

72
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**ANTIGENOS HIA Y SU RELACION CON LA
DEFICIENCIA DE LA ENZIMA ESTEROIDE 21-
HIDROXILASA EN HIPERPLASIA
CONGENITA ADRENAL.**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
NOEMI LAURA RODRIGUEZ GOMEZ**



Asesor: Dr. Luis Angel Terán Ortíz

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



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

	Pag.
I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	2
III GENERALIDADES	5
1. Antecedentes	5
2. Herencia	9
2.1 Recombinación	9
2.2 Desequilibrio de enlace	11
3. Mecanismo de asociación HLA-Enfermedad	15
4. Hiperplasia Adrenal Congénita	15
4.1 Etiología	18
4.2 Diagnóstico	20
4.3 Tratamiento	24
4.4 Trabajos de HLA y CAH por deficiencia de 21-hidroxilasa	26
IV OBJETIVOS	28
V HIPOTESIS	29
VI MATERIAL Y METODOS	30
6. Tipificación de linfocitos	33
6.1 Purificación de linfocitos	33
6.2 Separación de linfocitos	34
6.3 Microcitotoxicidad	35
VII RESULTADOS	38
VIII DISCUSION	40
IX CONCLUSIONES	51
X APENDICE	53
XI BIBLIOGRAFIA	55

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue tipificar los antígenos de histocompatibilidad en pacientes con Hiperplasia Adrenal Congénita y establecer su relación HLA-Enfermedad; para ello se estudiaron 17 familias mestizas mexicanas con 22 pacientes y 37 sanos. La técnica que se empleó fue la microcitotoxicidad. Como se tipificaron familias, se pudieron establecer algunas combinaciones por cromosoma, lo que se conoce como haplotipo.

Se compararon tanto los antígenos por separado, como por haplotipo entre pacientes contra sanos e inclusive contra población general, encontrándose un incremento en los pacientes de los antígenos HLA-A24 y HLA-DR4 con significancia estadística al compararse contra la población general. Los haplotipos considerados son : A2B39, A24B60, B39DR4 y B62DR4 mostrando mayor frecuencia haplotípica en pacientes, pero ninguna relación significativa con la enfermedad, al compararse pacientes contra sanos.

Varios factores pudieron influir en los resultados, que no permitieron aclarar la existencia de un marcador genético asociado a Hiperplasia Adrenal Congénita en la población mexicana, incluyendo orígenes antropológicos y diversidad alélica para ésta enfermedad.

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

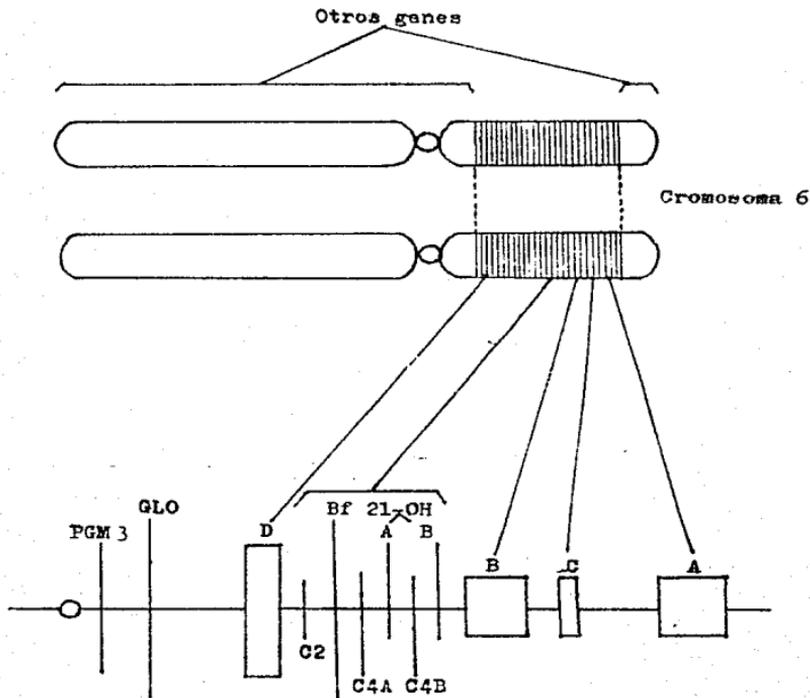
Los antígenos de histocompatibilidad dan identidad genética a cada individuo y constituyen el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), siendo el sistema HIA (H= humano, L= leucocito, A= primer sistema) en el humano y cuyo estudio se ha realizado en base al sistema H-2 del ratón por contar con cepas endogámicas para estudiar la respuesta inmune e interacciones celulares, dependientes de genes de este sistema, extrapolándose al sistema HLA, el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 constituido por un conjunto de genes, cada uno con sitio específico (locus) y heredados como unidad (haplotipo) y en forma codominante, presentando diversidad alélica (polimorfismo, tabla I).

En la región HLA existen genes con diversas funciones : antígenos leucocitarios HLA-A, -B, -C, -D/DR tipificadores de tejidos; enzimas como glicoxalasa y 21-hidroxilasa (21-OH); -componentes (C2, C4, Bf) y receptores (C3b, C3d) del complemento; que regulan la respuesta inmune, determinan capacidad, tipo y magnitud de la misma; promueven la producción de células inmunocompetentes y controlan su cooperación e interacción; determinan susceptibilidad y resistencia a ciertas enfermedades; regulan la síntesis de hormonas esteroides y embriogénesis.(fig. 1)(4,22,27)

Tabla 1. ESPECIFICIDADES RECONOCIDAS EN 1987
PARA EL SISTEMA HLA

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D/-DR	HLA-DQ	HLA-DP		
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQw1	DPw1
A2	B7	Bw50(21)	Cw2	Dw2	DR2	DQw2	DPw2
A3	B8	Bw51(5)	Cw3	Dw3	DR3	DQw3	DPw3
A9	B12	Bw52	Cw4	Dw4	DR4	DQw4	DPw4
A10	B13	Bw53	Cw5	Dw5	DR5	DQw5(1)	DPw5
A11	B14	Bw54(w22)	Cw6	Dw6	DR6	DQw6(1)	DPw6
Aw19	B15	Bw55(w22)	Cw7	Dw7	DR7	DQw7(3)	
A23(9)	B16	Bw56(w22)	Cw8	Dw8	DRw8	DQw8(3)	
A24(9)	B17	Bw57(17)	Cw9(3)	Dw9	DRw9	DQw9(3)	
A25(10)	B18	Bw58(17)	Cw10(3)	Dw10	DRw10		
A26(10)	B21	Bw59	Cw11	Dw11	DRw11		
A28	Bw22	Bw60(40)		Dw12	DRw12		
A29	B27	Bw61(40)		Dw13	DRw13		
A30	B35	Bw62(15)		Dw14	DRw14		
A31	B37	Bw63(15)		Dw15	DRw15(2)		
A32	B38(16)	Bw64		Dw16	DRw16(2)		
Aw33	B39(16)	Bw65		Dw17	DRw17(3)		
Aw34	B40	Bw67		Dw18	DRw18(3)		
Aw36	B41	Bw70		Dw19			
Aw43	Bw42	Bw71		Dw20			
Aw66	B44(12)	Bw72		Dw21			
Aw68	B45(12)	Bw73		Dw22			
Aw69	Bw46	Bw75(15)		Dw23			
Aw69	Bw47	Bw76(15)		Dw24			
Aw74(19)	Bw48	Bw77(15)		Dw25			
				Dw26			
		Bw4					
		Bw6					

**Fig. 1 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD
HUMANO HLA**



PGM 3 = Fosfoglucomutasa 3

GLO 1 = Glioxalasa

A, B, C, D, = Antígenos de histocompatibilidad humanos

C2 = Factor 2 del complemento

C4(A y B) = Factor 4 del complemento

Bf = Factor de la vía alterna del complemento

21-OH (A y B) = 21-hidroxilasa

A N T E C E D E N T E S

La historia del sistema de histocompatibilidad comienza a principios de este siglo, con trasplante de tumores en ratones por Jensen en 1903, sugiriendo la existencia de la relación entre susceptibilidad al trasplante tumoral y la raza - con alguna forma de control genético.(55)

En 1916 Little estableció los principios básicos de trasplante, demostrando que injertos cutáneos dentro de estirpes endogámicas tenían éxito, mientras que los injertos entre éstas (aloinjertos) fracasaban. Posteriormente Aldana en 1933 - propuso que la inmunidad estaba dirigida contra aloinjertos - más que contra antígenos tumorales, prediciendo diferencias - antigénicas comparables con las de los grupos sanguíneos, al conservar los tumores características aloantigénicas del donador que inducían rechazo tumoral.(55)

Gorer en 1936 estableció que la reacción entre aloinjertos en ratones estaba relacionada con el grado de histocompatibilidad de los aloantígenos detectados por serología, descubriendo lo que creyó otro sistema sanguíneo en el ratón, cuyos genes codifican al antígeno II, determinante del éxito o fracaso de injertos tumorales, denominándolos genes de histocompatibilidad o H y postulando sus leyes al introducir en ratones de la primera línea congénita que obtuvo, el genoma del - complejo de histocompatibilidad de otra cepa pura.(5,14,44)

Gorer, Lyman y Snell en 1948 demuestran que el gen para el antígeno II se encuentra en el cromosoma 17, que porta además el gen de la braquiuria (T) o anomalía de la cola; constatando Allen en 1955 que no se trataba de un solo gen, sino de un sistema complejo alelomórfico H-2 diferenciado, detecta

do por recombinantes intra H-2 en trasplantes; demostrando -
 Amos en 1953 que el producto de los genes de esa región podía
 detectarse en los leucocitos del ratón por leucoaglutinación.
 (14,55)

