



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" IZTACALA "

" PATRON GENETICO DEL MHC Y DE
AUTOANTICUERPOS EN EL LUPUS
ERITEMATOSO DISEMINADO "

BO1205/96
Ej. 2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ANASTASIA MAGAÑA HERNANDEZ



MEXICO,

MARZO DE 1996.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Histocompatibilidad del Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), bajo la dirección de la Doctora Clara Gorodezky Lauferman, Jefe de dicho Departamento.

Esta tesis va dedicada muy especialmente a mis padres, Josefina y Petronio. Ellos que con su gran apoyo y confianza siempre me ayudaron y estuvieron junto a mí en las buenas y en las malas.

A mis hermanos:

Alejandra, Vicente y Penélope

A mi sobrina:

Elisa

A mi novio:

José Antonio Elias Amezcua

Por su gran cariño y apoyo moral

A mis amigos de la ENEP Iztacala

**Ania, Lucila, Adriana, Maribel, Gerardo, Gustavo y
Germán**

También agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Histocompatibilidad del Departamento de Inmunogenética y a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

Biol. Gabriela De la Rosa

Biol. Norma Bautista Matías

Q.B.P. Juan Manuel Carranza

Tec. Lab. Gonzalo Cázares

Tec. Lab. Josefina Vilchis

Srita. Ma. Haydé Díaz

A los Especialistas de la Unidad de Reumatología del Hospital General

Dr. Rubén Burgos

Dra. Carolina Duarte

A los Especialistas del Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Renato Berrón

Y muy especialmente a:

Dr. Rafael Jiménez Flores, por sus sabios consejos.

Pero el mayor agradecimiento va dirigido para la Doctora Clara Gorodezky Lauferman, por su gran apoyo en todos los aspectos; sobre todo académico y humano. Pero más que nada por estar siempre dispuesta a que uno mismo se supere día a día, ya que posee sabiduría e inteligencia lo cual la hace toda una profesional.

INDICE

	Pag.
INDICE DE ABREVIATURAS	1
I RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
1. LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO	
1.1 <i>HISTORIA</i>	3
1.2 <i>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CLASIFICACIÓN</i>	4
1.3 <i>CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS</i>	8
a) <i>Anticuerpos anti-Nucleares (ANA)</i>	8
b) <i>Anticuerpos anti-DNA</i>	11
c) <i>Anticuerpos Dirigidos Contra Ribonucleoproteínas (RNP)</i>	12
d) <i>Anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B</i>	13
1.4 <i>PATOGÉNESIS</i>	16
a) <i>Células Precursoras</i>	17
b) <i>Citocinas</i>	19
c) <i>Participación de los Linfocitos T</i>	20
d) <i>Efecto de las Hormonas Sexuales</i>	22
e) <i>Participación de los Linfocitos B</i>	23
2. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	
2.1 <i>ANTECEDENTES</i>	24
2.2 <i>LOCALIZACIÓN Y MAPA GÉNICO</i>	26
2.3 <i>ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DEL MHC</i>	27
a) <i>Moléculas de clase I</i>	27
b) <i>Moléculas de clase II</i>	31
c) <i>Moléculas de clase III</i>	33
2.4 <i>TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD</i>	33

	Pag.
<i>a) Discriminación de lo Propio y lo No Propio</i>	33
<i>b) Papel de los Linfocitos T en la Respuesta Inmune</i>	37
<i>c) Inducción de Tolerancia</i>	38
2.5 HERENCIA Y POLIMORFISMO	41
2.6 EL MHC Y LAS ENFERMEDADES	43
3. MARCADORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL LED	46
3.1 EL RECEPTOR DE T	47
3.2 LAS INMUNOGLOBULINAS	47
3.3 EL SISTEMA DE COMPLEMENTO	48
<i>a) Deficiencia de C1q, C1s y C1r</i>	49
<i>b) Deficiencias de C4</i>	49
<i>c) Deficiencias de C2</i>	50
<i>d) Factor de Necrosis Tumoral</i>	52
3.4 PARTICIPACION DEL MHC	52
<i>a) Anticuerpos anti-Ro y anti-La</i>	54
<i>b) Anticuerpos anti-fosfolípidos</i>	55
<i>c) Anticuerpos anti-RNPn</i>	55
<i>d) Anticuerpos anti-DNA</i>	57
<i>e) Anticuerpos anti-EBA</i>	57
III. OBJETIVOS	
1.1 OBJETIVO GENERAL	60
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	60
IV. HIPOTESIS	61
V. METODOS	
1.1 POBLACIONES INCLUIDAS	62
1.2 TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA DE ANTÍGENOS HLA	62

	Pag
a) <i>Obtención de Linfocitos Totales a Partir de Sangre Periférica</i>	62
b) <i>Separación de Linfocitos T y B por Columna de Nylon</i>	62
c) <i>Preparación de Microplacas para Tipificación de Antígenos HLA</i>	63
d) <i>Tipificación de Antígenos HLA Mediante la Técnica Microlinfocitotoxicidad</i>	64
1.3 DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS.	
a) <i>Determinación de Autoanticuerpos Contra DNA Nativo Mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta con Crithidas sp.</i>	65
b) <i>Determinación de Autoanticuerpos Antinucleares por el método de Inmunofluorescencia Directa.</i>	66
c) <i>Determinación de Autoanticuerpos anti-PLP Mediante el Análisis de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA)</i>	67
1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
VI RESULTADOS	72
VII DISCUSION	95
VIII CONCLUSION	102
IX APENDICE	104
<i>1.1 MATERIAL</i>	104
<i>1.2 EQUIPO</i>	104
<i>1.3 REACTIVOS</i>	105
X BIBLIOGRAFIA	109

I. INDICE DE ABREVIATURAS

LED = Lupus eritematoso diseminado
HLA = Antígenos de leucocitos humanos
MHC = Complejo principal de histocompatibilidad
ANA = Anticuerpos antinucleares
DNA = Acido desoxirribonucleico
PLP = Fosfolípido
EBA = Procolágena
RNP = Ribonucleoproteína
ssDNA = DNA de doble cadena
dsDNA = DNA de cadena sencilla
Ig = Inmunoglobulina
IgG = Inmunoglobulina G
IgM = Inmunoglobulina M
INF- γ = Interferón gamma
TNF- β = Factor de necrosis tumoral
TNF- α = Linfotóxina
Ii = Cadena invariante
HSP-70 = Proteína de choque térmico
Is = Genes de respuesta inmunológica
Ir = Genes de supresión inmunológica
TCR = Receptor del linfocito T
ATP = Adenosin de trifosfato
Th = Linfocito T cooperador
Tc = Linfocito T citotóxico
Il = Interleucina
AR = Artritis Reumatoide
LED = Lupus eritematoso diseminado
DMDI = Diabetes mellitus dependiente de insulina
VKH = Vogt-Koyanagi-Harada
EMTC = Enfermedad mixta del tejido conectivo
EA = Espondilitis anquilosante
EAE = Encefalitis alérgica experimental
NZB = Ratón experimental propenso al LED de Nueva Zelanda
DBA = Ratón experimental sano
GGB = Gammaglobulina de bovino
NOD = Ratón no obeso propenso a la diabetes
U1 = Moléculas ricas en uridina
STF = Suero de ternera fetal

I. RESUMEN

El LED es una enfermedad autoinmune multisistémica compleja que consiste de una diversidad de alteraciones así como con una variedad de manifestaciones clínicas. La etiología de la enfermedad es aún desconocida, pero es evidente la participación tanto de factores ambientales como genéticos. En estudios con distintos grupos étnicos es evidente la asociación con los antígenos HLA-DR2 y DR3 del MHC y de diferentes secuencias de DNA con la síntesis de diversos autoanticuerpos. El objetivo de este trabajo es analizar los marcadores del MHC en pacientes mexicanos con LED infantiles y adultos para saber si la enfermedad es distinta y saber si existen genes Ir en el MHC que controlen la síntesis de los diferentes autoanticuerpos. Se estudiaron 121 pacientes con LED, 71 adultos y 50 niños. La mayoría pertenecen al sexo femenino (adultos 97.2% y en los niños 90%). En los adultos son más frecuentes el daño renal y la artritis, en cambio en los niños el daño renal, artritis, anemia hemolítica, vasculitis y úlceras orales. La edad $X=30$ años en adultos y $X=15.1$ años en niños y la de inicio es $X=24.1$ y $X=11.4$ respectivamente. Se realizó la tipificación serológica de antígenos de clase I (HLA-A, B y C) y antígenos de clase II (HLA-DR y DQ) con las técnicas de microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos T y B, utilizando aloantisueros y anticuerpos monoclonales del banco de sueros del Departamento de Inmunogenética. También se realizó la determinación de autoanticuerpos anti-ANA, anti-DNA, anti-RNP, anti-PLP, anti-Sm, anti-Ro y anti-La en el Hospital General y en el Instituto Nacional de Pediatría. Los autoanticuerpos que se presentaron con mayor incidencia son los anti-DNA (87.0%), anti-ANA (85.7%) y anti-RNP (81.0%) en los adultos y anti-ANA (88%), anti-DNA (74%), anti-PLP (42%) y anti-Sm (40%) en los pacientes infantiles. Se encontró una asociación indudable con los antígenos de clase II: el DR17 en adultos ($X^2Y=24.98$, $RR=5.05$, $FE=0.28$, $p < 0.00001$, $pc=0.0003$) y en niños ($X^2Y=6.65$, $RR=2.97$, $p=0.01$) y el DQ2 sólo en los pacientes adultos ($X^2Y=15.25$, $RR=3.09$, $p=0.0008$, $pc=NS$), lo que sugiere que los genes de susceptibilidad se hallan en la región DR y dependen de secuencias particulares en el nicho, el DR17 y el DQ2 se encuentran en desequilibrio de enlace. También se encontraron genes de protección asociados en ambos grupos al DQ6 ($X^2Y=27.62$, $FP=0.32$, $p=0.00001$, $pc=0.02$) indicando que un sujeto DQ6+ tiene menos riesgo de desarrollar LED. Al

correlacionar los marcadores HLA con los autoanticuerpos para conocer posibles diferencias entre adultos y niños, se encontró un aumento de los siguientes antígenos sólo en los niños, el DR8 con anti-RNP ($X^2Y=4.18$, $p=0.04$, $RR=0.25$), el DR4 y DR12 con anti-PLP ($X^2Y=5.85$, $p=0.009$, $RR=0.13$ y $X^2Y=4.00$, $p=0.05$, $RR=0.25$ respectivamente) y el DQ4 ($X^2Y=5.46$, $p=0.009$, $RR=5.85$). Se demostró la presencia de genes Ir que controlan la síntesis de autoanticuerpos y que muestran una asociación significativa, de modo que el DR13 se asocia a la presencia de anti-DNA ($X^2Y=43.83$, $p= <0.0001$); los anti-RNP dependen del DR7 en niños ($X^2Y=17.66$, $p=0.00003$, $RR=43.47$); anti-Sm dependen de secuencias en el DQ8 ($X^2Y=5.84$, $p=0.01$, $RR=8.6$).

Los resultados del presente trabajo demuestran que el LED es clínica e inmunológicamente diferente en niños y en adultos. Sin embargo, el gen que predispone a la enfermedad como tal en ambos grupos de pacientes mexicanos es el mismo que en caucasoides y los genes Ir que informamos indican que las posiciones 14 y 70 de la cadena DQB1 y la 34 y 76 en DQA1 son probablemente sitios complementarios de unión a las secuencias Ro y La de los péptidos del DNA. Se demuestra también la importancia de conocer el patrón genético en el LED y en el control de autoanticuerpos, pues esto permitirá el manejo más racional y oportuno de los sujetos en riesgo.

II. INTRODUCCION

I LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO

1.1 HISTORIA

La mayoría de los trastornos reumatológicos comparten alteraciones inmunológicas, razón por la cual es importante conocer los mecanismos de respuesta inmunológica que ocurren en ellas, para comprender su etiopatogénesis. Una de las entidades reumatológicas más complejas es el LED descubierto por Rayer en 1850 (59). El término de lupus fue utilizado por primera vez en 1851 por Cazenave para describir a pacientes cuya enfermedad se limitaba a la piel. El observó el padecimiento en jóvenes adultos y lesiones frecuentes en la cara (59). En esta época se le consideraba una enfermedad cutánea desfigurante pero no letal. En 1872 Kaposi señaló que el salpullido se asemejaba en su forma externa a una mariposa con posibles complicaciones sistémicas, incluyendo fiebre, pleuroneumonía, coma e incluso provocar la muerte. En 1904, Osler propuso posibles complicaciones gastrointestinales y cardíacas. También se describieron lesiones cutáneas polimórficas con una artritis concomitante y se informaron varios casos de pacientes con insuficiencia renal. No fue sino hasta las décadas de entre 1920 y 1930 que el LED se consideró como una entidad clínica independiente. En 1941, fue clasificado por Klemperer, Abou, Pollack y George Baehr como una enfermedad "colágeno-vascular", es decir un padecimiento que afectaba al tejido conectivo y a los vasos sanguíneos. El 1948 Hargraves descubrió a la célula de lupus eritematoso llamada célula LE que se define como un granulocito polimorfonuclear que fagocita y trata de eliminar a los complejos inmunes formados por los núcleos y sus anticuerpos. Bajo el microscopio se ve al polimorfonuclear con los gránulos de los complejos antígeno-anticuerpo lo que posteriormente dirigió la atención hacia el estudio de los aspectos inmunológicos del LED. (59, 61, 99).

Holman y Kunkel demostraron que el suero de pacientes con LED tenía un anticuerpo con afinidad para los núcleos y específicamente para las nucleoproteínas, que se unen al DNA en los cromosomas. También se encontraron en algunos pacientes anticuerpos capaces de reaccionar con el núcleo, y observaron que uno de estos anticuerpos se unía a la nucleoproteína formando un complejo antígeno anticuerpo que es el que se halla en la célula LE. (99). La observación de que la mayoría de los pacientes

con LED desarrollaba anticuerpos frente a los antígenos propios, sugirió que se trataba de una enfermedad autoinmune. (59, 87).

Se demostró como una entidad nosológica a partir del conocimiento de una serie de manifestaciones clínicas asociadas con ciertos hallazgos patológicos característicos como las lesiones renales, del bazo y la endocarditis verrugosa bacteriana. Con el desarrollo de pruebas del laboratorio sensibles para la identificación de autoanticuerpos asociados con el LED, el espectro se modificó significativamente, pues fue posible diagnosticar las formas más leves. Después de la descripción del fenómeno de las células LE, se descubrieron otros autoanticuerpos entre los cuales se hallan los anticuerpos anti-DNA y anti-Sm dirigidos contra un componente de las ribonucleoproteínas. Se emplearon técnicas de inmunofluorescencia basadas en agregar el suero que contiene los ANA del paciente a un tejido nuclear de ratón y luego un segundo anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína. Si el paciente tiene ANA, la anti-IgG se pega a la IgG del paciente que a su vez se fija a los núcleos y se pueden observar diferentes patrones de fluorescencia. En la actualidad, se conocen numerosos autoanticuerpos dirigidos contra algunos componentes intracelulares. El descubrimiento de las células LE dio lugar al primer método inmunológico para el diagnóstico junto con la biopsia renal percutánea. Widespread comprobó usando estas pruebas que la forma generalizada es más frecuente que la cutánea llegando a la conclusión de que el LED es una enfermedad letal que en algunas ocasiones no se identifica a tiempo. (59, 113).

1.2 CARACTERISTICAS CLINICAS Y CLASIFICACION

El LED es el prototipo de las enfermedades multisistémicas autoinmunes, a diferencia de otros padecimientos autoinmunes órgano específicos, en donde se desencadena una respuesta contra el tejido específico. Las manifestaciones clínicas en el LED constan de una gran cantidad de reacciones inmunológicas así como gran heterogeneidad clínica. Se caracteriza por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra el DNA de doble cadena, contra una variedad de ribonucleoproteínas intracelulares, células hematológicas y fosfolípidos. El perfil, de autoanticuerpos difiere ampliamente entre los pacientes. Mientras algunos de estos anticuerpos dañan directamente a los tejidos, los ANA forman complejos inmunes que se depositan en el interior de los vasos, causando un daño indirecto.

Desde el punto de vista clínico el LED no presenta un sólo patrón. El inicio puede ser agudo e insidioso y se presentan muchos cambios patológicos así como diversas manifestaciones clínicas. (6, 99). Los síntomas generales son la fatiga, que puede ser desde moderada hasta severa y se observa antes de que se manifiesten otros síntomas, también ocurre en aquellos casos donde la concentración del factor C3 del complemento es baja ó después del tratamiento hasta que haya otra exacerbación de la enfermedad. En la mayoría de los pacientes hay pérdida de peso que se acompaña con un síndrome nefrítico. El daño en las articulaciones es la característica más frecuente en el LED y en algunos casos el dolor muscular precede a la aparición de una enfermedad multisistémica que puede ocurrir desde los 6 meses hasta pasados 5 años. Actualmente se sabe que puede presentarse artritis sin o con una ligera deformidad y en ocasiones con espasmo en los músculos pero la artritis erosiva es poco frecuente. Sin embargo, también se presentan nódulos reumáticos y a nivel muscular se observan casos de miositis y serositis local que son menos frecuentes. (87, 113). Las lesiones cutáneas dermatológicas ocurren en el 90 % de los casos y en el 50 % se manifiesta el típico eritema en forma de alas de mariposa y es quizá el primer signo de la enfermedad, la cual se observa frecuentemente después de exposición a los rayos del sol. En ocasiones dicha exposición origina un segundo eritema en forma de una erupción eritematosa maculopapular. (87, 99). Así mismo se encuentran lesiones de color rojo en las yemas de los dedos, en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. La erupción maculopapular normalmente aparece sin enrojecimiento o hiperpigmentación, pero en algunos pacientes persisten las lesiones que se convierten en costras y desarrollan una artropatía superficial. Esto origina eritema discoidal, que se caracteriza por la presencia de parches con adherencia queratinica. (87).

El riñón es uno de los órganos más afectados y es de las mayores complicaciones. La nefritis que ocurre en el 75% de los casos se ha confirmado en autopsia y es la manifestación más grave. Se han descrito cinco lesiones histológicas: la glomerulonefritis mesangial, focal, proliferativa difusa, membranosa y la esclerosante caracterizadas por la presencia y depósito de complejos inmunes. (87). Habitualmente no se identifican depósitos de anticuerpos antinucleares en los tejidos de los pacientes con LED, como sería de esperarse, si éstos fueran responsables directos de la patología. Una serie de trabajos experimentales en ratón, sugieren un papel patogénico directo de los complejos antígeno-

anticuerpo. Al mismo tiempo que se descubrieron los ANA circulantes en el suero de lúpicos, Mellors (61) observó depósitos de gamma globulina en los glomérulos renales y Vázquez y Dixon (61), los encontraron en las pequeñas arterias del hígado y del bazo. Los anticuerpos circulantes van principalmente contra antígenos nucleares. DNA, tanto en su forma nativa de doble cadena como en la forma desnaturalizada de una cadena y contra los complejos de DNA e histonas. Tan, y col. (102) mostraron que los niveles séricos de antígenos de DNA y de los anticuerpos correspondientes fluctuaban, sugiriendo una asociación entre la formación de complejos inmunitarios y el incremento de los síntomas. Otros han demostrado una sorprendente correlación entre las exacerbaciones de la enfermedad y la reducción de los niveles séricos del complemento, que se une a los complejos depositados en los tejidos o que son eliminados por las células reticuloendoteliales. Los complejos inmunes son mediadores importantes tanto de la respuesta vascular como de las lesiones renales, dependiendo del sitio donde se depositan (61). Las biopsias renales de pacientes con proteinuria muestran depósitos granulares de gamma globulina con complemento a lo largo de la membrana basal del glomérulo renal por donde se filtra la sangre. El engrosamiento de los glomérulos renales condujo a Klemperer en 1935 a relacionar el LED con las lesiones de la enfermedad del suero observada en los riñones de caballos que reciben inyecciones repetidas de toxoide diftérico para la obtención del antisuero (antitoxina diftérica). El papel de los complejos inmunes se aclaró hasta que una serie de experimentos demostraron su importancia en la asociación a la gravedad de la enfermedad. Se demostró que la administración a largo plazo de antígenos proteicos en los conejos desencadena lesiones glomerulares parecidas a las observadas en los riñones de los pacientes con LED. (59).

También se afectan otros órganos, como el pulmón donde puede haber desarrollo de neumonitis lúpica, el corazón que puede mostrar miocarditis originando insuficiencia cardíaca congestiva con taquicardia, trastornos del ritmo y cardiomegalia; el sistema nervioso que presenta trastornos psíquicos como: psicosis, depresión o neurológicos como: convulsiones, parálisis de nervios craneales, meningitis aseptica, migraña, neuritis periférica y oclusiones vasculares cerebrales; en los ojos hay en ocasiones una degeneración focal de la fibra nerviosa de la retina, secundaria a vasculitis retinal y escleritis. En el aparato digestivo pueden aparecer úlceras gastrointestinales, pancreatitis, hepatitis y afección al sistema

microvascular, presentando hemorragias y oclusiones subungueales, infarto de la pulpa de los dedos y úlceras atróficas. Del 5 al 10% de los pacientes con LED desarrollan sequedad en las conjuntivas del ojo, característico del síndrome de Sjögren. Además hay una serie de anomalías hematológicas, como la anemia, leucopenia, leucocitosis, linfopenia y trombocitopenia. (87, 99).

El inicio del lupus y su exacerbación se relaciona frecuentemente con factores desencadenantes específicos como las infecciones, exposición al sol, intervenciones quirúrgicas, embarazo y problemas emocionales lo que generalmente se debe a una alteración en los mecanismos inmunológicos que conlleva al daño tisular en distintos órganos internos. En realidad su origen es desconocido pero se han propuesto algunas alternativas como son la participación de factores genéticos como mecanismo central pero también otros factores importantes son las inmunodeficiencias tímicas, las deficiencias de factores del sistema de complemento y es posible que los virus sean un desencadenante ya que hay evidencias de que ciertas cepas de ratón que se infectan por algunos virus desarrollan la enfermedad en forma espontánea. (6, 113).

A pesar de que no se ha logrado esclarecer su origen, existen evidencias considerables de que los factores genéticos del hospedero juegan un papel importante en la expresión y susceptibilidad de la enfermedad. Aproximadamente del 10-12 % de los parientes de pacientes con LED tienen un riesgo relativo primario para desarrollar la enfermedad. En estudios familiares se ha visto que el riesgo relativo va del 1.7 al 3.0% en parientes de enfermos en comparación con un riesgo relativo de 0.2-0.3% en parientes de población sana. Existe una alta concordancia entre gemelos monocigóticos (24-69%) comparado con gemelos dicigóticos (2-9%) (6). También es indudable que tanto la enfermedad como ciertas alteraciones inmunológicas tienen una mayor prevalencia entre los familiares que en la población normal, la cual oscila entre 0.5% y 4%. Más aún, cada día es más clara la participación genética sobre todo asociada a algunos problemas del sistema inmunológico. (113).

Pronto se consideró al LED una enfermedad autoinmune por lo que Cohem y la Asociación Americana de Reumatismo seleccionó en 1971, un grupo de expertos para analizar detalladamente estos criterios. De tal modo que se establecieron 14 criterios para el diagnóstico en 1971 (21) del LED lo cual se muestra en el cuadro 1. Con estos criterios, se demostró que el 90% de los pacientes presenta 4 de

alguno de los 14 criterios. Algunos encontraron que el 94-96% manifiestan 4 ó más, y otros que el 67% presenta 4 de los 14 criterios. A los 7 meses de evolución los manifiesta el 79%, el 89% los manifiesta a los 2 años y el 94% los tiene instalados 7 años después. Por éstos motivos se incluyeron otros datos como, la presencia de anticuerpos contra el DNA, los anticuerpos antinucleares, las alteraciones del complemento y otros hallazgos inmunopatológicos. (21).

En 1982, gracias a las técnicas más sensibles y específicas para la determinación de los autoanticuerpos y para la realización de otras pruebas para los aspectos clínicos se modificaron los 14 criterios del LED. Esta revisión incluye a los anticuerpos antinucleares, los dirigidos contra el DNA nativo y los llamados anti-Sm, reuniendo 11 características para su diagnóstico que son los actualmente consideradas internacionalmente. Y se muestran en el cuadro 2. Por lo tanto, para propósitos de identificación de los pacientes en estudios clínicos se considera que una persona padece de LED si presenta 4 o más de los 11 criterios mencionados en un momento dado o simultáneamente durante cualquier periodo. (21, 87, 103).

1.3 CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS

Las características de importancia inmunológica en las enfermedades autoinmunes son entre otras los autoanticuerpos, que tal vez sean los causantes de la patogénesis en el LED resultando en un daño secundario a los tejidos. También puede deberse la presencia de autoanticuerpos a algún virus que desencadene una respuesta de reactividad cruzada, o puede tratarse del paso inofensivo del agente etiológico. Los pacientes con LED producen una gama de autoanticuerpos dirigidos contra elementos celulares, como el núcleo, los fosfolípidos, las ribonucleoproteínas, el DNA, etc., los cuales tienden a asociarse con diferentes subtipos clínicos lo cuales se describen a continuación (81).

a) Anticuerpos antinucleares

Están formados por todo tipo de inmunoglobulinas y van dirigidos contra el núcleo o elementos de éste. Para su identificación se utiliza el método de inmunofluorescencia indirecta, en la cual se observan criterios mencionados en un momento dado o simultáneamente durante cualquier periodo. (17, 69, 82).

CUADRO 1
CRITERIOS CLINICOS PARA LA CLASIFICACION DE LED PROPUESTA POR LA
ASOCIACION AMERICANA DE ARTRITIS REUMATOIDE EN 1971

MANIFESTACION	DESCRIPCION
1) Eritema facial	Eritema facial difuso, liso o levantado cerca del puente nasal.
2) Lesión discoidal	Parches con adherencia queratínica escalada y tapones foliculares
3) Fenómeno de Raynaud	Dos fases de color en la cara por comprobación histórica o por observación clínica. Implica alteraciones en la circulación
4) Alopecia	Pérdida del cuero cabelludo
5) Fotosensibilidad	Sensibilidad a la luz solar
6) Artritis sin deformidad	La cual se acompaña de artralgias
7) Ulceración oral o nasofaríngeal	
8) Células LE	
9) Falsas positivas a la prueba de sífilis (STS)	
10) Proteinuria profusa	
11) Distribución celular	Pueden ser eritrocitos o hemoglobina
12) Pleuritis y/o pericarditis	
13) Psicosis y/o convulsiones	
14) Anemia hemolítica y/o leucopenia y/o trombocitopenia	

Tomado de Cohem y col., 1971 (21).

CUADRO 2
ASPECTOS RELEVANTES CONSIDERADOS DESDE 1981 PARA EL
DIAGNOSTICO DEL LED

- | | |
|----------------------|--------------------------------|
| 1) Eritema malar | 7) Alteraciones renales |
| 2) Eritema discoidal | 8) Alteraciones neurológicas |
| 3) Fotosensibilidad | 9) Alteraciones hematológicas |
| 4) Úlceras orales | 10) Alteraciones Inmunológicas |
| 5) Artritis | 11) Anticuerpos antinucleares |
| 6) Serositis | |

Tomado de Tan y col. 1981, (103).

6 diferentes patrones morfológicos, 4 de los cuales tienen importancia clínica. a) El patrón homogéneo que es la expresión morfológica de anticuerpos anti-histonas las cuales aparecen en pacientes con LED inducidos por fármacos. En este patrón los núcleos tienen una coloración difusa o uniforme. (81). b) El patrón periférico o delineado es la expresión morfológica de anticuerpos anti-DNA de doble cadena que son característicos del LED en su fase activa. c) El patrón moteado refleja la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes nucleares diferentes al DNA, como son los anticuerpos anti-ENA que son dos moléculas nucleares; los antígenos Sm y los RNP que son típicos del LED. d) El patrón nucleolar se ve cuando la coloración de los núcleos es homogénea. Se ha dicho que éste antígeno puede ser precursor ribosomal de ribonucleoproteínas. Este patrón está más relacionado con escleroderma, polimiositis o dermatomiositis. Una prueba positiva de ANA debe ser interpretada con mucho cuidado porque el suero de un paciente con cualquier enfermedad reumática puede tener muchos autoanticuerpos en contra de componentes del núcleo, además de que los anticuerpos en el suero pueden tener diferentes títulos. Por otro lado, la estabilidad de los antígenos es diferente para cada uno ya que pueden fijarse a tejidos o pueden desnaturalizarse y por último los patrones que se observan parecen estar influenciados por el tipo de tejido que se utiliza como sustrato para la prueba. Esta prueba es positiva del 1 al 5% de las personas sanas ó en pacientes con varias enfermedades crónicas. (81).

b) Anticuerpos anti-DNA

Existen tres tipos importantes de anticuerpos anti-DNA en pacientes con LED. 1) anticuerpos contra DNA de cadena simple o desnaturalizado (ss-DNA); 2) anticuerpos contra DNA nativo o de doble cadena (ds-DNA); y 3) anticuerpos que reaccionan contra ambos, ss-DNA y ds-DNA. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas de tipo IgG ó IgM. En el LED se observan altos títulos de anticuerpos anti-ds-DNA, en cambio los anti-ss-DNA se presentan en pacientes con AR, hepatitis crónica activa y en el lupus inducido por fármacos. Los anticuerpos anti-ds-DNA de la alta afinidad se asocian a la presencia de enfermedad renal. (36).

c) Anticuerpos Dirigidos Contra Ribonucleoproteínas (RNP), Hacia las Unidades U₁ y Sm

Las partículas proteicas del RNA se conocen como Sm, U₁ y RNP. Las moléculas U₁ están formadas por al menos 7 proteínas con pesos moleculares que van de 12 a 65 kDa. Las partículas Sm están compuestas por las mismas 7 proteínas del RNA, U₂, U₁, U₄, U₅ y U₆ conteniendo 196, 171, 145, 120 y 95 nucleótidos, respectivamente. Los anticuerpos anti-Sm se unen a 5 diferentes partículas de RNA que contienen U, cada una con un RNA distinto y 7 proteínas comunes. Las reacciones de precipitación de U₁RNP, requieren tanto de la proteína como del RNA. En cambio la presencia de la proteína sola es suficiente para la precipitación del complejo Sm/anti-Sm. Los anticuerpos anti-U₁RNP reaccionan con epitopes de polipéptidos (sólo para la unidad U₁), de 70, 33 y 22 kDa. Las proteínas de 33 y 22 kDa se designan como péptidos A y C respectivamente. Los anticuerpos anti-Sm reaccionan contra 2 proteínas de 28 y 16 kDa que tienen en común la unidad U y se llaman B y D. La B también se conoce como B/B' debido a que hay un par péptidos de 29 y 28 kDa, respectivamente. Los anticuerpos contra los componentes del RNA, como el U₁ RNP, son poco frecuentes. Existen 3 polipéptidos más pequeños, de 12, 11 y 9 kDa denominados E, F y G. Hay una considerable sobreposición en la distribución de estas especificidades en el suero teniendo varias combinaciones de precipitinas de anti-U₁RNP y anti-Sm. Esto es normal para el suero anti-U₁RNP, que inmunoprecipita sólo U₁ RNA con una sola banda (RNAsa) sensibles a RNAsa, puede unirse fuertemente a las bandas B/B'. (81). La actividad específica anti-Sm, es contra el péptido D y en menor frecuencia contra los E. En pacientes con anticuerpos anti-U₁RNP y anti-Sm hay reactividad cruzada entre los polipéptidos A y C, porque comparten secuencias de aminoácidos, mientras que entre los péptidos B/B' y D a pesar de que tienen epitopes compartidos no hay reactividad cruzada, indicando que el epitope es conformacional. (81).

