.7 ($p=0.016$) respectivamente. Tabla 18.

Algunas combinaciones resaltan, no por tener un gran número de mujeres enfermas, sino por presentar un gran número de mujeres sanas.

La combinación SC42-2/SC31-1 presenta nueve mujeres sanas y ninguna enferma.

Asimismo, FC31-1/SC01-2 tiene cuatro sanas y una enferma, aún cuando el haplotipo SC01-2 aparece preferencialmente en combinaciones de mujeres enfermas.

Como ya se mencionó anteriormente SC42-2/SC42-2 presenta tres mujeres sanas y ninguna enferma.

La única combinación que mostró diferencias estadísticamente significativas entre mujeres sanas y enfermas fué SC42-2/SC31-1. Esta combinación se encontró disminuída en mujeres enfermas, con un riesgo relativo de 0.057 ($p=0.004$).

Alrededor del 50% de los individuos estudiados se encuentran distribuídos en combinaciones de haplotipos, donde las diferencias entre mujeres sanas, mujeres enfermas y hombres, no se pueden analizar dado el bajo número de individuos en esas celdas.

Poco se dijo de los hombres en este estudio debido a que el 100% de enfermos con LEG fueron mujeres y sobre ellas se enfocó el trabajo. No obstante, llama la atención que si revisamos la Tabla 15, en todas las combinaciones la relación hombres/mujeres es aproximadamente de 50%, pero la combinación FC31-2/SC31-2 muestra que el 75% de sus miembros son hombres. De las 4 mujeres observadas dos son enfermas y dos sanas, no emparentadas entre sí.

TABLA 18.- PARES DE HAPLOTIPOS CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE MUJERES SANAS Y ENFERMAS.

	SC01-2 SC42-2	Otros	
LEG	4	57	61
SANAS	0	75	75
	4	132	136

$f_1 = 0.038$
 $p = 0.038$
 RR= 11.82

	SC01-2 SC31-2	Otros	
LEG	5	56	61
OTROS	0	75	75
	5	131	136

$f_1 = 0.004$
 $p = 0.016$
 RR = 14.70

	SC42-2 SC31-1	Otros	
LEG	0	61	61
SANAS	9	66	75
	9	127	136

$f_1 = 0.004$
 $p = 0.004$
 RR = 0.057

D I S C U S S I O N

En el presente estudio se identificaron complotipos y haplotipos (complotipos más el alelo del gen de *Glo 1*) incrementados en el grupo de mujeres con LEG y algunos otros disminuidos en este mismo grupo. El riesgo relativo (RR) de cada uno de ellos y la forma en que segregaron en la población de estudio, los dividen en marcadores de predisposición y marcadores protectores para esta enfermedad. Al primer grupo pertenecen SC01 (RR=2.33, $p < 0.05$) y SC30-2 (RR=7.71, $p=0.033$). Al segundo grupo pertenecen SC42 (RR=0.37, $p < 0.05$), SC42-2 (RR=0.35, $p < 0.05$) y FC31-1 (RR=0.21, $p=0.025$). Dos variables fenotípicas de C4 se encontraron también disminuidas en mujeres enfermas: C4A-4 (RR=0.42, $p < 0.05$) y C4B-2 (RR=0.43, $p < 0.05$), además de la combinación de haplotipos SC42-2/SC31-1 (RR=0.061, $p=0.004$). Otras dos combinaciones de haplotipos se encontraron aumentadas en mujeres enfermas SC01-2/SC42-2 y SC01-2/SC31-2 (RR=11.82, $p=0.04$ y RR=14.70, $p=0.02$, respectivamente).

A diferencia de algunos reportes de la literatura no se encontró ninguna asociación entre alelos nulos para los genes de C4 y LEG, a pesar de que los dos marcadores de riesgo para padecer esta enfermedad encontrados en el estudio, incluyen alelos nulos para C4A (SC01) y para C4B (SC30-2). Además a excepción de C4A-4 y C4B-2 ninguna otra variable fenotípica para los genes de los complotipos o para el gen de *Glo 1*, mostró diferencias significativas en los grupos estudiados (mujeres sanas, mujeres enfermas y hombres).