En 1943 Medawar y col. demostraron las bases inmunológi-
 cas del rechazo de trasplante de tejido normal, comparando -
 trasplantes de piel autóloga y alogénica en conejos y poste-
 riormente en 1953 induce tolerancia inmunológica en ratones -
 recién nacidos, inyectando células linfoides del donador del
 injerto de piel. Mitchisson en 1954 comprobó que la reacción
 al alotrasplante era un fenómeno mediado básicamente por in-
 munidad de tipo celular. (14,55)

Mediante la reacción a péptidos sintéticos en algunas ce-
 pas endogámicas de cobayos, Benacerraff en 1969 logra postu-
 lar la teoría sobre la existencia de algunos genes para la re-
 puesta inmune en los animales que respondían; observando lo -
 mismo en ratones Mc Devitt en 1968, demuestra que estos genes
 Ir-1 están en la región I, asociados y dentro de la región --
 H-2. (5,14,44)

La participación del complejo H-2 en la regulación del -
 metabolismo hormonal en ratones machos, fué descrita en 1972
 por Ivanyi; demostrando posteriormente Demant y col. su papel
 en el control genético y actividad de proteínas del complemen-
 to. (14)

Los descubrimientos del sistema HLA, independientes del
 sistema H-2, se iniciaron entre 1920 y 1950. Dausset en 1958
 descubre en individuos transfundidos producción de anticuer-
 pos aloespecíficos, reaccionando con individuos no relaciona-
 dos para el primer antígeno leucocitario, el cual llamó Mac.
 (5,14,44,55)

En 1958 van Rood y Payne descubren independientemente anticuerpos antileucocitarios en suero de mujeres multiparas. - Payne en 1964 descubrió 2 especificidades de una primera serie ó LA, LA1 y LA2.(55)

Yunis en 1970 describe al locus HLA-D como análogo al Ia murino y Amos en 1971 lo asocia con la proliferación linfoide en cultivo mixto de linfocitos (CMI).(14)

Los determinantes de activación linfocitaria (Lads) descubiertos por Scherd y Donnelly en 1971 por accidente al mezclar linfocitos de 2 individuos diferentes genéticamente, mostrando días después las células cultivadas estimulación blastogénica; demostraron que los antígenos que promueven la reacción de CML estan bajo control genético. Rijsvooljel y col. - en 1972 por estudios familiares, localizan al gen del CML - fuera del locus HLA-B- conocido como HLA-D; sin embargo, existe al menos otro gen Lad (Lad 2) que se identifica entre HLA-A y HLA-C de reacción al CML.(14)

Oliver y Festenstein en 1975 basado en asociaciones infrecuentes, postulan la existencia del locus HLA-C separado del locus HLA-B por ocurrencia de entrecruzamiento y recombinación en familias.(14)

Teisberg y col. en 1976 describen polimorfismo del componente del complemento C4, asociado al locus HLA-B y O'Neill y col. en 1978 determinan 2 loci para el mismo, cada uno con un alelo común silencioso.(2,14,43)

En 1984 White y col. manifiestan que existen 2 genes codificando la enzima 21-hidroxilasa (21-OH), cuya deficiencia se asocia a genes HLA, ya que se encuentra ubicada en esa región del cromosoma 6.(fig. 1)(17). En este mismo año se esta-

blecieron los loci HLA-DP y HLA-DQ.

La primera asociación entre el Complejo Principal de Higtocompatibilidad (MHC) y susceptibilidad a la enfermedad fué reportada por Lilly en 1966 al descubrir el importante papel del complejo H-2 del ratón, como regulador de la resistencia al virus de leucemia de Gross. En el humano Amiel en 1967 demuestra que pacientes con la enfermedad de Hodgkin presentaban el antígeno HIA-A2 con mayor frecuencia que la población normal.(4)

Avances recientes han descubierto asociaciones HLA-enfermedad, en los que se basa el diagnóstico, pronóstico, prevención y tratamiento de algunas enfermedades.(14)

La espondilitis anquilosante (AS) muestra la asociación más sorprendente conocida hasta la fecha, ya que más del 95% de pacientes tienen el antígeno HLA-B27.(14,55)

La Hiperplasia Adrenal Congénita (CAH) por deficiencia de la enzima esteroide 21-OH, es uno de los ejemplos de asociación HLA-enfermedad, cuya predisposición genética se ve asociada principalmente con los genes de HLA-B*47;DR7 y HLA-B*14;DR1, según el grado de manifestación de la enfermedad, variando su porcentaje de acuerdo a la población estudiada. Se han observado pacientes con otros antígenos HLA que presentan la enfermedad, esta diferencia de cada población se debe a diferentes marcadores antropológicos y variantes alélicas para CAH resultando de mutaciones genéticas.(11,13,32,49)

HERENCIA

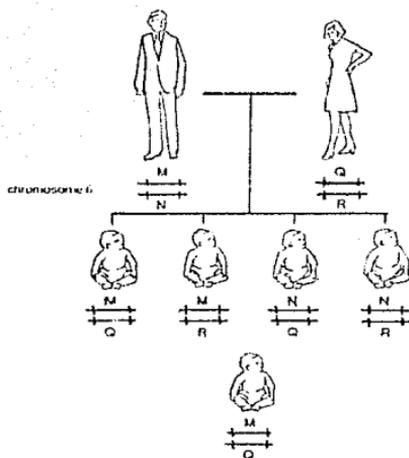
La especie humana cuenta con 46 cromosomas en cada célula somática, siendo 22 pares autosómicos y un par sexual, que le dan características diploides, procediendo 23 cromosomas - de la madre y 23 del padre. Cada cromosoma tiene genes en lugares específicos (locus), encontrando su homólogo en el otro cromosoma que forma el par y cuyas variantes alélicas existen en cada locus; así un individuo que presenta idénticos alelos homólogos será homocigoto para ese gen, pero si éstos son diferentes será heterocigoto, en el cual uno dominará al otro - (dominancia) o ambos se expresarán (codominancia). (55)

Por herencia mendeliana simple, un individuo hereda 2 haplotipos HLA, siendo todos sus genes muy próximos y ligados - entre sí, polimórficos y codominantes; así dentro de una familia, donde el padre presenta los haplotipos M y N, y la madre los haplotipos Q y R, se tiene para 4 de sus hijos las asociaciones posibles de haplotipos siguientes : MQ, MR, NQ, NR, donde existe 25% de probabilidad para que 2 hermanos compartan - los mismos haplotipos, 50% de compartir un haplotipo y 25% de ser incompatibles en sus antígenos HLA. (fig. 2) (15, 55, 56)

RECOMBINACION Y ENTRECruzAMIENTO

Durante la meiosis los cromosomas homólogos se aparean - antes de la reducción de 46 cromosomas (diploide) a 23 cromosomas (haploide), siendo posible que ocurra recombinación, intercambiando las regiones homólogas apareadas, material genético que origina una nueva unión, siendo la frecuencia de re-

Fig. 2. HERENCIA .



Fadres con 4 haplotipos diferentes (2 cada uno) tienen hijos con 4 posibles combinaciones, existiendo 25% de probabilidad de compatibilidad total o incompatibilidad total y 50% de compatibilidad parcial entre hermanos.

combinación entre 2 loci, proporcional a la distancia que los separa, segregándose como unidad los más próximos y en forma independiente los alejados. (fig. 3) (15,55)

D E S E Q U I L I B R I O D E E N L A C E

La cercanía de los genes del HLA raramente da lugar a disociación por entrecruzamiento en la meiosis; así la aparición de 2 antígenos sobre el mismo haplotipo es más frecuente de lo esperado al multiplicar sus frecuencias individuales, lo que se conoce como desequilibrio de enlace (Δ), evaluado por la diferencia entre la frecuencia observada y la esperada para un haplotipo con asociación de 2 antígenos HLA. (15)

Se han postulado hipótesis para explicar el desequilibrio de enlace, que involucran los siguientes factores : (15)

- 1) Emigración o mezcla de poblaciones.
- 2) Selectividad.
- 3) Consanguinidad.
- 4) Derivación al azar.

El desequilibrio de enlace se encuentra al determinar -- los antígenos HLA de una población, señalan sus orígenes y migraciones, así como las relaciones con la expresión de algunas enfermedades. (14)

La comparación entre individuos de diferentes razas muestra diferencias en las frecuencias de genes (tabla 2). Antígenos frecuentes en una población pueden estar ausentes en otras, lo cual es de gran utilidad en investigaciones antropológicas.