Los anticuerpos específicos contra la unidad U₂ siempre se acompañan por anticuerpos que precipitan a la unidad U₁, por lo que el RNP anti-U₂ inmunoprecipita a RNAs U₁ + U₂, mientras que el suero anti-U₁ RNP sólo precipita a la unidad U₁RNA y el suero anti-Sm precipita a las 5 proteínas de 1, 2, 4, 5 y 6 U RNAs. Esta reactividad cruzada se debe a la homología de las secuencias entre la proteína A de U₁ y B " de U₂. Las especificidades de los anticuerpos anti-Sm RNP se enlistan en el cuadro 3. (81).

En los pacientes con LED aparecen anticuerpos anti-Sm con o sin anti-U₁RNP. Los anti-U₁RNP

también son propios de la enfermedad de EMTC, que es una combinación de polimiositis y esclerosis progresiva sistémica. En ella, se han identificado anticuerpos específicos contra una proteína de 70 kDa. También existen epítopes múltiples por lo que el patrón de reactividad del suero de los pacientes con LED y con EMTC es similar y a veces idéntico. (81). Una de las asociaciones clínicas más sorprendentes es con la nefritis, pues los pacientes que sólo tienen anticuerpos anti-U₁RNP, tienen una baja frecuencia de insuficiencia renal, por lo que el predominio de éste tipo de anticuerpos sobre los anti-Sm ha sido el mejor indicador de bajo riesgo para la nefritis, mucho más que la presencia o ausencia de anticuerpos contra el péptido de 70 kDa. En el cuadro 4 se muestran algunas asociaciones clínicas y serológicas, como la relación entre anti-U₂RNP y EMTC y una alta prevalencia de polimiositis. (81).

d) Anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B

El componente Ro/SS-A, es una ribonucleoproteína nuclear y citoplasmática, conocida como hY RNA, (h = humano, Y = citoplasmico). Es rico en uridina, y está compuesto por al menos 4 especies únicas de RNA que tienen entre 83 y 112 pares de bases de las cuales 3 han sido secuenciadas. Cerca de la región helicoidal, al final de 3' y 5' cuando el hY RNA está compuesto por la proteína Ro/SS-A está protegida contra la enzima RNAsa. (81).

La proteína La/SS-B del RNA es la más compleja. En muchas células hay especies de RNA llamadas RNA 4.5S, que se unen a la proteína La/SS-B. Parece ser que la 4.5S es la primordial en el ratón y la 5.0S lo es en el humano, que es un precursor del RNA ribosomal. Hay sin embargo, muchos otros RNA también inmunoprecipitados por anticuerpos anti-La/SS-B, algunos de los cuales son moléculas precursoras del RNA de transferencia, lo cual apoya la hipótesis de que al menos todos los transductores de la RNA polimerasa III están asociados a la proteína La/SS-B. Un oligouridilo que se halla en el extremo 3' de la polimerasa III y que se une a la proteína La/SS-B pierde su antigenicidad muy rápido. Es un factor de terminación de la transcripción de la RNA polimerasa III. (81).

Existen un gran número de síndromes lúpicos asociados a la presencia de anticuerpos anti-Ro/SS-A, como el lupus eritematoso cutáneo subagudo, el eritematoso neonatal, el lupus con deficiencias de C2 y C4, fotosensibilidad, vasculitis y el síndrome de Sjögren. La presencia de anticuerpos anti-Ro/SS-A y

CUADRO 3
RELACIONES ANTIGENICAS DE ANTI-Sm RNPs

ANTICUERPOS ESPECIFICOS	EPITOPES ANTIGENICOS
Anti-U ₁ RNP	70 kDa, A (33 kDa) y C (22 kDa)
Anti-Sm	B/B' (29, 28 kDa), D (16kDa)
Anti-U ₂ RNP	A' (33 kDa) y B'' (28 kDa)

Tomado de Reichlin y col., 1985 (81).

CUADRO 4
AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS AL LED

AUTOANTIGENOS	ASOCIACION CLINICA
UIRNP	LED sólo ó asociado con polimiositis y esclerosos progresiva sistémica.
Ro/SS-A	En el lupus eritematoso subcutáneo subagudo, en el lupus eritematoso neonatal, en el LED con deficiencias de C2 y C4, en el síndrome de Sjögren, con fotosensibilidad y en la enfermedad intersticial del pulmón.

Tomado de Reichlin y col., 1985 (81).

anti-La/SS-B está restringida para el LED y el síndrome de Sjögren. La asociación clínica de los síndromes depende de la relación directa entre los anticuerpos anti-Ro/SS-A y la expresión de la enfermedad. En el cuadro 4 se muestran éstas asociaciones. (81).

1.4 PATOGENESIS

Se ha propuesto la participación de un virus como desencadenante, pero no se ha encontrado el agente causal. La enfermedad es más común en el sexo femenino y es también muy frecuente en individuos con el síndrome de Klinefelter. En modelos experimentales, se induce con estrógenos, lo cual sugiere que las hormonas modifican la respuesta autoinmune. También existen algunos fármacos que pueden inducir una enfermedad muy similar al lupus como la hidralazina o la procainamida, lo cual también sugiere la participación de agentes externos de tipo químico que puedan desencadenar la enfermedad. Adicionalmente se ha considerado que la radiación ultravioleta ó las dietas ricas en grasa, estimulan la aparición de ciertas lesiones cutáneas que pueden modificar la respuesta inmunológica y originar ó agravar tanto una afección cardiovascular como un problema renal. Todos éstos factores o agentes no son más que posibles elementos desencadenantes del proceso en la patogénesis de la enfermedad. En el LED se pueden encontrar alteraciones de casi todos los componentes del sistema inmunológico tanto humoral como celular. Hay hiperactividad de los linfocitos B y supresión de algunas funciones reguladoras de los linfocitos T y de los macrófagos, lo que conduce a la síntesis de anticuerpos diversos con acción directa en contra de autoantígenos de eritrocitos, plaquetas, fosfolípidos o linfocitos los cuales tienen un papel importante en la inmunorregulación. (113).

Los modelos experimentales como es el caso del ratón de Nueva Zelanda, han demostrado cuales son los genes involucrados y que autoanticuerpos y manifestaciones clínicas se asocian. En el cuadro 5 se muestra la localización de marcadores genéticos de susceptibilidad. (106). Los mecanismos inductores de la síntesis de autoanticuerpos incluyen la no tolerancia a lo propio, la hiperactividad de la subpoblación de linfocitos cooperadores Th1, el mimetismo molecular y la inducción de anticuerpos antiidiotipo que se unen a antígenos propios y a diferentes inmunoglobulinas. Además, hay una estimulación policlonal de células productoras de anticuerpos, seguramente favorecida por algunos

agentes patógenos. La enfermedad es evidentemente multifactorial y los autoanticuerpos pueden ser inducidos por inmunización con un antígeno extraño de reactividad cruzada con un antígeno propio. Este mecanismo conocido como "mimetismo molecular" se debe a la existencia de secuencias de aminoácidos o epítopes estructurales compartidos en la proteína propia y en la extraña. El mimetismo es responsable de algunas enfermedades como la fiebre reumática aguda, la cual se establece en individuos infectados con estreptococo β -hemolítico que tiene reactividad cruzada con alguna proteínas del miocardio. Otra fuente del mimetismo molecular son las inmunoglobulinas que han sufrido una mutación somática y que son una fuente potencial de neoantígenos. La respuesta contra determinantes antigénicos de ellas, seguidas de una inmunización por antígenos extraños resulta en la formación de anticuerpos antiidiotípicos. Si uno de los idiotipos mimetiza con un determinante del ácido nucleico, los anticuerpos antiidiotipo resultantes son simultáneamente anticuerpos antinucleares. Por lo que, tanto la reactividad cruzada debido a antígenos extraños como la ocasionada por las inmunoglobulinas propias pueden inducir la formación de autoanticuerpos. En condiciones normales el sistema inmunológico tiene la capacidad de discriminar en una forma muy eficiente lo propio de lo extraño pero también puede desencadenar respuestas autoinmunes dañinas. Hoy, hay evidencias considerables de que la deleción de linfocitos que reaccionan contra lo propio dentro del timo, el cual tiene un papel central en el desarrollo del reconocimiento de lo extraño y lo propio, ocurre en etapas muy tempranas. Este fenómeno de deleción clonal dentro del timo elimina primariamente a las células T autorreactivas que tienen alta afinidad en contra de los epítopes propios de las moléculas de clase II, llamados "epítopes dominantes". Los timocitos que no se eliminan llegan a la maduración y conforman el repertorio de los linfocitos T que van a reconocer a lo extraño, sin embargo las mismas células T podrían reaccionar a ciertos epítopes no dominantes de proteínas propias, con baja afinidad generando una respuesta contra lo propio. También existen mecanismos periféricos de tolerancia hacia lo propio y si hay defectos a este nivel, pueden desencadenar una enfermedad autoinmune, los cuales se describen brevemente. (79, 81)

a) Células Precursoras

Las células precursoras de la hematopoyesis juegan un papel importante en la instalación del lupus

CUADRO 5
DIFERENTES LOCI DE SUSCEPTIBILIDAD PARA EL LED EN EL RATON DE NUEVA
ZELANDA

CROMOSOMA	LOCUS	DAÑO	HERENCIA	CROMOSOMA	GENESCANDIDATOS
1	Lbw-7	Anti-cromatina	B dominante	1(61)	Cd28, Ctl4, bd-2, IL-10, Cfh, Elam, Grmp, Lnbr, gld
4	Lbw-2	GN/mortalidad	B dominante	4(46-65)	Bmfr, Icr, Ifa, Ifb, Tnfr2, Cenb1-rs4
5	Lbw-3	Mortalidad	W recesivo	5(88)	
6	Lbw-4	Mortalidad	B recesivo	6(60)	IL-5r, Tnfr1
7	Lbw-5	Mortalidad	W dominante	7(22)	otf2, Tgfb1, bcl-3
11	Lbw-8	Anti-cromatina	B dominante	11(30-42)	Irf1, IL-10, Cfh, gld
17	Lbw-1	Anti-cromatina/ GN/Mortalidad	BW	17(19)	I-A, Tnf
18	Lbw-6	GN/Mortalidad	W recesivo	18(49-57)	
1	Sbw-1	Esplenomegalia	B recesivo	1(61)	Cd28, Ctl4, bd-2, IL-10, Cfh, Elam, Grmp, Lnbr, gld
4	Sbw-2	GN/Mortalidad	Adicional	4(46-65)	Bmfr, Icr, Ifa, Ifb, Tnfr2, Cenb-rs4

Theofilopoulos, 1995 (106).

murino cuando se trasplantan de un ratón lúpico NZB a ratones normales DBA/2 o BALB/c irradiados. Estos animales desarrollan anticuerpos antinucleares 2 meses después. Del mismo modo, cuando se trasplantan células inmaduras de médula ósea de los NZB a los F1 de NZB y NZW, también desarrollan un título alto de anticuerpos anti-DNA, proteinuria y disminuye la supervivencia comparativamente con ratones normales. En casos de ratones irradiados y trasplantados con médula de normales, éstos quedan protegidos de la autoinmunidad. Después de las radiaciones, las células del hospedero son incapaces de despertar una respuesta autoinmune y es necesaria la presencia de las células precursoras intactas para su inducción. El lupus murino, se caracteriza por un incremento en el número de células precursoras o en la proliferación de su progenie inmediata. Esta actividad representa anomalías intrínsecas en las células precursoras o resulta de la activación de factores de estimulación ocasionada por otro tipo celular desconocido. (79). Las células de la médula ósea del ratón NZB producen una cantidad muy elevada de inmunoglobulinas y es posible contribuyan de modo importante a la exacerbación de la producción de los linfocitos B en el ratón NZB. Los defectos en la tolerancia y en la expresión anormal retroviral del ratón NZB son el resultado de un defecto en la codificación para la expresión de las células precursoras o en su maduración. (79).

b) Citocinas

Muchas de las funciones de los linfocitos, están reguladas por factores estimuladores solubles procedentes de diferentes células que se llaman genéricamente citocinas. El exceso o deficiencia en la producción de ellas puede ocasionar autoinmunidad generalizada. La respuesta exacerbada de las células B de los ratones F1, (NZB x NZW) y BXSB es consecuencia de su estimulación por citocinas. En cambio el ratón lúpico MRL-*lpr/lpr* produce factores estimuladores de las células T en exceso. Además la respuesta disminuida de los linfocitos B hacia la señal de las Th en el lupus murino está bajo el control del gen *xid*. Más aún, la interleucina Il-2 funciona como factor de crecimiento de los linfocitos B probablemente porque en los NZB los linfocitos B tienen un número incrementado de receptores para la Il-2. (79). También se ha sugerido que la Il-4 tiene un posible papel patogénico en la hiperactividad de los linfocitos B en el ratón con LED, pues en el sobrenadante de líneas celulares de los ratones MRL-

lpr lpr hay una gran cantidad de anticuerpos anti-Il-4 que estimulan a los linfocitos B del ratón NZB, mientras que los ratones normales requieren de señales adicionales. El ratón NZB también es hiperrespondedor a la Il-5, lo cual se debe al incremento de linfocitos B CD5⁺. En ellos hay INF- δ circulante que es resultado de una activación policlonal de los linfocitos B. El suero de los pacientes con LED también muestra INF durante la etapa activa de la enfermedad. La síntesis de Il-2 está aumentada tanto en los ratones como en el humano con LED (79).

c) Participación de los linfocitos T

Los linfocitos T son necesarios para la síntesis de autoanticuerpos en el lupus murino, tanto *in vitro* como *in vivo*, pues la eliminación de Th-CD4⁺ retarda o previene la enfermedad. Sin embargo, no está claro que los linfocitos T representen una anomalía primaria o que sean un factor necesario en la síntesis de autoanticuerpos. Se ha sugerido que con el incremento a la edad, los ratones NZB tienen una pérdida progresiva de linfocitos Th (Th1 y Th2) pero un incremento en células amplificadoras. Sin embargo, los linfocitos B son resistentes a los efectos inhibidores de la supresión y responden a efectos estimuladores de células Th. Así, los defectos combinados pueden contribuir al incremento en la producción de autoanticuerpos. (79).

Los genotipos *lpr lpr* y *gld gld* incrementan los linfocitos T y las características de autoinmunidad. Un exceso en el número de linfocitos T, induce la activación policlonal de los linfocitos B resultando en el fenómeno autoinmune. Por otro lado, estos genotipos se asocian con anomalías en otras estirpes celulares, tal vez por alteración en las células precursoras. Los linfocitos CD4⁺, CD8⁻ se hallan muy incrementados en el ratón *lpr/lpr*. Los linfocitos T son relativamente inertes pero los provenientes de ganglios linfáticos del ratón *lpr/lpr* son heterogéneos y las células CD4⁺, CD8⁻ anormales puedan diferenciarse a células doble positivas o *vice versa*. El incremento de estas células puede ocasionar hipergamaglobulinemia. (79).

Los anticuerpos anti-T eliminan a subpoblaciones de linfocitos T causando un desequilibrio en la regulación. Pueden estimular a las células T a liberar factores cooperadores que inducen estimulación policlonal por retroalimentación positiva. El ratón NZB con propensión al lupus, tiene anticuerpos

CUADRO 6

TOLERANCIA AL CONJUGADO DE GAMMA GLOBULINA DE BOVINO, EN RATONES NZB

Timo	Médula	Manipulación Sexual	Tolerancia a los Receptores
DBA	DBA	M o F	++++
DBA	NZB	M o F	++++
NZB	DBA	M	++++
NZB	DBA	F	0
NZB	DBA	M castrado	0
NZB	DBA	F + andrógenos	++++
DBA + NZB	DBA	F	0
NZB	NZB1	M o F	0

La tolerancia es semicuantitativa: 0 = no tolerancia; + + + + = tolerancia en los ratones DBA/2 intactos

F= sexo femenino no manipulado

DBA= normales

Las hembras tratadas con andrógenos muestran

M= sexo masculino no manipulado

NZB= LED

el mismo efecto, hayan sido ooforectomizadas o

no.

Tomado de Pelfrey, 1992 (79).

dirigidos contra los linfocitos T y los timocitos contribuyendo a acelerar la enfermedad y la muerte. Los linfocitos T con receptor para un antígeno-específico pueden reconocer al autoantígeno o a uno con reactividad cruzada y estimularse produciendo citocinas que inducen la activación de las células B. (79).

Es bien sabido que la deleción de las células que reaccionan contra lo propio en el timo, son la primer barrera contra las enfermedades autoinmunes, lo cual involucra a algunos mecanismos que mantienen la tolerancia hacia lo propio, como son la anergia, la supresión y la tolerancia. La tolerancia experimental se logra presentando al antígeno, al sistema inmunológico para que con intentos subsecuentes de inmunización no haya respuesta. Por ejemplo, el ratón NZB se hace tolerante al conjugado de GGB, después de extirpar el timo en los neonatos e irradiar letalmente a los adultos F1 (NZB X NZW/2). Al reconstruir con médula ósea y timocitos de animales híbridos en todas sus combinaciones. Se observa que la tolerancia del ratón NZB proviene de los timocitos NZB anormales. Más aún, cuando los timocitos y la médula ósea de DBA son normales hay tolerancia, en cambio cuando los timocitos son NZB y la médula de DBA, se rompe la tolerancia. Aunque los timocitos NZB no son capaces de inducir la tolerancia, interfieren con ella. Es pues evidente, que la pérdida de la tolerancia hacia ciertos antígenos propios conduce a un defecto en la inmunorregulación. (Cuadro 6). (79).

d) Efectos de las Hormonas Sexuales

Los estudios en el ratón F1 propenso al LED (NZB X NZW) demuestran que cuando se administran andrógenos a muy temprana edad se desarrolla rápidamente enfermedad renal que es menos grave en el sexo masculino. Al ooforectomizar a las hembras en las 3 primeras semanas de vida éstas se masculinizan. Las bases celulares del efecto de algunas hormonas se estudiaron mediante la inducción de tolerancia. En el cuadro 6 se muestra que cuando las células DBA se administran a los receptores, tanto hembras como machos muestran tolerancia y al administrar sólo células del NZB no se establece tolerancia ni en machos ni en hembras. Sin embargo, cuando se combina el timo de NZB con médula de DBA, los machos se hacen tolerantes mientras que las hembras no, lo cual demuestra los efectos de las hormonas sexuales. El tratamiento con andrógenos en las hembras da un patrón masculinizado de tolerancia y la castración de los machos da un patrón femenino sin tolerancia. Esto sugiere que un

defecto en los NZB es suficiente para que una hembra se haga susceptible a las anomalías de tolerancia hacia lo propio que permita el desarrollo de la enfermedad. En contraste, los machos no están predispuestos a dichas anomalías en presencia de un defecto celular. Es importante enfatizar que los andrógenos no protegen a los machos cuando éstos tienen células de timo y de médula ósea de ratones NZB. Cuando la predisposición genético-celular es modesta, los andrógenos pueden retardar o prevenir la enfermedad, pero cuando es homocigótica, los andrógenos son menos capaces de evitar la enfermedad. Estos hallazgos son valiosos para explicar la distribución de sexos en el humano. Así si los individuos tienen una gran predisposición, los andrógenos no los protegerían y aproximadamente la mitad serían hombres. Si algunos individuos fueran poco susceptibles, la mayoría en este segundo grupo serían mujeres y los hombres estarían protegidos. Esto explicaría una enfermedad severa en hombres, aunque son la minoría, lo cual indicaría que pueden existir factores ligados al cromosoma Y que los predispone a la severidad. (79).

c) Participación de los Linfocitos B

Cuando se estimula policlonalmente a los ratones propensos a la autoinmunidad, la enfermedad se acelera. Si se combinan factores activadores de las células B con una timectomía neonatal, se producen anticuerpos anti-DNA. Los ratones lúpicos tienen un número incrementado de células productoras de anticuerpos en el bazo y de inmunoglobulinas. En el bazo hay un gran porcentaje de linfocitos B que secretan anticuerpos capaces de reconocer antígenos convencionales y autoantígenos como el DNA, la miosina y antígenos de superficie de los linfocitos T. La expansión policlonal temprana en el ratón puede ser el resultado de un defecto primario o de la maduración de los linfocitos B. (79).

La autoinmunidad y las células B autorreactivas aumentan con el incremento de la edad, lo cual en ratones normales ocurre en una proporción mínima. Se propone una mutación somática seguida de la estimulación por un antígeno que origine la expansión de células productoras de anticuerpos anti-DNA. En los híbridos F1 ((NZB X (NZB X NZW)) se observa una importante correlación entre la activación policlonal en ratones de 3 meses de edad con el desarrollo de glomerulonefritis. (79).

2. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

2.1 ANTECEDENTES

Los primeros trabajos del MHC humano fueron inspirados en el sistema H-2, MHC del ratón, descrito en 1945 por Gorer. (39). Aunque Moeschlin observó leucoaglutininas que eran anticuerpos inducidos por amidopirina, en individuos alérgicos Dausset demostró la presencia de aloanticuerpos contra una pequeña proporción de individuos no relacionados del mismo grupo étnico (25, 26). En 1958 él mismo demostró con la técnica de leucoaglutinación la primera especificidad HLA conocida como **MAC**. Shulman desarrolló la técnica de fijación del complemento para la descripción del sistema **PLA** de antígenos de plaquetas. (27). En 1958, Van Rood, Payne y Rolfs descubrieron anticuerpos anti-leucocitos en el suero de mujeres múltiparas. Posteriormente Van Rood y Van Leeuwen describieron nuevas especificidades HLA (77) y Payne en 1964 encontró dos especificidades de la serie **LA**; **LA1** y **LA2** que segregaban en familias. (78). En 1964 después de una colaboración internacional intensa, se logró la organización del primer "Workshop" o Taller de Histocompatibilidad, donde se compararon las diferentes técnicas con el uso de los sueros que se tenían y células de diferentes individuos. En 1965 se realizó el segundo "Workshop", en el cual se compararon las diferentes especificidades descritas por parte de los distintos investigadores. (7). Así surgieron las primeras especificidades lo cual permitió su análisis genético. En ese mismo año Dausset postuló que se trataba de un sistema inmunogenético complejo análogo al sistema H-2 del ratón al que denominó sistema **Hu**, después designado HLA. (28). Al buscar el papel biológico del complejo HLA se encontró asociación entre los antígenos HLA y el linfoma de Hodgkins (28). Cepellini realizó el 3er. Workshop, en 1967 (20), en el que se estudiaron 11 familias. Weitkamp y col., demostraron la transmisión alélica de la primera y segunda serie de antígenos que se llama HLA-A y HLA-B, lo cual permitió establecer la distancia entre los dos loci mediante el análisis de familias recombinantes (115). Terasaki organizó el 4o. Workshop en 1970, (104), donde se incluyeron 300 familias. Quedó establecido que en el sistema existen dos loci polialélicos intimamente asociados. Pronto se encontró un tercer locus llamado HLA-C. (89). En 1972, el progreso del sistema HLA era suficiente para permitir una intensa investigación antropológica, lo cual fue el objetivo del 5o. Workshop, coordinado por J. Dausset y Colombani en 1973 (23). Así se confirmó la transmisión

CUADRO 7
RELACION DE LOS DIFERENTES "WORKSHOPS" REALIZADOS

AÑO	TALLER, LUGAR, ORGANIZADOR	HALLAZGOS Y AVANCES
1964	1 W. Durham: Bernard Amos	Tipificación serológica de los primeros antígenos HLA.
1965	2 W. Leiden: Jon Van Rood	Trasplantes. Descubrimiento de los antígenos HLA-A y B.
1967	3 W. Turín: Ruggiero Ceppellini	Segregación familiar. Leyes de la herencia familiar.
1970	4 W. Los Angeles: Paul Terasaki	Descubrimiento del locus HLA-C.
1973	5 W. Evian: Jean Dausset	Genética de poblaciones.
1974	6 W. Arhus Flemming Kissmeyer	Cultivo de mezcla de linfocitos (MLC). Antígenos de clase II.
1977	7 W. Oxford: Walter Bodmer	Genética de HLA clase II. Producción de anticuerpos monoclonales
1980	8 W. Los Angeles: Paul Terasaki	Tipificación serológica de HLA-DR. Análisis de haplotipos. Isoelectroenfoque. Estructura bioquímica.
1984	9 W. Munich y Viena: Ekkehard Albert y Wolf Mayr	Análisis bioquímico tipificación de HLA-D con células homocigotas (HTC). Tecnología del DNA.
1987	10 W. Princeton y Nueva York: Bo. Dupont	RFLPs. Tipificación de HLA-DP por PLT. Correlación estructura-función. Tipificación por DNA. Investigación molecular de la asociación HLA y enfermedad.
1991	11 W. Yokohama: Kimiyoshi Tsuji	PCR para tipificación de clase II. Mecanismos moleculares de las funciones de las asociaciones HLA enfermedad del rechazo y de trasplantes.
1996	12 W. St. Malo y París: Dominique Charron	Genética de Poblaciones. Antropología molecular. Tipificación molecular de genes clase I. Investigación de mecanismos moleculares de asociación.

Tomado de Gorodezky, 1994 (46).

hereditaria y la variabilidad de este sistema genético en los diversos grupos humanos. El 6o. Workshop se enfocó al descubrimiento del locus HLA-D (60). En 1965 se demostró que algunos sitios en las moléculas equivalen a especificidades públicas, cada una asociada a un antígeno privado. (94). Así los Workshops han permitido conocer profundamente al sistema HLA y su gran diversidad. En el cuadro 7 se muestra la evolución de los "Workshops" o Talleres de Histocompatibilidad y su trascendencia en el desarrollo del conocimiento del complejo HLA. (46, 94).

2.2 LOCALIZACION Y MAPA GENETICO

El MHC en el humano ocupa una región en el brazo corto del cromosoma 6 conocidas como la región HLA que codifica para la síntesis de moléculas llamadas antígenos de histocompatibilidad, íntimamente relacionadas, en sus funciones inmunológicas y su estructura. El nombre de MHC deriva de que sus productos intervienen como la barrera más importante para la aceptación del trasplante alogénico ya que las diferencias entre sus productos condicionan el rechazo agudo de tejidos. Esta región contiene además a los genes que codifican para la producción de algunos componentes del complemento, el factor de necrosis tumoral y para la enzima 21-hidroxilasa, que se encuentran junto a los genes clásicos de histocompatibilidad. La región HLA, es una región homóloga a la de otros organismos vertebrados como el ratón, el perro y el cerdo entre otras (llamados H-2, DLA y SLA respectivamente). El mapa genético del sistema HLA abarca al rededor de 4000 Kb y está compuesto por diversos genes que se observan en la figura 1. (9, 46, 109).

Los genes y moléculas del sistema HLA se dividen en tres en base a su estructura y función; clase I, clase II y clase III. Los genes clase I comprenden a los loci: HLA-A, B, C, (clase I, clásicos) y a HLA-E, F, G, H, J y X (no clásicos); Los A, B y C, se expresan en forma universal mientras que los no clásicos se hallan en la interfase materno-fetal y son antígenos de diferenciación celular. (43, 46). Los de clase II abarcan a los genes DR que incluyen a HLA-DRA y de DRB1 al DRB9. La región DQ contiene a DQA1, DQA2, DQB1, DQB2, DQB3. El locus DP alberga a DPA1, DPA2, DPB1 y DPB2. Adicionalmente se hallan DMA y DMB, DNA, DOB, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, RING1, RING2, RING3, RING9 y COL11A2. De estos se expresan los DR, DQ y DP y los TAP1, TAP2, LMP2.

LMP7, DMA y DMB. (18, 37, 46, 80). La región de clase III está constituida por al menos 35 genes que alcanzan 680 Kb, los cuales gobiernan la síntesis de algunas proteínas del complemento que intervienen en la activación de la respuesta inmunológica humoral. Incluye a los genes que controlan la síntesis para los factores C2 y C4 de la vía clásica y Bf de la vía alterna del complemento. Esta región también contiene a los genes CYP21A y CYP21B que codifican para la síntesis de la enzima 21-hidroxilasa. Entre las regiones de clase I y clase II se encuentran los genes para la síntesis del TNF- α y de la linfoxina TNF- β y los de la Hsp-70. (9, 72).