El estudio mostró además la importancia de analizar a los complotipos junto con el alelo del gen de *Glo 1* con que segregan. El complotipo SC01 que en la Tabla 2 se muestra significativamente incrementado en -

mujeres enfermas, deja de mostrar significado estadístico al subdividirlo en función de la variable fenotípica de Glo I. sin embargo, en la Tabla 13a podemos observar que la mayoría de las mujeres cuyo fenotipo incluye a SC01-2 y SC01-1, están enfermas (69% y 57% respectivamente). No obstante, SC01-2 tiene una mayor frecuencia en este grupo, aunque la diferencia entre mujeres sanas y mujeres enfermas con este marcador no llega a ser significativo.

Según lo anterior SC01 por sí mismo parece ser el marcador de riesgo para padecer LEG, incrementándose el riesgo para los portadores de este complotipo en combinación con la variable fenotípica 2 del gen de Glo I (SC01-2).

Por otro lado, el haplotipo SC30 que no muestra diferencias significativas entre mujeres sanas y enfermas que lo llevan, muestra un incremento estadísticamente significativo en las mujeres enfermas al combinarse con la variable fenotípica 2 de Glo I (SC30-2). 6 de 7 mujeres con este marcador son enfermas con LEG (86%), mientras que sólo 2 de 6 mujeres (33%) con el fenotipo SC30-1 lo están. SC30-2 es así un marcador de predisposición para que un individuo (mujer) que presente este fenotipo sea susceptible de padecer LEG.

FC31-1 es un haplotipo que ha diferencia de SC01 y SC30-2 se encuentra disminuido significativamente en mujeres enfermas (15%) y que a semejanza de SC30-2, no había sido identificado antes de dividirlo en función de las variables fenotípicas de Glo I. FC31-2 se encuentra dividido equitativamente entre mujeres sanas y enfermas, 52% y 48% respectivamente.

SC42 aparece también aumentado con significado estadístico en las mujeres sanas, al igual que SC42-2. Prácticamente todos los individuos positivos a SC42 llevan la variable fenotípica 2 del gen de Clo 1. Solamente 2 de las 32 mujeres con el complotipo SC42 son SC42-1, 1 enferma y una sana compartiendo ambos complotipos (hermanas); ningún hombre fué SC42-1. Además, la frecuencia fenotípica de SC42-2 es de 0.10, mientras que la de SC42-1 es menor a 0.01. SC42-2 parece ser así un marcador de protección y SC42-1 pudiera ser incluso un marcador de susceptibilidad para padecer LEG.

Seguramente la causa de que C4A-4 y C4B-2 se hayan encontrado disminuidos significativamente en mujeres enfermas es debido a que SC42 se encuentra a su vez disminuido en este grupo y que es además, el único marcador en el que aparece esta combinación. Esto es, el marcador protector identificado es SC42 (SC42-2) y no las variables fenotípicas de los genes de C4. Su significancia puede deberse también a un probable desequilibrio de unión entre C4A-4 y C4B-2, ya que C4A-4 se combina solamente con C4B-Q0 y C4B-1, ambas combinaciones en complotipos con frecuencias genotípicas menores a 1%.

Un fenómeno semejante al anterior ocurre con las combinaciones por pares de haplotipos que aparecen incrementados en mujeres enfermas: SC01-2/SC42-2 y SC01-2/SC31-2. En la primera se encuentra combinado un marcador de predisposición a LEG con uno protector y en la segunda, el mismo factor de riesgo combinado con el haplotipo de mayor frecuencia genotípica en la población estudiada.

Además, los haplotipos más frecuentes en esta población son justamente los involucrados en estas asociaciones.

Esto parece indicar nuevamente, que el haplotipo de predisposición es - SC01-2, cuyo incremento en estas combinaciones es debido a la elevada frecuencia de los haplotipos con quien segrega.

Apoya a lo anterior el hecho de que SC30-2, incrementado en mujeres - enfermas, no es significativo en ninguna asociación; lo cual puede deberse a que a excepción de la combinación con SC31-2 (3 de 4 mujeres enfermas) ninguna otra combinación presenta frecuencias genotípicas elevadas.