Sin embargo, las frecuencias de genes establecidas en una población normal en comparación con algunas patologías en oca

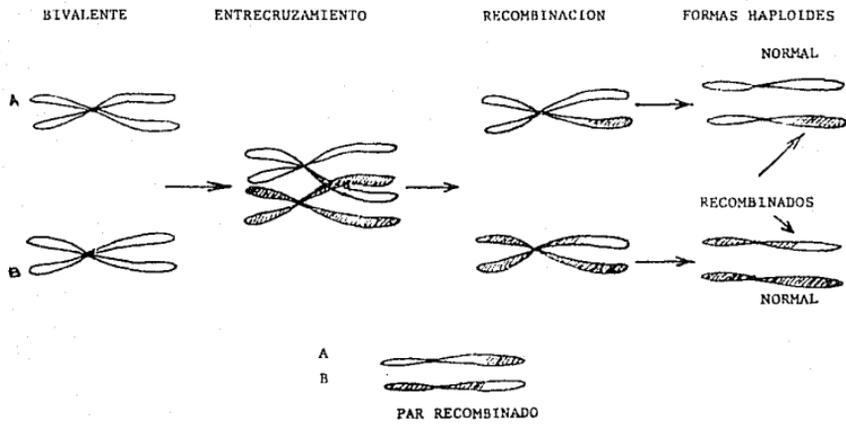


FIG. 3 ENTRECRUZAMIENTO DE DOS CROMOSOMAS HOMOLOGOS DURANTE LA MEIOSIS

Tabla 2. FRECUENCIAS ANTIGENICAS PARA LOCUS HLA-A, -B y -DR.

Antígeno	EUC	NEG	JAP	AMI	MEX
A1	27.5	6.5	1.0	2.9	14.8
A3	21.9	14.2	1.1	2.9	5.9
A28	7.7	16.6	1.1	13.0	5.9
A36	0.7	3.3	0.5	0.0	0.0
Ax	0.9	16.2	2.6	0.2	0.2
n	2648	367	948	69	85
B5	16.8	4.6	36.4	47.9	16.7
B8	15.7	5.8	0.2	2.9	6.0
B12(w44,w45)	22.9	21.4	12.8	7.3	34.5
B13	5.6	1.4	4.0	0.0	4.8
B14	5.8	8.0	0.2	1.5	4.8
B15(w62,w63)	11.4	2.5	17.1	43.5	17.8
B16(38,39)	9.1	3.6	6.1	23.2	15.4
B17(w57,w58)	8.4	28.0	1.7	0.0	3.6
B21(49,50)	7.0	6.3	0.6	1.5	15.5
B27	7.7	3.0	0.8	1.5	4.8
B35	18.2	12.1	14.0	20.3	41.7
Bw47	0.9	0.3	0.4	0.0	0.0
Bx	1.2	30.2	23.0	0.2	0.2
n	2652	365	950	69	84
DR2	25.1	28.5	36.0	46.3	14.8
DR3	20.4	31.6	3.2	6.0	16.0
DR4	18.3	9.6	41.4	47.8	28.4
DR5	19.5	24.8	4.3	3.0	27.3
DRx	66.5	33.6	26.5	15.6	66.9
n	2499	323	884	67	88

EUC Europeos Caucásicos, NEG Negros, JAP Japoneses,
AMI Indios Americanos, MEX Mexicanos. (3)

ciones presentan desequilibrio de enlace, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HLA.

Enfermedad	HLA	Frecuencia		rr
		E	C	
Enfermedad de Hodgkin	A1	40	32	1.4
Hemacromatosis idiopática	A3	76	28	8.2
Enfermedad de Behncet	B5	41	10	6.3
Hiperplasia Adrenal Congénita	B47	9	0.6	15.4
Espondilitis anquilosante	B27	90	9	87.4
Enfermedad de Reiter	B27	79	9	37.0
Uveitis anterior aguda	B27	52	9	10.4
Tiroiditis subaguda	B35	70	15	13.7
Psoriasis vulgar	C6	87	33	13.3
Dermatitis herpetiforme	DR3	85	26	15.4
Enfermedad celiaca	DR3	79	26	10.8
Síndrome de Sjögren	DR3	78	26	9.7
Enfermedad de Addison	DR3	69	26	6.3
Enfermedad de Graves	DR3	57	26	3.7
Diabetes mellitus tipo I	DR3	56	26	3.3
Lupus eritematoso sistémico	DR3	70	28	5.8
Esclerósis múltiple	DR2	59	26	4.1
Síndrome de Goodpasture	DR2	88	32	15.9
Artritis reumatoide	DR4	50	19	4.2
Tiroiditis de Hashimoto	DR5	19	7	3.2

E = Enfermos, C = Controles sanos, rr = riesgo relativo (44)

MECANISMO DE ASOCIACION HLA-ENFERMEDAD

El descubrimiento de asociaciones entre ciertas enfermedades y el MHC representa uno de los avances más importantes de la última década en medicina clínica, y proporciona por primera vez una base firme para el entendimiento de la causa y patógenesis de toda una serie de enfermedades difíciles de comprender, como son esclerosis en placa o artritis reumatoide. (14)

La primera indicación de que el MHC jugaba un papel importante en la patógenesis de ciertas enfermedades fue el descubrimiento de genes ligados a H-2 que controlan la resistencia a la leucogénesis viral y las respuestas inmunitarias específicas. (14)

Se han postulado teorías a cerca de los mecanismos que explican las asociaciones HLA-enfermedad.:

1.- La mayoría de las asociaciones involucrando antígenos de los loci HIA-B o -D, evidencian la acción de genes de respuesta inmune específica, estrechamente ligados y en desequilibrio de enlace con los antígenos de esos loci. La carencia de un determinante adecuado originaría susceptibilidad recesiva hacia ciertas infecciones. Un determinante autoagresivo originaría susceptibilidad dominante hacia fenómenos autoinmunes, o bien determinante de inmunosupresión. (14,15,44)

2.- El mimetismo molecular supone que los antígenos de ciertos microorganismos se asemejan a algunos antígenos HLA, causando susceptibilidad dominante hacia infecciones severas en individuos que los portan. Es posible que dicha semejanza an-

tigénica pudiera conducir al quebrantamiento de la autotolerancia, y por una susceptibilidad dominante (autoinmunidad inducida por virus). Seager y col. encuentran linfocitos HLA-B27 en individuos con espondilitis anquilosante (AS) respondiendo poco a Klebsiella, lisándose los linfocitos por los antígenos. (4,14,15,44)

3.- Estructuras de superficie celular, como antígenos HLA podrían servir como receptores para ciertos agentes patógenos. Es el caso de los receptores Ced como sitios de unión del virus Epstein Barr para linfoma de Burkitt y mononucleosis infecciosa, determinados por Klein en 1975. (14,15,44)

4.- Algunos antígenos podrían influir en la función endócrina o en la interacción celular, interfiriendo en la interacción entre hormonas y receptores correspondientes en la superficie celular. (44)

5.- Anomalías en un factor del complemento controlado por el sistema HLA (C2, C4, Bf), podrían causar susceptibilidad hacia infecciones u originar fenómenos autoinmunes; o bien, por desequilibrio de enlace o ausencia de recombinación con genes vecinos a ellos. (42,44)

6.- Alteraciones en genes vecinos a los del HLA, predisponen a ciertas enfermedades, por la existencia entre ellos de desequilibrio de enlace, manifestándose la asociación; es el caso de la asociación del antígeno HLA-B47 con Hiperplasia Adrenal Congénita por deficiencia de la enzima 21-OH, cuyos genes no

se incluyen en la respuesta inmune.(42)

7.- Genes de la respuesta inmune cifrados por MHC controlan \pm la magnitud de la respuesta de células T a productos bacteria nos específicos.(14)

H I P E R P L A S I A A D R E N A L C O N G E N I T A

La Hiperplasia Adrenal Congénita (CAH), pertenece a la familia de desórdenes hereditarios de esteroidogénesis adrenal, como un caracter autosómico recesivo (AR), con defecto a la síntesis del cortisol.(13)

Se presenta en diferentes grupos étnicos, ambos sexos, - al nacer, en la pubertad, antes y después de ella, manifiestan do alteraciones a nivel hormonal y junto con ello en los caracteres sexuales primarios y secundarios.(35)

Estudios con DNA recombinante de leucocitos y secuenciación de sus genes, muestran sitios de mutación genética en cuda variante alélica del gen en cuestión, así la deleción estructural del fragmento en la región HLA, C4B;21-OH, da por resultado entrecruzamiento desigual durante la meiosis, cuya recombinación lleva a la duplicación de C4B;21-OH en un cromosoma y a su ausencia en el otro, el cual porta el error innato del metabolismo.(fig. 4)(7,29,40,41,45,46,50)

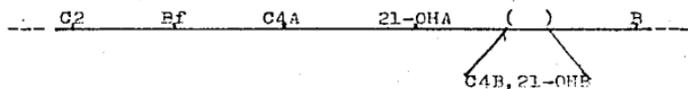
E T I O L O G I A

CAH es un síndrome adrenogenital que se encuentra por ausencia o carencia de la enzima 21-OH (E.C.1.14.99.10) en un - paso de la biosíntesis del cortisol, para convertir 17-hidroxiprogesterona (17-OH) a 11-desoxicortisol; aumentándose sus precursores que dan lugar a metabolitos urinarios en exceso, (37,45,53)

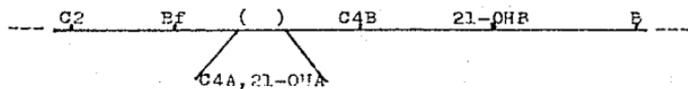
Existe control por retroalimentación negativa plasmática normal entre cortisol libre y hormona adrenocorticotrópica - (ACTH), interviniendo el sistema hipotalámico-pituitaria-adra

Fig. 4 DELECCION ESTRUCTURAL EN LA REGION H1A.