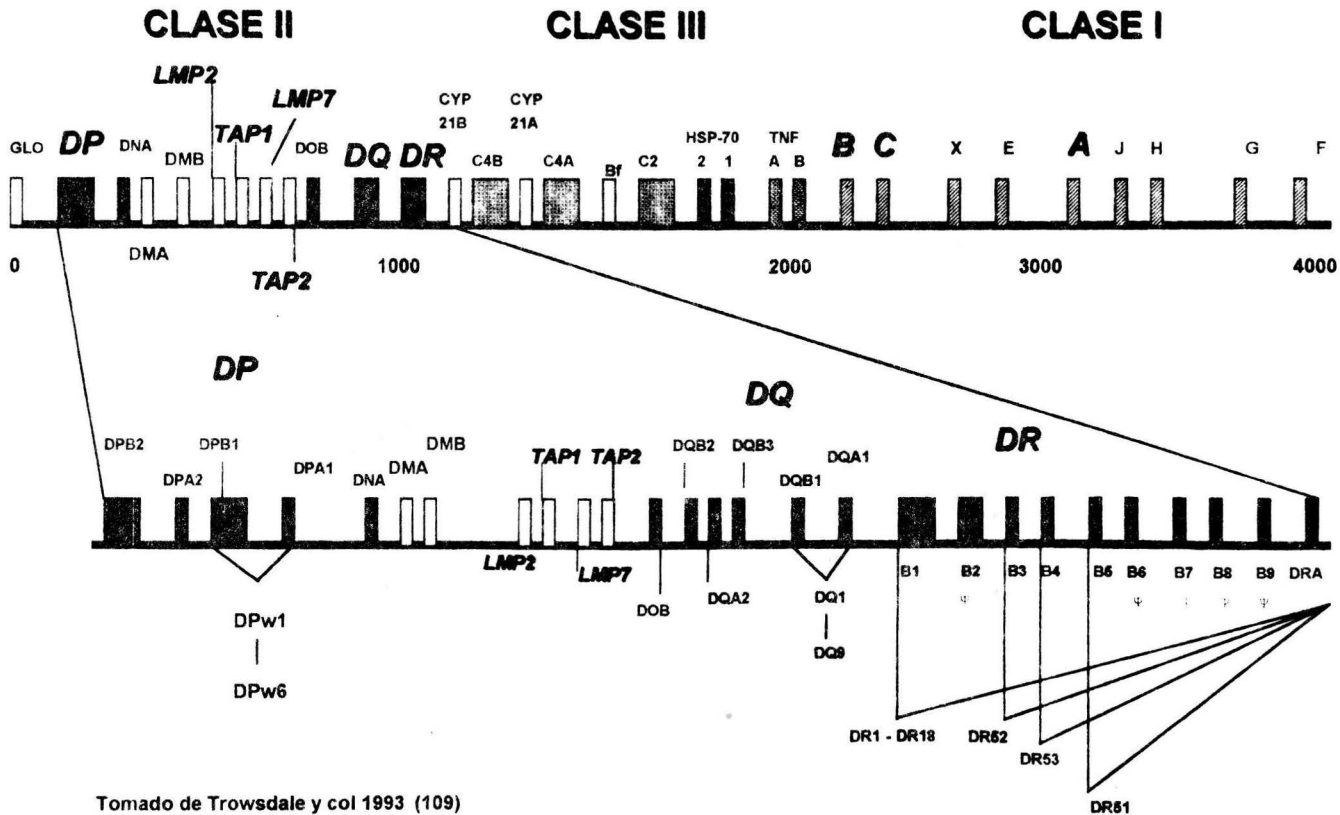
2.3 ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MOLECULAS DEL MHC

Ahora se conoce la estructura de las moléculas HLA gracias a la cristalografía de rayos X lo que ha permitido saber con precisión la estructura y las funciones de estas proteínas. Así, hoy es evidente como se unen los antígenos HLA al péptido antigénico ya procesado y como se expresan sobre la superficie de las CPAs, como los macrófagos, las células endoteliales y los linfocitos B. El procesamiento y presentación del péptido, es un proceso indispensable para la iniciación de la respuesta inmunológica contra los antígenos proteicos, ya que el receptor de los linfocitos T sólo puede reconocer péptidos anclados a la molécula MHC. Por esta razón, el papel de los antígenos HLA es el servir como mecanismo de restricción de los linfocitos T para el reconocimiento del antígeno y la inducción de la respuesta celular específica. (65, 71, 90). Las moléculas de clase I y II constan de una estructura tridimensional similar y su característica principal es que ambas presentan un sitio único de unión al antígeno, el cual está formado por una base constituida por una cadena β -plegada y en las paredes, se encuentran las cadenas α -hélice. Esta es una estructura elegantemente diseñada para llevar a cabo la función de presentar al antígeno al TCR. (96).

a) Moléculas de Clase I

La cristalografía del antígeno A2, permitió conocer en detalle la estructura fina de las moléculas de clase I. Estas son glicoproteínas polimórficas que se expresan en la membrana de todas las células nucleadas del organismo. Son heterodímeros constituidos por una cadena pesada α de 46 kD codificada

Figura 1. MAPA DEL COMPLEJO HLA



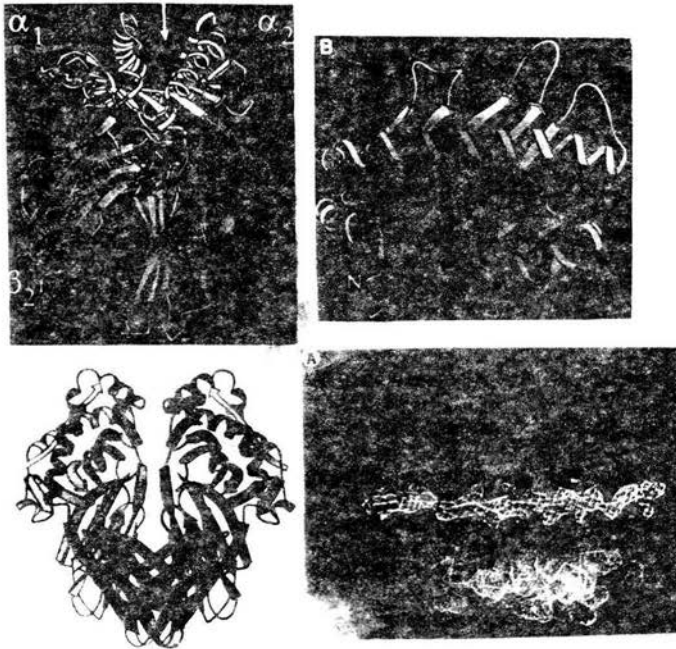
Tomado de Trowsdale y col 1993 (109)

en el cromosoma 6 y por una cadena ligera de 12 kD llamada β -2 microglobulina, codificada en el cromosoma 15, la cual está unida a la cadena α por un enlace no covalente. La β -2 microglobulina confiere estabilidad a la molécula de clase I. (18, 65, 86, 96). La cadena α consiste de 3 dominios externos llamados α 1, α 2 y α 3, el dominio transmembranal y un dominio intracitoplasmático. Tiene dos unidades estructurales extracelulares, el sitio distal de la membrana es decir, la región de anclaje al péptido formado por la íntima asociación de los dominios α 1 y α 2 que son polimórficos y la porción distal donde se encuentra el dominio α 3 que es constante. (65, 86, 96). Las unidades de los dominios α 1 y α 2 consisten de 4 secciones con una la estructura β -plegada anti-paralela que se unen por la parte final en la región carboxilo terminal de la α -hélice que consta de 35 aminoácidos. Las 4 secciones de la β -plegada de cada dominio forman una plataforma sencilla de 8 bandas, mientras que las α -hélice que la rodean se encuentran separadas una de la otra. La estructura plegada forma un nicho que mide 25 $^{\circ}$ A de largo por 10 $^{\circ}$ A de ancho y es el sitio donde se une el péptido antigénico. (96).

EL nicho está constituido por un material electrodenso, el cual no altera la estructura polipeptídica de las moléculas HLA. Este material, consiste de fragmentos antigénicos que están dentro del sitio de anclaje que se co-purifican con las moléculas HLA. El péptido que se ancla es de alrededor de 9 aminoácidos. En los antígenos del locus A, el mayor polimorfismo se encuentra agrupado alrededor del sitio de unión al antígeno, en las posiciones del 15 al 17. Además, en estas se han encontrado unas pequeñas bolsas (pockets A, B, C, D, E y F) que yacen bajo las α -hélice y que están en el nicho. De éstas, A, B, D y F son los sitios de anclaje del péptido. Esto apoya la hipótesis de que el polimorfismo ha sido seleccionado por sus diferencias funcionales, basado en la capacidad para presentar el péptido a los linfocitos T. La estructura cristalográfica también ha permitido identificar la contribución de los residuos de un aminoácido en particular a la unión del péptido y al contacto con el TCR. Los residuos que se encuentran en la pared de la α -hélice, donde se une el péptido, interactúan tanto con el péptido como con el TCR. Así los residuos sobre la base de la β -plegada interactúan predominantemente con el péptido. (96). En la figura 2 se observa la estructura de las moléculas de clase I y clase II. (63).

La formación de los heterodímeros de las moléculas clase I se lleva a cabo en el retículo endoplásmico donde capta al péptido y posteriormente la molécula se transporta al aparato de Golgi, donde se dan

Figura 2. Estructura molecular de los antígenos HLA clase I y clase II



En la figura superior del lado izquierdo se observa la cristalografía del antígeno clase I. Los dominios α_1 y α_2 son las alfa hélice que rodean al piso de la estructura beta plegada, que conforman el nicho o surco donde se une el péptido. Los nichos de clase I aceptan péptidos de 8 o 9 aminoácidos. En la figura superior del lado derecho, se observa el nicho visto desde arriba con un péptido de 8 o 9 aminoácidos en forma de espiral.

En la figura de la parte inferior izquierda se muestra la cristalografía del DR1 de clase II, se muestran dos moléculas unidas. En la figura de la parte inferior derecha se ilustra el nicho de clase II que es más flexible y acepta péptidos principalmente exógenos de 12 a 22 aminoácidos. (12, 19).

Tomado de Gorodezky, 1995 (48).

modificaciones y ocurre la glicosilación, seguida por el transporte de las moléculas a la superficie celular pasando por el retículo endoplásmico. El proceso de ensamble y transporte es dependiente de ATP y es un mecanismo endógeno de la restricción en la presentación del antígeno por parte de las moléculas de clase I. La unión del péptido derivado endógenamente, es decir péptidos que provienen de antígenos tumorales o virales tiene una importancia vital en el ensamble y el subsecuente transporte de los heterodímeros a la superficie celular. Cuando las moléculas de clase I no se expresan en la membrana junto con el antígeno, son inestables y se degradan y se internalizan rápidamente. Sin embargo, sobreviven a bajas temperaturas y pueden estabilizarse al unirse a algún péptido. Las moléculas LMP2 y LMP7 son las que cortan al antígeno en péptidos de diferentes tamaños cuando el virus o el antígeno tumoral están en el citoplasma. Una vez que esto ocurre, las moléculas TAP1 y TAP2 seleccionan y transportan al péptido hacia el retículo endoplásmico. Cuando se lleva a cabo el ensamble, tanto el péptido antigénico como la β 2-microglobulina tienen una configuración estable. Además de la interacción del péptido asociado a las moléculas clase I, con el receptor TCR los HLA también interactúan con una molécula accesoria que se encuentra en la membrana del linfocito T, llamada CD8 (6, 37, 65, 71).

b) Moléculas de Clase II

Los antígenos clase II son heterodímeros glicoproteicos que consisten de una cadena ligera llamada β de 29 kD y una cadena pesada llamada α de 34 kD. (8, 17, 28). En la región de genes clase II la organización entre intrones y exones dan lugar a la síntesis de las cadenas α y β que corresponden a los dominios funcionales. El segundo exón contiene la información que codifica para la mayoría de las secuencias donde se encuentra el polimorfismo de clase II. (8, 9, 37, 71, 96). Estas moléculas se expresan sobre la superficie de un número limitado de células, como son los linfocitos B, linfocitos T cooperadores, monocitos, macrófagos y en general sobre todas las CPAs. Los antígenos clase II sirven como mecanismo de restricción de la respuesta celular para que los linfocitos Th presenten péptidos provenientes de antígenos exógenos al macrófago, el cual capta, internaliza y procesa al antígeno extraño. Estas proteínas, provenientes de cualquier fuente externa son procesadas y posteriormente

presentadas sobre el clase II al TCR de los linfocitos Th, formándose el complejo trimolecular clase II-peptido-TCR. Esto induce al linfocito T a proliferar y a cooperar con los linfocitos B para que éstos se transformen en células plasmáticas y produzcan los anticuerpos específicos contra el antígeno inductor. Por otro lado, los Th participan estimulando a los linfocitos T citotóxicos para que éstos ejerzan una función de citotoxicidad directa contra células tumorales o infectadas por virus, mediante la presentación del péptido sobre clase I al TCR de esta célula. (9, 65, 71, 96, 112).

Son glicoproteínas heterodiméricas que se hallan asociadas en forma no covalente. Ambas tienen dos dominios externos de aproximadamente 90 aminoácidos ($\alpha 1$ y $\alpha 2$ para la cadena α ; $\beta 1$ y $\beta 2$ para la cadena β), un dominio transmembranal y uno intracitoplásmico de alrededor de 90 aminoácidos, para cada cadena. La cadena β tiene dos puentes de disulfuro y es la más polimórfica y la α tiene sólo uno. Los estudios de infraestructura del DR1 han demostrado que la estructura es similar a la de los clase I, aunque el sitio de unión al péptido es más permisivo. (19). Las moléculas DR están codificadas por la cadena DR α y el heterodímero puede ser el producto de la unión de la cadena α que es constante con la DR $\beta 1$ dando lugar a los antígenos DR1 al DR18; con la DR $\beta 3$ dando lugar a las variantes DR52, con la DR $\beta 4$ que expresa a las del DR53 o con la DR $\beta 5$ que codifica para los subtipos del DR51. Los antígenos DQ son el producto de la unión de la cadena DQ $\alpha 1$ con la DQ $\beta 1$, ambas polimórficas y los DP son el resultado de la unión de la cadena DP $\alpha 1$ con la DP $\beta 1$, también ambas con variabilidad, pero la DP $\alpha 1$ tiene un polimorfismo limitado y la DP $\beta 1$ tiene una gran diversidad. El sitio de unión al antígeno, similar al de clase I, formado por la asociación entre los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ y el polimorfismo alélico se encuentra predominantemente en este sitio. Hay una asociación muy estrecha entre los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ y la porción NH₂-terminal, lo cual es necesario para que se lleve a cabo el apareamiento entre las cadenas para conformar a la molécula de clase II. El sitio de unión al péptido difiere del de clase I en que las moléculas de clase II tienen una configuración más abierta al final de la molécula, y por lo tanto puede acomodar péptidos más grandes en su nicho. El tamaño del péptido antigénico puede ser entre 10 y 22 aminoácidos de longitud. La vía bioquímica de la presentación del antígeno por medio de las moléculas de clase II es diferente a la de clase I. Se sabe que estas moléculas se sintetizan en el retículo endoplásmico, y las cadenas se asocian con una cadena invariante Ii, que es

una glicoproteína con un dominio transmembranal y un extremo amino-terminal citoplásmico. Hay 3 formas de la cadena Ii con dos extremos diferentes que se expresan como resultado del "splicing" ó corte alternante de los sitios de iniciación. Después de la glicosilación, las cadenas α y β , se mantienen unidas a un fragmento de la cadena Ii llamado CLIP que cubre el surco de unión al péptido con el objeto de que el clase II no capte péptidos endógenos dentro del retículo endoplásmico para que el clase I los asocie libremente. Cuando el clase II + CLIP llegan al compartimento endosomal, lugar donde el procesamiento del antígeno se lleva a cabo, las moléculas DMA y DMB se llevan al CLIP y cargan el nicho de clase II con el péptido antigénico el cual substituye al fragmento CLIP. Esto indica que la función de la Ii es cuidar a la molécula clase II desde el retículo endoplásmico hasta que llega al endosoma en donde el péptido está ya accesible por su unión al surco clase II. La función de las moléculas DM cuya estructura es muy similar a las moléculas clase II es pues la de transportar péptidos exógenos a las moléculas DR, DP ó DQ de modo que son los equivalentes de las TAP para los péptidos endógenos. (65, 80, 90, 96).

c) Moléculas de Clase III

Los genes de la región de clase III, como ya se dijo, gobiernan la síntesis de los factores C2 y C4 de la vía clásica y al Bf de la vía alterna del complemento. Esta región también contiene a los genes CYP21A y CYP21B que codifican para la síntesis de la enzima 21-hidroxilasa. Entre las regiones de clase I y clase II se encuentran los genes necesarios para la síntesis del TNF- α , de la linfotoxina TNF- β y los de la Hsp-70 (9, 72). (Fig 1)

2.4 TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD

a) Discriminación de lo Propio y lo No Propio

Existen muchas especies animales y plantas lo cual se debe a la variabilidad genética entre los organismos. Además, los miembros de determinada especie tienen un polimorfismo individual considerable a pesar de su similitud aparente. Esta variabilidad genética individual permite la adaptación con flexibilidad al medio ambiente. Uno de los mecanismos más importantes de generación del

CUADRO 8
ANTIGENOS DEL COMPLEJO HLA HUMANO

HLA-A		HLA-B		HLA-B	
Antígeno	Alelo	Antígeno	Alelo	Antígeno	Alelo
n=20	n=59	n=43	n=118		
A1	A*0101-0102	B7	B*0701-0705	B49(21)	B*4901
A2	A*0201-0217	B8	B*0801-0802	B50(21)	B*5001
A3	A*0301-0302	B13	B*1301-1303	B51(5)	B*5101-5105
A11	A*1101-1102	B64(14)	B*1401	B52(5)	B*52011-52012
A23(9)	A*2301	B65(14)	B*1402	B53	B*5301
A24(9)	A*2402-2406	B15	B*1511, 1521-1523, B*1525	B54(22)	B*5401
A25(10)	A*2501	B62(15)	B*1501, 1504-1508, B*1515, 1520, 1524	B55(22)	B*5501-5502
A26(10)	A*2601-2604	B63(15)	B*1516-1517	B56(22)	B*5601-5602
A29(19)	A*2901-2902	B70	B*1509	B57(17)	B*5701-5702
A30(19)	A*3001-3005	B71(70)	B*1510, 1518	B58(17)	B*5801-5802
A31(19)	A*31011-31012	B72(70)	B*1503	B59	B*5901
A32(19)	A*3201	B76(15)	B*1514, 1519	B67	B*67011-67012
A33(19)	A*3301-3303	B77(15)	B*1513	B73	B*7301
A34(10)	A*3401-3402	B18	B*1801-1802	B75	B*1502
A36	A*3601	B27	B*2701-2708	B78	B*7801
A43	A*4301	B35	B*3501-3510		
A66(10)	A*6601-6602	B37	B*3701		
A68(28)	A*68011-6802	B38	B*3801-3802		
A69(28)	A*6901	B39	B*3903-3905, 3907, 39011, 39013		
A74(19)	A*7401		B*39021, 39022, 39061, 3962		
		B60(40)	B*40011		
		B61(40)	B*40012, 4006, 4007		
		B40	B*4003-4005		
		B42	B*4201		
		B44(12)	B*4402-4206		
		B45(12)	B*4501		
		B46	B*4601		
		B47	B*4701		
		B48	B*4801-4802		

HLA-C	
Antígeno	Alelo
n=8	n=36
Cw1	Cw*0101-0104
Cw2	Cw*0201-0202
Cw3	Cw*0301-0304
Cw4	Cw*0401-0202
Cw5	Cw*0501
Cw6	Cw*0601-0602
Cw7	Cw*0701-0703
Cw8	Cw*0801-0803

CUADRO 8
(CONTINUACION)

HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
Antígeno	Alelo	Antígeno	Alelo	Antígeno	Alelo
n=17	n=145	n=7	n=41	n=6	n=70
DR1	DRB1*0101-0104	----	DQA1*0101-0104	----	DPA1*0103-0104
DR15(2)	DRB1*1501-1504	----	DQA1*0201	----	DPA1*02011-02022
DR16(2)	DRB1*1601-1606	----	DQA1*03011-0302	----	DPA1*0301
DR17(3)	DRB1*03011-03012	----	DQA1*0401	----	DPA1*0401-0402
DR18(3)	DRB1*0302-0305	----	DQA1*0501'-0503	DPw1	DPB1*01011-01012
DR4	DRB1*0401-0422	DQ5(1)	DQB1*0501-0504	DPw2	DPB1*0201-0202
DR11(5)	DRB1*11011-11019	DQ6(1)	DQB1*06011-06012, 0602-0609	DPw3	DPB1*0301
DR12(5)	DRB1*01201-12031	DQ2	DQB1*0201-0202	DPw4	DPB1*0401-0402
DR13(6)	DRB1*1301-1319	DQ7(3)	DQB1*0301-0304	DPw5	DPB1*0501
DR14(6)	DRB1*1401-1408	DQ8(3)	DQB1*0302	DPw6	DPB1*0601
DR7	DRB1*0701	DQ9(3)	DQB1*0303		
DR8	DRB1*0801-0811	DQ4	DQB1*0401-0402		
DR9	DRB1*09011-09012				
DR10	DRB1*1001				
DR51	DRB5*0102-0103, 0201-0203				
DR52	DRB3*0101-0301				
DR53	DRB4*01011c, 01'				

Tomado de Bodmer y col., 1994 (14), Bodmer y col., 1995 (15).

polimorfismo es el intercambio genético continuo entre los individuos de la misma especie durante la reproducción, lo cual permite que los genes interindividuales sean reconocidos como extraños. Uno de estos mecanismos es la discriminación entre "lo propio" y "lo extraño" desarrollado cuando hay invasión de un microorganismo patógeno que es reconocido como extraño y eliminado. Sólo en los vertebrados a excepción de los ciclóstomos, hay mecanismos de discriminación de lo extraño mediante el MHC, ya que este complejo sólo está presente en aquellos. (71).

El sistema HLA en el humano se caracteriza por tener un alto nivel de polimorfismo genético porque se encargan de regular la respuesta inmunológica discriminando entre lo propio y lo no propio. Los antígenos (extraños y propios) son presentados por las moléculas HLA y el complejo HLA-antígeno extraño restringe la formación de complejos HLA-antígeno propio, para discriminar lo propio de lo que no lo es. En otras palabras el antígeno extraño no puede ser reconocido por el linfocito T a menos que este asociado a moléculas HLA. Los linfocitos T son un mecanismo celular de defensa contra lo extraño. Los genes mutantes que son desventajosos para la supervivencia de la población son eliminados rápidamente (selección natural negativa) y la mayoría de los alelos existentes son el resultado de la llamada selección neutral en la cual no hay ventajas ni desventajas específicas para la supervivencia. Por otro lado, la selección natural positiva, es un proceso mediante el cual ciertas mutaciones predominan en una especie y confieren una ventaja selectiva, pero éste fenómeno no es muy común. Sin embargo, en el MHC este tipo de selección, es muy importante pues existe un alto índice de sustituciones de bases de DNA que conducen a cambios en los aminoácidos y por lo tanto a un gran número de variantes alélicas. El estudio del MHC en otros vertebrados indica que hubo un ancestro común de los alelos del MHC antes de la divergencia de los vertebrados y la diversidad del MHC ha permanecido a lo largo de la evolución. En el cuadro 8 se muestra el número de proteínas oficialmente reconocidas y el número de variantes moleculares que se han descrito hasta ahora, como se señala en el cuadro, existen 159 antígenos y 494 variantes moleculares lo que convierte al complejo HLA en el sistema más polimórfico que existe. (15, 16, 70, 71).

b) Papel de los Linfocitos T en la Respuesta Inmunológica

EL reconocimiento del antígeno por parte del linfocito T es determinante para que la respuesta inmunológica se lleve a cabo. El TCR es un heterodimero formado de una cadena α y una cadena β , cada una de 45 kDa aproximadamente que se encuentra sobre la superficie de la gran mayoría de los linfocitos T y es expresado como parte de un complejo que incluye varias subunidades de la molécula CD3, formado por 5 cadenas proteicas de soporte γ , δ , ϵ , ζ , η ó γ , δ , ϵ , ζ , η . (75). Existen dos tipos de TCR2, el ($\alpha\beta$) expresado en un 95 % de los linfocitos T y es el que tiene interacción con las moléculas HLA y el TCR1 ($\gamma\delta$) que se presenta sobre subtipos de células T CD4⁺ y CD8⁺, que reconocen a la proteína de choque térmico propia y bacteriana y que se expresan en el 5 % de los linfocitos que están en la circulación. Los genes del TCR α y γ se encuentran en el cromosoma 14 y el TCR β y δ en el 7. Tanto el TCR $\alpha\beta$ como el $\gamma\delta$ se encargan de reconocer al complejo sistema HLA-péptido. Las cadenas α y β ó γ y δ están compuestas por una región V y una región C. La región V de la cadena α está codificada por los genes V y J, mientras que la región V de la cadena β está codificada por los genes V, J y D. El gran repertorio de reconocimiento antigénico del TCR se debe al rearrreglo de cada uno de estos genes. La región V tiene 3 o 4 regiones hipervariables las cuales forman una región determinante complementaria que se une al complejo HLA-péptido. Las 5 cadenas proteicas forman una estructura de apoyo involucradas en señales de transducción es decir en la transmisión de señales para la activación de los linfocitos T. Después de que las cadenas alfa y beta del TCR se unen al complejo HLA-péptido las moléculas CD4 del Th y CD8 Tc asocian a la región constante de las moléculas HLA para reforzar la unión del complejo trimolecular (TCR-HLA-péptido) y facilitar las señales de transducción. Adicionalmente se forman dos ligandos que refuerzan la unión trimolecular, una es la unión de la molécula-1 (ICAM-1) con su ligando LFA-1 (función del linfocito asociada al antígeno-1) y el otro es con el LFA-3, LFA-2, con el CD2, quienes facilitan la adhesión celular la CPA con el linfocito T. Las enzimas tirosin cinasa como la *lck* y *lyn* son muy importantes en la activación de la función del TCR. Estas enzimas fosforilan substratos intracelulares así como proteínas de membrana (especialmente la cadena ζ) y son señales importantes de transducción durante la activación del linfocito T. Después de que el TCR reconoce al complejo MHC-antígeno, se desfosforilan las tirosin cinasas *lck* y *lyn* y se

activan por la fosfatasa tirosina CD45. Después fosforilan a muchos substratos celulares que son mediadores de señales de transducción. Esto da como resultado la degradación del fosfatidilinositol y la activación de la proteína cinasa. La activación de los linfocitos Tc requiere de la participación del complejo trimolecular HLA-clase I-péptido presentado por las CPAs. Durante la presentación del antígeno, mediada por clase II, se activan los linfocitos Tc lo cual induce la expresión del receptor para la Il-2 (Interleucina 2) sobre estas células. Sin embargo, para que un linfocito Tc madure y crezca, se requiere que el linfocito T reconozca al complejo HLA-péptido. Los precursores de los linfocitos Tc son estimulados en la presencia de la Il-2, para diferenciarse a un linfocito Tc maduro con actividad asesina que mata a la célula blanco inyectándole perforina la cual es citotóxica en presencia de iones de calcio. Existen dos subgrupos de células Th llamadas Th1 y Th2; el primer subgrupo producen Il-2 e INF- γ a través de transducción mediada por las proteínas cinasas. (71).

c) Inducción de Tolerancia

El organismo posee un sistema inmunológico muy sofisticado que se encarga de eliminar a casi todos los antígenos extraños, sugiriendo la interrogante de como se logra la no respuesta frente a los antígenos propios. El timo es el órgano central encargado de establecer la tolerancia hacia lo propio. Aún cuando algunos autores sugieren que todos los autoantígenos del organismo están presentes en el timo o puede llegar al timo desde otros tejidos a través de la circulación. Hoy día se sabe que la tolerancia inmunológica hacia un autoantígeno que no se presenta en el timo, es inducida en otros tejidos, por lo que la tolerancia hacia lo propio es controlada tanto por el timo como por el sistema periférico. Las enfermedades autoinmunes se pueden definir como el reconocimiento de autoantígenos como resultado de una falla en el establecimiento de la tolerancia hacia lo propio. Existen varias hipótesis de porqué se dan estos mecanismos que incluyen a las siguientes:

1.- Selección Clonal

La teoría se basa en que los precursores de los linfocitos T producidos en la médula ósea, viajan por la circulación hacia el timo. Estas células precursoras (CD3⁻), son inicialmente CD4⁺, CD8⁻, para después

diferenciarse a un estadio de dobles positivas, $CD4^+$, $CD8^+$ y posteriormente terminar en una célula T madura, $CD4^+$ $CD8^-$ o $CD4^-$ $CD8^+$. Esto ocurre por selección negativa y positiva en asociación con la expresión de las cadenas α y β del TCR. Por lo tanto, después de que los linfocitos T con un TCR totalmente complementario para los autoantígenos y aquellos que no tienen afinidad alguna con ellos son eliminados (por selección negativa o deleción clonal) sólo queda el repertorio clonal de los linfocitos T que sean complementarios con baja afinidad al autoantígeno ó los TCR con especificidades para lo extraño los cuales se seleccionan y expanden. Esto recibe el nombre de selección positiva. Este modelo sugiere que los linfocitos T reconocen a las moléculas HLA asociadas al antígeno extraño. Por ejemplo reconocen a los marcadores propios que han sufrido alguna pequeña alteración debido a la unión con péptidos antigénicos extraños que tienen estructuras comunes. Esta hipótesis se conoce como el reconocimiento de "lo propio alterado". Este mecanismo se ha propuesto como una hipótesis fundamental la cual tomo en cuenta a la interacción entre las moléculas HLA y las células T. Las células que presentan autoantígenos junto con las moléculas HLA en el timo se vuelven tolerantes a lo propio y probablemente son timocitos y células precursoras. El repertorio clonal de los linfocitos T difiere en cada individuo, es decir, que el repertorio de T que es seleccionado por la presentación de fragmentos peptídicos diversos, derivados de la digestión de las proteínas intracelulares propias que se unen a los alelos HLA particulares de cada sujeto, dando como resultado un espectro completamente diferente de repertorios de linfocitos T de un individuo a otro, debido a la presentación de péptidos diversos asociados a los alelos HLA distintos que porta cada quien. (71).

2 - Anergia Clonal

Este mecanismo ocurre cuando existe una clona de linfocitos T con especificidad contra un autoantígeno determinado pues tiene una falla en la inducción de la respuesta inmunológica debido a alguna disfunción. Esto significa que ciertas clonas de linfocitos T no proliferan en respuesta a las señales derivadas del TCR o a los mecanismos de regulación, aunque son capaces de responder a la $IL-2$ cuando ésta se administra exógenamente. Un ratón transgénico, puede permanecer libre de padecer cualquier enfermedad autoinmune si se le introducen antígenos HLA alogénicos. Se pueden encontrar

linfocitos T con algunas familias $v\beta$ específicas de las cadenas β con especificidad en contra de estos aloantígenos MHC pero no hay respuesta inmunológica contra ellos. La eliminación de señales del TCR, mediante el uso de anticuerpos anti-interleucina y anti-CD4 induce la anergia de las clonas de los linfocitos T que debían haber sido ya sea activadas ó eliminadas, lo cual indica que los cambios cuantitativos y cualitativos de estas señales alteran la estimulación de los linfocitos T desde la activación hasta la anergia clonal. Los linfocitos T, no responden si se agregan monoclonales anti-T sólo si el antígeno es presentado por una CPA como las células epiteliales del timo o las células pancreáticas. Esto indica que cuando la presentación es inadecuada, la consecuencia es la anergia clonal. La activación de la célula T también requiere generalmente de la presencia de señales coestimuladoras. La presentación del antígeno sin estas llamadas "segundas señales" origina una no respuesta. La interacción entre las moléculas BB-I/B7, que se expresan en las CPAs y el CD28 que se hayan sobre los linfocitos T son ésta segunda señal de coestimulación. El ligando BB-I/B7-CD28 estimula importantemente la producción de IL-2 después de su unión. Este mecanismo de anergia se presenta tanto en el timo como en la periferia. La IL-1 es un buen coestimulador de las células Th2, pero no tiene relación con la anergia clonal. (71)

3.- Supresión por los Linfocitos T

Los linfocitos T con función supresora son diferentes de los Th y de los Tc ya que su función es inhibir la fase de activación de la respuesta específica. Las células Th que ejercen supresión ó Th2 son inducidas por las mismas condiciones que inducen la anergia clonal de los linfocitos ó por una alta concentración de antígenos proteicos o de haptenos químicamente reactivos administrados sin adyuvantes ó inyectados intravenosamente. Estas condiciones de inmunización favorecen la interacción directa del antígeno con los linfocitos sin la participación de las CPAs, reconociendo de este modo los linfocitos Th2 al antígeno en ausencia de las moléculas MHC. En la mayoría de los sistemas experimentales las células que inhiben la respuesta inmunológica son $CD8^+$ cuyo crecimiento y desarrollo depende de las células $CD4^+$. En el ratón y en el humano, diferentes poblaciones de linfocitos Th2 son específicos para antígenos como las proteínas o los haptenos, o para un determinante idiótipo de los receptores de los linfocitos ó de los anticuerpos. Se desconoce aún el papel del MHC en el desarrollo y activación de los linfocitos Th2, pero

el reconocimiento del antígeno por parte de estos linfocitos no se encuentra restringido por el MHC, a diferencia de lo que sucede con la mayoría de otros linfocitos T maduros. Los linfocitos Th2 de un individuo pueden inhibir la activación de los linfocitos T con un HLA diferente de otro individuo. Estos linfocitos T pueden producir un exceso de citocinas con función inhibidora y la naturaleza y magnitud de la respuesta está determinada por la producción de estas citocinas, como es el caso del factor transformador del crecimiento β (FTC- β), que es un inhibidor potente de la proliferación de los linfocitos T y B. (1).