Por otro lado y en adición a lo anterior, de las 11 mujeres enfermas hermanas de los casos índice, 6 comparten ambos haplotipos con éstos, cuatro comparten sólo uno y una enferma más no comparte ninguno con ellos. El haplotipo que comparten cada una de las cuatro hermanas enfermas con el caso índice son respectivamente SC01-2 (tres enfermas) y SC302. El fenotipo de la mujer enferma que no comparte ningún haplotipo con el caso índice es SC31-2/SC31-1, una combinación que no mostró significancia por sí misma ni por sus haplotipos individuales. Esta enferma tiene una hermana sana con quien comparte ambos haplotipos y el caso índice de la familia lleva el marcador SC30-2.

La combinación SC42-2/SC31-1, donde todas las mujeres observadas son sanas, se justifica por sí misma, ya que el haplotipo SC42-2 además de -

estar significativamente disminuído en mujeres enfermas, su frecuencia genotípica es alta al igual que la de SC31-1. Esta es una combinación poco probable de observarse en mujeres enfermas.

Además de los anteriores, se observaron haplotipos que sólo existen en mujeres sanas o sólo en mujeres enfermas, pero dado el bajo número de individuos positivos para tales fenotipos no es posible incluirlos en algún tipo de análisis.

Por otro lado sería importante llevar a cabo, el seguimiento de las hermanas sanas de los casos índice que comparten con éstos ambos haplotipos o algún marcador identificado como de predisposición, además de otros estudios para observar si en estas personas existe alguna alteración inmunológica, e inclusive extender el análisis a los marcadores del sistema HLA, esperando obtener una definición más clara de los marcadores de predisposición al LEC, semejante a la que se obtuvo al utilizar las variables fenotípicas de la enzima eritrocítica Glioxalasa I (Glo I).

C O N C L U S I O N E S

- Los complotipos como marcadores del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) son herramientas útiles en el estudio de la etiología del Lupus Eritematoso Generalizado (LEG).
- La inclusión de el análisis de los alotipos de la enzima eritrocítica -- Glioxala I (Glo I) en la búsqueda de marcadores del MHC que identifiquen individuos con predisposición genética de padecer LEG, permite hacer una mejor definición de estos marcadores.
- La forma en que se comparten los haplotipos entre los casos índice y sus hermanos, en el grupo de estudio, no difiere de el patrón de herencia mendeliano.
- Los hermanos sanos comparten preferentemente uno o ningún haplotipo con el caso índice. Aquel que comparten, generalmente no pertenece a los marcadores identificados como de predisposición genética.
- Las hermanas enfermas comparten preferentemente ambos haplotipos con el caso índice. Los individuos enfermos que comparten sólo un haplotipo con el caso índice, comparten generalmente haplotipos identificados como de predisposición genética.
- Se identificaron como marcadores de predisposición genética para padecer LEG, los siguientes:

SC01 RR=2.33 $p < 0.05$

SC30-2 RR=7.71 $p = 0.033$

- El mayor factor de predisposición genética es el hecho de compartir ambos haplotipos con el caso índice:

RR=10.05 p < 0.005

- Se identificaron como marcadores de protección genética, los siguientes:

SC42-2 RR=0.35 p < 0.05

FC31-1 RR=0.21 p = 0.025

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Allen, F.H. Linkage of HLA and GBC. *Vox Sang.* 27, 382-382 (1974).
- 2.- Alper, C.A.; Propp, R.P. Genetic Polymorphism of the third component of human complement (C'3). *J. Clin. Invest.* 47, - 2181-2191 (1968).
- 3.- Alper, C.A.; Boenisch, T.; Watson, L. Genetic Polymorphism in human glycine-rich betaglycoprotein. *J. Exp. Med.* 135, -- 68-80 (1972).
- 4.- Alper, C.A.; Awdeh, Z.L.; Raum, D.D.; Yunis, E.D. Extended Major Histocompatibility Complex haplotypes in man: Role of alleles analogous to murine t mutants. *Clinical Immunology and Immunopathology* 24, 276-285 (1982).
- 5.- Alper, C.A.; Raum, D.; Karp, S.; Awdeh, Z.L.; Yunis, E.J. Serum complement "supergenes" of the Major Histocompatibility Complex in man (Complotypes). *Vox. Sang.* 45, 62-67 (1983).
- 6.- Arnett, F.C.; Shulman, L.E. Studies in familial Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 55, 313-322 (1976).
- 7.- Arnett, F.C.; Reveille, J.D.; Willson, R.W.; Provost, T.T.; Bias W.B. Systemic Lupus Erythematosus: Current State of the Genetic Hypothesis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 14, 24-35 (1984).