H1A-Bw47 (deficiencia de 21-OH)



H1A-B8 (normal)



nal, que actúa en ausencia del cortisol. aumentando la secreción de ACTH, que estimula a las glándulas adrenales a la producción excesiva de andrógenos (testosterona), aldosterona y precursores del cortisol, así como a hiperplasia de la corteza adrenal, que sintetiza 3 clases de hormonas : Mineralocorticoides (vía 17-desoxi), Glucocorticoides (vía 17-hidroxi) y - andrógenos.(figs. 5,6 y 7)(12,37,49,50)

Dentro de la formación de esteroides, los eventos bioquímicos más importantes son : la introducción de grupos -OH en C21, C17 y C11, catalizados por sistemas enzimáticos específicos.(37)

Las causas de éste síndrome adrenogenital incluyen : (22)

CAH virilizante

Adenomas

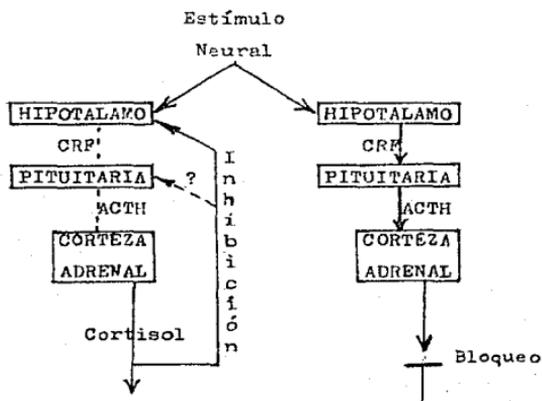
Carcinomas

D I A G N O S T I C O

Se basa en las manifestaciones e historial clínicos, acompañados de análisis hormonal de los niveles plasmáticos matutinos (mujeres en 5^o-8^o días del ciclo menstrual) de progesterona (P) y 17OHP (≤ 2 ng/ml), indicando exceso de los niveles basales normales de los anteriores y ACTH, con disminución de 17-cetosteroides, 17-hidroxicorticosteroides y cortisol en orina, debido a la función anormal de las glándulas adrenales por alteración enzimática.(22,37)

Si los resultados son dudosos, se realiza un perfil hormonal postestimulación de ACTH, detectando en muestras sanguíneas a los 30, 60 min. de su administración, los niveles de -

Fig.5 REGULACION DE SECRECION DEL CORTISOL EN SUJETOS NORMALES Y PACIENTES CON CAH .



CRF = Factor liberador de ACTH

Fig. 6 REGULACION DE SECRECION DE ALDOSTERONA

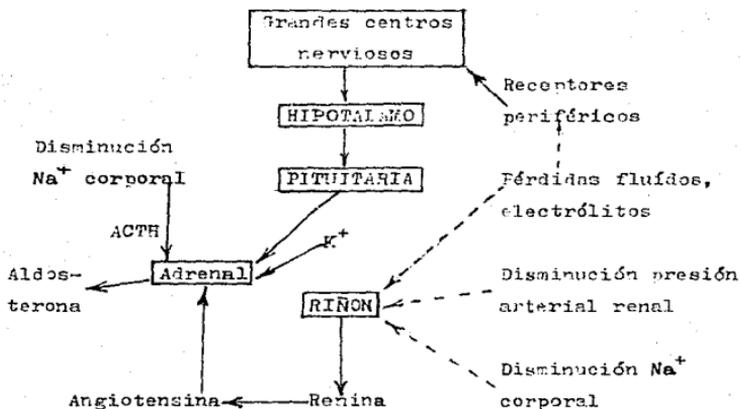
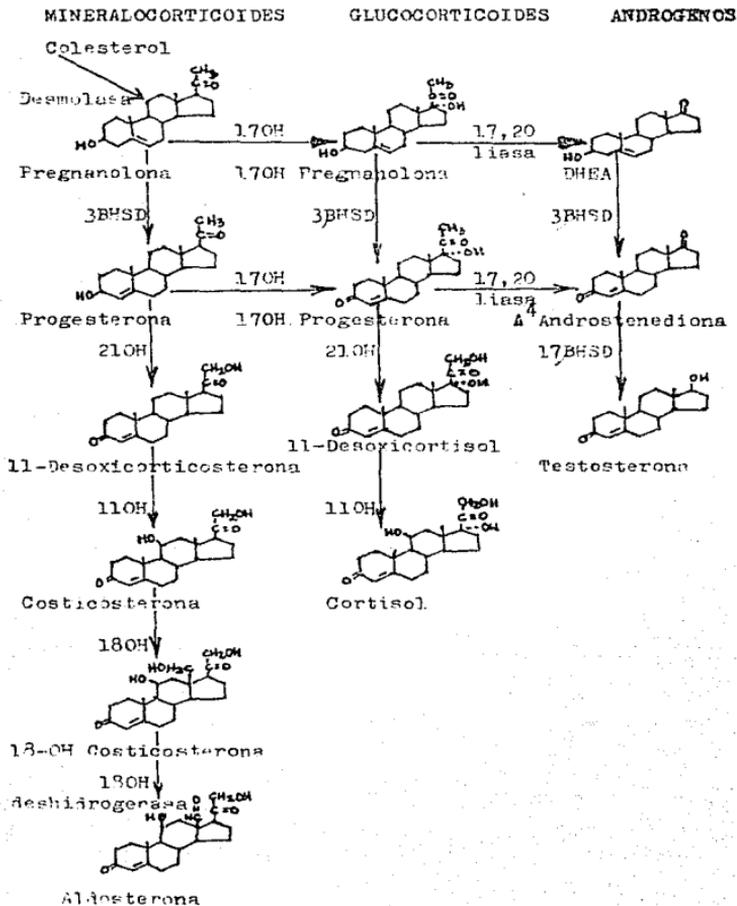


Fig. 7 ESQUEMA SIMPLIFICADO PARA LA ESTEROIDOGENESIS ADRENAL



17OHP, Δ^4 -androstenediona (Δ^4), dehidroepiandrosterona (DHEA, DHA), sulfato de DHA (DHEA-S), testosterona (T), P, cortisol, por medio de radioinmunoensayo (RIA) para cada hormona en particular; sobrepasando niveles normales en individuos afectados en todas las hormonas, excepto en cortisol, donde sus niveles son bajos. (11,21,29,32,37,40,49)

La CAH se manifiesta en 2 formas, presentando cada una - de ellas 2 tipos con efectos virilizantes que dependen del se xo y la edad del paciente en el momento de la aparición del - trastorno, acompañándose de otros signos y síntomas mostrados en el cuadro I. (13,18,22)

T R A T A M I E N T O

Con la terapéutica temprana, contando con órganos sexuales internos normales, es posible alcanzar una pubertad, fertilidad y gestaciones normales. (37)

Una terapia endócrina reemplaza déficit hormonal. Los -- glucocorticoides suprimen sobreproducción de ACTH y aumentan el nivel del cortisol, reteniendo sales en el organismo, mej orando aún más los casos del tipo SW, por lo que hay que deter minar la dosis adecuada en los otros casos, considerando las reac ciones secundarias que pueden presentar. (37)

Se requiere tratamiento con hidrocortisona en ambos se-- xos para crecimiento adecuado, evitando la fusión temprana de la epífisis.

En el caso de la hembra pseudohermafrodita por deficien-- cia de 21-OH, se realiza una corrección quirúrgica de geni talia ambigua, para una función futura y fertilidad. (37)

Cuadro I. CLASIFICACION DE CAH POR DEFICIENCIA DE 21-OH

Formas	Tipo	Herencia	Manifestaciones Clínicas	Diagnóstico
Clásica (al nacer)	Simple Virilización (SV)	Heterocigosis (sev/normal)	Función adrenocortical inicial en 3er mes de gestación, aumentan andrógenos adrenales, masculinización genital externa, hermafroditismo en hembra, virilización progresiva, estatura corta eventual.	Hormonal
	Pérdidas Salinas (SW)	Homocigosis (sev/sev)	Virilización, defecto aldosterona, bajo Na^+ plasmático, amenaza de muerte en 1 ^{as} 3 ^{as} sems. de vida.	Hormonal
No Clásica (pubertad temprana, tardía, postpubertad)	Tardío	Homocigosis (suave/suave) Heterocigosis (suav/normal)	Nace mujer con vagina y útero normales o fusión labio menor, sintomática, atenuada, adquirida, acné, hirsutismo variable, virilización, menstruación irregular o amenorrea, corta estatura, obesidad ocasional.	Hormonal
	Oculto	Heterocigosis (sev/suave)	Asintomática, virilización, llega a manifestarse, crecimiento rápido temprano y corta estatura posterior, infertilidad.	Hormonal, Historia Clínica

sev = severo

TRABAJOS PREVIOS DE HLA Y CAH POR DEFICIENCIA DE 21-OH

Mediante estudios hormonales y genotipificación, ha sido posible diferenciar manifestaciones de CAH, asociada con mayor frecuencia a los antígenos HLA-A28 y B14 por desequilibrio de enlace para la forma variante de CAH clásica (no clásica), aquella se asocia con Bw47, como portadores obligados.(45)

Se han realizado estudios de diferentes poblaciones para determinar el genotipo común a CAH y sus variantes alélicas, observándose diferentes marcadores en cada grupo étnico o poblaciones en estudio.