2.5 HERENCIA Y POLIMORFISMO

El MHC se hereda de acuerdo a la primera ley de Mendel, es decir en forma codominante y en bloques de haplotipos completos. La frecuencia de recombinación es muy baja debido a que los loci están muy cerca entre sí. Los descendientes heredan un haplotipo proveniente de uno de los cromosomas maternos y uno que viene de uno de los cromosomas paternos, conformando el genotipo que lleva la información genética de los progenitores. Cada individuo expresa al menos 12 antígenos HLA en su genotipo, de los cuales 6 vienen del haplotipo materno y 6 del paterno. Cada cromosoma contiene un antígeno del locus A, uno del B, uno del C, al menos uno del DR, uno del DQ y un DP. Una de las características más importantes del complejo HLA es que existen ciertos antígenos que tienden a encontrarse juntos en un mismo individuo, más de lo esperado, fenómeno que se conoce como "desequilibrio de enlace" o Δ . Este desequilibrio de enlace probablemente confiere una ventaja selectiva a la especie humana pues cualquier antígeno del locus A debería tener las mismas oportunidades de encontrarse en el mismo individuo con cualquier antígeno de otras regiones. Sin embargo, en la práctica hay ciertas combinaciones que existen más de lo que se espera teóricamente. Algunos ejemplos son los haplotipos A1, B8, Cw7, DR17, DR52, DQ2 ó el A3, B7, Cw7, DR15, DR51, DQ6, combinaciones preferenciales que ocurren en las poblaciones humanas mucho más de lo que se espera de acuerdo a la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg. Por ejemplo, la frecuencia del A1-B8 debiera ser el resultado de multiplicar la frecuencia de A1 por la del B8 con lo que se obtendría la frecuencia teórica del haplotipo; sin embargo al contar cuantos sujetos A1 que también son B8, está es mucho mayor, por lo tanto ésta combinación está en

desequilibrio de enlace. Se le atribuyen ventajas selectivas a este mecanismo, pues posiblemente estas combinaciones fueron seleccionadas a lo largo de la evolución en ciertos nichos ecológicos donde el tenerlas permitía un reconocimiento adecuado y por lo tanto la inducción específica de la respuesta inmunológica contra los patógenos de su medio ambiente. (9, 40, 44).

Otra característica particular del sistema HLA es su extraordinario polimorfismo, ya que el número de genes y alelos presentes en el humano es enorme. Hasta ahora se han identificado 494 genes, de los cuales, 221 pertenecen a las moléculas de clase I, 59 en el locus A, 118 en el locus B, 36 en el C; el locus E consta de 4 alelos y el locus G de 4 alelos. De las moléculas clase II se conocen 272 alelos, de los cuales 145 pertenecen al locus DR, 41 al locus DQ, 70 al locus DP, 4 al locus DMA, 4 al locus DMB, 5 al locus TAP1 y 4 al locus TAP2. Esto muestra que las poblaciones humanas tienen una gran variabilidad de frecuencias antigénicas, y que cada grupo humano es distinto a otro. (15, 16).

El MHC constituye una herramienta de enorme valor en la genética de poblaciones para el conocimiento de variantes alélicas nuevas en las tribus del mundo y es extraordinariamente útil para trazar rutas de las migraciones humanas que se han dado a lo largo del tiempo. Desde el punto de vista epidemiológico se pueden identificar genes Ir ó Is que puedan haber conferido una ventaja selectiva a las diferentes poblaciones en sus diversos nichos ecológicos. Por ejemplo, se conoce la participación de genes HLA en algunas enfermedades como la lepra, la tuberculosis, la alergia y la esquistosomiasis en diversos grupos indígenas. (40, 42). En México existe un gran número de etnias en las que se ha demostrado la presencia de antígenos HLA nuevos y otros que son marcadores característicos de individuos mexicanos aunque son obvios los genes mongoloides. Los antígenos de clase I más frecuentes son similares a los de algunos grupos indígenas de Latinoamérica. Los más frecuentes son el A2, A24, A31, A32, A33; B51, B62, B39, B60, B61 y B35; Cw3, Cw4 y Cw7. De los alelos clase II sobresalen los DR15, DR7, DR4 y DR8 en mexicanos. (22, 41, 44).

Otra de las características relevantes del MHC, es su papel central en la susceptibilidad y resistencia a un gran número de enfermedades que son poligénicas y multifactoriales. Hoy se conocen más de 500 entidades clínicas asociadas a estos genes, por lo que el complejo HLA es el sistema de elección para estudiar enfermedades con fondo genético. (43, 107, 108).

2.6 EL MHC Y LAS ENFERMEDADES

Los marcadores HLA han permitido la caracterización genética de algunas entidades clínicas heterogéneas y la descripción de factores genéticos de susceptibilidad y de resistencia que intervienen en la etiopatogénesis de una gran variedad de enfermedades. El MHC confiere susceptibilidad y/o protección a muchas enfermedades tanto autoinmunes como crónico-degenerativas e infecciosas. Las investigaciones sobre la capacidad de las moléculas HLA para presentar a los péptidos de los antígenos propios, han demostrado, que la presentación depende de la estructura polimórfica y de la región variable de las moléculas HLA. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los genes y antígenos HLA muestran la importancia de la participación de los residuos polimórficos en la susceptibilidad o resistencia para desarrollar las enfermedades asociadas a HLA. (33). Estos hallazgos han originado grandes expectativas en la búsqueda del origen del tratamiento genético y la naturaleza de los mecanismos de las asociaciones observadas. (6, 42, 43, 88, 100, 108, 107, 110).

Las enfermedades con fondo HLA pueden clasificarse en: 1) enfermedades asociadas o ligadas a las moléculas clase I, es decir antígenos HLA-A, B ó C, 2) enfermedades asociadas a clase II, 3) enfermedades que dependen de las moléculas clase III, es decir de ciertos factores del complemento ó de otros genes HLA que están dentro del MHC y 4) enfermedades unigénicas como la hiperplasia suprarrenal congénita que se debe a la delección de una secuencia de un sólo gen o las deficiencias de C2 o C4 que se deben a alteraciones en esos genes. (42, 64, 107, 108). Las enfermedades relacionadas a las moléculas de clase I se ejemplifican con el grupo de las artropatías seronegativas, con participación intensa del B27, el cual se presenta en el 90% de los pacientes caucásicos con EA en comparación con la población sana que sólo tiene alrededor del 10%. (100, 107, 108). En mexicanos en cambio, aunque la asociación también es muy intensa la frecuencia del B27 es menor que en caucásicos (69 % vs 5 % en testigos). En la EA y el síndrome de Reiter ha demostrado que ambos son precedidos muchas veces por episodios discretos de infecciones intestinales por *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* o *Klebsiella*. Estos hallazgos han sugerido como posible mecanismo de asociación al mimetismo molecular. Es posible que al instalarse la bacteria en el organismo de individuos B27+, el sistema inmunológico monte una respuesta poco eficiente contra el patógeno debido a que subtipos del antígeno B27 y la nitrogenasa de

Klebsiella pneumoniae comparten 6 residuos de aminoácidos. Esto da como resultado el "mimetismo molecular" y el proceso inflamatorio que desencadena la enfermedad. (43). El análisis molecular ha demostrado que los 8 subtipos del B27, se hallan asociados a la EA y especialmente *2705 y *2702 como lo demostró el grupo de Gorodezky para mexicanos y otros para otros grupos étnicos, lo que indica que las secuencias conservadas del B27 son los que se asocian al péptido artritogénico. (35, 62, 66, 108).

Los padecimientos autoinmunes tienen un patrón genético muy especial, lo cual ha dado lugar en años recientes a una investigación profunda de la genética de enfermedades mediadas por los linfocitos T, como la diabetes mellitus tipo I que se caracteriza por una destrucción progresiva de las células del páncreas encargadas de la síntesis de insulina. Esta enfermedad se encuentra ligada a los antígenos DR3 y DR4, que contribuyen importantemente a la expresión de la enfermedad mientras que el DR2 confiere protección. (74, 88, 110). En mexicanos también es indudable la participación de DR3, DR4, DQ8 y DR17, DQ2. (43). Otro grupo de enfermedades de tipo autoinmune incluye entre otras a la dermatitis herpetiforme que se asocia al DR3, la AR que se asocia al DR4. En cambio la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves se asocian fuertemente al antígeno DR5, mientras que el DR8 se relaciona con la artritis reumatoide juvenil. (43, 74, 75, 107, 108). Una de las enfermedades infecciosas ligadas a las moléculas de clase II es la lepra, donde participan marcadores de la región DR y DQ en la expresión de los dos polos de lepra, la lepra lepromatosa está ligada al DQ1 y la tuberculoide al DR3. (33, 36). En la tuberculosis pulmonar hay una clara participación de clase II, y en mexicanos el grupo de Gorodezky demostró que en la forma severa de la enfermedad existe un gen de susceptibilidad ligado a DR2 y uno de protección ligado a DR11. (8).

Otro tipo de enfermedades asociadas al MHC, es la enfermedad de Behçet, que se caracteriza por ser un desorden inflamatorio multisistémico que afecta a varios órganos, pero su principal característica son las lesiones oculares como la iridociclitis y la corioretinitis así como úlceras orales, lesiones en la piel y úlceras genitales. Esta se asocia intensamente al antígeno B51 que controla directamente la predisposición a la enfermedad causando hiper o hipoactividad de la respuesta inmunológica durante la presentación del péptido antigénico a los linfocitos Tc. La susceptibilidad depende de la asparagina en la

posición 63 y/o fenilalanina en la posición 67 de la tercera región hipervariable de la cadena α del B51 las cuales se encargan de regular la respuesta inmunológica y además constituyen una región crucial de los "pockets" ó bolsas del locus HLA-B, sitio importante para la unión y anclaje del péptido antigénico extraño. (71). Otra de las enfermedades con asociación al MHC es el modelo experimental para la DMDI del ratón NOD, en el que hay destrucción temprana de las células β del páncreas. El gen que confiere susceptibilidad en el ratón es el I-Ab^{NOD} acompañado por un gen normal el I-Aa^d. El polipéptido codificado por los genes de Ab^{NOD} no tiene ácido aspártico en la posición 57 de la cadena IA. En el humano hay también ausencia de ácido aspártico en esta posición homóloga de la cadena DQB1, que confiere susceptibilidad a la DMDI del hombre. Hay evidencias que sugieren que tanto el tener genes Ab^{NOD} como expresar el antígeno H-2E contribuyen al desarrollo de la DMDI en el ratón. La susceptibilidad en el ratón NOD puede atenuarse o ser eliminada introduciendo transgenes con ácido aspártico en H-2A. Utilizando una molécula H-2A^k con una serina en lugar de un ácido aspártico en la posición 57 un H-2A con prolina en lugar de histidina en la posición 56 de la cadena β . La cadena de Ab^{NOD} es la única que tiene histidina en la posición 57, lo que modifica la cadena A confiriendo protección. Esto demuestra que la participación del polimorfismo en la posición 57 en DQ y en las cadenas H-2A de las moléculas no basta para la expresión de la DMDI. (64). En el humano está claramente demostrado que participan 3 genes clase II DRB1 (pos 57 y 74), DQA1 (pos 52) y DQB1 (pos 57) y que al identificarlas se puede señalar a los individuos genéticamente en riesgo hasta en un 90%. (48).

En el hombre existen alrededor de 40 enfermedades originadas por un proceso autoinmune que afectan al 5% de la población. A pesar de que son enfermedades que pueden variar en sus manifestaciones, resultan de mecanismos inmunológicos y existe la probabilidad de que sean tratadas con intervención inmuno-específica y que en el futuro se puedan predecir. Hay una probabilidad alta de que los alelos de clase II sean los verdaderos genes de susceptibilidad en éstas enfermedades pues casi todas ellas se asocian a las moléculas de clase II. Algunas otras enfermedades se asocian a las moléculas de clase I como el linfoma de Hodkings asociado a un grupo de antígenos con reactividad cruzada: HLA-B5, B35, B15 y B18. La leucemia linfoblástica aguda con HLA-A2 y la EA con el B27. Sin

embargo, existen individuos sanos con el haplotipo ó alelo asociado a la enfermedad, lo cual parece indicar que el factor ambiental también es importante. Por ejemplo, el 32% de los pacientes caucasoides con AR no tienen el DR4, el 49% de los pacientes de con EM no tienen DR2 y el 52% de los pacientes con psoriasis no tienen DR7. Además cada enfermedad se manifiesta de modo distinto en cuanto a la edad, el sexo ó la evolución. En algunos casos, la susceptibilidad depende de epítopes compartidos de moléculas presentes en diferentes clase II. También se sabe que la mayoría de las enfermedades autoinmunes son poligénicas y multifactoriales, y que por lo tanto, los genes HLA constituyen uno de los factores de susceptibilidad. Probablemente existan otros genes distintos a HLA o genes que se encuentren en desequilibrio de enlace con el sistema HLA. (56).

Se han implicado algunos virus en la expresión de la autoinmunidad en la DMDI, se ha sugerido la infección con algunos virus como, el Coxsackie, la rubéola y citomegalovirus. En ésta enfermedad hay infiltración de células T, B y células inflamatorias y la expresión de las moléculas de clase II en las células del páncreas originando la autorrespuesta de T y la autorrespuesta y la aberrante producción de autoanticuerpos. (56).

3. MARCADORES GENETICOS INVOLUCRADOS EN EL LED

El LED ha mostrado ser desde muy al inicio de su descripción una enfermedad con un componente hereditario importante pues del 1.7 al 3% de los familiares de pacientes con lupus desarrollan la enfermedad, en comparación con un 0.2% a un 0.3% en personas no relacionadas. En gemelos monocigóticos hay una alta concordancia y el riesgo de padecer la enfermedad es del 24 al 69%, comparado con gemelos dicigóticos que es del 2 al 9%. Sin embargo, se ha visto que el LED poligénico y los genes que contribuyen están principalmente relacionados con el sistema inmunológico. (6).

En la búsqueda de marcadores genéticos, desde 1974 se describió asociación con ciertos antígenos del MHC. Entonces se postuló la participación B5 en negros, del B8 en caucasoides, del B13 y B17 en Irán del B40 en mexicanos americanos, en negros americanos se encontró incrementado el A1. (107) Sin embargo, muy pronto fue evidente que los verdaderos genes de susceptibilidad se localizan en la región de clase II. El DR2 y DR3 se hallan francamente asociados en negros americanos y el riesgo relativo del

B8 se debe a que el B8 está en desequilibrio de enlace con el DR3. En japoneses en cambio se encontró incrementado el DR4. (107).

Además se confirmó la presencia de deficiencias hereditarias de algunos componentes del sistema de complemento (C2 y C4). También hay evidencias de la participación de otros genes como son los del TCR, los de las inmunoglobulinas, citocinas, etc. Es importante hacer notar la diversidad de las enfermedades autoinmunes, la presencia de autoanticuerpos distintos, así como anormalidades de los linfocitos T y B que se encuentran en los pacientes con LED y en sus familiares. Más aún, otras enfermedades autoinmunes comparten con el LED los mismos marcadores genéticos. Adicionalmente los estudios con parientes de lupus han demostrado que el sistema HLA y las deficiencias genéticas del complemento no siempre segregan junto con la enfermedad o con las anormalidades inmunológicas, probablemente porque existe otros defectos en la inmunorregulación ya sea a nivel genético o ambiental que desencadenan el padecimiento. La enfermedad es poligénica y probablemente tiene un patrón de herencia dominante con penetrancia incompleta. La complejidad genética del LED se incrementa con la heterogeneidad serológica lo que ha estimulado el análisis de la relación entre la clínica la genética y los autoanticuerpos, que se traducen en diferentes subtipos clínicos de la enfermedad. (6). A continuación se describen brevemente los marcadores genéticos descritos hasta ahora (6, 34).

3.1 EL RECEPTOR DE T

No existe una asociación definitiva de los genes del TCR al LED pero se ha descrito un defecto en los genes TCR β en el ratón NZW. En humanos es distinto, algunos autores informan un incremento de una banda TCR α *Pst*I en los genes de *v α* en caucásicos pero no en mexicano-americanos. Frank y col., encontraron la combinación de las bandas *v β Bg*III y *v β Kpn*I elevados en los pacientes con LED que tienen anticuerpos anti-Ro comparado con los que son anti-Ro negativos. (6, 34).

3.2 LAS INMUNOGLOBULINAS

Los genes de las inmunoglobulinas también parecen contribuir al desarrollo de la enfermedad. Se han descrito asociaciones con los alotipos de la cadena pesada (Gm) de la IgG y en algunos casos con los de

la cadena ligera kappa (Km). Las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas juegan un papel importante en la susceptibilidad pues se han identificado idiotipos con reacciones cruzadas con los anticuerpos anti-DNA tanto en sus pacientes como en sus familiares. El idiotipo IdGN2 está presente en el suero de los pacientes, que tienen nefritis y lesiones glomerulares, sin correlación con los antígenos de clase II. En estudios recientes se encontró una delección homocigótica en el gen *Hum hu*, el cual codifica para el factor reumatoide en el 20% de los pacientes enfermos contra el 2% en los sujetos sanos. En el futuro próximo se tendrán datos más certeros sobre la genética de las inmunoglobulinas ya que se conocen bien los autoanticuerpos específicos. (6, 34).

3.3 EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

Los defectos genéticos del sistema del complemento, especialmente los que resultan de deficiencias completas de componentes de la vía clásica, son el ejemplo más preciso de predisposición genética a las enfermedades autoinmunes parecidas al LED. Las deficiencias homocigóticas de C1, C4 y C2 contribuyen directamente a la expresión del LED, pero también existen deficiencias de otros componentes como al inhibidor de C1 y C3 y de componentes terminales como C5-C9. Las deficiencias del complemento son defectos genéticos raros ya que muy pocos pacientes con LED las presentan además de que tienen manifestaciones clínicas atípicas. Los elementos del complemento juegan un papel importante en la formación de los complejos inmunes que contienen inmunoglobulinas del tipo IgG o IgM los cuales activan la vía clásica iniciando con la unión de C1q seguida de C1r y C1s, C4, C2 y terminando con C3b. Los agregados inmunológicos contienen C3b unido al receptor de los eritrocitos CR1(C3b/C4b), que el macrófago elimina antes de que se depositen en órganos muy vascularizados como el hígado o el pulmón. La deficiencia de cualquiera de los componentes del sistema de complemento permite la formación de complejos inmunes solubles dañinos que si no se eliminan se depositan en el interior de los vasos o en los tejidos. En el primer caso propician la coagulación intravascular. Desafortunadamente, no se ha logrado precisar la etiología de la enfermedad para saber si éstos defectos ocurren debido a un virus que actúa como agente iniciador o a defectos en los mecanismos de inmunorregulación. (6, 34, 67).

a) Deficiencias de C1q, C1s y C1r

El C1q asociado a C1s y C1r que son derivados del primer componente C1, están constituidos por genes localizados en el cromosoma 1p que codifican para las cadenas C1q A, B, y C. En el mismo cromosoma pero lejos del loci C1q, se encuentran los genes reguladores de la activación del complemento (RCA), incluyendo a CR1, CR2, la proteína de unión del C4, el factor del decaimiento de la aceleración (DAF), el cofactor de membrana y el factor H. Las bases moleculares de la deficiencias de C1q se definieron en un paciente con una mutación puntual en el residuo 150 de la cadena β que parece ser un codón de terminación. Hay pocos pacientes con deficiencia de C1q, aunque los que la tienen presentan eritema malar, fotosensibilidad, glomerulonefritis con depósito de complejos inmunes, anticuerpos anti-Ro y ANA en menor proporción. (6, 67).

Los genes que codifican para C1s y C1r se encuentran en el cromosoma 12 y las deficiencias aparecen juntas pero todavía no se han logrado determinar las bases moleculares de dichas deficiencias. Dentro de las manifestaciones que se relacionan con ellas se encuentra la fotosensibilidad y la glomerulonefritis, y en menor proporción la presencia de anticuerpos anti-Sm. (6, 67).

b) Deficiencias de C4

Los genes que codifican para el componente C4 se encuentran en el cromosoma 6. C4 contiene los loci C4A y C4B, con un alto grado de polimorfismo. Entre C4A y C4B hay 12 aminoácidos diferentes, la mitad de los cuales se encuentran alrededor de la unión de un tioester. C4A difiere funcionalmente de C4B en su avidez para unirse a grupos amino, tal es el caso de la unión a complejos inmunes, mientras que C4B muestra mayor preferencia por los grupos carboxilo, como los que se encuentran en los eritrocitos. Las deficiencias heterocigóticas tanto de C4A como de C4B (alelos C4A o C4B nulos, o C4A*QO o C4B*QO) son comunes en la población normal, con una frecuencia del 18% y 15% respectivamente sobre todo cuando segrega con la enzima 21-OHA el haplotipo HLA-B8, DR3. Sin embargo, es raro encontrar los alelos nulos de C4A y C4B juntos en el mismo haplotipo. La deficiencia total de C4 es muy rara, pues se requiere de una disfunción o de la presencia de alelos nulos, ya sea C4A o C4B. En el caso de los heterocigotos, las deficiencias son menores. En individuos con alelos C4A

nulos sin delección, las mutaciones puntuales son causa frecuente de secuencias no codificadoras de alelos C4A generados probablemente por conversión de genes con C4B. Cuando hay deficiencia total de C4, puede haber una gran variedad de defectos moleculares que ocasionan disfunción de los genes de C4A y C4B. La deficiencia de C4 y la pérdida o disminución de sus niveles normales parecen predisponer al LED. (6). La deficiencia se asocia a la presencia de glomerulonefritis, anticuerpos anti-DNA y anti-Ro. Las deficiencias homocigóticas de C4A se presentan de un 10 a un 15% de los pacientes y en un 0-2% en los sanos. Inicialmente no estaba claro, si el alelo C4A nulo predispone "per se" ó porque se encuentra en desequilibrio de enlace con los genes HLA B8 y DR3. Posteriormente se encontró ésta deficiencia en otros haplotipos de varios grupos étnicos como en los negros americanos, japoneses, chinos y mexicanos. Por lo tanto, el alelo C4A nulo sí confiere cierto riesgo al LED, pero la participación del C4B nulo no es clara. El haplotipo con delección es el HLA-A1, B8, DR3, C4AQ*0, C4B1, C2-1, BfS. El C4A6 es poco común pero participa en la activación de la C3 convertasa. Esta anomalía se debe a la sustitución de una arginina por un triptófano en la posición 458 de la cadena β de C4A6. (6, 114, 117).

c) Deficiencia de C2

El gen que codifica para la proteína C2 también se encuentra en la región MHC de clase III, cerca de los genes para el factor B, con el cual comparte cierta homología. C2 no es muy polimórfico y el alelo más común es el C2 nulo (C2*Q0), que segrega en el haplotipo HLA-A25, B18, DR2. A nivel molecular existe un defecto en la pretraducción, lo cual impide la síntesis de C2. Existen deficiencias homocigóticas de C2 se presentan de un 0.0025% a un 0.01% en la población normal, y deficiencias heterocigóticas de un 1-2%. Arnett y col. no encontraron ninguna deficiencia homocigótica, pero sí heterocigótica, en un 6% de lúpicos. Cuando hay deficiencias homocigóticas de C2, asociada a un síndrome cutáneo dominante, la nefritis es poco frecuente, mientras que los anticuerpos anti-Ro se encuentran en un 70% de los pacientes. (6, 117). En el cuadro 9 se muestran las deficiencias de algunos elementos del sistema de complemento relacionados con el LED.

CUADRO 9
DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO ASOCIADOS A SINDROMES LUPICOS

COMPONENTE DEL COMPLEMENTO	LOCALIZACION CROMOSÓMICA	RIESGO RELATIVO
C1q	1p	Alto
C1r-C1s	12p	Alto
C4 total	6q (MHC)	Alto
C4A nulo homocigótico	6q (MHC)	Alto
C4A nulo heterocigótico	6q (MHC)	Moderado
C2 nulo homocigótico	6q (MHC)	Moderado
C2 nulo heterocigótico	6q (MHC)	Bajo

Tomado de Arnett, 1992 (6).

d) Factor de Necrosis Tumoral

Los genes del TNF α y β se encuentran en la región de clase III del sistema MHC. En el LED existen niveles bajos de TNF asociados al gen TNF α en desequilibrio de enlace con los genes HLA-DR2, DQ1, mientras que los altos niveles se relacionan con el haplotipos HLA-DR3 y DR4 (6).

3.4 PARTICIPACION DEL MHC

La primera asociación descrita del LED con un marcador HLA, fue con el B8 y se informó en 1971. Recientemente se determinó que el DR2 y DR3 están involucrados. (6). Bias y col. realizaron un estudio comparativo en 11 grupos étnicos: negros, mexicanos y caucasoides de E.U.A., caucasoides del Reino Unido, caribeños, indúes asiáticos, italianos, griegos, japoneses, chinos y taiwaneses, que hacen un total de 336 pacientes. Se incluyeron características demográficas, manifestaciones clínicas y perfil de autoanticuerpos. El resultado de éste estudio demostró que el LED es una enfermedad muy heterogénea, y que los antígenos involucrados son DR2, DR3 y DR6. En otro trabajo se observaron dos haplotipos ligados; B7-C4A3-Bf-DR2 y B8-C4AQ0-Bf-DR3, confirmando la participación de DR2 y DR3 (9, 92, 117). En el cuadro 10 se muestran los genes HLA involucrados tanto en población no relacionada como en familias.

En el LED y en otras enfermedades autoinmunes ciertos autoantígenos cuya naturaleza es pobremente conocida, inducen respuestas anormales dependientes de linfocitos T en el contexto de moléculas MHC. El polimorfismo HLA determina que el péptido se una al nicho de las moléculas clase II y esto tiene un papel crítico en la autoinmunidad. Puede ser que ciertas secuencias polimórficas sean importantes para la formación de autoanticuerpos específicos en los pacientes. En cualquier asociación de la enfermedad con DR17, podrían haber secuencias que confieran susceptibilidad y que estén presentes en los alelos del DRB1 en el gen DRB3 (DR52), o en el resto del haplotipo, DQB1*0201 o DQA1*0501. Estas asociaciones haplotípicas pueden ser diferentes, especialmente en otros grupos étnicos. (6, 10, 11, 30, 83, 84, 85). En el cuadro 11 se pueden observar los distintos antígenos HLA así como los haplotipos asociados al LED en algunos grupos étnicos.

CUADRO 10
ASOCIACION GENETICA DEL MHC CON EL LED EN POBLACION NO
RELACIONADA Y SEGREGACION EN FAMILIAS

POBLACION	ANTIGENO O HAPLOTIPO	REFERENCIA
Caucasoides	B5, B8 DR2, DR3 B8, DR3, DQ2	Szegedi, 1978 (101) Grumet, 1971(52). So AKL, 1990 (97). Hartung, 1992 (54).
Negros de EUA	A1, DR2, DR17(3)	Goldberg, 1976(49) Reveille, 1989(82)
México-Americanos	B40, DR3	Nies, 1974 (73), Reveille, 1994 (85).
Iraníes	B13, B17	Davatchi, 1977 (29).
Ingléses	B8, DR2; DR3	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Alemanes	B8	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Austriacos	B8, DR3	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Suecos	B8, DR3	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Finlandeses	B8, DR3	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Mexicanos	B13	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Blancos de EUA	DR2, DR3	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Australianos	DR3	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Japoneses	DR2, DR4	Tiwari y Terasaki, 1985 (108).
Daneses	DR3, DR6	Cowland, 1994 (124).
Chinos	DR2	Hawkins, 1979 (55).
Escandinavos	DR2	Skarsvag, 1992 (93).
Españoles	B18, DR3	Gómez JR, 1991 (50).
Alemanes	DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602	Bettinotti 1993 (10).
Negros de EUA	DRB1*0501/3, DRB5*0101	Bias, 1992 (11).
Japoneses	DRB1*0501, DRB5*0101 DQB1*0602	Bias, 1992 (11).
México Americanos	DRB1*0301, DRB1*0501/3, DRB5*0101	Reveille, 1994 (85).
Caucasoides Europeos	DRB1*0301, C4A*QO DQA1*0501-DQB1*0201	Reveille, 1991 (83).
Caucasoides, Centro de Europa, Chinos, Japoneses	DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602	Dong y col., 1993 (30).
Negros de EUA	DRB1*1503, DQA1*0102, DQB1*0602	Reveille y col., 1991 (84).