- 8.- Awdeh, Z.L.; Rau, D.; Glass, D.; Agnello, V.; Schur, P.H.; Johnston, R.B.; Gelfand, E.N.; Ballow, M.; Yunis, E.; Alper, C.A. Complement-HLA haplotypes in C2 deficiency. *J. Clin. Invest.* 67, 581 (1981).
- 9.- Awdeh, Z.L.; Alper, C.A. Inherited structural polymorphism of the fourth component of complement C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3576-3580 (1980).
- 10.- Awdeh, Z.L.; Raum, D.; Alper, C.A. Genetic polymorphism of the fourth component of human complement: Detection of heterozygotes. *Nature* 282, 205-207 (1979).
- 11.- Awdeh, Z.L.; Raum, D.; Alper, C.A. Major Histocompatibility Complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes) (abstract). *Fed. Proc.* 40, 1066 (1981).
- 12.- Awdeh, Z.L.; Raum, D.; Yunis, E.J.; Alper, C.A. Extended -- HLA/Complement allele haplotypes: Evidence for T/t-like complex in man. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 80, 259-263 (1983).
- 13.- Balow, M.; Mc Lean, R.H. Hereditary C4 deficiency-genetic studies and linkage to HLA. *Transplant Proc.* 14, 1710-1712 (1979).
- 14.- Block, S.R.; Winfield, J.B.; Lochshin, M.C. Studies of twins with Systemic Lupus Erythematosus: A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am. J. Med.* 59, 533-552 (1975).

- 15.- Buckman, K.; Moore, S.; Cox, M. Familial Systemic Lupus Erythematosus. Arch. Intern. Med. 138, 1674-1676 (1978).
- 16.- Carrol, M.C.; Belt, K. T.; Palsdottir, A. Molecular Genetics of the fourth component of human complement and steroid 21-hydroxylase. Immunological Review 87, 39-60 (1985).
- 17.- Carro, M.C.; Campbell, R.D. A molecular map of the human Major Histocompatibility Complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. Nature 307, 237-241 (1984).
- 18.- Dausset, J. Iso-Leuco-anticorps. Acta Haematol. 20, 156-166 (1958).
- 19.- Dausset, J. The major Histocompatibility Complex in man. Science 213, 1469 (1981).
- 20.- De Horatius, R.J.; Pillarisetty, R.; Messner, R.P. Antinucleic acid antibodies in Systemic Lupus Erythematosus patients and their families. Incidence and correlations with lymphocytotoxic antibodies. J. Clin. Invest. 56, 1149-1154 (1975).
- 21.- Douglas, G.N. The Biological consequences of complement activation, in: Complement System. Calbiochem-Behring (Division of American Hoechst Corporation), La Jolla, California. pp.17-18 (1984).

- 22.- Fearon, D.T. Complement as a Mediator of Inflammation, in: Clinics In Immunology and Allergy. Fauci, A.S. (ed.) W.B. Saunders Company Ltd., Philadelphia. 1, 2, 225-243 (1981).
- 23.- Fernández, H.N.; Hugly, T.E. Chemical evidence for common ancestry of complement components C3 and C5. J. Biol. Chem. 252, 1826 (1977).
- 24.- Fielder, A.H.L.; Walport, M.J.; Batchelor, J.R. Family study of the Major Histocompatibility Complex in patients with Systemic Lupus Erythematosus: Importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. Br. Med. J. 1, 425-428 -- (1983).
- 25.- Fleishnick, E.; Raum, E.D.; Awdeh, Z.L.; Granados, J. Extended MHC Haplotypes in 21-hydroxylase deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. Shared genotypes in unrelated patients. Lancet 1, 152-156 (1983).
- 26.- Fu, S.M.; Kunkel, H.G.; Brusman, H.P.; Allen, F.H.; Fotino, M. Evidence for linkage between HLA histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement. J. Exp. Med. 140, 1108 (1974).
- 27.- Giles, C.M.; Godde-Dahl, T.; Bobson, E.B. Rg (Rodgers) and the HLA region. Linkage and associations. Tissue Antigens 8, -- 143-149 (1976).