Al comparar un antígeno HLA específico entre grupos control y enfermos, para una población heterogénea de New York, la deficiencia de 21-OH en CAH no clásica se asocia a B14;DR1 (31,49). Un grupo de población de Israel presentó en heterocigotos con el tipo tardío B14;DR1 o sólo B14 y en homocigoto - Bw48 y Bw44; para la forma clásica Bw47.(18,28)

En la población yugoslava un grupo de enfermos mostró - Bw47;DR7 como parte del complotipo A3,Cw6,Bw47,BfP,DR7.(23)

Dentro de una población francesa, CAH se asocia a Bw47 - (clásica) y B14 (tardío) con haplotipo A3,B14 en unos y E12 ó B35 en otros, ligados a DRw1 y DRw6, concluyendo que el haplotipo de Europa Norte para CAH tiene un origen común y es A3, Bw47,Cw6; asociado el tipo tardío a Aw33,B14.(10)

En cambio la población italiana no mostró igualdad entre su zona norte y sur, además no se asocia Bw47 a la enfermedad. (56)

Blancos caucásicos y africanos con hirsutismo, mostraron 15 pacientes de 11 familias los haplotipos Aw33,B14 y A3,Bw35 en CAH no clásica.

Estudio en 29 familias, detectó por recombinación en una familia, el gen para CAH por deficiencia de 21-OH, entre los loci HLA-B y glioxalasa, determinando alto riesgo, por métodos hormonales y tipificación del HLA.(48)

Básicamente los estudios de antígenos HLA se han establecido en poblaciones caucásicas, negra, oriental y en fase inicial en nuestra población, y dado que la frecuencia fenotípica como haplotípica varía según la raza, nos crea los siguientes problemas :

No podemos usar tablas de frecuencias extranjeras.

Los marcadores asociados a la patología (salvo HLA-B27 - con AS) no son del todo universales.

Además el interés por comprender y determinar las causas que hacen manifiesta una enfermedad, como CAH en la población mestiza mexicana y su relación con un marcador genético de origen étnico, motivó a la realización de este trabajo de investigación, ya que esta enfermedad se hereda como caracter AR y puede evitarse previamente progenie afectada, que seguirá -- transmitiendo el trastorno de generación en generación, Aún, si el producto se espera, existen técnicas para determinar antígenos de histocompatibilidad en las células del líquido amniótico asociados a CAH, permitiendo tomar ciertas medidas durante su desarrollo y después de su nacimiento.

La aplicación de la asociación HLA-CAH, se amplía a estudios de pacientes con alteraciones características de ésta enfermedad, mejorando la selección de su tratamiento, al conocer cual de las variantes de la enfermedad presentan y que consideraciones deben tomarse, para evitar graves efectos secundarios.

O B J E T I V O S

- I Determinar la existencia de marcadores genéticos (antígenos del sistema HLA) en un grupo - de pacientes (mestizos mexicanos) que presentan Hiperplasia Adrenal Congénita.

- II Establecer una relación entre un determinado marcador genético del sistema HLA y las diferentes formas o variantes alélicas que presenta dicha enfermedad.

H I P O T E S I S

Determinando los antígenos de histocompatibilidad (HLA-A, -B y -DR) en un grupo de familias de una misma población (mestiza mexicana) con miembros sanos y enfermos por deficiencia de la enzima 21-hi
droxilasa, es posible establecer los marcadores ge-
néticos HLA asociados a Hiperplasia Adrenal Congéni-
ta y sus variantes alélicas.

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

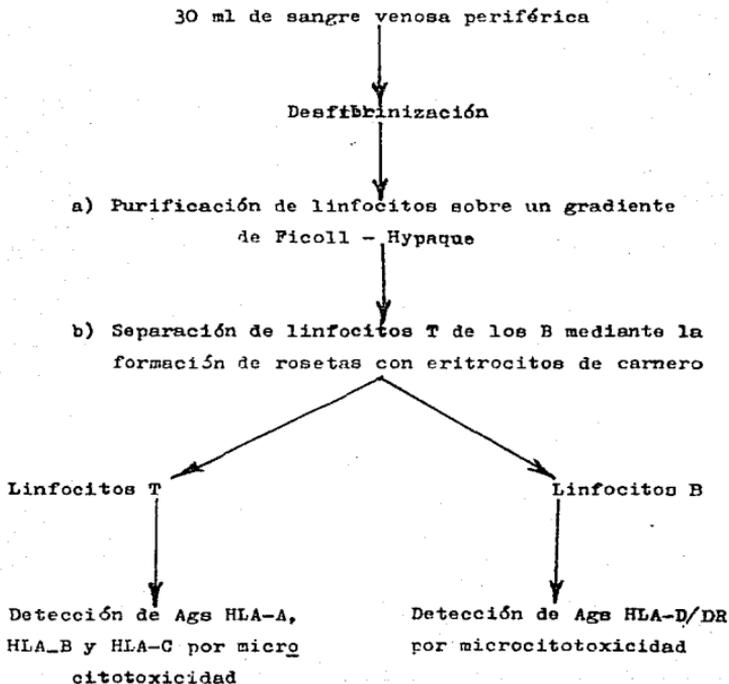
Se tipificaron 17 familias, de las cuales 37 individuos fueron sanos y 22 individuos presentan Hiperplasia Adrenal - Congénita por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa, del Servicio de Endocrinología del C.H. " 20 de Noviembre " ISSSTE que presentaron anomalías características de la enfermedad.

TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA.

La tipificación requiere de linfocitos de sangre periférica, purificados por centrifugación sobre gradiente de Ficoll Hypaque y separación de linfocitos T de los B mediante la formación de rosetas. La detección de antígenos HLA se realiza por la técnica de microcitotoxicidad.

Las metodologías empleadas se esquematizan (esquema I) y amplian enseguida :

Esquema 1. TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA



M A T E R I A L

Centrífuga clínica Beckman con unidad refrige_rante

Microscopio óptico Zeiss de 3 objetivos

Microscopio invertido Biostar con 3 objetivos

Agitador vórtex Thermolyne Maxi Mix

Estufa Incubaril de 0 a 70°C

Microplacas Microtest con 60 pozos

Cámara Neubauer

Jeringa Hamilton sencilla de 50 ul

Jeringa Hamilton múltiple

Cubreobjetos de 24 x 40 mm

Solución de Ficoll Hypaque

Medio RPMI

Solución salina amortiguada (SSA), pH 7.0-7.4

Suero fetal de ternera

Eritrocitos de carnero

Solución de AET a 0.14 M, pH 9.0

Aceite mineral

Antisueros anti-HLA

Eosina amarillenta al 5% en agua

Formalina neutralizada

Solución de Hanks

Suero de conejo antilinfocítico

Suero normal humano

M E T O D O S

A) Purificación de linfocitos

Se realiza aprovechando la diferentes densidades de las células sanguíneas y centrifugando sobre la mezcla de Ficoll Hypaque (densidad 1.076-1.078). Después de la centrifugación los eritrocitos y polimorfonucleares se depositan en el fondo, mientras que los linfocitos permanecen cerca a la interfase - entre el suero y la solución separadora.

1. Extraer por punción venosa 30 ml de sangre .
2. Colocar la sangre en tubos de tapón de rosca -con perlas - de vidrio- y desfibrinar mecánicamente por rotación.
3. Diluir la sangre en solución de Hanks en relación 2:1.
4. Colocar 3 ml de solución separadora en tubos de ensayo 3l x 100.
5. Estratificar cuidadosamente la sangre con una pipeta Fas--teur sobre la solución de Ficoll Hypaque.
6. Centrifugar a 1 800 rpm por 30 min a temperatura ambiente.
7. Recuperar la banda de linfocitos con una pipeta Pasteur.
8. Lavar los linfocitos en solución de Hanks centrifugando a 2 000 rpm por 10 min y repetir esta operación 2 veces más.
9. Resuspender en 1 ml de solución de Hanks.
10. Contar las células y ajustarlas a una concentración de 4×10^6 cel/ ml con medio RPMI.

B) Separación de linfocitos T y B.

La detección de antígenos de la clase I se realiza con los linfocitos purificados anteriormente. Para los antígenos de la clase II, se requiere linfocitos B, por lo que se separan los linfocitos T de los B por formación de rosetas con eritrocitos de carnero.

Los linfocitos T receptores que reaccionan con glóbulos rojos de carnero, forman agregados denominados "rosetas". El agente reductor AET, modifica de alguna manera estos eritrocitos, con lo que se logra la formación de rosetas en poco tiempo y con una aceptable estabilidad ante cambios mecánicos.

a) Preparación de eritrocitos de carnero.

1. Lavar los eritrocitos de carnero 3 veces con SSA.
2. Incubar los eritrocitos con solución de AET durante 15 min a 37°C (1:4).
3. Dejar enfriar y agregar solución de Hanks frío.
4. Lavar cuantas veces sea necesario hasta el punto en que el pH de la solución se haya neutralizado.
5. Ajustar los eritrocitos a una concentración de 2% en medio de cultivo con 20% de SFT.

b) Purificación de linfocitos B.