Desde los inicios del estudio del LED, se le atribuyó a los autoanticuerpos la causa principal del daño a los órganos vascularizados. Primeramente se encontraron autoanticuerpos anti-DNA, ANA y luego se identificaron los anti-PLP, anti-Ro, anti-La y anti-Sm, los cuales se hayan en los pacientes en forma heterogénea. En el cuadro 11 se muestran los distintos autoanticuerpos identificados en el LED y las manifestaciones clínicas relacionadas (6). A continuación se describe la correlación genética del MHC con la autoinmunidad.

a) HLA y autoanticuerpos anti-Ro y anti-La

Los anticuerpos anti-Ro presentes en 25-50% de los pacientes como ya se mencionó, se dirigen contra una ribonucleoproteína nuclear o citoplásmica de función desconocida asociados a una erupción en la piel debida a la fotosensibilidad. Además los haplotipos presentan anti-La, vasculitis, citopenia hematológica, hiperglobulinemia policlonal y altos niveles del factor reumatoide IgM e IgG. Se ha sugerido la participación de DR2, DQ1 y DR3, DQ2 a anti-Ro y anti-La tanto en LED como en el síndrome de Sjögren. Se ha propuesto que la combinación de DQ1/DQ2 heterocigótica en un individuo se debe a una transcomplementación de genes, pues se ha visto que las cadenas DQ α y β pueden estar codificadas por haplotipos opuestos provenientes de los dos cromosomas, es decir en *trans*, que podrían aparearse o formar heterodímeros híbridos sobre la superficie celular. Cuando se aparean las cadenas a partir de una copia del mismo cromosoma se dice que se encuentran en *cis*. Cada persona tiene la posibilidad de tener 4 posibles heterodímeros: 2 en *cis* y 2 en *trans* provenientes de los haplotipos materno y paterno (110). En estudios *in vitro* se ha demostrado que las cadenas DQ α de DQ2 no se pueden aparear con la de DQ β del DQ3 o viceversa, pero si se pueden encontrar asociadas en la superficie celular en patologías como el LED. Por ello la transcomplementación alélica puede ser la explicación de la fuerte predisposición para desarrollar altos niveles de autoanticuerpos anti-Ro y anti-La en heterocigosis con DQ1 y DQ2. Se han encontrado con los anticuerpos anti-Ro y anti-La a los antígenos DQ6 o DQ5 del DQ1 y en el haplotipo DR17, DQ2 1 ó DQ2 2. No hay asociación con los DP (5, 6). Reveille y col. encontraron en blancos y negros a DR3 y DQ2 1 así como DQ6/DQ2 1 significativamente elevados en enfermos con este tipo de autoanticuerpos. La heterocigosis DQ6/DQ2 1

se halla en el 25% de estos pacientes con ambos autoanticuerpos. Entre los negros con anti-Ro existe el DR17-DQ2 que es un haplotipo caucasoide más que el haplotipo africano DR18-DQ4. Debido a que entre el DR17 y DR18 hay una pequeña diferencia de 4 sustituciones de aminoácidos conservados, se sugiere que el gen DRB1 no es el locus principal que confiere susceptibilidad para la síntesis anti-Ro, sino que el DQ parece ser el candidato más indicado. (6, 81). Todos los pacientes con anti-Ro y con o sin anti-La presentan ya sea uno o más de los antígenos DR3, DR2, DQ2.1 ó DQ6. Las secuencias nucleotídicas de los alelos asociados muestran que el 100% de los pacientes con anti-Ro tienen una *glutamina* en la posición 34 de la cadena DQ α 1 y una *leucina* en la posición 26 de la cadena DQ β 1, lo que contribuye al reconocimiento de esos péptidos y por lo tanto al desarrollo de la respuesta autoinmune. (6). (Fig. 3).

b) Autoanticuerpos anti-fosfolípidos

Los anticuerpos anti-PLP se presentan de un 34 a un 44% de los pacientes con LED y son los causantes de las falsas positivas en las pruebas de sífilis. Los pacientes presentan trombosis intravascular, abortos espontáneos recurrentes, endocarditis de Libman-Sacks, lívido reticularis y trombocitopenia. Savi y col. (91), informaron un incremento del DR7 en Italianos con LED y con anticuerpos anti-cardiolipinas, mientras que otros (67, 68, 69) encontraron un exceso de DR4 en ingleses y australianos. Debido a que DR7 y DR4 se encuentran en desequilibrio de enlace con el DR53, se pensó que este sería el antígeno asociado. Posteriormente se encontró asociación con el DQ7 que se encuentra en el lupus anticoagulante y en LED. Las secuencias nucleotídicas, revelan que el DQB1*0301 (DQ7), *0302 (DQ8) y el *0602(DQ6) comparten la misma secuencia de aminoácidos en las posiciones 71- 77 de la tercera región hipervariable, (Thr-Arg-Ala-Glu-Leu-Asp-Thr). (fig. 3), sugiriendo que esta región tiene un epítopo capaz de regular la respuesta autoinmune. (6).

c) Autoanticuerpos anti-RNP

Este tipo de anticuerpos, como ya se mencionó, es frecuente y va dirigido contra una pequeña ribonucleoproteína nuclear rica en uridina. Mientras los anti-Sm son específicos del LED, los anti-RNP

CUADRO 11

AUTOANTICUERPOS, AUTOANTIGENOS Y MANIFESTACIONES CLINICAS EN EL LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO

ANTICUERPO	ANTIGENO	MANIFESTACIONES CLINICAS
Anti-Ro (SS-A)	Ribonucleoproteína nuclear y citoplásmica	Síndrome de Sjögren
Anti-La (SS-B)	Factor de terminación de la transcripción de la RNA polimerasa III	Lupus cutáneo, lupus neonatal citopenias hematológicas, vasculitis, hiperglobulinemia, factor reumatoide.
Anti-fosfolípidos	Fosfolípidos	Trombosis intravascular, aborto espontáneo, hematoma, endocarditis, trombocitopenia.
Anti-Sm	Ribonucleoproteínas (RNP), U1, U2, U4, U5, U6. (B, B', D y E)	Ninguna
Anti-RNPn	Ribonucleoproteína U1 (A, C, 70kD)	Fenómeno de Raynaud, miositis, nefritis
Anti-DNAs	DNA de doble cadena	Glomerulonefritis proliferativa difusa, eritema malar, pleuritis, neumonitis, artropatía de Jaccoud
Anti-EBA	Procolágena tipo VII	Lesiones de la piel

Tomado de Arnett. 1992 (6)

se asocian a otros desordenes como escleroderma, polimiositis y EMTC. En los presencia de este autoanticuerpo hay fenómeno de Raynaud y miositis. El anti-Sm se asocia con el DR7 y anti-RNP con DR4 (6). Kaneoka y col. (57) informaron una asociación con el DR4 y DR2. Algunas secuencias en la segunda y tercera regiones hipervariables de los alelos de DRB1, DR4 y DR2, pueden compartir epítopes de susceptibilidad, en las posiciones 26, 28, 30-32, 70 y 73. En negros con anti-Sm hay asociación con el DR2-DQ6 y los anti-RNP se relacionan con DQ5 tanto en blancos como en negros y el DQ8 se haya en blancos (76). Las secuencias involucradas son el alelo DQA1*0102 del DQ6, asociado con anti-Sm que difieren del DQA1*0101 del DQ5 asociado con anti-RNP en un sólo aminoácido en la posición 34. El anti-Sm asociado con el alelo DQA1*0102 posee una *glutamina* que es neutra, mientras que el anti-RNP asociado al alelo DQA1*0101 tiene un *ácido glutámico* cargado negativamente. De modo similar, la cadena DQB1*0602 del DQ6 (asociado con anti-Sm) comparte secuencias con las cadenas del DQB1*0501 (DQ5) y DQB1*0302 (DQ8) a excepción de las posiciones 9, 57 y 87 que son conservadas y tienen sustituciones neutras. En contraste el DQB1*0602 en la posición 57 posee un *ácido aspártico* cargado negativamente (asociado con anti-Sm), mientras que en el DQB1*0501 hay una *valina* que es neutra en la posición 57 y una *alanina* neutra en la posición 57 del DQB1*0302 (asociado con anti-RNP). (Fig. 3). (6).

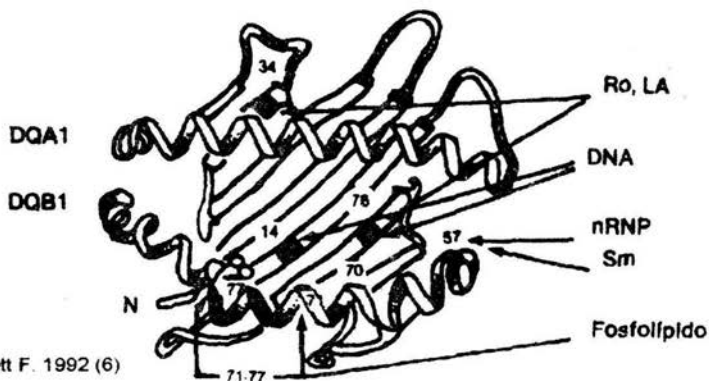
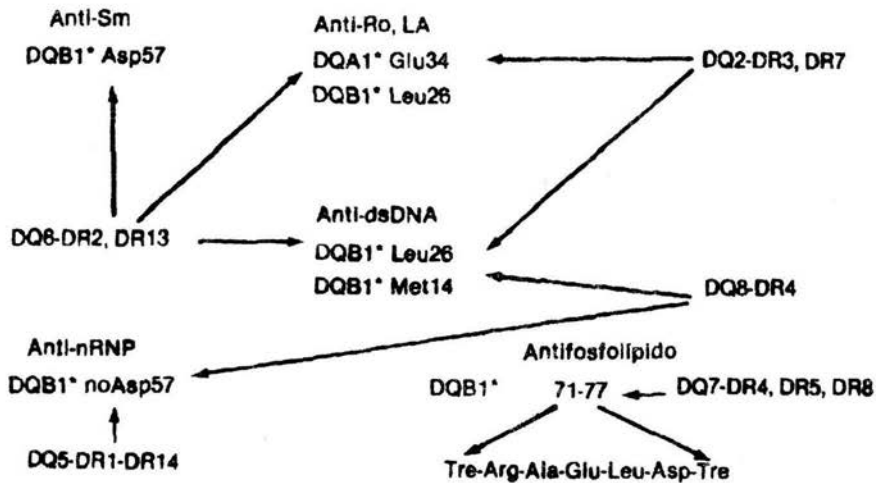
d) Autoanticuerpos anti-DNA

Estos se hayan en 40-60% y se asocian con eritema malar, serositis, neumonitis y artropatía. Se ha descrito incremento del DR3 con éste autoanticuerpo (51). Alvarellos (3) informó asociación con DR2-DQ1. Posteriormente se demostró el DR3-DQ2.1 y DQ6 (58). Los alelos DQB1*0201 y DQB1*0602 se hayan en el 90% de los pacientes con altos niveles de anti-DNA; el resto tienen DQB1*0302. Estos 3 alelos llevan *metionina* en la posición 14 y *leucina* en la posición 26. (fig. 3) En griegos el DQB1*0502 que tiene secuencias diferentes se asocia al LED y a los anticuerpos anti-DNA (6).

e) Autoanticuerpos anti-EBA

Los anticuerpos anti-EBA o procolágena se manifiestan raras veces y cuando hay lesiones en la piel

Figura 3. GENETICA DE LOS AUTOANTICUERPOS



Tomado de Arnett F. 1992 (6)

Se asocia con DR2 (6). En el cuadro 11 se muestran los autoanticuerpos que van dirigidos a algunos componentes celulares presentes en el LED.

Todos estos hallazgos son de extraordinaria utilidad para predecir el proceso autoinmune y conocer los mecanismos de etiopatogénesis en el LED. Además es indispensable en conocimiento en diferentes grupos étnicos por las diferencias claramente señaladas aquí. Más aún, es esencial el análisis en mexicanos pues es evidente la necesidad de conocer, por un lado el perfil genético del LED en la población mexicana y por otro determinar si existen o no genes Ir ligados a alelos o secuencias particulares que puedan ser cruciales en la producción de los diferentes tipos de autoanticuerpos y las distintas manifestaciones clínicas.

III OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón genético del MHC de el LED en su forma adulta e infantil en la población mestiza mexicana. Dado que es una enfermedad inmunológica y clínicamente muy compleja se determinan las posibles correlaciones de los marcadores HLA con diferentes manifestaciones clínicas y los diferentes autoanticuerpos, para definir genéticamente los distintos síndromes clínicos e inmunológicos.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estudiar la distribución de antígenos de histocompatibilidad clase I y clase II en pacientes adultos y niños con lupus eritematoso diseminado en mexicanos comparado con un grupo de sujetos sanos del mismo grupo étnico.
- 2) Demostrar si existe asociación con algún antígeno HLA en mestizos mexicanos con LED.
- 3) Determinar si el LED en mexicanos abarca diferentes entidades clínicas e inmunológicas de acuerdo al patrón de autoanticuerpos y al perfil genético HLA.
- 4) Conocer si la enfermedad infantil es diferente de la del adulto, tanto genética como inmunológicamente mediante el análisis de los marcadores HLA y de los autoanticuerpos así como de las características clínicas.
- 5) Establecer los análisis estadísticos comparativos necesarios entre todos los subgrupos: entidades clínicas, patrones de anticuerpos en adultos y en niños. Los autoanticuerpos incluyen: Anti-ANA, anti-DNA, anti-Ro, anti-La, anti-Sm y anti-RNP. Todos los datos se comparan con el grupo testigo de sujetos sanos.

IV HIPOTESIS

Se postula que en mestizos mexicanos se encuentra una asociación indudable de los genes HLA clase II, con las diferentes formas clínicas e inmunológicas del LED puesto que los genes clase II son marcadores de susceptibilidad en la enfermedad en caucasoides, en negros, y además hay una distinción evidente de los subgrupos clínicos de la enfermedad dada por los diferentes factores genéticos que determinan distintos patrones de autoinmunidad. También se postula que posiblemente el LED infantil es un síndrome diferente al del adulto.

V METODOS

1.1 POBLACIONES INCLUIDAS

Se estudiaron 121 pacientes con diagnóstico de LED seleccionados por los clínicos expertos de acuerdo a los criterios internacionales incluyen aspectos inmunológicos, el patrón de autoanticuerpos así como las manifestaciones clínicas (101). Los pacientes pertenecen a dos instituciones diferentes: 71 adultos fueron seleccionados por los Doctores Rubén Burgos y Carolina Duarte de la Unidad de Reumatología del Hospital General de México S.S.A. Los 50 niños fueron incluidos por el Doctor Renato Berrón, Jefe del Servicio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría S.S.A. Los resultados se compararon con 229 sujetos aparentemente sanos del panel de individuos de la población general conformados por del personal del Departamento de Inmunogenética así como por donadores de banco de sangre y estudiantes. Todos los participantes en el estudio pertenecen a la población mestiza mexicana.

1.2 TIPIFICACION SEROLOGICA DE ANTIGENOS HLA

a) Obtención de Linfocitos Totales a partir de Sangre Periférica. (47).

1. Se toman 20 ml de sangre venosa heparinizada en condiciones estériles. Se diluyen con un volumen igual en solución de Hanks normal. La sangre se estratifica en tubos de ensaye que contienen 2.5 ml de una solución de ficoll-Hypaque y se centrifugan a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Con una pipeta pasteur se aspiran los linfocitos que forman un anillo blanco sobre la interfase y se colocan en otro tubo.
3. Los linfocitos se diluyen en solución de Hanks y se centrifugan a 1200 rpm durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante y se realizan 2 lavados más con solución de Hanks.

b) Separación de Linfocitos T y B por Columna de Nylon. (47).

1. Se sumergen aproximadamente 70 mg de fibra de nylon bien peinados en solución de Hanks normal. Se corta un popote común y se cierra en ángulo de 45°

2. En forma laxa se empaca la lana en el popote, y se hace una perforación muy pequeña en el extremo cerrado del popote para permitir la salida del líquido. Se lava una vez con solución de medio RPMI con STF al 5% precalentado a 37°C en forma horizontal.
3. Los linfocitos obtenidos se pasan por la columna de nylon hasta que toda la suspensión penetre a la lana. El popote se incuba en forma horizontal a 37°C durante 30 minutos.
4. Se coloca la columna sobre un tubo marcado para linfocitos T y se lava varias veces con el medio RPMI completo con STF al 5% previamente calentado y se deja escurrir el contenido celular.
5. Los linfocitos B se adhieren a la fibra de nylon. Para su obtención se exprime y presiona fuertemente la columna con los dedos, adicionando alícuotas de medio RPMI con STF al 0.5 % frío.
6. Se centrifugan tanto las células T como las B, se retira el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de medio RPMI. Se ajustan las células 2.5×10^6 cél/ml.

c) Preparación de las Microplacas para la Tipificación de Antígenos HLA. (47).

Se emplean reactivos que incluyen aloantisueros y anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos HLA del Banco de Reactivos del Departamento de Inmunogenética que está constituido por sueros obtenidos localmente y de intercambio internacional. Se preparan 4 microplacas de Terasaki de 60 pozos, para colocar antisueros contra antígenos de los loci A, B y C y 2 para los reactivos contra los loci DR, DQ y DP.

Se agregan 5 ul de aceite mineral en cada excavación y posteriormente 1 ul de cada uno de los antisueros contra cada especificidad en diferente pozo, preparando placas con antisueros contra antígenos clase I (A, B y C) y contra clase II (DR, DQ y DP). Se montan 288 reactivos anti clase I y 144 reactivos anti clase II que incluyen antisueros y anticuerpos monoclonales. El total de reactivos que se utilizan para tipificar a los antígenos son 380. Las microplacas ya preparadas se conservan a -70°C hasta su uso. Los reactivos permiten la identificación de 130 antígenos. De clase I, 23 del locus A, 59 del locus B, 10 del locus C; para los de clase II, 18 para el locus DR, 3 para DR51, DR52, DR53 y 9 para DQ.

d) Tipificación de Antígenos HLA Mediante la Técnica de Microlinfocitotoxicidad. (47).

1. Se saca un juego de placas por individuo del ultracongelador y se coloca 1 ul de la suspensión de linfocitos T con 2,000-2.500 células en cada uno de los pozos de las microplacas con anticuerpo específico para los antígenos de los loci A, B y C y 1 ul conteniendo 2,000-2.500 células de la suspensión de linfocitos B para los loci DR, DQ y DP.
2. Las placas se agitan en un vortex para que los reactivos se mezclen bien. Las placas con antisueros anti-clase I se incuban a 37°C durante 30 minutos mientras que las placas con sueros anticlase II se incuban durante 60 minutos, a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se adiciona a cada excavación 5 ul de complemento especial para clase I y el correspondiente para clase II. Las placas con antisuero A, B y C se dejan incubando durante 60 minutos mientras que las clase II se incuban durante 2 horas; ambas a temperatura ambiente.
4. Al cabo de este tiempo se agregan 5 ul de solución de eosina amarilla al 5% y se deja actuar durante 5 minutos. Posteriormente se adicionan 5 ul de formól a cada excavación.
5. Se lee al microscopio invertido de contraste de fases, y se calcula el número de células vivas y muertas: esta últimas se ven grandes, opacas y planas por el daño provocado por la acción del complemento y porque el colorante penetra a la célula, mientras que los linfocitos vivos se observan pequeños, refringentes y convexos. Los resultados se informan de la siguiente manera:

	Asignación del Antígeno	CALIFICACION
0 - 10 % de mortalidad	-	(1)
11 - 20 % de mortalidad	-/+	(2)
21 - 30 % de mortalidad	+/-	(4)
31 - 80 % de mortalidad	+++	(6)
81 - 100 % de mortalidad	++++	(8)

1.3 DETERMINACION DE AUTOANTICUERPOS. (17, 20).

La determinación de los diferentes autoanticuerpos se realizó en dos instituciones distintas. Los de la población adulta se efectuaron en el Departamento de Reumatología del Hospital General de México. Las pruebas de los pacientes infantiles se realizaron en el Laboratorio del Servicio de Inmunología en el Instituto Nacional de Pediatría. Para la determinación de anticuerpos anti-DNA se utilizó el método de inmunofluorescencia con *Crithidia* sp. Para el caso de ANA, anti-Ro y anti-La se utilizó el método de inmunofluorescencia indirecta. Para la determinación de los anticuerpos anti-fosfolípidos (anti-cardiolipinas), anti-RNP, anti-Ro, anti-La y anti-Sm se empleó el método de análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Los métodos se describen a continuación:

a) Determinación de Autoanticuerpos contra DNA Nativo mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta con Crithidias sp.

1. Los sueros testigo y problema se inactivan en baño maría a 56°C por 30 min. Se preparan diluciones de suero 1:10 por duplicado.
2. Las laminillas se cubren con el antígeno y se dejan descongelar durante 15 min. Posteriormente se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire.
3. Los campos cubiertos con el antígeno se cubren con la dilución de suero del paciente y se incuban en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min.
4. Se elimina el exceso de suero lavando las laminillas con PBS pH 7.2 por 30 min y 10 min con agua destilada.
5. Se le agrega antisuero del paciente fluoresceinado diluido 1:10 con PBS y se titula. Se incuba 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se quita el exceso de conjugado y se lavan las laminillas con PBS durante 30 min y 10 min con agua destilada. Se seca perfectamente el exceso de agua destilada y se gotea con glicerina. Se observa el cubreobjetos al microscopio de fluorescencia.

b) Determinación de Autoanticuerpos por el Método de Inmunofluorescencia Indirecta

Esta técnica permite la identificación de anticuerpos en sueros de los pacientes, dirigidos contra componentes del núcleo celular. La primera etapa del método es la preparación del antisuero o de gama globulina purificada; el segundo paso es la conjugación con el colorante fluorescente y la tercera es el procedimiento de tinción.

1. Separar el suero de 2 ml de sangre sin anticoagulante.
2. Sacar los porta objetos que contienen el corte histológico del congelador de -70°C y se marca con un lápiz de diamante alrededor del corte.
3. Se coloca en cámara húmeda y se cubre el corte con el suero problema, ya diluido (1:10 con PBS). Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Eliminar el exceso de suero y lavar la laminilla con solución amortiguadora de Coons.
4. Eliminar el suero en un baño con 500 ml de amortiguador de Coons y con agitación constante durante 30 min.
5. Secar alrededor del corte y pasar la laminilla a la cámara húmeda.
6. Cubrir la laminilla con un antisuero fluoresceinado específico contra las inmunoglobulinas (IgM). Se diluye el antisuero en PBS 1:4 y se deja en cámara húmeda durante 30 min.
7. Secar perfectamente el exceso de regulador de la laminilla sin tocar el corte. Se monta con amortiguador de glicerol cubriendo con el cubreobjetos.
8. Observar al microscopio de fluorescencia.

En ningún caso debe quedar el corte expuesto al aire directamente porque puede dañarse.

Patrones de Inmunofluorescencia

Los diferentes autoanticuerpos se definen de acuerdo al patrón que se observa, como se describe a continuación:

- I. Homogéneo o Difuso: Los anticuerpos contra la RNP, son de clase IgG y están muy correlacionados con las células LE.
- II. Patrón periférico o en halo: Este tipo de patrón se observa cuando hay anticuerpos contra las ribonucleoproteínas ribosomales, por ejemplo en enfermedades como la esclerodermia.

IV Patrón Moteado: Se observa cuando existen los siguientes tipos de autoanticuerpos:

- Contra antígenos Sm específico de LED
- Contra RNP: Enfermedad mixta del tejido conectivo
- Contra Ro: LED

Por lo tanto debe hacerse ENA para buscar determinante Sm o RNP y también anti-Ro.

c) Determinación de Autoanticuerpos anti-PLP, anti-RNP, anti-Ro, anti-La y anti-Sm Mediante el Análisis de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA).

El ELISA consiste en la técnica del llamado doble anticuerpo, donde un antígeno específico conocido no marcado es adherido a una microplaca donde se adiciona el suero problema, posteriormente se adiciona un segundo anticuerpo marcado con enzima, dirigido contra el anticuerpo del suero problema que se unió al antígeno conocido. La cantidad del segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo depende del título de éste en el suero problema. El anticuerpo marcado que no se unió se lava y posteriormente se agrega un sustrato específico para la enzima, que al reaccionar con éste cambia el color de la reacción. La intensidad del color desarrollado depende de la cantidad de anticuerpo marcado unido al anticuerpo que a su vez está unido al antígeno conocido.

1. Agregar el antígeno en amortiguador de recubrimiento a los tubos o placas de poliestireno.
2. Incubar para permitir el acoplamiento del antígeno a la fase sólida.
3. Desechar la solución de antígeno.
4. Lavar tres veces con solución salina-fosfatos adicionada de Tween 20 (PBS-T) evitando la formación de burbujas y dejando la solución en contacto por 3 minutos en cada ocasión. Esto se hace con el fin de eliminar el antígeno que no se acopló a la fase sólida.
5. Agregar albúmina sérica bovina (BSA) en PBS-T.
6. Incubar para permitir el bloqueo de los sitios libres de la fase sólida para la albúmina.
7. Desechar la solución de BSA-PBS-T
8. Lavar (como en el paso 4) para eliminar el exceso de BSA.

En este momento existen dos posibilidades:

a. Método Directo

- Se añade una dilución adecuada de conjugado, en el cual el anticuerpo del conjugado está específicamente dirigido contra el antígeno unido a la fase sólida
- Incubar para permitir la reacción.
- Desechar el conjugado (Es el segundo anticuerpo más la enzima).
- Lavar (como en el paso 4) para eliminar el exceso de conjugado
- Adicionar el sustrato (el cual se prepara hasta el momento de usarse).
- Incubar en la obscuridad para permitir la reacción enzimática y el desarrollo del color.
- Detener la reacción con H_2SO_4 8 M.

b. Método Indirecto

- Adicionar diluciones adecuadas del suero en el cual se desea buscar anticuerpos específicos.
- Incubar para permitir que los anticuerpos específicos reaccionen con el antígeno unido a la fase sólida.
- Desechar el suero.
- Lavar como en el paso 4, para eliminar todos los componentes que no reaccionaron
- Adicionar una solución adecuada del conjugado, en el cual el anticuerpo del conjugado reconoce y reacciona específicamente con el anticuerpo ya unido al antígeno de la fase sólida.
- Incubar para permitir la reacción del conjugado con los anticuerpos ya unidos a la fase sólida.
- Desechar el conjugado.
- Lavar para eliminar el exceso de conjugado.
- Agregar el sustrato (cromógeno 1.20 el cual se prepara el el momento de usarse)
- Incubar en la obscuridad para permitir la reacción enzimática y el desarrollo del color
- Detener la reacción con H_2SO_4 8 M.

Resultados

Si se dispone de un fotocolorimetro, se hacen las lecturas del color desarrollado a 492 nm contra un blanco que no contiene anticuerpos. Con este blanco se ajusta a 0 de absorbancia. De no ser así la lectura se hace visual y la interpretación del color se hace en cruces.

1.4 ANALISIS ESTADISTICO (45)

Se aplicaron las siguientes pruebas en sanos y enfermos.

a) Obtención de Frecuencias Antigénicas y Génicas

La frecuencia antigénica (FA) es la proporción de sujetos del total, que son portadores de un determinado antígeno. Esta se calcula en porcentaje. Ej: 2 individuos A1 en 100; FA=2%.

La frecuencia génica (FG) se calcula a partir de la FA la cual se toma en números absolutos mediante la formula de Haldane (53) cuya expresión es como sigue:

$$FG = 1 - \sqrt{1-A}$$

b) Asociación del Marcador Genético con la Enfermedad

En el caso de existir un antígeno incrementado o disminuido en la población se determinará la significancia estadística de la probable asociación HLA. Esta se calcula mediante la prueba de **chi cuadrada** (X^2), corregida por Yates que emplea una tabla de 2 x 2 como se muestra a continuación:

	con el ag	sin el ag	Total
No. de Pacientes	a	b	a + b
No. de Testigos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	N=a+b+c+d

Se usa la X^2 usando la corrección de Yates que es más estricta y por lo tanto, la significancia estadística es más real. Sirve para evaluar la comparación de un antígeno en dos poblaciones diferentes.

$$X^2Y = \frac{(ad - bc - N/2)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)N}$$

Una vez que se tiene la X^2Y , se busca el valor de la probabilidad p en las tablas de estadística, tomando en cuenta que el número de grados de libertad es $N-1$. Es decir que si se están comparando dos poblaciones para un antígeno, los grados de libertad son 1. El valor de la p se corrige (p_c) multiplicando por el número de antígenos estudiados para hacer más estricta la evaluación estadística. Si la asociación es con clase I, se multiplica el valor de $P \times 73$. Si es en clase II, se multiplica la $P \times 28$ que fueron el número de antígenos estudiados.

c) *Riesgo Relativo*

Cuando el antígeno se encuentra significativamente elevado en los pacientes se habla de una asociación y por lo tanto de un gen de susceptibilidad. En este caso se calcula el **Riesgo Relativo (RR)** que es una estimación de la intensidad de la asociación. Indica cuantas veces más riesgo de desarrollar la enfermedad, tiene un individuo portador del antígeno en cuestión.

$$\text{Según Woolf (116)} \quad RR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

$$\text{Según Haldane (53)} \quad RR = \frac{(2a+1)(2d+1)}{(2b+1)(2c+1)}$$

d) *Fracción Etiológica*

Para calcular cuanto de la enfermedad depende del marcador se calcula la **fracción etiológica (FE)** que es una medida relativa de cuanto de la asociación se debe al marcador en cuestión. Mientras más se acerca el valor a 1, más se debe de la enfermedad al marcador. Se calcula como sigue:

$$FE = \frac{RR - 1}{RR} \quad hp$$

$$hp = \frac{a}{a+b}$$

e) *Fracción Preventiva*

Si un antígeno se halla significativamente disminuido en los enfermos en comparación con los sanos se sugiere la presencia de un posible gen de protección asociada al marcador. En este caso se obtiene la

Fración Preventiva (FP) que es también una medida relativa la cual indica cuanto de la protección se debe al marcador. Se calcula como se describe a continuación:

$$FP = \frac{(1 - RR) hp}{RR (1-hp) + hp}$$

f) Análisis

Todo este análisis se efectúa para el grupo total de pacientes además de que se subdividen para su comparación en adultos y niños y se correlaciona la presencia de los diferentes autoanticuerpos y de los parámetros clínicos con los genes de susceptibilidad y protección para conocer si algún marcador predispone a algún rasgo clínico o inmunológico particular.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que los 121 pacientes incluidos cumplen con los criterios internacionales para ser clasificados como pacientes con LED. Un grupo de 71 constituyen a la población adulta y 50 son población infantil. Como el total abarcaba pacientes adultos e infantiles, todos los análisis se hicieron para el total y en forma independiente para los dos grupos con el objeto de saber si la enfermedad infantil difiere de la adulta desde el punto de vista clínico, inmunológico y/o genético. Las manifestaciones clínicas (Cuadro 12) más frecuentes considerando desde un mínimo de 8.4% hasta el porcentaje mayor que es 56.0%, sin tomar en consideración la edad, son el daño renal, la artritis, el eritema malar, la anemia hemolítica, la vasculitis, úlceras orales y la fotosensibilidad. Valga señalar la asociación total de anemia hemolítica, pleuritis, pericarditis, daño hepático, flebitis y alteraciones osteomusculares en adultos en contraste con los niños que no presentan alopecia, daño mucocutáneo, neuropatía y trastornos hematológicos. Las alteraciones prevalentes en adultos son daño renal, artritis, eritema malar, artralgia, fotosensibilidad y serositis, mientras que en los niños daño renal, artritis, anemia hemolítica, vasculitis, pleuritis, úlceras orales, trombocitopenia y fotosensibilidad. La edad promedio en el total de los pacientes es de 23.8 años, con una edad promedio de inicio de 18.9 años y un tiempo de evolución de 4.9 años. La edad promedio de los adultos es de 30 años, con una edad promedio de inicio de 24.1 y un periodo de evolución de 5.8 años. En los niños la edad promedio es de 15.1 años, la de inicio es de 11.5 años, el tiempo de evolución es un poco menor (3.6 años). Existe prevalencia del sexo femenino en ambos dos grupos de pacientes ya que el 90% de los afectados infantiles son niñas y el 97.2% de los adultos son pacientes femeninas. En el total el 94.2% pertenecen a ese sexo.