- 28.- Glass, D.; Raum, D.; Gibson, D.; Stillman, J.S.; Schur, P.H.; Alper, C.A. Inherited deficiency of the second component of complement. *J. Clin. Invest.* 58, 853-861 (1976).
- 29.- Glass, D.N.; Fearon, D.T.; Austen, K. F. Inherited abnormalities of the complement system, in: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5th. Ed. Stanbury, J.B. (ed). Mc Graw-Hill. pp. 1934-1955 (1983).
- 30.- Goldberg, M.A.; Arnett, F.C.; Bias, W.B. Histocompatibility antigens in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 19, 129-132 (1976).
- 31.- Hobart, M.J.; Lachman, P.J. Allotyping of complement components in whole serum by isoelectric focusing in goat followed by specific haemolytic assay. *J. Immunol.* (abstract) 116, 1736 (1976).
- 32.- Kumpf, J.; Bissbort, S.; Gusaman, S. Polymorphism of red cell glyoxalase I. A new genetic marker in man. *Humangenetik* 27, 141 (1975).
- 33.- Lachman, P.J. Inherited complement deficiencies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B306, 419-430 (1984).
- 34.- Lachman, P.J. Initiation of complement activation. *Springer Semin. Immunopathol.* 7 143-162 (1984).

- 35.- Lahita, R.G.; Chiorazzi, N.; Gibofsky, A. Familial Systemic Lupus Erythematosus in males. *Arthritis Rheum.* 21, 183-191 (1978).
- 36.- Lamm, I.V.; Buskjaer, L.; Peterson, G.B. Complement C2 and C4 and factor B allotypes of insylin dependent diabetes (IDD) in Denmark. Abstract. VIIIth. International Histocompatibility Conference. Los Angeles (1980).
- 37.- Marrack, P.; Kappler, J. The T cell and its receptor. *Scientific - American* 254, 2, 15-20 (1986).
- 38.- Martin A.; Lachmann, P.J.; Halbwachs, L. Haemolytic difusion - plate assays for factors B and D of the alternative patway of complement activation. *Immunochemistry* 13, 317 (1976).
- 39.- Mauff, G.; Hauptmann, G.; Daha, M.; Federmann, G. Congenital inactivity of properdin factor B. Eight International Complement - Workshop. *J. Immunology* 124. 1531 (abstract) (1980).
- 40.- Mauff, G.; Gauchel, F.D.; Hitzcroth, H.W. Polymorphism of properdin factor B in South African, Negroid, Indian and colored -- populations. *Human Genetic* 33, 319 (1976).
- 41.- Mauff, G.; Bender, K.; Fischer, B. Genetic polymorphism of the fourth component of human complement. *Vox. Sang.* 34 296-301 - (1978).

- 42.- Meo, T.; Atkinson, J.P.; Bernoco, d.; Ceppellini, R. Structural heterogeneity of C2 complement protein and its genetic variants - in man: A new polymorphism of the HLA region. Proc. Natls. Acad. Sci. USA 74, 1672-1675 (1977).
- 43.- Middleton, J.; Crookston, M.C.; Falk, J.A.; Robson, E.B.; Cook, P.J.L.; Batchelor, J.R.; Bodner, J.; Ferrara, G.B.; Festenstein, - H.; Harris, R.; Kissmeyer-Nielsen, F.; Lawler, S.D.; Sachs, J.A. Wolf, E. Linkage of Chido and HLA. Tissue Antigens. 4, 366-373 (1974).
- 44.- Ngan, B.; Minta, J.O. Analysis of the peptide maps of human fac tor B; evidence for structural homology and common ancestry. J. - Immunol. 120, 1788 (abstract) (1978).
- 45.- Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigens 24, 73-80 (1984).
- 46.- Olaisen, B.; Teisberg, P.; Nordhager, R.; Michaelsen, T.; Gedde-Dahl, T. Human Complement C4 locus is duplicated on some chromosomes. Nature 279, 736-737 (1979).
- 47.- O'Neill, G.; Yang, S.Y.; Duppont, B. Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5165-5169 (1978).