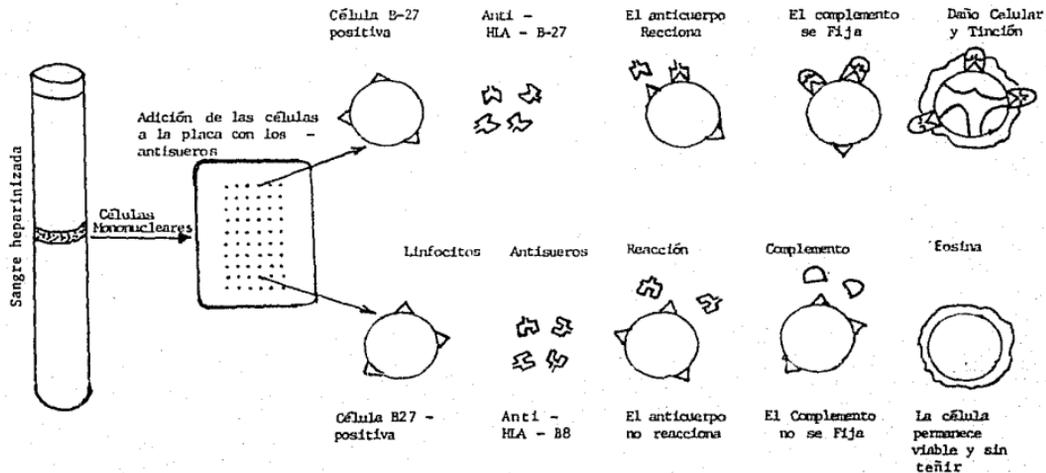
1. Mezclar volúmenes iguales de una suspensión de linfocitos ajustados a 4×10^6 cel/ml con la suspensión de eritrocitos de carnero al 2% sensibilizados con AET.
2. Incubar a 37°C durante 15 min, agitando suavemente cada 5 min.
3. Centrifugar a 600 rpm por 5 min.
4. Incubar a 4°C por un mínimo de 2 a 3 hrs.
5. Resuspender muy suavemente y estratificarla sobre la solución de Ficoll Hypaque, la mezcla anterior.
6. Centrifugar a 1 500 rpm por 30 min a temperatura ambiente.
7. Separar la interfase con linfocitos B y lavar 2 veces con medio de cultivo con SFT.
8. Resuspender en 0.25 ml de medio enriquecido.
9. Contar y ajustar a la concentración de 4×10^6 cel/ml.

c) Microcitotoxicidad.

Mediante esta técnica se determinan los antígenos de hig tocompatibilidad, utilizando anticuerpos específicos contra cada uno de los antígenos establecidos internacionalmente. La reacción se realiza en 2 pasos : se incuba la suspensión de linfocitos con diferentes antisueros, si estos contienen el anticuerpo que reconozca el antígeno HLA, se formará el complejo antígeno-anticuerpo; enseguida se añade complemento de conejo, el cual será fijado y activado por el complejo formado, matando las células blanco que se detectan recurriendo a colorantes vitales, como eosina y azul tripan (no citotóxicos) que penetran únicamente en las células dañadas, por existir cambios de permeabilidad en su membrana.(fig. 8)

FIG. 8

TIPIFICACION DE LINFOCITOS POR LA TECNICA DE MICROCITOTOXICIDAD



Las placas se preparan depositando 5 μ l de aceite mineral y aadiendo 1 μ l de antisueros tipificadores a cada pozo, además de controles positivo y negativo, Se conservan a -20°C .

1. Descongelar las placas que vayan a usarse, dejándolas que alcancen la temperatura ambiente.
2. Una vez ajustada la concentración de cada una de las poblaciones de linfocitos a 4×10^6 cel/ml, se siembra 1 μ l en cada pozo en la placa correspondiente.
3. Mezclar suavemente empleando un agitador vórtex.
4. Incubar por 60 min a temperatura ambiente, tanto los linfocitos T como los B.
5. Adicionar 5 μ l de complemento a cada pozo y mezclar suavemente con el agitador vórtex.
6. Incubar la placa que contiene a los linfocitos T durante 60 min. y la de los linfocitos B durante 120 min., ambas a temperatura ambiente.
7. Agregar 5 μ l de la solución de eosina y dejar reposar durante 15 min.
8. Adicionar 5 μ l de formalina neutralizada.
9. Se colocan los cubreobjetos sobre la placa y se guardan en refrigeración.
10. Leer en un microscopio invertido las placas que hayan alcanzado la temperatura ambiente.

La calificación que se le da a cada pozo, es en base al criterio siguiente :

Células muertas (%)	Calificación	Interpretación
1 ----- 10	1	Negativo
11 ----- 20	2	Negativo
21 ----- 30	4	Dudoso
31 ----- 80	6	Positivo
81 ----- 100	8	Positivo

R E S U L T A D O S

Fueron tipificados 22 pacientes con Hiperplasia Adrenal Congénita de 2 a 60 años de edad, del Servicio de Endocrinología del C.H. " 20 de Noviembre " ISSSTE, cuyo diagnóstico se basó en manifestaciones clínicas y pruebas hormonales.

El análisis estadístico de los resultados consideró lo siguiente :

1. Frecuencia antigénica o fenotípica : F.f. = Número de positivos a un antígeno, entre el número de sujetos estudiados.

2. Desequilibrio de enlace : Diferencia entre la frecuencia haplotípica esperada y la observada.

$$D = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+c)(c+d)}{n^2}}$$

En donde:

n = Tamaño de muestra.

b = Número de individuos con uno de los antígenos del mismo haplotipo.

c = No. de individuos con el otro antígeno del haplotipo en cuestión.

d = No. de individuos que no poseen los antígenos del haplotipo.

3. Frecuencia haplotípica : F.H. = No. de veces que coinciden 2 marcadores de diferentes locus, que normalmente es proporcional al producto de las frecuencias individuales de estos marcadores; combinaciones más frecuentes presentan desequilibrio de enlace.

Para determinar la asociación de los antígenos HLA con una enfermedad, se calcula el riesgo relativo (rr) y la ji-cuadrada (χ^2), con ello se encuentra que la probabilidad sea

debida al azar o a una relación significativa.

El riesgo relativo indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos portadores del antígeno respecto de los que carecen de éste. Un $rr \geq 1$ indica que el antígeno es más frecuente en los pacientes que en los controles, mientras que un $rr \leq 1$ indica asociación negativa. El valor de X^2 ayuda a determinar que tan significativa es la asociación HLA-enfermedad.

Mediante una tabla de contingencia 2×2 , se calculan - tanto rr como X^2 de una muestra de pacientes, a fin de comparar sus frecuencias antigénicas (HLA) con las de una población normal.

Tabla de contingencia 2×2 :

		Ag HLA		Totales
		+	-	
Enfermedad	Positivo	a	b	M_3
	Negativo	c	d	M_4
Totales		M_1	M_2	n

En donde :

a = Pacientes con el antígeno en cuestión.

b = Pacientes sin el antígeno.

c = Controles con el antígeno.

d = Controles sin el antígeno.

$$M_1 = a + c \qquad M_2 = b + d$$

$$M_3 = a + b \qquad M_4 = c + d$$

Para el riesgo relativo se tiene :

$$rr = \frac{a \cdot d}{c \cdot b}$$

La χ^2 se calcula como sigue :

$$\chi^2 = \frac{[(ad-bc) - n/2]^2}{n \cdot M_1 \cdot M_2 \cdot M_3 \cdot M_4}$$

Los criterios considerados para los valores de χ^2 son en términos de p (probabilidad), y son los siguientes :

0.05 < p < 0.01	significativos
0.01 < p < 0.001	muy significativos
p < 0.0001	altamente significativos

El valor de χ^2 se consulta en tablas considerando un grado de libertad y obtenemos el valor de p que es la probabilidad de que la asociación observada sea debida al azar. Mientras menor sea el valor de p (χ^2 más grande) mayor es el significado de la asociación. (14,42)

La comparación de frecuencias antigénicas para los antígenos HLA-A, -B y -DR entre pacientes, sanos y población general, se muestra en la tabla 4, donde los antígenos más frecuentes en pacientes fueron : A24 (54.4%), B39 (22.72%), B51 (18.8%), B60 (22.72%), B62 (22.72%) y DR4 (54.54%), siendo significativos entre pacientes y población general solamente A24 y DR4. (tablas 5 y 6)

Al determinar la asociación entre los antígenos de los locus HLA-A/HLA-B y HLA-B/HLA-DR, se encontraron los haplotipos de las tablas 7-10, mostrando asociación significativa en cada caso.

Para los haplotipos anteriormente considerados en pacientes, se realizó el análisis estadístico entre pacientes y sanos, no obteniéndose para ninguno de ellos significancia estadística, es decir, no se encontró relación entre alguno de los haplotipos y la manifestación de la enfermedad, como se mues-

tra en las tablas 11-14; aunque de éstos haplotipos, sólo A2; B39, A24;B60, B39;DR4 y B62;DR4 se encuentran con mayor frecuencia haplotípica de la esperada entre los pacientes.(tabla 15)

Tabla 4 FRECUENCIAS DE ANTIGENOS HLA EN PACIENTES CON CAH
SANOS Y POBLACION GENERAL

Antígeno	Pacientes	Sanos	Pob. General
A1	4.5	2.7	16.27
A3	4.5	21.6	11.18
A23	13.6	13.5	3.38
A24	54.4	40.5	31.52
A28	45.45	43.2	15.59
A36	4.5	5.4	3.38×10^{-3}
B13	4.54	18.91	6.77
B14	4.54	2.7	7.11
B35	27.27	24.32	21.35
B39	22.72	16.21	11.52
B44	9.09	24.37	13.89
B47	4.54	2.7	3.38×10^{-3}
B58	9.09	0	3.72
B60	22.72	18.91	10.84
B62	22.72	10.81	10.84
Bx	13.53	5.4	3.38
DR3	9.09	13.51	16.61
DR4	54.54	43.24	27.11
DR5	9.09	5.4	19.32
DR7	27.27	21.62	4.06
DRw14	4.54	5.4	27.45
DRx	9.09	13.91	22.33
n	22	37	295