En el cuadro 13, se observan las frecuencias obtenidas para los distintos autoanticuerpos examinados, los anti-ANA, anti-DNA, anti-RNP, anti-PLP, anti-Sm, anti-Ro y anti-La, los cuales se determinaron en el total de pacientes y en los dos grupos en forma independiente. En este cuadro se aprecia que los anti-ANA y anti-DNA predominan en los dos grupos de pacientes, (86.7% y 81.5% en el total, 85.7% y 87.0% en los adultos y 88% y 74.0% en los niños), mientras que los anti-RNP predomina en los adultos (81%) con respecto a los niños (12%). Lo mismo ocurre para los anti-Ro, pues están en el 67.5% de los

CUADRO 12

CARACTERISTICAS CLINICAS DEL LED

MANIFESTACIONES CLINICAS	PACIENTES TOTALES		ADULTOS		NIÑOS	
	N=121	%	N=71	%	N=50	%
Daño Renal	57	47.1	29	40.8	28	56.0
Artritis	56	46.3	32	45.1	24	48.0
Eritema Malar	30	24.8	23	32.4	7	14.0
Anemia Hemolítica	22	18.2	0	0	22	44.0
Vasculitis	14	11.6	2	2.8	12	24.0
Ulceras Orales	11	9.1	4	5.6	7	14.0
Fotosensibilidad	11	9.1	6	8.4	5	10.0
Artralgia	9	7.4	8	11.3	1	2.0
Trombocitopenia	9	7.4	3	4.2	6	12.0
Pleuritis	8	6.6	0	0	8	16.0
Serositis	8	6.6	7	9.9	1	2.0
Alopecia	4	3.3	4	5.6	0	0
Pericarditis	4	3.3	0	0	4	8.0
Otras alteraciones cutáneas	3	2.5	3	4.2	0	0
Alteraciones del SNC	3	2.5	1	1.4	2	4.0
Leucopenia	3	2.5	1	1.4	2	4.0
Neuropatía	2	1.7	2	2.8	0	0
Daño Hepático	1	0.8	0	0	1	2.0
Flebitis	1	0.8	0	0	1	2.0
Alt. Osteomuscular	1	0.8	0	0	1	2.0
Polineuropatía	1	0.8	1	1.4	0	0
Otros trast. hematológicos	1	0.8	1	1.4	0	0
Psicosis	1	0.8	1	1.4	0	0
Hipertemia	1	0.8	1	1.4	0	0
Hipertensión	1	0.8	1	1.4	0	0
Edad (X) + DE	23.8+11.32		30+10.97		15.1+3.57	
Edad de Inicio Promedio (X)	18.9		24.1		11.5	
Evolución (años)	4.9		5.8		3.6	
SEXO	N	%	N	%	N	%
Femenino	114	94.2	69	97.2	45	90.0
Masculino	7	5.8	2	2.8	5	10.0

CUADRO 13

FRECUENCIA DE LOS DISTINTOS AUTOANTICUERPOS EN EL LED

AUTOANTICUERPO	PACIENTES TOTALES		ADULTOS		NIÑOS	
	N	(%)	N	(%)	N(50)	(%)
Anti-ANA	104/120	86.7	60/70	85.7	44	88.0
Anti-DNA	97/119	81.5	60/69	87.0	37	74.0
Anti-RNP	40/92	43.5	34/42	81.0	6	12.0
Anti-Sm	37/90	41.1	17/40	42.5	20	40.0
Anti-PLP	41/116	35.3	20/66	30.3	21	42.0
Anti-Ro	30/90	33.3	27/40	67.5	3	6.0
Anti-La	12/40	30.0	12/40	30.0	ND	

ND: No se determinó

Nota: En la N en cada grupo se incluye el número de pacientes a los cuales se le hizo la determinación.

adultos, mientras que en los niños sólo el 6% fueron positivos. Los anti-La sólo se determinaron en la población adulta que muestra un 30% de incidencia.

Con respecto al análisis genético de los antígenos HLA en los cuadros del 14, 15 y 16 se muestran las frecuencias antigénicas (F.A.) y génicas (F.G.) de antígenos HLA, clase I A, B y C respectivamente en la población sana y en los pacientes totales, así como en los niños. Mientras que en los cuadros 17 y 18 se muestran las frecuencias para los antígenos de clase II de los loci DR y DQ respectivamente, para los mismos grupos. No se encontró ninguna diferencia significativa para los antígenos de clase I, aunque es importante señalar que el B8 se halla sin llegar a la significancia estadística aumentado, en el total de pacientes (FG=6.40%), en los adultos (FG=6.55%) y en los niños (FG=6.19%) en comparación con los sujetos sanos cuya frecuencia génica es de 2.43.

Con respecto a los antígenos de clase II (cuadros 17 y 18) cuyo análisis estadístico se muestra en el cuadro 19, resalta la participación de estos genes en la expresión del LED. A pesar de que aparece un incremento de DR1 en el total de pacientes ($X^2Y=9.63$), en los adultos ($X^2Y=7.4$) y en los niños ($X^2Y=4.55$), el valor de la p pierde su significancia al corregirse multiplicando por el número de antígenos de clase II estudiados que son 28. Aunque el RR oscila entre 2.5 y 2.9. En cambio, el DR17 sí está indudablemente asociado a la enfermedad, pues en el total de pacientes la $X^2Y=23.36$, en los adultos en los que la $pc= <0.0003$ pues la $X^2Y=24.98$. La FE en ambos casos es de 0.23 y 0.28 respectivamente, en tanto que en los niños la constitución del DR17 es menor ($X^2Y=6.65$, $p=0.01$, $pc=NS$) y el valor de RR es también menor (RR=2.97). En la región DQ se ve que el DQ2 está significativamente aumentado en adultos ($X^2Y=15.24$; $p=0.0008$, $pc=0.02$), con un RR=3.09, en tanto en niños no aparece esta asociación. Resumiendo hay un gen de susceptibilidad al LED en mexicanos en la región DR ligado al DR17 particularmente condicionante de la forma adulta. El DQ2 está menos aumentado en todos los casos sugiriendo que el gen de susceptibilidad se halla en el locus DR y no en el DQ.

También surgieron antígenos de clase II cuya frecuencia está disminuida con respecto a los testigos, lo que sugiere que hay secuencias de protección. En éste sentido hay varios antígenos disminuidos. En el locus DR, DR9 12 y 14 parecerían de protección, pero la significancia se pierde al corregir la p . Más aún

CUADRO 14
DISTRIBUCION DE ANTIGENOS HLA-A EN MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO
DISEMINADO, ADULTOS E INFANTILES Y EN SUJETOS SANOS

HLA-A	TESTIGOS			PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	229			121			71			50		
A1	23	10.04	5.15	23	19.01	10.00	15	21.13	11.19	8	16.00	8.35
A2	121	52.84	31.33	69	57.02	34.44	41	57.75	35.00	27	54.00	32.18
A3	20	8.73	4.47	7	5.79	2.94	6	8.45	4.32	1	2.00	1.01
A11	19	8.30	4.24	9	7.44	3.79	6	8.45	4.32	3	6.00	3.05
A23	5	2.18	1.10	5	4.13	2.09	3	4.23	2.14	3	6.00	3.05
A24	58	25.33	13.59	31	25.62	13.76	14	19.72	10.40	17	34.00	18.76
A25	5	2.18	1.10	5	4.13	2.09	2	2.82	1.42	3	6.00	3.05
A26	10	4.37	2.21	8	6.61	3.36	7	9.86	5.06	1	2.00	1.01
A28	3	1.31	0.66	5	4.13	2.09	3	4.23	2.14	2	4.00	2.02
A29	23	10.04	5.15	5	4.13	2.09	3	4.23	2.14	2	4.00	2.02
A30	13	5.68	2.88	11	9.09	4.65	6	8.45	4.32	5	10.00	5.13
A31	32	13.97	7.25	21	17.36	9.09	13	18.31	9.62	8	16.00	8.35
A32	12	5.24	2.66	6	4.96	2.51	0	0.00	0.00	6	12.00	6.19
A33	26	11.35	5.85	7	5.79	2.94	4	5.63	2.86	3	6.00	3.05
A34	1	0.44	0.22	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00
A36	2	0.87	0.44	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00
A43	0	0.00	0.00	2	1.65	0.83	2	2.82	1.42	0	0.00	0.00
A66	0	0.00	0.00	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00
A68	43	18.78	9.88	5	4.13	2.09	2	2.82	1.42	3	6.00	3.05
A69	19	8.30	4.24	7	5.79	2.94	4	5.63	2.86	3	6.00	3.05
A74	0	0.00	0.00	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00
AX	23	10.04	5.15	12	9.92	5.09	7	9.86	5.06	5	10.00	5.13

FA= Frecuencia Antigénica

FG= Frecuencia Génica

AX= Antígeno blanco ó no determinado

CUADRO 15

DISTRIBUCION DE ANTIGENOS HLA-B EN MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO, ADULTOS E INFANTILES Y EN SUJETOS SANOS

HLA-B	TESTIGOS				PACIENTES				ADULTOS				NIÑOS			
	N		F.G. %		N		F.G. %		N		F.G. %		N		F.G. %	
	229			121				71				50				
B7	28	12.23	6.31	7	5.79	2.94	3	4.23	2.14	4	8.00	4.08				
B8	11	4.80	2.43	15	12.40	6.40	9	12.68	6.55	6	12.00	6.19				
B13	13	5.68	2.88	9	7.44	3.79	4	5.63	2.86	5	10.00	5.13				
B14	16	6.99	3.56	2	1.65	0.83	2	2.82	1.42	0	0.00	0.00				
B15	1	0.44	0.22	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00				
B16	3	1.31	0.66	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00				
B18	9	3.93	1.98	8	6.61	3.36	5	7.04	3.59	3	6.00	3.05				
B27	8	3.49	1.76	2	1.65	0.83	2	2.82	1.42	0	0.00	0.00				
B35	78	34.06	18.80	44	36.36	20.23	27	38.03	21.28	16	32.00	17.54				
B37	2	0.87	0.44	2	1.65	0.83	2	2.82	1.42	0	0.00	0.00				
B38	10	4.37	2.21	4	3.31	1.67	2	2.82	1.42	2	4.00	2.02				
B39	34	14.85	7.72	19	15.70	8.19	14	19.72	10.40	5	10.00	5.13				
B41	10	4.37	2.21	4	3.31	1.67	4	5.63	2.86	0	0.00	0.00				
B42	3	1.31	0.66	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00				
B44	21	9.17	4.70	14	11.57	5.96	10	14.08	7.31	5	10.00	5.13				
B45	9	3.93	1.98	6	4.96	2.51	3	4.23	2.14	3	6.00	3.05				
B47	2	0.87	0.44	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00				
B48	14	6.11	3.10	4	3.31	1.67	1	1.41	0.71	3	6.00	3.05				
B49	9	3.93	1.98	5	4.13	2.09	4	5.63	2.86	1	2.00	1.01				
B50	9	3.93	1.98	6	4.96	2.51	3	4.23	2.14	3	6.00	3.05				
B51	22	9.61	4.92	17	14.05	7.29	9	12.68	6.55	7	14.00	7.26				
B52	5	2.18	1.10	9	7.44	3.79	6	8.45	4.32	3	6.00	3.05				
B53	21	9.17	4.70	2	1.65	0.83	1	1.41	0.71	1	2.00	1.01				
B54	1	0.44	0.22	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00				
B55	3	1.31	0.66	2	1.65	0.83	1	1.41	0.71	1	2.00	1.01				
B56	1	0.44	0.22	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00				
B57	2	0.87	0.44	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00				
B58	5	2.18	1.10	1	0.83	0.41	0	0.00	0.00	1	2.00	1.01				
B59	1	0.44	0.22	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00				
B60	13	5.68	2.88	17	14.05	7.29	10	14.08	7.31	7	14.00	7.26				
B61	21	9.17	4.70	6	4.96	2.51	1	1.41	0.71	6	12.00	6.19				

CUADRO 15
(CONTINUACION)

HLA-B	TESTIGOS			PACIENTES								
	N	F.A. %	F.G. %	TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
				N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
B62	18	7.86	4.01	8	6.61	3.36	3	4.23	2.14	5	10.00	5.13
B63	5	2.18	1.10	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00
B64	1	0.44	0.22	4	3.31	1.67	4	5.63	2.86	0	0.00	0.00
B65	6	2.62	1.32	5	4.13	2.09	1	1.41	0.71	4	8.00	4.08
B67	5	2.18	1.10	1	0.83	0.41	0	0.00	0.00	1	2.00	1.01
B70	3	1.31	0.66	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
B71	0	0.00	0.00	1	0.83	0.41	0	0.00	0.00	1	2.00	1.01
B73	4	1.75	0.88	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
B75	1	0.44	0.22	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
B78	0	0.00	0.00	3	2.48	1.25	3	4.23	2.14	0	0.00	0.00
BX	30	13.10	6.78	10	8.26	4.22	3	4.23	2.14	7	14.00	7.26
BW4	118	51.53	*	60	49.59	*	38	52.52	*	22	44.00	*
BW6	232	103.31	*	113	93.39	*	66	92.96	*	47	94.00	*

FA= Frecuencia Antigénica

FG= Frecuencia Génica

BX= Antígeno blanco ó no determinado

* Sólo se determinó la frecuencia antigénica para los supertipos Bw4 y Bw6.

CUADRO 16
DISTRIBUCION DE ANTIGENOS HLA-C EN MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO
DISEMINADO, ADULTOS E INFANTILES Y EN SUJETOS SANOS

HLA-C	TESTIGOS			PACIENTES			ADULTOS			NIÑOS		
				TOTALES								
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	229			121			71			50		
Cw1	38	16.59	8.67	20	16.53	8.64	10	14.08	7.31	10	20.00	10.56
Cw2	29	12.66	6.55	8	6.61	3.36	6	8.45	4.32	2	4.00	2.02
Cw4	94	41.05	23.22	52	42.98	24.49	32	45.07	25.89	19	38.00	21.26
Cw5	17	7.42	3.78	17	14.05	7.29	13	18.31	9.62	5	10.00	5.13
Cw6	21	9.17	4.70	8	6.61	3.36	6	8.45	4.32	2	4.00	2.02
Cw7	108	47.16	27.31	47	38.84	21.80	29	40.85	23.09	17	34.00	18.76
Cw8	41	17.90	9.18	5	4.14	2.13	2	2.82	1.42	3	6.00	3.03
Cw9	20	8.73	4.47	16	13.22	6.85	9	12.68	6.55	7	14.00	7.26
Cw10	12	5.24	2.66	15	12.40	6.40	7	9.86	5.06	9	18.00	9.45
CwX	78	34.06	18.80	54	44.63	25.59	28	39.44	22.18	26	52.00	30.72

FA= Frecuencia Antigénica

FG= Frecuencia Génica

CX= Antígeno blanco ó no determinado

CUADRO 17
DISTRIBUCION DE ANTIGENOS HLA-DR EN MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO
DISEMINADO, ADULTOS E INFANTILES Y EN SUJETOS SANOS

HLA-DR	TESTIGOS			PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	229			121			71			50		
DR1	26	11.35	5.85	30	24.79	13.29	18	25.35	13.60	12	24.00	12.82
DR4	58	25.33	13.59	31	25.62	13.76	16	22.54	11.99	15	30.00	16.33
DR5	0	0.00	0.00	1	0.83	0.41	1	1.41	0.71	0	0.00	0.00
DR7	39	17.03	8.91	20	16.53	8.64	15	21.13	11.19	5	10.00	5.13
DR8	68	29.69	16.15	40	33.06	18.18	21	29.58	16.08	19	38.00	21.26
DR9	26	11.35	5.85	3	2.48	1.25	1	4.23	2.14	2	4.00	2.02
DR10	10	4.37	2.21	6	4.96	2.51	4	5.63	2.86	2	4.00	2.02
DR11	45	19.65	10.36	14	11.57	5.96	9	12.68	6.55	4	8.00	4.08
DR12	32	13.97	7.25	7	5.79	2.94	3	4.23	2.14	4	8.00	4.08
DR13	27	11.79	6.08	8	6.61	3.36	4	5.63	2.86	4	8.00	4.08
DR14	20	8.73	4.47	3	2.48	1.25	3	4.23	2.14	0	0.00	0.00
DR15	43	18.78	9.88	17	14.05	7.29	8	11.27	5.80	9	18.00	9.45
DR16	11	4.80	2.43	8	6.61	3.36	4	5.63	2.86	4	8.00	4.08
DR17	22	9.61	4.87	37	30.58	16.60	25	35.21	19.35	12	24.00	12.82
DR18	20	8.73	4.47	13	10.74	5.52	8	11.27	5.80	6	12.00	6.19
DRX	11	4.80	2.43	4	3.31	1.67	2	2.82	1.42	2	4.00	2.02
DRW52	201	87.77	65.03	109	90.08	68.51	64	90.14	68.60	45	90.00	68.38
DRW53	117	51.09	30.07	53	43.80	25.03	33	46.48	26.84	20	40.00	22.54

FA= Frecuencia Antigénica

BX= Antígeno blanco ó no determinado

FG= Frecuencia Génica

CUADRO 18
DISTRIBUCION DE ANTIGENOS HLA-DQ EN MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO
DISEMINADO, ADULTOS E INFANTILES Y EN SUJETOS SANOS

HLA-DR	TESTIGOS			PACIENTES								
				TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	229			121			71			50		
DQ1	8	3.49	1.76	6	4.96	2.51	2	2.82	1.42	4	8.00	4.08
DQ2	50	21.83	11.59	48	39.67	22.33	33	46.48	26.84	15	30.00	16.33
DQ4	67	29.26	15.89	43	35.54	19.71	25	35.21	19.51	19	38.00	21.26
DQ5	45	19.65	10.36	44	36.36	20.23	25	35.21	19.51	18	36.00	20.00
DQ6	103	44.98	25.82	21	17.36	9.09	12	16.90	8.84	10	20.00	10.56
DQ7	92	40.17	22.65	47	38.84	21.80	25	35.21	19.51	21	42.00	23.84
DQ8	45	19.65	10.36	11	9.09	4.65	7	9.86	5.06	4	8.00	4.08
DQ9	9	3.93	1.98	5	4.13	2.09	3	4.23	2.14	2	4.00	2.02
DQX	39	17.03	8.91	17	14.05	7.29	10	14.08	7.31	7	14.00	7.26

FA= Frecuencia Antigénica

FG= Frecuencia Génica

BX= Antígeno blanco ó no determinado

CUADRO 19

**ANTIGENOS HLA CLASE II INVOLUCRADOS EN SUSCEPTIBILIDAD EN EL LUPUS ERITEMATOSO
DISEMINADO MEXICANOS**

HLA	TOTAL DE PACIENTES					ADULTOS					NIÑOS				
	X ² Y	RR	FE	p	pc	X ² Y	RR	FE	p	pc	X ² Y	RR	FE	p	pc
DR1	9.63	2.55	0.15	0.005	NS	7.4	2.65	0.15	0.009	NS	4.55	2.99	0.14	0.04	NS
DR17	23.36	4.09	0.23	<0.00001	<0.0003	24.98	5.05	0.28	<0.00001	<0.0003	6.65	2.97	0.15	0.01	NS
DQ2	11.62	2.34	0.22	0.001	0.02	15.24	3.09	0.31	0.0008	0.02					

**ANTIGENOS QUE SUGIEREN PROTECCION EN EL LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO EN
MEXICANOS**

HLA	TOTAL DE PACIENTES					ADULTOS					NIÑOS				
	X ² Y	RR	FP	p	pc	X ² Y	RR	FP	p	pc	X ² Y	RR	FP	p	pc
DR9	9.41	0.23	0.07	0.005	NS	7.81	0.16	0.06	0.009	NS	NS	---	---	---	---
DR12	6.22	0.39	0.08	0.01	NS	5.98	0.31	0.08	0.09	NS	NS	---	---	---	---
DR14	6.11	0.30	0.05	0.01	NS	NS	---	---	---	---	NS	---	---	---	---
DQ6	27.62	0.26	0.32	<0.00001	<0.0003	19.28	0.25	0.32	0.00003	0.0001	10.62	0.31	0.30	0.001	0.02
DQ8	7.37	0.42	0.11	0.009	NS	4.34	0.47	0.09	0.04	NS	4.69	0.39	0.11	0.04	NS

pc = p multiplicada x 28 que fué el número de antígenos de clase II estudiados.

en los adultos parecería estar presente un débil efecto del DR9 y del DR12 pero ningún antígeno se halla disminuido en los niños. (Cuadro 19). En la región DQ, sin embargo se muestra una clara disminución del DQ6 en ambos grupos, pues en adultos la $X^2Y=19.28$, la $p=0.0001$ y la $pc=0.0003$ y en niños la $X^2Y=10.62$, la $p=0.001$ y la pc se mantiene significativa ($pc=0.32$). La FP es de 0.32 en adultos y 0.30 en niños indicando que una buena parte de la protección se debe al gen DQ6. El DQ8 que también aparece en el cuadro 19, no necesitó la corrección de la p y su valor de FP es pequeño.

En los cuadros 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 se intentó analizar si los marcadores HLA condicionan un patrón de autoinmunidad diferente entre adultos y niños. En el cuadro 20 se muestra la distribución para anti-ANA y no se observa disminución alguna entre niños y adultos para ningún antígeno en particular. En el cuadro 21 se observan los anti-DNA, donde los antígenos más frecuentes son el DR17 que está aumentado en adultos ($FG=20.42\%$), pero no llega a la significancia estadística. Otros antígenos que se ven diferentes para auto-DNA entre niños y adultos son DR7 (adultos $FG=10.56\%$ vs niños $FG=4.14\%$) y DQ2 (adultos $FG=22.68\%$ vs niños $FG=14.58\%$). No se observaron diferencias para los anti-ANA y anti-DNA entre niños y adultos. En el cuadro 22 se señalan las frecuencias para anti-RNP. Se observan los siguientes antígenos. Están aumentados en adultos, DR11, DR13, DR15, DR17, DQ5 y DQ8. Están aumentados en niños DR7, DR8, DR12 y DQ6. De todos ellos en el cuadro 27 se indica que sólo el DR8 está significativamente incrementado con una $X^2Y=4.18$ y una $p=0.04$. En el cuadro 23 se señala la distribución de clase II en relación a anticuerpos anti-Sm y se ven aumentados en adultos DR12, DR17 y DQ2. En niños se halla incrementado DR8, DR12, DR15 y DR18. Sin embargo en el cuadro 27 no se indica ninguna asociación estadísticamente significativa entre niños y adultos. En el cuadro 24 se muestra la distribución de antígenos clase II en los pacientes con anti-PLP. Aquí las diferencias son las siguientes: El DR1 está elevado en adultos $FG=19.38\%$ vs $FG=10.03\%$ en niños. El DR4 está incrementado en niños ($FG=2.53\%$ en adultos vs $FG=15.48\%$) y el DR18 está elevado en adultos ($FG=10.56\%$ vs $FG=4.88\%$ en niños) en comparación con los niños. En el locus DQ los antígenos DQ7 ($FG=13.40\%$ en adultos vs $FG=25.32\%$ en niños) y DQ8 ($FG=7.80\%$ en adultos vs 2.41% en niños), sin embargo los únicos que muestran una diferencia significativa limitrofe son el DR12 con una $X^2Y=4.00$, $p=0.05$ pues ningún adulto es portador del DR12 vs una $FG=2.41\%$ en los niños y el DR4

CUADRO 20

**FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES
CON AUTOANTICUERPOS ANTI-ANA**

ANTIGENO	PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	104			60			44		
DR1	26	25.00	13.40	17	28.33	15.34	9	20.45	10.81
DR4	25	24.04	12.84	12	20.00	10.56	13	29.55	16.06
DR5	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR7	16	15.38	8.01	11	18.33	9.63	5	11.36	5.85
DR8	34	32.69	17.96	17	28.33	15.34	17	38.64	21.67
DR9	3	2.88	1.45	1	1.67	0.84	2	4.55	2.30
DR10	5	4.81	2.43	3	5.00	2.53	2	4.55	2.30
DR11	12	11.54	5.95	8	13.33	6.91	4	9.09	4.65
DR12	6	5.77	2.93	3	5.00	2.53	3	6.82	3.47
DR13	18	17.31	9.06	4	6.67	3.39	3	6.82	3.47
DR14	3	2.88	1.45	3	5.00	2.53	0	0.00	0.00
DR15	15	14.42	7.49	7	11.67	6.01	8	18.18	9.55
DR16	7	6.73	3.42	3	5.00	2.53	4	9.09	4.65
DR17	30	28.85	15.65	20	33.33	18.35	10	22.73	12.10
DR18	13	12.50	6.46	8	13.33	6.91	5	11.36	5.85
DRX	4	3.85	1.94	2	3.33	1.68	2	4.55	2.30
DQ1	6	5.77	2.93	2	3.33	1.68	4	9.09	4.65
DQ2	39	37.50	20.94	26	43.33	24.72	13	29.55	16.06
DQ4	39	37.50	20.94	22	36.67	20.42	17	38.64	21.67
DQ5	38	36.54	20.34	22	36.67	20.42	16	36.36	20.23
DQ6	18	17.31	9.06	10	16.67	8.71	8	18.18	9.55
DQ7	38	36.54	20.34	20	33.33	18.35	18	40.91	23.13
DQ8	10	9.62	4.86	7	11.67	5.92	3	6.82	3.44
DQ9	3	2.88	1.45	1	1.67	0.84	2	4.55	2.30
DQX	17	16.35	8.54	10	16.67	8.71	7	15.91	8.30

CUADRO 21

**FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES
CON AUTOANTICUERPOS ANTI-DNA**

ANTIGENO	PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	97			60			37		
DR1	23	23.71	12.66	14	23.33	12.44	9	24.32	13.01
DR4	24	24.74	13.25	13	21.67	11.49	11	29.73	16.17
DR5	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR7	15	15.46	8.06	12	20.00	10.56	3	8.11	4.14
DR8	31	31.96	17.51	17	28.33	15.34	14	37.84	21.16
DR9	3	3.09	1.56	1	1.67	0.84	2	5.41	2.74
DR10	5	5.15	2.61	4	6.67	3.39	1	2.70	1.36
DR11	11	11.34	5.84	8	13.33	6.91	3	8.11	4.14
DR12	6	6.19	3.14	3	5.00	2.53	3	8.11	4.14
DR13	8	8.25	4.21	4	6.67	3.39	4	10.81	5.56
DR14	3	3.09	1.56	3	5.00	2.53	0	0.00	0.00
DR15	14	14.43	7.50	8	13.33	6.91	6	16.22	8.47
DR16	7	7.22	3.68	4	6.67	3.39	3	8.11	4.14
DR17	31	31.96	17.51	22	36.67	20.42	9	24.31	13.01
DR18	9	9.28	4.75	5	8.33	4.26	4	10.81	5.56
DRX	4	4.12	2.08	2	3.33	1.68	2	5.41	2.74
DQ1	6	6.19	3.14	2	3.33	1.68	4	10.81	5.56
DQ2	37	38.14	21.35	27	45.09	22.68	10	27.03	14.58
DQ4	35	36.08	20.05	19	31.67	17.34	6	43.24	24.66
DQ5	25	25.77	13.85	21	35.00	19.38	14	37.84	21.16
DQ6	17	17.53	9.18	11	18.33	9.63	6	16.22	8.47
DQ7	35	36.08	20.05	22	36.67	20.42	13	35.14	19.46
DQ8	8	8.25	4.21	6	10.02	5.04	2	5.41	2.74
DQ9	4	4.12	2.08	2	3.33	1.68	2	5.41	2.74
DQX	17	17.53	9.18	10	16.67	8.71	7	18.92	9.95

CUADRO 22

**FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES
CON AUTOANTICUERPOS ANTI-RNP**

ANTIGENO	PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	40			34			6		
DR1	9	22.50	11.97	8	23.53	12.55	1	16.67	8.71
DR4	9	22.50	11.97	7	20.59	10.89	2	33.33	18.35
DR5	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR7	7	17.50	9.17	5	14.71	7.65	2	33.33	18.35
DR8	10	25.00	13.40	7	20.59	10.89	3	50.00	29.29
DR9	1	2.50	1.26	1	2.94	1.48	0	0.00	0.00
DR10	3	7.50	3.82	3	8.82	4.51	0	0.00	0.00
DR11	7	17.50	9.17	7	20.59	10.89	0	0.00	0.00
DR12	3	7.50	3.82	2	5.88	2.99	1	16.67	8.71
DR13	3	7.50	3.82	3	8.82	4.51	0	0.00	0.00
DR14	1	2.50	1.26	1	2.94	1.48	0	0.00	0.00
DR15	5	12.50	6.46	5	14.71	7.65	0	0.00	0.00
DR16	2	5.00	2.53	2	5.88	2.99	0	0.00	0.00
DR17	13	32.50	16.38	12	35.28	17.76	1	16.67	8.71
DR18	5	12.50	6.46	4	11.76	6.07	1	16.67	8.71
DRX	2	5.00	2.53	1	2.94	1.48	1	16.67	8.71
DQ1	2	5.00	2.53	2	5.88	2.99	0	0.00	0.00
DQ2	17	42.50	24.17	14	41.18	23.30	3	50.00	29.29
DQ4	12	30.00	16.33	10	29.41	15.98	2	33.33	18.35
DQ5	13	32.50	17.84	12	35.29	19.56	1	16.67	8.71
DQ6	8	20.00	10.56	6	17.65	9.25	2	33.33	18.35
DQ7	14	35.00	19.38	12	35.29	19.56	2	33.33	18.35
DQ8	3	7.50	3.82	3	8.82	4.51	0	0.00	0.00
DQ9	1	2.50	1.26	1	2.94	1.48	0	0.00	0.00
DQX	10	25.00	13.40	8	23.53	12.55	2	33.33	18.35

CUADRO 23

FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES CON AUTOANTICUERPOS ANTI-Sm

ANTIGENO	PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	37			17			20		
DR1	6	1.22	8.47	3	17.65	9.25	3	15.00	7.80
DR4	10	27.03	14.58	5	29.41	15.98	5	25.00	13.40
DR5	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR7	5	13.51	7.00	3	17.65	9.25	2	10.00	5.13
DR8	13	35.14	19.46	4	23.53	12.55	9	45.00	25.84
DR9	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR10	2	5.41	2.74	1	5.88	2.99	1	5.00	2.53
DR11	6	16.22	8.47	5	29.41	15.98	1	5.00	2.53
DR12	5	13.51	7.00	1	5.88	2.99	4	20.00	10.56
DR13	1	2.70	1.36	0	0.00	0.00	1	5.00	2.53
DR14	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR15	9	24.32	13.01	3	17.65	9.25	6	30.00	16.33
DR16	3	8.11	4.14	2	11.76	6.07	1	5.00	2.53
DR17	10	27.03	14.58	6	35.28	17.94	4	20.00	10.56
DR18	2	5.41	2.74	0	0.00	0.00	2	10.00	5.13
DRX	2	5.41	2.74	1	5.88	2.99	1	5.00	2.53
DQ1	2	5.41	2.74	1	5.88	2.99	1	5.00	2.53
DQ2	12	32.43	17.80	7	41.18	23.30	5	25.00	13.40
DQ4	12	32.43	17.80	5	29.41	15.98	7	35.00	19.38
DQ5	11	29.73	16.17	5	29.41	15.98	6	30.00	16.33
DQ6	10	27.03	14.58	7	41.18	23.30	7	35.00	19.38
DQ7	12	32.43	17.80	5	29.41	15.98	7	35.00	19.38
DQ8	7	18.92	9.95	3	17.65	9.25	4	20.00	10.56
DQ9	1	2.70	1.36	0	0.00	0.00	1	5.00	2.53
DQX	7	18.92	9.95	5	29.41	15.98	2	10.00	5.13