- 48.- O'Neill, G.; Yang, S.Y.; Tegoli, J.; Berger, R.; Dupont, B. Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human C4. *Nature* 273, 668-670 (1978).
- 49.- Pariser, K.M.; Raum, D.; Berkman, E.M.; Aper, C.A.; Agnello, B. Evidence for a silent or null gene in hereditary C2 deficiency. *J. Immunology* 121, 2580-2581 (1978).
- 50.- Porter, RR. Introduction to the complement system. *Phi. Trans. R. Soc. Lond* B306, 279-281 (1984).
- 51.- Raum, D.; Glass, D.; Carpenter, C.B.; Schur, P.H.; Alper, C.A. Mapping of the structural gene of the second component of complement with respect to the human major histocompatibility complex. *Am. J. Humn. Genet.* 31, 35-41 (1979).
- 52.- Raum, D.; Donaldson, V.H.; Rosen, F.S.; Alper, C.A.. Genetics of complement. *Current Topics in Hematology* 111-174 (1980).
- 53.- Raum, D.D.; Awdeh, Z.L.; Glass, D. The location of C2, C4 and Bf relative to HLA_B and HLA-D. *Immunogenetics* 12, 473-483 (1981).
- 54.- Reinertsen, J.L.; Klippel, J.H.; Johnson A.A. B-lymphocyte alloantigens associated with systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. Med.* 299, 515-518 (1978).

- 55.- Reveille, J.D.; Arnett, F.C.; Provost, T.t. Null alleles of the fourth component of complement (C4) in familial Lupus Erythematosus. *Immunogenetic* 21, 299-311 (1985).
- 56.- Reyes, L.P.A. Lupus Eritematoso Sistémico. *Tribuna Médica* -- 9, 9-20 (1983).
- 57.- Rittner, C.; Hauptmann, G.; Grosse-Wilde, H.; Grosshans, E.; Tongio, M.M.; Mayer, S. Linkage between HLA (major histocompatibility complex) and genes controlling the synthesis of the -- fourth component of complement, in: Kissmeyer-Nielsen F (ed.). *Histocompatibility Testing*. Copenhagen: Munksgaard, pp. 945-954 (1975).
- 58.- Rittner, C. Genetic loci of components of the classical and alternative pathway of complement activation: A new dimension of the immunogenetic linkage group (HLA) on chromosome 6 in man. - *Genet.* 35, 1-20 (1976).
- 59.- Rittner, C.; Bertrams, J. On the significance of C2, C4 and - factor B polymorphism in disease. *Human Genetic* 56, 235-247 - (1981).
- 60.- Rosenfel, S.I.; Ruddy, S.; Austen, K.F. Structural polymorphism of the fourt component of human complement. *J. Clin. Invest.* -- 48, 2283-2292 (1969).

- 61.- Ryder, L.P.; Svedjgaard, A. Genetics of HLA disease association. *Ann. Rev. Genet.* 15, 169-187 (1981).
- 62.- Schur, P.H. Complement and Lupus Erythematosus. *Arthritis - Rheum.* 25, 793-798 (1982).
- 63.- Schur, P.H.; Meyes, I.; Garovoy, M. Associations between systemic Lupus Erythematosus and the mayor histocompatibility complex: Clinical and immunological considerations. *Clin. Immunol. - Immunopathology* 24, 263-275 (1982).
- 64.- Shows, T.B.; Alper, C.A.; Bootsma, D. International system for human gene nomenclature. *Cytogenet. Cell. Genet.* 25, 96-116 (1980).
- 65.- Simmons, M.J.; Tait, B.D. HLA Genetics, in: *Detections of Immune-associated Genetics Markers of Human Disease. Practical - Methods in Clinical Immunology Series.* Churchill Livingstone, - New York 7, 4-17 (1984).
- 66.- Steinmetz, M.; Hood, L. Genes of the mayor histocompatibility complex in mouse and man. *Science* 222, 727-733 (1983).
- 67.- Svejgaard, A.; Jersild, L.; Nielsen, S.; Bodmer, F.W. HLA antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 4, 95-105 (1974).