Tabla 5

HLA-A24 EN CAH

HLA-A24

	+	-	Totales
Pacientes	12	10	22
Controles	93	202	295
Totales	105	312	317

$$rr = 2.6$$

$$\chi^2 = 3.96, p < 0.025$$

Tabla 6

HLA-DR4 EN CAH

HLA-DR4

	+	-	Totales
Pacientes	12	10	22
Controles	80	215	295
Totales	92	225	317

$$rr = 2.6$$

$$\chi^2 = 6.2, p < 0.025$$

Tabla 7

HLA-A2,B39 EN CAH

HLA-A24

		+	-	Totales
HLA-B39	+	4	0	4
	-	4	14	18
Totales		8	14	22

$$\chi^2 = 5.524, n < 0.025$$

Tabla 8

HLA-A24,B60 EN CAH

HLA-A24

		+	-	Totales
HLA-B60	+	1	4	5
	-	11	6	17
Totales		12	10	22

$$\chi^2 = 4.1756, p < 0.05$$

Tabla 9

HLA-B39, DR4

		HLA-B39		Totales
		+	-	
HLA-DR4	+	1	11	12
	-	4	6	10
Totales		5	17	22

$$\chi^2 = 5.1786, p < 0.025$$

Tabla 10

HLA-B62, DR4

		HLA-B62		Totales
		+	-	
HLA-DR4	+	1	11	12
	-	4	6	10
Totales		5	12	22

$$\chi^2 = 5.1786, p < 0.025$$

Tabla 11

HLA-A2 ,B39 EN CAH

	HLA-A2 ,B39		Totales
	+	-	
Pacientes	4	18	22
Controles	1	36	37
Totales	5	54	59

$$rr = 8$$

$$\chi^2 = 2,499 \quad \text{N.S.}$$

Tabla 12

HLA-A24,B60 EN CAH

	HLA-A24,B60		Totales
	+	-	
Pacientes	1	21	22
Controles	1	36	37
Totales	2	57	59

$$rr = 1.714$$

$$\chi^2 = 0.1336 \quad \text{N.S.}$$

N.S. = No significativo

Tabla 13

HLA-B39, DR4 EN CAH

	HLA-B39, DR4		Totales
	+	-	
Pacientes	1	21	22
Controles	2	35	37
Totales	3	56	59

$$rr = 0.833$$

$$\chi^2 = 0.5747 \quad N.S.$$

Tabla 14

HLA-B62, DR4 EN CAH

	HLA-B62, DR4		Totales
	+	-	
Pacientes	1	21	22
Controles	2	35	37
Totales	3	56	59

$$rr = 0.833$$

$$\chi^2 = 0.5747 \quad N.S.$$

N.S. = No significativo

Tabla 15 FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS LOCUS
HLA-A/HLA-B y HLA-B/HIA-DR DE PACIENTES CON
CAH, CONTROLES SANOS Y POBLACION GENERAL .

HAPLOTIPO	CAH %	SANOS %	POB. GENERAL %
A2 , B39 *	8.26	6.12	4.13
A24, B60 **	12.38	7.65	3.41
Ax, B18	0.2	0.51	0.46
E39, DR4 *	12.39	7.02	3.12
B51, DRx	1.65	1.53	3.03
B61, DR5 ***	1.23	0.29	-
B62, DR4 ***	12.39	4.67	2.93

(-) Indica desequilibrio de enlace negativo

* Significancia estadística cuando menos con $p < 0.025$

** Significancia estadística cuando menos con $p < 0.05$

*** Significancia estadística cuando menos con $p < 0.005$

D I S C U S I O N

Este estudio pretendía establecer los antígenos HLA en pacientes mestizos mexicanos con CAH y su asociación con esta enfermedad, lo que ha sido determinado en algunas poblaciones de diferentes grupos étnicos. (10,23,28,31)

Como se menciona en la literatura (19), la población mexicana está formada de la mezcla de razas de diferente procedencia, cuyo origen tuvo lugar con la conquista y épocas posteriores a ésta, por lo cual, considerando sólo a la población mexicana que ha alcanzado el equilibrio genético, se realizó este estudio, no logrando establecer un marcador genético predominante en estos pacientes con CAH, ya que la procedencia familiar no es común para todos los casos.

Se ha observado en estudios de otras enfermedades asociadas con antígenos HLA, que ciertos antígenos para los locus - HLA-B y -DR predominan en estas enfermedades. Para este trabajo A24 (rr = 2.6) y DR4 (rr = 3.2) fueron los antígenos HLA con mayor frecuencia significativa en los pacientes en relación con la población general, encontrando al HLA-DR4 en otros padecimientos como Artritis Reumatoide (rr = 4.2), Péñfigo (judíos, rr = 14.4), Diabetes Insulino Dependiente (rr 6.4), ésta última al igual que CAH, es agrupada dentro de los padecimientos de origen endócrino. (44)

Al buscar asociación entre los antígenos de los locus - HLA-A/-B y HLA-B/-DR en los pacientes, se encontró que ésta es significativa sólo para los haplotipos que incluyen a los antígenos HLA antes mencionados y otros de mayor frecuencia -

antigénica que no presentaban significancia estadística entre pacientes y población general, pero ninguno de éstos mostró - relación con la enfermedad de manera significativa entre pa-+ cientes y sanos.

Es necesario considerar que algunos antígenos HLA-A, -B y -DR no se definieron y por lo tanto, solo algunos haploti- pos estudiados se definieron completamente y los restantes - parcialmente, debido a que los antisueros utilizados de dife- rente origen de procedencia, no reaccionan contra todos los - antígenos de nuestra población, requiriendo contar con anti- sueros obtenidos de la misma población, siendo esto un traba- jo previo a una investigación como esta, ya que un mayor núme- ro de antisueros de esta misma población, darían tipificacio- nes más completas.

Se está trabajando en obtención de antisueros a partir - de placentas humanas, requiriéndose además determinar su espe- cificidad. Existe también un intercambio de antisueros entre laboratorios de diferentes países que trabajan esta área de - investigación, lo que permite determinar antígenos HLA poco - frecuentes en poblaciones diferentes de donde proceden los an- tisueros.

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

La finalidad por aclarar la asociación existente entre antígenos HLA y CAH, para prevención, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad, hace necesario ampliar la población de pacientes estudiados, incluyendo a sus familiares no enfermos, así como contar con antisueros específicos de la población mexicana.

Al resultar que no existe un marcador genético que se relacione significativamente con la enfermedad y por lo tanto de alguna procedencia étnica, se requiere buscar otros genes, como los de C4 (C4B) que probablemente estén más íntimamente ligados a los genes que controlan la expresión y función de la enzima 21-OH indispensable en la biosíntesis del cortisol y regulación de sus niveles sanguíneos. (30, 41, 45, 46)

El establecer la predisposición genética asociada ya sea a genes del sistema HLA o genes situados en esa región y cercanos a los genes de la enzima 21-OH, ayudaría a encontrar la susceptibilidad a la enfermedad en los familiares de pacientes con CAH, que pronostica y previene de una descendencia afectada, así como permitiría seleccionar el tratamiento adecuado evitando reacciones secundarias contraproducentes, al determinar si es posible, la forma y el tipo de CAH.

Lo anterior aclararía si este padecimiento tiene un origen antropológico o si es independiente de éste, comparando los resultados obtenidos con los otros grupos étnicos estudiados.

La substitución de una sola base en la secuencia del DNA que especifica el cambio de un aminoácido por otro en un punto específico de la molécula de la enzima 21-OH, podría ser - la causa de su inactividad enzimática parcial o total en un - paso de la esteroidogénesis adrenal, que conduce a la CAH.

Se ha encontrado la delección del segmento C4B;21-OHB en la región H1A, a consecuencia de entrecruzamiento y recombinación desigual entre los cromosomas homólogos (cromosoma 6), - durante la meiosis y su detección podría explicar la manifestación de la enfermedad CAH.(40,45,46)

Realizando más estudios sobre lo anteriormente mencionado usando técnicas aprobadas y controlando las variables que pudieran afectar los resultados, permitirían aclarar la asociación HLA-CAH, si existe.

En este trabajo la técnica empleada, así como el control de variables en su desarrollo, se encuentran ya establecidas en trabajos previos, por lo que, el no haber logrado determinar una asociación de CAH con antígenos HLA en la población - estudiada, es difícil asociarlo al método empleado y factores que intervinieron.

A P E N D I C E

REACTIVOS EMPLEADOS.

Solución Ficoll Hypaque estéril en frasco ambar de 100 ml de Pharmacia Fine Chemicals (Ficoll-Paque)

Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Medium 1640) Medio de cultivo enriquecido en proteínas, aminoácidos, vitaminas, sales y rojo de fenol en frasco de 500 ml con una concentración 10X y estéril de Dulbecco. El volumen deseado se prepara con agua desionizada.

Solución salina amortiguada preparada con las siguientes sales disueltas en agua desionizada y aforando a 1 litro, se ajusta el pH a 7.0 - 7.4.

NaCl	7.65 g
Na ₂ HPO ₄	1.268 g
NaH ₂ PO ₄	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.2113g

Suero Petal de Ternera en frasco de 100 ml de Microlab.

Solución de AET (dibromhidrato de b-aminoetilisotiurea) Pesar 39.34 g de AET seco, diluir y aforar a 1 litro con agua desionizada, ajustando el pH a 9.0.

Solución de Hanks preparada con agua desionizada a partir de 3 soluciones A, B y C.