CUADRO 24

**FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES
CON AUTOANTICUERPOS ANTI-PLP**

ANTIGENO	PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	41			20			21		
DR1	11	26.83	14.46	7	35.00	19.38	4	19.05	10.03
DR4	7	17.07	8.94	1	5.00	2.53	6	28.57	15.48
DR5	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR7	8	19.51	10.29	4	20.00	10.56	4	19.05	10.03
DR8	13	31.71	17.36	6	30.00	16.33	7	33.33	18.35
DR9	1	2.44	1.23	1	5.00	2.53	0	0.00	0.00
DR10	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR11	6	14.63	7.61	3	15.00	7.80	3	14.29	7.42
DR12	1	2.44	1.23	0	0.00	0.00	1	4.76	2.41
DR13	2	4.88	2.47	1	5.00	2.53	1	4.76	2.41
DR14	1	2.44	1.23	1	5.00	2.53	0	0.00	0.00
DR15	10	24.39	13.05	5	25.00	13.40	5	23.81	12.71
DR16	2	4.88	2.47	0	0.00	0.00	2	9.52	4.88
DR17	13	31.71	17.36	6	30.00	16.33	7	33.33	18.35
DR18	6	14.63	7.61	4	20.00	10.56	2	9.52	4.88
DRX	1	2.44	1.23	1	5.00	2.53	0	0.00	0.00
DQ1	4	9.76	5.00	1	5.00	2.53	3	14.29	7.42
DQ2	18	43.90	25.10	9	45.00	25.84	4	42.86	24.41
DQ4	14	34.15	18.85	7	35.00	19.38	7	33.33	18.35
DQ5	13	31.71	17.36	7	35.00	19.38	6	28.57	15.48
DQ6	10	24.39	13.05	5	25.00	13.40	5	23.81	12.71
DQ7	13	31.71	17.36	5	25.00	13.40	8	38.10	21.32
DQ8	4	9.76	5.00	3	15.00	7.80	1	4.76	2.41
DQ9	2	4.88	2.47	1	5.00	2.53	1	4.76	2.41
DQX	4	9.76	5.00	2	10.00	5.13	2	9.52	4.88

CUADRO 25

**FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES
CON AUTOANTICUERPOS ANTI-R₀**

ANTIGENO	PACIENTES TOTALES			ADULTOS			NIÑOS		
	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %	N	F.A. %	F.G. %
	30			27			3		
DR1	7	23.33	12.44	6	22.22	11.81	1	33.33	18.35
DR4	7	23.33	12.44	6	22.22	11.81	1	33.33	18.35
DR5	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR7	4	13.33	6.91	4	14.81	7.70	0	0.00	0.00
DR8	9	30.00	16.33	8	29.63	16.11	1	33.33	18.35
DR9	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DR10	2	6.67	3.39	2	7.41	3.37	0	0.00	0.00
DR11	4	13.33	6.91	4	14.81	7.70	0	0.00	0.00
DR12	2	6.67	3.39	2	7.41	3.77	0	0.00	0.00
DR13	2	6.67	3.39	2	7.41	3.77	0	0.00	0.00
DR14	1	3.33	1.68	1	3.70	1.87	0	0.00	0.00
DR15	4	13.33	6.91	4	14.81	7.70	0	0.00	0.00
DR16	1	3.33	1.68	1	3.70	1.87	0	0.00	0.00
DR17	12	40.00	20.16	11	40.74	20.57	1	33.33	18.35
DR18	3	10.00	5.13	2	7.41	3.77	1	33.33	18.35
DRX	2	6.67	3.39	1	3.70	1.87	1	33.33	18.35
DQ1	1	3.33	1.68	1	3.70	1.87	0	0.00	0.00
DQ2	15	50.00	29.29	14	51.85	30.61	1	33.33	18.35
DQ4	11	36.67	20.42	9	33.33	18.35	2	66.67	42.26
DQ5	8	26.67	14.37	8	29.63	16.11	0	0.00	0.00
DQ6	5	16.67	8.71	4	14.81	7.70	1	33.33	18.35
DQ7	11	36.67	20.42	10	37.04	20.65	1	33.33	18.35
DQ8	2	6.67	3.39	2	7.41	3.77	0	0.00	0.00
DQ9	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
DQX	7	23.33	12.44	6	22.22	11.81	1	33.33	18.35

CUADRO 26**FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR Y DQ EN LOS PACIENTES
CON AUTOANTICUERPOS ANTI-La**

ANTIGENO	ADULTOS		
	N	F.A. %	F.G. %
	12		
DR1	3	25.00	13.40
DR4	4	33.33	18.35
DR5	0	0.00	0.00
DR7	0	0.00	0.00
DR8	2	16.67	8.71
DR9	0	0.00	0.00
DR10	1	8.33	4.26
DR11	1	8.33	4.26
DR12	1	8.33	4.26
DR13	0	0.00	0.00
DR14	1	8.33	4.26
DR15	4	33.33	18.35
DR16	0	0.00	0.00
DR17	6	50.00	25.56
DR18	0	0.00	0.00
DRX	1	8.33	4.26
DQ1	1	8.33	4.26
DQ2	6	50.00	29.29
DQ4	3	25.00	13.40
DQ5	4	33.33	18.35
DQ6	4	33.33	18.35
DQ7	3	25.00	13.40
DQ8	2	16.67	8.71
DQ9	0	0.00	0.00
DQX	1	8.33	4.26

CUADRO 27
DIFERENCIAS ENTRE LOS NIÑOS Y ADULTOS CON LED CONSIDERANDO EL
PERFIL HLA CLASE II PARA CADA AUTOANTICUERPO

ANTIGENO	AUTOANTICUERPO	X ² Y	P	RR
DR8	RNP	4.18	0.04	0.25
DR4	PLP	5.85	0.009	0.13
DR12	PLP	4.00	0.05	0.2481
DQ4	Ro	5.46	0.009	5.85

Nota: Estos antígenos están incrementados sólo en niños.

CUADRO 28
CONTROL GENETICO DE LOS AUTOANTICUERPOS

	Ag-HLA	AutoAg (+ +/+ -)	AutoAg (- -/- +)	X²Y	RR
DNA, (T)	DR7	15/82	6/16	2.6292	0.4769
n=119	DR13	0/97	8/14	43.8362¹	0.0087
	DR17	31/66	6/16	0.0301	1.224
	DQ2	37/60	11/11	1.5979	0.6198
	DQ5	27/72	6/16	0.1711	0.8928
RNP, (T) n=92	DR14	1/39	0/52	0.0175	3.9873
RNP, (N)	DR7	2/4	3/41	17.66²	43.47
n=50	DR8	3/3	16/28	0.0389	1.7273
Sm, (T)	DR12	5/32	1/52	3.0496	5.9231
n=90	DR13	1/36	6/47	3.6176	0.3003
	DR15	9/28	5/48	2.6316	2.9394
	DQ6	10/27	7/46	1.8889	2.367
	DQ8	7/30	1/52	5.843³	8.6066
Sm, (N) n=50	DR12	4/13	0/23	4.08	16.63
	DQ8	4/13	0/23	4.08	16.63
PLP, (T) n=116	DR11	6/35	7/68	0.3106	1.62723
	DR15	10/31	7/68	3.6765	3.0444
	DQ7	13/28	29/46	0.8980	1.8696

CUADRO 28
(CONTINUACION)

	Ag-HLA	AutoAg⁻ (+ +/+ -)	AutoAg (- -/- +)	X²Y	RR
PLP, (N) n=50	DQ11	3/18	1/28	0.7501	3.59
Ro, (T)	DR15	4/26	5/55	0.1389	1.7136
n=90	DR17	12/18	15/45	1.4881	1.9834
	DQ2	15/15	17/43	3.2065	2.4857
	DQ6	11/19	12/48	2.1098	2.2882
Ro, (N)	DR8	1/2	5/42	0.0658	4.6364
n=50	DQ4	2/1	17/30	0.1451	2.9048
La, (T)	DR17	6/6	9/19	0.5079	2.0526
n=40	DQ2	6/6	11/17	0.0779	1.5217
	DQ6	4/8	3/25	1.6162	3.8257

+++ = Autoac +, Ag HLA +; +- = Autoac +, Ag HLA -

-+ = Autoac -, Ag HLA -; -- = Autoac -, Ag HLA -

T= Total de pacientes, A= Adultos, N= Niños

1.- La p= <0.00001; 2.- La p= 0.00003; 3.- La p= 0.01

con una $X^2Y=5.85$, $p=0.009$. En el cuadro 25 se describe la distribución para autoanticuerpos anti-Ro. Los antígenos aumentados en adultos son DR7, DR11, DQ2 y DQ5 y los observados en niños son DR18, DQ4 y DQ6. Al efectuar el análisis sólo permanece una asociación con el DQ4 ($X^2Y=5.46$, $p=0.009$).

En resumen las diferencias entre niños y adultos son las señaladas en el cuadro 27 para cada autoanticuerpo pues son las únicas que alcanzaron significancia estadística. De modo que los genes Ir que conducen la respuesta autoinmune en mexicanos son los siguientes que curiosamente se hallan significativamente aumentados en los niños con respecto a los adultos. Para PLP DR4 y DR12, para Ro DQ4 y para RNP DR8. No se encontró ninguna disminución entre niños y adultos con respecto a los anti-Sm, anti-ANA y anti-DNA. Por último no se pueden analizar los anti-La pues estos sólo se determinaron en adultos. Sin embargo lo que resalta son las frecuencias elevadas con respecto a los sanos de DR15 (FG=9.88% en sanos vs FG=18.35% en pacientes) y DR17 (FG=4.87% en sanos vs FG=25.56% en pacientes).

Por último el cuadro 28 muestra un resumen de la presencia de genes Ir que determinan la expresión de los diferentes autoanticuerpos, pues aquí se expresan los resultados de la presencia o ausencia del anticuerpo respectivo en presencia y ausencia del antígeno en cuestión. El cuadro indica que existen los siguientes genes Ir: Es evidente que no sólo hay genes de susceptibilidad al LED sin que la enfermedad es inmunológicamente heterogénea pues los genes que gobiernan la síntesis de autoanticuerpos son: En pacientes adultos; para anti-DNA DR7 Y DR13 ($X^2Y=43.83$, $RR=0.0087$), DR17 y DQ2, para Ro DQ2 y para PLP DR15, sin embargo sólo para anti-Sm el DR12 da un $RR=2.6$ y los otros tienen una asociación marginal en el límite de la significancia a excepción del DQ8 ($X^2Y=5.843$, $RR=8.60$). En niños es importante la participación del DR7 en síntesis de anti-RNP con un ($X^2Y=17.66$, $RR=43.47$). Para los Sm parece que DR12 y DQ8 son parcialmente responsables con un valor de $RR=16.6$ para ambas. (cuadro 28).

VIII DISCUSION

Este es uno de los trabajos más relevantes que se llevan a cabo en una enfermedad cuya etiología, como ya se ha dicho desde el inicio, es compleja por su gran heterogeneidad clínica, de patogenia inmunológica y de participación genética. El estudio tuvo como objetivo central el contribuir al conocimiento de esta complejidad, tratando de discernir cuales son los marcadores genéticos del MHC que precipitan la enfermedad y cuales son las manifestaciones clínicas y el patrón de autoinmunidad más importantes, haciendo énfasis en saber si el LED infantil es distinto al de adultos y en conocer sus relaciones genéticas. Además, el análisis en la población mexicana del perfil genético y su correlación con los parámetros estudiados fue uno de los aspectos principales del trabajo, pues la investigación de las enfermedades autoinmunes en el contexto étnico ha demostrado claramente que la susceptibilidad, protección y control de síntesis de autorrespuestas dañinas es distinto dependiendo del fondo racial (6, 108).

Los hallazgos clínicos del grupo incluido, que se hallan en el cuadro 12 indican que es una muestra amplia, pues del total de pacientes el número de adultos de 71 y de 50 de niños es un tamaño que permite la evaluación por subgrupos. Clínicamente no se ven diferencias con respecto a lo informado en la literatura para otras series en cuanto a la edad promedio, la evolución o la edad de inicio de la enfermedad. Valga señalar que la edad no se traslapa en los dos grupos, pues a pesar de que hay algunos pacientes en los infantiles que tiene hasta 18 años, en los adultos el menor tiene 20 años de edad. También coincide con lo informado, la presencia de una enfermedad particularmente de mujeres (6, 59, 61, 87 Y 99), aunque no se encontró ninguna correlación con el MHC en este aspecto. Se desconoce porqué esta preferencia de sexos, pero los estudios experimentales indicados, han demostrado que la influencia hormonal es muy importante y las hormonas femeninas aceleran el padecimiento mientras que los andrógenos la retardan, aun cuando parece haber un factor facilitador de la enfermedad en el cromosoma Y (79). La enfermedad renal, la artritis y el eritema malar predominan en adultos, como ocurre en la mayoría de los informes (entre el 50 y 85%), excepto en chinos en los que más del 90% tienen estas manifestaciones y en blancos de EUA en los que sólo el 5% presentan

este eritema (11). Llama la atención que en niños la anemia hemolítica ocurre en un 44% de los casos y la trombocitopenia es mayor que en adultos. Las cifras de anemia son muy bajas en orientales y caucásicos pero en negros es de 33%, que podría deberse a una mayor sensibilidad en los niños a los medicamentos o a que la enfermedad es clínicamente distinta y dependerá de la edad en la que el paciente inicia para observar el compromiso de distintos órganos. También debe considerarse que los pacientes en esta serie pertenecen a un medio socioeconómico bajo, pues provienen de Instituciones de asistencia social que reciben a enfermos de bajos recursos. Esto puede agudizar ciertos signos como la anemia, leucopenia y otros asociados con la desnutrición y la frecuencia de infecciones. La fotosensibilidad probablemente se debe a un rasgo étnico, pues ésta es más común en caucasoides que en mexicanos y no existe en negros, ya que ellos tienen una piel más resistente a los rayos ultravioleta y los individuos con piel más sensible como lo son los caucasoides son más propensos. Por último, no queda duda que el LED en mexicanos es clínicamente tan heterogéneo como en otras poblaciones (6, 103, 11), pero los síndromes difieren en su prevalencia, tal vez debido a factores ambientales.

Uno de los aspectos más importantes en el LED ha sido sin duda la producción de autoanticuerpos, que como se indica en el cuadro 13 van dirigidos también en mexicanos contra una diversidad de componentes celulares y nucleares propios. Cabe hacer notar que aunque desafortunadamente no se lograron determinar en todos ellos, se obtuvieron datos en un buen número de ellos, con excepción de los anti-LA que no se obtuvieron en el grupo infantil. Resaltan como los más frecuentes los anti-ANA y los anti-DNA en ambos grupos, los cuales son también los más comunes en otras series y otras razas (6, 8, 11). Sin embargo, es notorio que les siguen en orden decreciente los anti-RNP, anti-Sm, anti-PLP, Ro y La en adultos, en cambio en niños le siguen los anti-PLP anti-Sm, anti-RNP y Ro. Esta diferencia puede deberse simplemente al número de enfermos que se determinaron en ambos grupos, pues los Sm, los RNP y los Ro sólo se investigaron en 40 adulto. Por otro lado, las pruebas se hicieron en dos laboratorios diferentes y puede haber discrepancias debido a las técnicas empleadas en cada uno de ellos. No obstante, los resultados permiten por primera vez conocer el patrón de autoanticuerpos en el LED en mexicanos, lo cual es un dato muy valioso. En el único trabajo hecho en mexicano-americanos que se ha publicado, se estudiaron sólo 50 pacientes y de los autoanticuerpos estudiados, se

encontraron los RNP después de los anti-DNA, lo cual coincide con los hallazgos de este trabajo. Después siguen los Ro (22%) en primer lugar, frecuencia similar a los del presente estudio (33%), seguidos de los La (10%) que aquí se hallan tres veces más (30%) y en los Sm que ellos informan en un 6%, la discrepancia es realmente significativa, pues en estos pacientes están presentes en un 40%. Sin embargo en una publicación previa hecha por el mismo grupo, en el contexto del XI Taller Internacional de Histocompatibilidad (11) se informa una prevalencia del 22.6% de autoanticuerpos que pueden ser Sm o anti-RNP, de tal manera que estarían muy cercanos a los datos de este estudio.

La frecuencia de anti-PLP es muy similar en japoneses, caribes, italianos y británicos a la de mexicanos, pero esto no parece ser debido a factores genéticos, pues son de orígenes étnicos muy distintos cada uno de estos grupos. Más bien, puede deberse a factores ambientales relacionados con la predominancia de antígenos exógenos con secuencias comunes a la cardiolipina en algunas poblaciones y en entornos diferentes para cada población.

Con respecto al análisis genético del MHC, es indudable de este estudio que los genes clase II juegan un papel central en la expresión del LED en mestizos mexicanos al igual que en otros grupos. El DR17 está indudablemente involucrado como un gen de susceptibilidad al LED en mexicanos, como se indica en el cuadro 17 y no hay duda de que las secuencias de este antígeno tienen un papel central en el desencadenamiento de la enfermedad tanto en adultos como en el LED infantil, pues el análisis estadístico (cuadro 19) muestra una X^2Y muy elevada tanto en el grupo total como en adultos, de modo que la p permanece altamente significativa, aún después de corregirla ($p_c = <0.0003$). Los valores de RR de 4.1 y 5.1 respectivamente indican que un sujeto sano portador de este antígeno tiene de 4 a 5 veces más probabilidades de desarrollar LED que un sujeto que no lo lleva. En el caso de los niños la significancia es menor ($p=0.01$) y se pierde al corregir el valor de p . Sin embargo, la razón es probablemente que el número de niños analizados es menor y ya que la asociación es tan intensa, si se aumentara el número de niños, la significancia se reforzaría. El otro antígeno que parecería de susceptibilidad es el DQ2. No obstante, el valor de p es mucho menor ($p_c=0.02$) lo que muestra que el verdadero gen de susceptibilidad está en la región DR y no en el locus DQ. Ciertamente, este antígeno aparece menos intensamente asociado porque la combinación DR17-DQ2, se halla en desequilibrio de

enlace no sólo en las poblaciones caucasoides, sino también en la mexicana, como se demostró por el grupo de Gorodezky (41). Es interesante señalar que de los datos existentes en la literatura, que se resumen en el cuadro 10 de la sección de la Introducción, resaltan dos asociaciones fundamentales. El haplotipo A1-B8,DR17,DQ2 y el haplotipo DR2 (fundamentalmente con el subtipo DR15)-DQ1 (con la variante DQ6), en poblaciones caucasoides principalmente de origen europeo (6, 52, 97, 101, 108). En cambio, en chinos y japoneses, sólo se halla el DRB1*1501 mientras que en poblaciones negras participan dos alelos del DR15: el *1501 y el *1503 (105). Estos hallazgos permiten investigar cuales son las secuencias precisas en el nicho del DR17 y de las variantes del DR15 involucradas en el reconocimiento del o los péptidos que funcionan como autoantígenos en estos pacientes. Los resultados son compatibles con la hipótesis de que el gen de susceptibilidad para el LED en mexicanos es de origen caucasoides y no hubo ninguna contribución al padecimiento, de los genes orientales o negros están presentes en la población mestiza de nuestro país. Estos hallazgos coinciden también con lo informado por Reveille y col. (82, 84) quienes al efectuar un análisis molecular de los genes clase II informan una asociación significativa con el DRB1*0301 que es el gen que codifica para el antígeno DR17, aquí descrito, aunque la significancia no fue muy intensa en el estudio mencionado de Reveille y col. seguramente porque sólo incluyeron a 50 pacientes.

Otro aspecto sobresaliente de este trabajo es la identificación de un posible gen involucrado en la resistencia a manifestar el LED. En el cuadro 19 se incluyeron varios antígenos potencialmente marcadores de este rasgo. Sin embargo, queda claro que sólo el DQ6 puede estar participando en protección, pues la X^2Y en el grupo total así como en los adultos y en los niños se mantiene alta y la p se mantiene significativa después de la corrección en todos los casos ($p < 0.0003$, $p < 0.0003$, y $p = 0.02$ respectivamente). Hasta ahora no se había informado de la presencia de un gen de protección en otras poblaciones, por lo que este hallazgo llama la atención para hacer ahora una búsqueda intencionada en otros grupos, pues esto permitirá reconocer a individuos dentro de las familias con antecedentes de individuos que están en muy bajo riesgo de manifestar el LED.

Resumiendo estos datos, es importante resaltar dos aspectos. Uno es que estos datos indican indudablemente la participación de los genes clase II del MHC tanto en susceptibilidad como en

protección, pues no sólo se corrigieron las p, sino también se empleó la X^2 Yates que hace más estricto el análisis estadístico. El segundo aspecto es que es evidente que la enfermedad no es genéticamente diferente en niños de adultos, pues son los mismos genes dentro del MHC que son por lo menos parcialmente responsables de la susceptibilidad (DR17) y de la protección (DQ6) en ambos grupos. Finalmente, los hallazgos constituyen una herramienta muy valiosa para predecir la enfermedad y hacer diagnósticos tempranos o identificar individuos en alto o bajo riesgo de expresar la enfermedad, sobre todo en aquellos casos en los que existen antecedentes familiares de LED. En este sentido, ya se discutió ampliamente que se ha descrito historia familiar de LED desde 2 hasta 25% dependiente del grupo racial (6). En este trabajo, no se lograron reunir con fidelidad los datos en historias clínicas de antecedentes familiares, pero se sabe de un estudio hecho en mexico-americanos, que la historia familiar de LED es de alrededor del 20% en familiares de primer grado (11).

En cuanto a la presencia de autoanticuerpos, cada vez hay un mayor número de evidencias de que el LED es un padecimiento formado de subtipos de autorrespuestas asociadas a los genes clase II del MHC. Los anti-DNA se han relacionado con algunos antígenos o haplotipos como son los DR17, DR7-DQ2; DR4-DQ8; DR13, DR15-DQ6; los cuales se ven en caucasoides, pero algunos aparecen en las tres razas troncales como son los del DR15 y DR17, datos que se discutieron ampliamente y que se muestran resumidos en la Fig. 3 de la introducción (6, 11, 82, 84). En este estudio, cuyos datos se observan en el cuadro 28, los anti-DNA se hallaron asociados al DR7 y DR13 sin llegar a la significancia estadística ($X^2Y=2.62$ y 43.83 respectivamente), pero con RR bajos de 0.47 y 0.008, sugiriendo una asociación débil si se analiza el autoanticuerpo dirigido contra el DNA completo. Los anti-Ro y anti-La se han asociado a los haplotipos DR15, DR13 y DR17, DR7, que también participan como genes Ir en la respuesta contra DNA y en este grupo de pacientes se encontraron las siguientes relaciones: Con anti-Ro, DQ2, DQ6 y DR17 están no significativamente incrementados pero muestran RR= 2.48; 12.8 y 1.98 respectivamente, mientras que el DR15 que tiene una X^2Y totalmente NS tiene un RR=1.7. Estos datos coinciden con lo informado en la literatura y que también señala Reveille y col (82, 84) en su estudio en México americanos, aunque tampoco llega a la significancia estadística, pues como ya se indicó, el número de pacientes incluido por ellos fue pequeño. En niños se observa una

asociación con el haplotipo DR8-DQ4 con riesgos de 4.63 y 2.90 respectivamente, hallazgo que también fue informado por Reveille y col en mexico-americanos (84). La expresión de los anticuerpos anti-La parecen estar parcialmente condicionados por los antígenos DR17 y DQ6, pues aunque la estadística no muestra significancia los riesgos son de $RR=2.05$ y 3.8 respectivamente, indicando que probablemente la mismas secuencias del nicho de DQ y de DR que se observan en poblaciones blancas, son las responsables de la unión a diferentes fracciones del DNA. También es importante hacer notar, que cuando se analizan los autoanticuerpos contra fracciones, empiezan a surgir las asociaciones, demostrando que los genes Ir son para reconocer epítopes definidos de secuencias pequeñas dentro de toda la molécula del antígeno. Si bien los anti-Sm se han relacionado con DR12, DR13, DR15 y DQ6, una hallazgo de interés de este trabajo es la asociación clara con DQ8 ($X^2Y=5.84$) con una $p=0.01$ y un riesgo bastante alto de 8.6, lo cual indica que en mexicanos este es un factor muy importante de riesgo para la síntesis de autoanticuerpos aunque también hay una participación no significativa del DR15 y DQ6 (con un RR de 2.93 y de 2.36) que se observa en caucásicos y negros. Los anticuerpos contra RNP mostraron genes Ir en las moléculas del DR14 con un $RR=3.98$ y del DR7 con una significancia muy elevada ($p=0.00003$) y un riesgo sumamente incrementado de 43.4. El grupo de mexico-americanos también muestra el haplotipo DRB1*0701-DQB1*0201, pero ellos encuentran una asociación más fuerte con el alelo que corresponde al DQ8, tal vez por el grado de heterogeneidad étnica un tanto diferente al de los mestizos de México. Por último, las siguientes secuencias participan en el control de la síntesis de los anticuerpos contra PLP: DR11 con un $RR=3.59$ en niños y DR15 que muestra una participación en el límite ($p=0.05$) y un riesgo medio de 3.59.

En resumen, las asociaciones HLA con las diferentes autorrespuestas en el LED, existentes en los distintos grupos étnicos estudiados hasta ahora, sugieren fuertemente que los genes HLA son en realidad candidatos importantes como genes Ir que controlan la síntesis de autoanticuerpos. El análisis de las secuencias ha demostrado como también se observa de los datos de este trabajo, que las posiciones 14 y 70 de la cadena DQB1 y la 34 y 76 en DQA1 son probablemente sitios complementarios de unión a secuencias de los péptidos del DNA que conforman al Ro y al LA. La

posición 57 en DQB1 es crucial para RNP y Sm y las posiciones 71-77 modulan la respuesta contra los fosfolípidos.

En conclusión, los resultados de la exploración de la participación del MHC en el LED en mexicanos indica que la enfermedad es tan heterogénea como en otras series tanto desde el punto de vista clínico como inmunológico. La expresión de la enfermedad "*per se*", depende por lo menos en parte de los genes que codifican para el DR17 (DRB1*0301) y la resistencia de un gen en la región DQ, cercano al DQ6. Por otro lado, la síntesis de autoanticuerpos diversos es el resultado de la presencia de genes particulares en los individuos susceptibles, pues si bien un portador del DR17 tiene un riesgo alto de manifestar LED, también podrá desarrollar anticuerpos anti-DNA, anti-Ro y anti-La. Si es portador del DQ6 y/o DQ8 estará en riesgo de producir anti-Sm. Si es portador del DR15 y DR11, la síntesis se dirige a los anticuerpos anti-PLP. El DR8 y DQ2 condicionan la síntesis de anti-Ro, DR12, DR13 Y DQ8 la de Sm y DR14 y DR8 la de RNP, con un riesgo mayor si llevan al DR7. Las secuencias del DQ6 se asocian a péptidos del Sm y Ro de la molécula de DNA.

Con estos resultados, habrá que investigar cuidadosamente las secuencias que participan para dejarle accesible al TCR, las secuencias que éste reconocerá específicamente para desencadenar una respuesta de gran afinidad, ocasionando la respuesta autoinmune.

Una importante lección de estos hallazgos es que ahora se podrán investigar en familias con antecedentes de LED a los individuos que se hallan genéticamente en riesgo de manifestar la enfermedad, de modo que se podrá predecir muy tempranamente si un individuo tiene posibilidades de enfermarse. Mas relevante, es el hecho de determinar autorrespuestas en estas familias y seguir la síntesis de autoanticuerpos en individuos que aún no manifiestan el LED, pero presentan autoanticuerpos. Con esto, se podrán hacer diagnósticos tempranos, seguimiento de sujetos que producen autoanticuerpos y tal vez, iniciar terapias o métodos profilácticos para retardar la instalación del LED o para hacerla una enfermedad menos severa. La investigación molecular detallada de los genes DRB1, DQA1 y DQB1, así como los defectos en los genes del TCR y el análisis de los péptidos de cada uno de los antígenos desencadenantes de la autoinmunidad, es el paso obligado para conducir al manejo inmunogenético de estos pacientes.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los hallazgos clínicos en el LED muestran una enfermedad tan heterogénea como lo ya descrito en comparación con lo que se tiene en la literatura, pues los adultos presentan daño renal, artritis y eritema malar y los niños manifiestan daño renal, artritis y anemia hemolítica. El único dato que llama la atención es la ausencia de anemia hemolítica en adultos.
2. La mayoría son pacientes femeninos (94.2%), como en otros estudios sugiriendo una influencia hormonal como desencadenante del LED.
3. Los autoanticuerpos van dirigidos contra una diversidad de componentes y su prevalencia es ligeramente diferente entre adultos y niños. Los anticuerpos anti-ANA y anti-DNA se hallan con mayor frecuencia en ambos, pero en los adultos le siguen los anti-RNP, anti-Sm, anti-PLP, anti-Ro y anti-La, mientras que en los niños le siguen los anti-PLP, anti-Sm, anti-RNP y anti-Ro, lo cual probablemente se debe a eventos inmunológicos relacionados con la edad.
4. El perfil genético del complejo HLA demostró que el gen de susceptibilidad en el LED es el DR17. La asociación menos intensa con el DQ2 demuestra que las secuencias responsables están en el locus DR y que el DQ2 aparece porque estos dos antígenos se encuentran en desequilibrio de enlace.
5. Se observó la presencia de un gen de probable protección en la región DQ, pues el DQ6 está significativamente disminuido en ambos grupos, lo que sugiere que un sujeto portador de este antígeno tiene menor riesgo de expresar el LED.
6. La enfermedad en México no es diferente genéticamente en niños de adultos y las diferencias clínicas o inmunológicas se deben probablemente a aspectos relacionados con el desarrollo, desnutrición y otros factores exógenos.
7. En la región DR y DQ existen secuencias que controlan la síntesis de autoanticuerpos para ciertos componentes como son el DNA para el cual DR7 y DR17 tienen complementaridad. Ciertos péptidos del DNA como Ro y La, desencadenan autorrespuestas en presencia de DQ2, DQ6 y DR17. Sm se reconoce en el contexto del DQ8 y los RNP se asocian a secuencias del DR14 y DR7.

8. Los hallazgos permiten identificar tempranamente a sujetos en riesgo de expresar el LED, cuando hay antecedentes familiares de la enfermedad. Ahora se podrá hacer un seguimiento de la presencia de autoanticuerpos como marcadores predictivos en sujetos aparentemente sanos de familias con antecedentes de enfermedades autoinmunes.

9. Con el conocimiento del perfil genético y su correlación inmunológica se facilita la identificación temprana, el tratamiento oportuno y en el futuro la terapia génica.

IX APENDICE

1. MATERIAL

- Fibra de nylon, Fenwal Laboratories
- Frascos de vidrio de 50 a 100 ml
- Jeringas Estériles (10 Y 20 ml)
- Ligadura
- Microjeringas sencillas multiples de 50 y 250 ul (Robbins Scientific Corporation)
- Microplacas de Terasaki para microcitotoxicidad 3034 (Rubbins Scientific Corporation)
- Pinzas
- Pipetas graduadas (5 y 10 ml)
- Pipetas pasteur
- Popotes de plástico
- Portaobjetos Clay Adamas, Cold Seal No. 3021
- Torundas
- Tubos de vidrio de 13 x 150
- Tubos Fisher, (Robbins Scientific Corporation)
- Portaobjetos desechables para microplacas
- Cámara de Newbauer

2. EQUIPO

- Balanza granataria, Harvard Trip
- Centrifuga Fisher, modelo 59
- Centrifuga refrigerada, modelo PR-2
- Estufa a 37°C
- Microscopio invertido, American Optical, Biostar
- Microscopio óptico, E. Letz W. Nr. 532147
- Potenciómetro
- Vortex Mixer 60085
- Congelador de -20°C
- Ultracongelador
- Refrigeradores

1.3 REACTIVOS

Aceite mineral

Alcohol al 96%

Antibióticos:

Penicilina G sódica (ampolleta de 1,00,000 UI) con una concentracióp n de 100U/ml

Estreptomina (ampolleta de 1 gr.) con ampolleta de 5 ml. de agua tridestilada estéril.

Azul de tripano

Eosina amarilla al 5% en agua

Pesar 5 gr. de eosina amarilla en 100 ml de agua, ajustada a un pH de 7.2.

Formol, solución saturada (Reactivo al 34%)

Heparina 1000 U/ml: (1,000,000 u (180 U/mg)

Se pesan 550 mg de - heparina y se disuelven en 100 ml de agua tridestilada. Se esteriliza por filtro milipore usando un poro de 0.22 u. Se distribuye en frascos estériles en alícuotas de 10 ml. Se tapan con tapón de hule y retapa metálica y se guardan en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Medio RPMI 1640

Añadir el contenido de un sobre de medio RPMI en un matraz erlenmeyer que contenga 950 ml de agua tridestilada. Agitar suavemente hasta que se disuelva por completo. Añadir 2 gr. de bicarbonato de sodio y aforar a 1000 ml. Ajustar el pH a 0.2 - 0.3 unidades por debajo del pH deseado (el pH aumenta de 0.1 a 0.3 unidades después de la filtración). Usar NaOH o HCl 1N para ajustarlo. Mantener perfectamente tapado el matraz hasta que se filtre. Esterilizar por milipore (0.22 u), distribuyendo en frascos estériles de 100 ml y sellar con tapón de hule y retapa metálica. Guardar hasta su uso a 4°C y protegerlo de la luz.

Solución balanceada de Hanks normal

Se hidrata el polvo con agua tridestilada y se afora a 1 litro, se ajusta a un pH de 7,2 y se esteriliza por filtro milipore (0.22 u). Distribuir en frascos estériles de 100 ml., colocar tapones de hule y retapas metálicas y guardar en refrigeración a 4°C en la obscuridad.

Solución de Ficoll-Hypaque

Solución de Hepes (SIGMA, No. H-3375) al 1M, pH 7.2 (Lymphoprep)

Disolver 23 gr de hepes en 70 ml de agua tridestilada ajustada a un pH de 7.2 NaOH 5N. Completar a 100 ml de agua tridestilada. Esterilizar en autoclave a 15 Lb (120°C).

Suero AB

Reactivos anti-HLA

1.3 DETERMINACION DE AUTOANTICUERPOS. (15, 20).

a) *Determinación de Autoanticuerpos contra DNA Nativo mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta con Crithidias sp.*

Reactivos

Medios de Cultivo: Medio NNN

A. Solución Madre de Ringer (en 1 litro)

NaCl.....	70g
CaCl.....	3g
KCl.....	2.5 g

Para usarla, diluirla 1:10 con agua neutra estéril.

B. Agar sangre:

Agar puro (Bacto-agar o agar nutritivo)	14g
Agua destilada	900 ml
NaCl	6g
Sangre de conejo desfibrinada	2-3%
NaOH	1N

Preparación

1. Se añade el agar y el NaCl al agua destilada, se lleva al punto de ebullición se deja enfriar entre 50^o y 60^oC y se neutraliza con NaCl 1N.
2. Se preparan las alicuotas del medio y se esteriliza en autoclave a 12 lb de presión por 30 min y se colocan en refrigeración hasta su uso.

Medio

1. Se funde una alicuota de agar se deja enfriar a 50-60^oC. Se añade la sangre de conejo desfibrinada, en un ambiente estéril y se mezcla bien hasta tener la concentración de 2-3%.
2. En tubos estériles se agregan 5 ml de medio de agar-sangre y se inclinan. Cuando se ha solidificado se refrigera durante 12 hrs. Se incuban los tubos por 24 hrs a 37^oC para ensayo de esterilidad.
3. Agregar a los tubos la solución de Ringer diluido 1:10 con agua destilada estéril.
4. Resembrar una alicuota de la cepa disponible (0.4 ml). Dejar los tubos en incubación a 22 - 25^oC por 15 a 20 días.

Preparación de laminillas

Un tubo con la cepa se centrifuga a 3000 g durante 10 min, se desecha el sobrenadante y se lava 3 veces con PBS a pH 7.2. Se resuspende el botón con 0.2 ml de agua destilada estéril y se coloca una gota de la suspensión en la laminilla. Se deja secar y se fija con etanol al 96% por 10 min y se guardan en envases cerrados a -20^oC hasta su uso.

Cepas de Crithidias sp.

PBS pH 7.2 (Solución madre) :

Solución A.	Na ₂ HPO ₄ 0.1 M:	
	Na ₂ HPO ₄	14.2 g
	Agua destilada	1 litro
Solución B.	NaH ₂ PO ₄ 0.1 M	
	Na ₂ HPO ₄	13.8 g
	Agua destilada	1 litro

Mezclar solución A más B:

Solución A	71.5 ml
Solución B	28.5 ml
Solución Salina 0.85%	900 ml

Se regula el pH a 7.2 con ayuda de las soluciones madre.

Glicerina Amortiguada

A. Amortiguador de fosfatos pH 8.0:

Solución A	94.5 ml
Solución B	5.5 ml

Corrección del pH con NaOH 10N.

A 9 ml de glicerina se le añade 1 ml de amortiguador de fosfatos pH 8.0. Se mezclan y conservan en refrigeración.

b) *Determinación de Autoanticuerpos por el Método de Inmunofluorescencia Indirecta*

1. Preparación del Polvo de Hígado

El hígado de cobayo, rata o ratón se homogenizan en una licuadora por dos min con un volumen igual de solución salina y se filtran a través de seda. Al filtrado se le adicionan 4 volúmenes de acetona fría. Se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min. Lavar el precipitado con SSF hasta que el sobrenadante quede libre de hemoglobina (4-5X). Finalmente se lava con agua destilada y 3-4 veces con acetona para completar la deshidratación. Se coloca el polvo a 37°C por 24 hrs, se muele en un mortero y se almacena en tubos con tapón de rosca a 4°C.

2. Antisuero

1. Reconstituir el antisuero fluoresceinado convencional con el diluyente que trae el equipo.
 2. Absorber con polvo de hígado de rata:
 - a) 100 mg/ml (0.5 g por 5 ml)
 - b) Para reducir pérdida del volumen del conjugado, el polvo de hígado se humedece con unas gotas de amortiguador de Coons.
 - c) Dejar en frío (hielo) 45 min con agitación cada 10 min.
 - d) Centrifugar a 2000 rpm durante 10 min y separar en alícuotas de 0.1 ml y congelar a -70°C.
- Se diluye con PBS 1:4* antes de su uso. * Debe titularse el antisuero antes de su dilución.

3. Amortiguador de COONS pH 7.2

5,5 dietilbarbiturato de sodio	20.6 g
Cloruro de sodio	85 g
Acido clorhídrico	80.6 ml
Agua destilada	llevar a 5 litros

Diluir con agua destilada 1:2 antes de ser usado.

4. Amortiguador de glicina 0.1 M pH 8.6

Glicina	14 g
Hidróxido de sodio	0.7 g
Cloruro de sodio	17 g
Azida de sodio	1 g
Agua destilada	aforar a 1 litro

Diluir 1:3 con glicerol antes de usarse.

5. Amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2

Cloruro de sodio	8.5 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	8.62 g
KH ₂ PO ₄	2.48 g
Agua destilada	aforar a 1 litro

6. Cortes de Hígado

1. Hacer cortes de hígado de rata con microtomo y sumergirlos en buffer de fosfatos 0.1 M con formalina 10%. Guardar a -70°C. Después se fijan los cortes con acetona al 100% durante 10 min.

Para preparar el amortiguador de fosfatos

KH ₂ PO ₄ 0.5 M	68.04 gL-1	17.6 ml
Na ₂ HPO ₄ 0.5 M	70.99 gL-1	60.8 ml
Agua destilada		llevar 1 litro

Formalina : formol al 37% con agua destilada.

c) *Determinación de Autoanticuerpos anti-PLP, anti-RNP, anti-Ro, anti-La y anti-Sm Mediante el Análisis de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA).*

1. Fase sólida (Tubos o placas de poliestireno)
2. Solución de antígeno, que consiste de el suero problema.
3. Suero humano normal.
4. Suero humano positivo.
5. Solución de conjugado (IgG de cabra anti-inmunoglobulinas totales).
6. Sustrato: 100 ml de amortiguador de citratos pH 5 + 40 mg de ortofenilen-diamina + 40 ul H₂O₂ al 30% en oscuridad.
7. Amortiguador de recubrimientos (Carbonatos 0.1 M pH 8.6).
8. Amortiguador de salina fosfatos 0.01 M pH 7.2 adicionado de Tween 20 (PBS-T).
9. H₂SO₄ 8 M.
10. Bomba de vacío y estufa a 37°C.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH y Pober JS. Immunologic Tolerance and the Regulation of Immune Responses. En: Cellular and Molecular Immunology. Eds. Abbas AK, Lichtman AH y Pober JS. Filadelfia, Pensilvania. 1991.209-215.
2. Albert ED, Baur MP y Mayr WR. Histocompatibility Testing. Proceedings of the 9th International Histocompatibility Workshop. Alemania/Viena. Springer-Verlag, Berlin.1984.
3. Alvarellos A, Ahearnm JM, Provost TT. Relationships of HLA-DR and MT antigens to autoantibody expression in SLE. *Arthritis Rheum.* 1983.26:1533-1535.
4. Amos DB y Bach FH. Phenotypic expression of the mayor histocompatibility locus in man (HL-A): Leucocyte antigens and mixed leucocyte culter reactivity. *J Exp Med.* 1968.128:623-637.
5. Arnett FC, Bias WB y Reveille JD. Genetic studies in Sjögren syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 1989. 2:403-413.
6. Arnett FC y Revielle JD. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Amer.* 1992.18:865-892.
7. Balner H, Cleton FL y Eernisse JG, eds. Histocompatibility Testing 1965. Proceedings of the 2nd Internat. Histocompat. Workshop. Munksgaard, Copenhagen. Eds. Van Rood JJ, Van Leeuwen A, Shippers MJ, Vooyes WH, Frederiks E, Balner H, Eernisse JG. Munksgaard, Copenhagen. 37-50.
8. Bautista MN. Tesis de Licenciatura de Biología. "Factores de susceptibilidad genética y genes de respuesta inmunológica ligados al MHC en la Tuberculosis". UNAM. México, D.F. 1993.34-59.
9. Beatty PG, Mickelson EM. Histocompatibility 1991. *Transfusion.*1991,31:847-856.
10. Bettinotti MP, Hartung K, Deicher HRG, Keller E, Mikschl S, Albert E. DR2 haplotypes (DRB1, DQA1, DQB1) associated with systemic lupus erythematosus. *Immunogenet.* 1993.20:259-266.
11. Bias WB, Hochberg RH McLean RH y Machan C. Systemic lupus erythematosus joint report. HLA 1991 Worshop and Conference. Eds. Tsuji K, Aizawa M y Sasazuki T. Springer-Verlag, Oxford. Vol. 1. 1992.740-745.
12. Bjorkman PJ, Saper MA, Samaroub B, Nennett WS, Strominger JL, Willey DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition region of class I histocompatibility antigens. *Nature.*1987 329:506-518.
13. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens.* 1992.39:1-13.

14. Bodmer WF, Batchelor JR, Bodmer JG, Festenstein H y Morris PJ. Report of the 7th International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford England. Munksgaard, Coopenhagen. 1977.
15. Bodmer JG, Marsh GE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Th Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A y Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens* 1994;44:1-18.
16. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Bo Dupont, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A y Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system. 1995. *Hum Immunol.* 1995 43:149-164
17. Botero C. y Mejia SC. *Manual de prácticas en inmunología.* Instituto Nacional de Pediatría. Departamento de Inmunología. 1992.
18. Braciale JT y Braciale LV. *Antigen Presentation: Estructural themes and functional variations.* *Immunol. Today.* 1991, 12: 124-129.
19. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Tridimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1993 364:33-39.
20. Ceppellini R, Curtoni E S, Mattuiz P L, Miggiano V, Scudeller G y Seirs A. Genetics of leucocyte antigens: A family study of segregation and linkage. En: Curtoni E S, Mattuiz P L y Tosi R M. *Histocompatibility Testing.* Munksgaard, Copenhagen. 1967. pp. 149-187.
21. Cohem AS, Reynolds WE, Freanklin EC, Kulka JP, Polpes ML, Shulman LE y Wallace SN. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* 1971.21:643.
22. Coligan EJ, Kruisbek AM, Morgulies DH, Sevach EM, Strober W. *Current Protocols in Immunology.* Vol. I. Eds. NIH, NIAID, Bethesda Maryland. 1991.
23. Colombani J, Colombani M, y Dausset J. Non-complement-fixing IgM antibodies whith anti-HL-A2 specificity and blocking activity. *Transplantation.* 1973.16:257-260.
24. Cowland JB, Andersen V, Halberg P, Morling N. DNA polymirphism of HLA class II genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 1994.43:34-37.
25. Dausset J y Nenna A. Presence d'une leucoagglutinine dans le serum d'un cas d'agranulocytose chronique. *C. R. Soc Biol (Paris)* 1952 146 1539-1541.
26. Dausset J. Leuco-agglutinins IV. Leucoagglutinins & blood transfusion. *Vox Sang.* 1954 4:190-198.
27. Dausset J Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol (Basel)* 1958 20:156-166

28. Dausset J, Iványi, Iványi D. Tissue alloantigens in humans: Identification of a complex system (Hu-1). En: *Histocompatibility Testing*. Eds Balner H, Cleton FL, y Eernisse JG. Munksgaard, Copenhagen. 1965. pp. 51-62.
29. Davatchi F, Nikbin B, Ala F. Histocompatibility antigens (HLA) in rheumatic disease in Iran. *J Rheumatol*. 1977;4 (Suppl 3):36-38.
30. Dong RP, Kimura A, Hashimoto H, Akisuki M, Nishimura Y, Sasazuki T. Diference in HLA-linked genetic background between mixed connective tissue disease and systemic lupus erythemathosus. *Tissue Antigens*. 1993;41:20-25.
31. Dupont B. Immunobiology in HLA. *Proceedings of the 10th International Histocompatibility Workshop and Conference*. Princeton/Nueva York. Springer-Verlag. 1987.
32. Dyer P. y Warrens A. Design and Interpretation of studies of the Major Histocompatibility Complex in disease. En: *HLA and Disease*. Ed. Robert Lechler. Academic Press, Londres. 1994. pp. 93-113.
33. Erlich. AH. HLA Class II Gene Polymorfism: DNA Typing, evolution and relationship Aspects of the Major Histocompatibility Complex Eds. Moulds FKJ, Garner RJ. American Association of Blood Banks. Arlington. 1989. pp. 101-106.
34. Fathman GC. Immunotherapy of rheumatic disease genetic predisposition to the development of these diseases. *Rheum Dis Clin North Amer*. 1992, 18:915-926.
35. Fraga A, Gorodezky C, Lavalle C, Castro EL, Magaña A y Escobar GA. HLA-B27 in Mexican patients with ankylosing spomdyilitis. *Arthritis Rheum*. 1979;22:302-304.
36. Fye HK y Sack KE. "Rheumatic Disease". En: *Basic and Clinical Immunology*. Eds. Stites DP. San Francisco, Ca. 1994. pp. 387-411.
37. Germain RN. The biochemistry and cell biology of antigen, processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol*. 1993. 11: 403-450.
38. Goday A."Endocrinología" En: *Medicina Interna*. Eds. Farreras PV y Rozman C. DOYMA. Barcelona. 1992. pp. 1240-1270.
39. Gorer PA. Lyman and Snell GD. Studies on the genetic and anigenis basis of tumour transplantation. Linkage between a Histocompatibility Gene and "Fused" in Mice. *Proc. R. Soc. Lond. Biol*. 1948.135: 499-5051.
40. Gorodezky C, Flores J, Arévalo N. y Castro LE. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. *Lepr Rev*. 1987. 58: 401-406.
41. Gorodezky C. Variación genética del MHC en la población mexicana. *Histocomp Latamer*. 1988.1:8-21.

42. Gorodezky LC. Genes de susceptibilidad y supresión inmunológica ligados al MHC en la lepra. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN México, D.F., Tesis Doctoral. 1989.
43. Gorodezky C. La Inmunogenética en las enfermedades reumáticas En: Reumatología Pediátrica. Ed. R. Rodríguez SR. Mc Graw Hill. México. 1994. pp. 21-36.
44. Gorodezky C. Genetic difference between Europeans and Indians: Tissue and Blood Types. *Allergy Proc.* 1992. 13:243-250.
45. Gorodezky C. Metodos para el análisis estadístico del complejo HLA. Real Academia de Ciencias de España. 1993.
46. Gorodezky C. Papel de la Inmunogenética en la distribución y frecuencia de las Enfermedades Tropicales. En: Las Enfermedades Tropicales en México, Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica. Ed. Valdespino JLV, Velasco C, Ibañez B, Del Río A, Escobar GA. 1994.
47. Gorodezky C. Manual de Técnicas del XIV Curso Teórico-Práctico de actualización en Histocompatibilidad. Departamento de Inmunogenética. INDRE, SSA. 1995. pp. 50-56, 76-79.
48. Gorodezky C, Olivo A, Debaz H, Rodríguez L, Altamirano N, Juárez V, Robles C. Los mecanismos moleculares de susceptibilidad y protección dependiente del MHC en la Diabetes Tipo I en mexicanos. *Gaceta Médica Academia Nacional de Medicina* p 395-402 1995. EN PRENSA
49. Goldberg MA, Arnett FC, Bias WB, Shulman LE. Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1974.19:129-132.
50. Gómez-Reino JJ, Martínez-Lazo J, Vicario JL, paz-Artal E, Aragón A, Martín-Villa JM, DeJuan MD, Pérez-Aciego P, Arnaiz-Villena A. Immunogenetic of systemic lupus erythematosus in spanish patients: diferencial HLA markers. *Immunobiol.* 1991.182:465-471.
51. Griffing WL, Moore SB, Luthra HS. Association of antibodies to native DNA with HLA-DR3: A possible major histocompatibility linked human immune response gene. *J. Exp Med.* 1980. 152. 3195-3205
52. Grument FC, Coukell A, Bodmer JC, Bodmer WF, Mc Devitt. Histocompatibility (HLA-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. *New Eng. J Med.* 1971.285:193-196.
53. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frecuencies. *Ann Hum Genet.* 20:309-311, 1956
54. Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter KK, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA, Stangel W, Deicher HRG. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1992 90:1346-1351.

55. Hawkins BR, Dawkins RL, Richmond J, Rigby RJ. Immunogenetic factors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1979;22-94.
56. Heard R. "HLA and Autoimmune Disease" En: HLA and Disease. Ed. R Lechler. Academic Press, Londres. 1994. pp. 123-145.
57. Kaneoka H, Hsu KC, Takeda Y. Molecular Genetic Analysis of HLA-DR and HLA-DQ genes among anti-U1-70 kd autoantibody positive connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum.* 1992. 35:83-94.
58. Khanduja S, Arnett FC, Reveille JD: HLA-DQ beta genes encode an epitope for lupus specific DNA antibodies (abstract). *Clin Res.* 1991;38:975.
59. Kimberly R. Lupus eritematoso, formas sistémica y local. En: Medicina Interna. Ed. Kelley WN. Panamericana. Philadelphia, Pennsylvania. 1990:1063-1071.
60. Kissmeyer-Nielsen F. Report of the VI International Histocompatibility Workshop Conference. Histocompatibility Testing. Arhus Denmark. Munksgaard, Copenhagen. 1975.
61. Koffler D. "Lupus Eritematoso Sistémico". 1980. En: Libros de Investigación y Ciencia. Scientific American. 2a. ed. prensa Científica. 1984:314-325.
62. Layrisse Z. Sistema HLA en poblaciones latinoamericanas "Análisis de estudios en poblaciones sanas de diverso origen étnico". *Histocomp Allergy Proc Latamer.* 1988. 1:23-29.
63. Lechler R. "The roles of class I and II molecules of the major histocompatibility complex in T-cell immunity". En: HLA and Disease. R Lechler. Academic Press, Londres. 1994. pp. 49-72.
64. Lechler R. "Mechanism of HLA and Disease Associations". En: HLA and Disease. Eds. Lechler. London, UK. Academic Press, Londres. 1994.83-92.
65. Long ED. y Steven J. Pathways of viral antigen processing and presentation to CTL: Defined by the Mode of Virus Entry? *Immunol. Today.* 1989. 10: 45-48.
66. López LC, González RS, Peña M, Domínguez O, Coto E, Alvarez V, Moreno M, Hernández O, Borgos R y Gorodezky C. Characterization of B27 haplotypes by oligotyping and genomic sequencing in Ankylosing Spondylitis: Juvenile and Adult Onset. *Human Immunol.* 1995.43:174-180.
67. Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M. Serological findings in patients with "ANA-Negative" Systemic lupus erythematosus. *Medicine.* 1981.60:87-94.
68. McHugh NJ, Maddison PJ. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989.32:1623-1624.

69. McNeil HP, Gavaghan TP, Kriles SA. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 1990 8:425-427.
70. Mildfor EL. Nomenclature of HLA. En: **Scientific and Technical Aspects of the Major Histocompatibility Complex**. Eds. Moulds JM, Fawcett KJ y Garner RJ. Am Asso of Blood Banks. Arlington. 1989. pp. 1-21.
71. Mizuky N, Inoko H y Ohno S. Role of HLA and T lymphocytes in the immune response. *Ocular Immunol. and Inflamm.* 1994;2:57-91.
72. Moulds JM, Warnwr NR y Goldstein R. Class III antigens: 21-OH, C4, Bf, C2 y TNF. En: **Scientific and Technical Aspects of the Major Histocompatibility Complex**. Eds. Moulds JM, Fawcett KJ y Garner RJ. Am Asso of Blood Banks. Arlington. 1989. pp. 73-90.
73. Nies KM, Brown JC, Dubois EL, Guismorio FC, Friou GJ, Terasaki PI. Histocompatibility (HLA) antigens and lymphocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum.* 1974.17.397-402.
74. Nepom GT, Concannon P. Molecular Genetics of Autoimmunity. En: **The Autoimmune Diseases II**. Eds: Rose NR, Mackay IR. Academic Press. Nueva York. 1992. pp. 127-152.
75. Nepom GT. Disease markers and new therapeutics. *Rheum Dis Clin North Amer.* 1992.18:719-727.
76. Olsen ML, Goldstein R, Arnett FC. C4A gene deletion and HLA associations in black Americans with systemic lupus erythematosus. *Immunogene.* 1989.30:27-33.
77. Payne R. y Rolfs MR. Fetomaternal leucocyte incompatibility. *J Clin Invest.* 1958 37:1756:1763.
78. Payne R, Tripp MW, Eeigle J y Bodmer WF. A new leucocyte iso-antigen system in man. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1964 29:285-295.
79. Pelfrey CM y Steinberg AD. Pathogenesis of multisystem autoimmunity-SLE as a model. En: **The Autoimmune Diseases II**. Eds. Rose NR, Mackay IR. Academic Press. Nueva York. 1992. 107-125.
80. Pollack MJ. Class II HLA antigens: HLA-D, DR, DQ y DP. En: **Scientific and Technical Aspects of the Major Histocompatibility Complex**. Eds. Moulds JM, Fawcett KJ y Garner RJ. American Association of Blood Banks. Arlington, V.A. 1989. 47-72.
81. Reichlin M. Disease Specific Autoantibodies in the systemic rheumatic diseases. En: **The Autoimmune Diseases II**. Rose NR y Mackay IR. Oxford, Academic Press. 1992. 202-212.
82. Reveille JD, Schrohenloher RE, Acton RT y Barger BO. DNA analysis of HLA DR and DQ genes in american blacks with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989.10: 1243-1251.

83. Reveille JD, MacLeod MJ, Whittington K. Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/ La (SS-B) autoantibody responses. *J Immunol.* 1991;146:3871-3876.
84. Reveille JD, Barger BO, Hodge TW. HLA-DR2-DRB1 allele frequencies in DR-positive Black Americans with and without systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 1991;38:178-180.
85. Reveille JD, Moulds JM, Arnett. Major Histocompatibility Complex class II and C4 alleles in Mexican Americans with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 1994; 44: 1-7.
86. Rodey GE. Class I antigens: HLA-A, -B, -C and cross-reactive groups. En: *Scientific and Technical Aspects of the Major Histocompatibility Complex.* Eds. Moulds JM, Fawcett KJ y Garner RJ. Am Asso of Blood Banks. Arlington. 1989. pp. 23-46.
87. Rothfiel NF. Clinical features of systemic lupus erythematosus. Eds. Kelley WN, Harris ED, Ruddy, Sledge CB. *Textbook of Rheumatology.* Ed.3. Philadelphia:WB Saunders.1988. pp. 1070-1097.
88. Rubinstein P. HLA and IDDM: Facts and speculations on the disease gene and its mode of inheritance. *Human Immunol.* 1991; 30: 270-277.
89. Sandberg L, Thorsby E, Kissmeyer-Nielsen F y Lindholm A. 1970. Evidence of a third sublocus within the HLA-A chromosomal region. Eds. P.I. Terasaki. En: *Histocompatibility Testing.* Munksgaard, Copenhagen. 1970. pp. 165-169.
90. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neeffjes JJ, Geuze HJ y Trowsdale J. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science.* 1994;266:1566-1569.
91. Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in Northern Italian systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 1988 31:1568-1570.
92. Schneider PM y col. Association of MHC class I, II, and genes with systemic lupus erythematosus-results of a German collaborative study. HLA 1991 Workshop and Conference. Eds. K Tsuji, M Aizawa y T. Sasazuki. Springer-Verlag. Oxford. 1992. pp. 2:525-528.
93. Skarsvag S, Hansen KE, Host A y Moem I. Distribution of HLA class II alleles among Scandinavian patients with systemic lupus erythematosus (SLE): An increased risk of SLE among non-DRB*03, DQA1*0501, DQB*0201. Class II homozygotes? *Tissue Antigens* 1992; 40:128-133.
94. Snell GD, Dausset J y Nathanson S. *Histocompatibility.* Academic Press. Nueva York, San Francisco, Londres. 1976. pp.181-190.
95. So A. "Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region". En: *HLA and Disease.* R Lechler. Academic Press, Londres. 1994. pp. 1-34.

96. So A. "Structure and assembly of class I and class II molecules". En: HLA and Disease. R Lechler London, UK. Academic Press. 1994. pp. 35-47.
97. So AKL, Fielder AHL, Warner CA, Isenberg DA, Batchelor JR, Walport MJ. DNA polymorphism of major histocompatibility complex class II and class III genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 1990;35:144-147.
98. Speirs C, Fielder AHI, Chapel H, Davey NJ y Batchelor JR. Complement system protein C4 and susceptibility to hydralazine-induced systemic lupus erythematosus. 1989:922-924.
99. Stites DP y Terr IA. *Inmunología Básica y Clínica. "Enfermedades Reumáticas"*: Fye KH y Sack KE. 7a ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. 1993. p.513-542.
100. Svejgaard A, Platz P, y Ryder LP. HLA and Disease 1982-A Survey. Tissue Typing Laboratory of the Blood Grouping Department. 1982. pp. 193-214.
101. Szegedi G. Immunological investigations in systemic lupus erythematosus. *Panminerva Med*. 1978;20:9-22.
102. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*. 1989;44:93-151.
103. Tan EM, Cohem AS, Fries JF, y col. The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25:1271-1277.
104. Terasaki PI. *Histocompatibility Testing*. 1970. Munksgaard, Copenhagen.
105. Terasaki P. *The Eight International Histocompatibility Workshop*. Los Angeles California. 1980.
106. Theofilopoulos AN. "The basis of autoimmunity: Part II Genetic predisposition. *Immunol. Today*. 1995;16:150-159.
107. Tiwari JL y Terasaki PI. "Mechanism of HLA and Disease Associations", "Overview", "Rheumatology and Joint Diseases". En: *HLA and diseases associations*. Springer-Verlag, Nueva York, 1985. 28-31; 32-48; 49-60.
108. Tiwari JL y Terasaki PI. "Connective Tissue Diseases". En: *HLA and diseases associations*. Springer-Verlag, Nueva York. 1985. 363-369.
109. Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. Map of the Human MHC. *Immunol. Today*. 1993 14: 349-352.
110. Trucco M. To be or not to be: ASP 57, That Is The Question. *Diabetes Care* 1992 15: 705-715.
111. Tsuji K. *Histocompatibility Testing*, 11th International Histocompatibility Workshop. Yokohama.

112. Unanue ER y Allen PM. The Basis of the Immunoregulatory role of macrophages and others accessory cells. *Science*. 1987; 236: 551-557.
113. Vilardell M. Reumatología: "Lupus Eritematoso Sistémico". En: *Medicina Interna*. Farreras PV y Rozman C. Ed. DOYMA. Barcelona España. 1992:996-1003.
114. Walport M. Connective Tissue Diseases. En: *The Autoimmune Diseases II*. Rose NR y Mackay IR. Academic Press. Nueva York. 1992. pp. 153-163.
115. Weitkamp LR , Van Rood JJ, Thorsby E, Bias W, Fotino M, Lawler SD, Dausset J, Mayr WR, Bodmer J, Ward FE, Seignalet J, Payne R, Kissmeyer-Nielsen F, Gatti RA, Sachs JA y Lamm LU. The relation of parental sex and age to recombination in the HL-A system. *Hum Hered*. 1973. 23:197-205.
116. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet*. 1960:251-253.
117. Wong KL. y col. Immunogenetics in Chinese patients whith SLE. *Scand J Rheum*. 1991;20:110-114.