Solución A :

NaCl	40.0 g
KCl	2.0 g
NaH ₂ PO ₄	0.356g
KH ₂ PO ₄	0.3 g

Glucosa	5.0 g
Na ₂ SO ₄	1.0 g
Rojo de fenol	0.085g

Se disuelve con agua desionizada y se lleva a 1 litro. -
Poner en frascos de 100 ml, 70 ml de agua desionizada y 20 ml
de solución A. Esterilizar en autoclave a 10 lb por 15 min.

Solución B :

Disolver 0.310 g de CaCl₂ en 100 ml de agua desionizada.
Esterilizar en autoclave a 10 lb por 15 min.

Solución C :

Disolver 0.7 g de NaHCO₃ en 100 ml de agua desionizada.
Esterilizar en autoclave a 10 lb por 15 min.

Al frasco con solución A añadir 5 ml de solución B y 5 ml
de solución C en condiciones asépticas. Se conserva a tempera
tura ambiente.

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

1. Bach F.H. et al. Fast, present and future aspects of histocompatibility. Trans Proc March XI(1):1207-'10. 1979.
2. Bach J.P. Inmunología. 1a ed. Ed. Limusa, S.A. México, D.F. 908p. 1984.
3. Baur M.P., Danilovs J.A. Population Analysis of HLA-A,-B,-C -DR and other genetic markers. Terasaki P.I. (ed) Histocompatibility Testing 1980. California USA 955-'93. 1980.
4. Bernice S. et al. Topics in clinical histocompatibility testing. Educational Committee of AASHT. USA 1:1-189
5. Barrett J.T. Inmunología, Inmunocquímica e Inmunobiología. 4a. ed. Nva. Editorial Interamericana, S.A. México, D.F. 507p. 1985.
6. Benjamín P. et al. Prevalence of end markers for the attenuated form of CAH and HPPH masquerading as PCOD Fer Ster 46(2):215-'20. 1986.
7. Bodmer J. et al. Histocompatibility 1984. Imm Today 5(9): 251-'4. 1984.
8. Bodmer W.F. et al. HLA. Today. Hum Imm 17:490-503. 1986.
9. Camarena O.A.E. Obtención de Antisueros Titrificadores del Sistema HLA-A,-B a partir de Placentas Humanas y Pacientes Transplantados. Tesis de Lic. Q.F.B. U.N.A.M. México, D.F. 1986.
10. Coullin et al. HLA associations in 21-OH deficiency (congenital and late-onset adrenal hyperplasia) in France. Ann NY Acad Sci 458:41-'5. 1985.
11. Chetkowski R.J. et al. The incidence of late-onset conge-

- nital adrenal hyperplasia due to 21-OH deficiency among hirsute women. J Clin End Met 58(4): 595-'8. 1984.
12. Dewailly D. et al. Clinical and biological phenotype an - late-onset 21-OH deficiency. J Clin End Met 63 (2):418-'23. 1986.
 13. Dupont B. et al. Close genetic linkage between HLA an CAH (21-OH deficiency). Lancet Dec 24:31:1308-'12.1977
 14. Festenstein H. et al. Inmunogenética Fundamental, Biología y Aplicaciones Clínicas del HLA y H-2.1a ed. Ed El Manual Moderno, S.A. México, D.F. 298p 1981.
 15. Fudenberg H.H. et al. Inmunología Básica Clínica.4a ed. Ed El Manual Moderno, S.A México, D.F. 825p. 1981.
 16. Funk A. et al. Structural aspects of the products of the human Major Histocompatibility Complex. Trans - Proc IX(4) Dec:1685-'9. 1977.
 17. Giles M.T. et al. Structure, Function and genetics of human class II molecules. Adv Imm 37:1-11.1985.
 18. Gordon V.T. et al. Genetics and biochemical variability of variants of 21-OH deficiency. J Med Gen Oct 22: 354-'60. 1985.
 19. Gorodezky C. et al. HLA frecuencias in a Mexican Mestizo Population. Tissue Antigens 14:347-'52. 1979.
 20. Gouderman M. et al. Immuno-Hematologie et Immunogenetique. 1a ed. Ed. Flammarion Medicine-Sciences, 20 rue Venfirard, Paris 6^e. 588p. 1980.
 21. Heim J.M. et al. Androgenes, stude critique du diagnostic biologique chez la femme hirsute. J Gyn Obst Rep 12:27-30. 1983.
 22. Kaplan A.I. et al. Química Clínica.1a ed. Ed. Médica Pana

- mericana, S.A. Buenos Aires, Argentina. 1737p. 1986
23. Kästelán A. et al. The HLA associations in CAH due to --
21-OH deficiency in Yugoslav population. Ann NY Acad Sci 458:36-40. 1985.
 24. Klein J. et al. The evolution of class I MHC genes. Imm Today 7(2):41-44. 1986.
 25. Knorr D. et al. Different gene defects in the SW, SV and No
Classical (NC) types of CAH. Ann NY Acad Sci 458:
71-75. 1985.
 26. Kuhnle U. et al. Virilization without adrenal hyperplasia
in 21-OH deficiency during fetal life. J Clin End Met 58(3):574-7. 1984.
 27. Lamm L.U. et al. The HLA genetic linkage group. Trans Proc Dec XI(4):1692-6. 1979.
 28. Laron Z. et al. The HLA associations in late-onset 21-OH
deficiency in Israel. Ann NY Acad Sci 458:52-64
1985.
 29. Levine F. et al. Deletion mapping of HLA and chromosome
6p genes. Proc Natl Acad Sci USA 82:3741-5. 1985
 30. Levine L.S. et al. Genetic and hormonal characterization
of cryptic 21-OH deficiency. J Clin End Met 53(
6):1192-8. 1981.
 31. Levine L.S. et al. HLA-B14 and Nonclassical 21-OH deficien
cy in a heterogeneous New York population. Ann NY Acad Sci 458:65-70. 1985.
 32. Lorenzen F. et al. Hormonal phenotype and HLA-genotype in
families of patients with CAH (21-OH deficiency) Ped Res 13:1356-50. 1979.
 33. Malissen B. Transfer and expression de genes MHC. Imm Today
7(4):106-11. 1985.

34. Margni R.A. Immunología e Inmunología Química. 3a ed. Ed. Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina. 511p 1982.
35. Mathews A.R. et al. HLA linkage to 21-OH CAH. Indian J Med Res Nov.73:676-680. 1983.
36. Navarrete C, et al. Different function and associations - of HLA-DR and HLA-DQ(DC) antigens show by serological cellular and DNA assay. Tissue Antigens Mars 25(3):130-145. 1985.
37. New M.I. Clinical and endocrinology aspects of 21-OH deficiency. Ann NY Acad Sci 458:1-25. 1985.
38. Nijenhuis L.E. et al. Three locus haplotypes interactions in the analysis of linkage disequilibrium. Tissue Antigens 26:215-226. 1985.
39. Olivares I.R.P. Importancia de los haplotipos de C (complejo tipo) en inmunobiología. Tesis de Lic. Q.P.B. - U.N.A.M. 1986.
40. Pollark M.S. et al. The immunology detection of a 21-OH - deficiency mutation HLA supertype. Am J Hum Gen 38:698-698. 1986.
41. Raum D. et al. Haplotypes human C4 with C4A > C4B. Am J - Hum Gen 36:72-79. 1984.
42. Robles J.G. Antígenos HLA y su relación con la intolerancia a la D-penicilamina y sales de oro en un subgrupo de pacientes con Artritis Reumatoide. Tesis de Lic. Q.P.B., F.E.S.C., U.N.A.M. 1984.
43. Riott I.M. Essential Immunology. 15 ed. Ed. Blackwell Scientific Publications, Boston, Palo Alto. 369p. 1984
44. Rose N.R. et al. El Laboratorio en Inmunología. 2a ed. Ed. Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina 1215p. 1984.

45. Rumsby M.C. et al. Detection of the steroid 21-OH and complement C4 genes in CAH. J Med Gen 13:204-'8. + 1986.
46. Schneider P.M. et al. Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-OH genes. J Clin Inv Sept 78: 650-'7. 1986.
47. Silva B.R. Frecuencia de antígenos del complejo HIA en una Población Mestiza Mexicana. Tesis de Lic.Q.P.R. Fac. Q.,U.N.A.M. 1983.
48. Sobel D.C. et al. Genetic associations and linkage in CAH due to 21-OH deficiency. J Ped June 98(6):1017-'8. 1981.
49. Speiser F.W. et al. Genotype and hormonal phenotype in non classical 21-OH deficiency. J Clin End Met 64(1) 86-91. 1987.
50. Strominger J.L. The human Major Histocompatibility Complex: Genes and proteins. Ann NY Acad Sci 458:262-'7. 1985.
51. Sueti P. et al. Influence of race on the predictability of mixed lymphocyte culture identity by HLA-DR matching. Trans 35(1):35-'8. 1983.
52. Sullivan K.E. et al. A model for the Transcriptional regulation of MHC class II genes. Elsevier Publications Cambridge. 289-'92. 1987.
53. Feitz N.M. Química Clínica Moderna. la ed. Ed. Interamericana, S.A. México, D.F. 990p. 1972.
54. Thomson G. et al. Statistical aspects of measuring the strength of associations between HLA antigens and disease Tissue Antigens 21:320-'8. 1983.
55. Zappacosta S. et al. The associations between CAH and HIA

in Southern Italy. Ann NY Acad Sci 458:46-51.1985⁶⁰

56. Weissman I.L. et al. Immunology. 2nd ed. Ed. The Benjamin -
Cummings Publishing Company, Inc. California USA
558p. 1984.