



11271  
69

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL SISTEMA PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD EN PACIENTES CON  
ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
( I N M U N O L O G I A )

P R E S E N T A:  
ANA LUISA WECKMANN GONZALEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

*Dedico esta tesis a la memoria de  
mi tío, Doctor Luis Weckmann Muñoz, que fue  
para mí un ejemplo de excelencia y dedicación al trabajo.*

Agradezco al Dr. Julio Granados Arriola, por su dirección en la realización de este trabajo, al Dr. Mario Humberto Cardiel Ríos, por sus invaluable y cuidadosas sugerencias y a todos mis compañeros del Departamento, quienes me han apoyado en muy diversas maneras.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, que ha proporcionado las mejores condiciones para mi trabajo y desarrollo académicos.

## INDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>II.1. EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (SPH).</b> .....	<b>5</b>
Definición.....	5
El SPH y enfermedades. ....	10
El SPH en mestizos mexicanos. ....	10
<b>II.2. ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO (EMTC)</b> .....	<b>11</b>
Definición.....	11
Controversias acerca del concepto de EMTC. ....	12
Autoanticuerpos en EMTC.....	15
<i>Anticuerpos anti-RNP</i> .....	15
<i>Epítomos de la proteína de 70 kD</i> .....	17
<i>Epítomos del RNA</i> .....	17
<i>Otros autoanticuerpos</i> .....	19
<i>Anticuerpos antinucleares</i> .....	20
<i>Factor reumatoide</i> .....	20
<i>Anticuerpos anti-fosfolípido</i> .....	20
Inmunología Celular en EMTC. ....	20
<i>Linfocitos B</i> .....	21
<i>Linfocitos T</i> .....	21
<i>Función supresora</i> .....	23
<i>Células NK</i> .....	24
<i>Monocitos</i> .....	24
EMTC y HLA.....	25
<i>EMTC y biología molecular del HLA</i> .....	27
<i>EMTC en niños</i> .....	29
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>

<b>IV. MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>IV.1. PACIENTES.....</b>	<b>31</b>
<b>IV.2. CONTROLES.....</b>	<b>31</b>
<b>IV.3. TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE HLA.....</b>	<b>32</b>
<b>IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>32</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>V.1. GRUPO TOTAL DE 30 PACIENTES. ....</b>	<b>33</b>
<b>Locus HLA-A. ....</b>	<b>33</b>
<b>Locus HLA-B.....</b>	<b>33</b>
<b>Locus HLA-DR.....</b>	<b>33</b>
<b>Locus HLA-DQ. ....</b>	<b>34</b>
<b>V.2. SUBGRUPOS CLÍNICOS.....</b>	<b>34</b>
<b>V.3. PACIENTES QUE REUNIERON LOS CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE EMTC Y DE OTRAS 4 ENFERMEDADES REUMÁTICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>V.4. TABLAS .....</b>	<b>36</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>44</b>

## I. RESUMEN

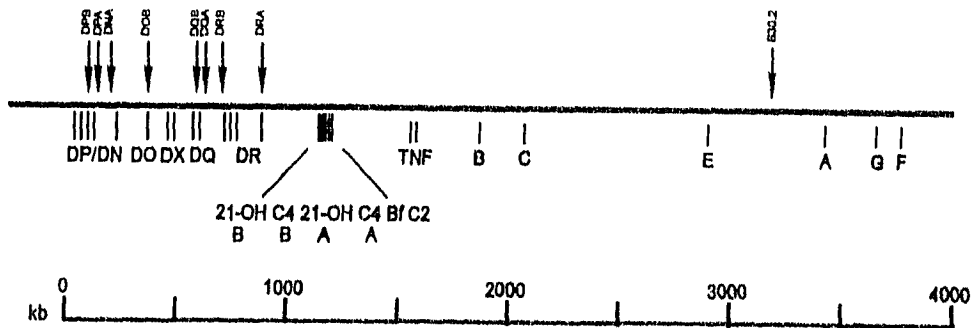
Las diferencias en frecuencias de HLA entre distintos grupos étnicos apoyan la necesidad de determinar el perfil de HLA de poblaciones diferentes en la salud y en la enfermedad. El objetivo del presente estudio fue determinar las frecuencias de los antígenos de HLA-A, -B, -DR y -DQ en un grupo de 30 pacientes mestizos mexicanos con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC). Se estudiaron 100 sujetos sanos como grupo control. Los pacientes se clasificaron en subgrupos clínicos según sus manifestaciones clínicas predominantes. Los antígenos de HLA se tipificaron por ensayos de microlinfocitotoxicidad. Dentro de los alelos más frecuentes de los pacientes se encontraron A2, B35 y DR5, aunque éstos no tuvieron diferencias significativas comparados con los controles. En cambio, el alelo más frecuente del locus HLA-DQ en los pacientes fue DQw1, el cual estuvo aumentado significativamente comparado con controles ( $p=0.0051$ ). Una comparación entre los subgrupos clínicos y los controles mediante el análisis de varianza de Kruskal-Wallis no mostró ninguna diferencia en la distribución de alelos de HLA. El aumento de DQw1 en pacientes mexicanos con EMTC puede indicar la existencia de una susceptibilidad genética particular, puesto que hay reportes previos en otras poblaciones de una asociación entre EMTC y otros alelos del HLA, como DR4. Las diferencias en susceptibilidad podrían ser el resultado de diferencias en trasfondos genéticos. La homogeneidad de las frecuencias de HLA en la subclasificación clínica realizada es congruente con el concepto de que la EMTC es una entidad clínica independiente.

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1. EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (SPH).

#### Definición.

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH o MHC, siglas en inglés de *major histocompatibility complex*) es un conjunto de genes que se encuentran en el brazo corto del cromosoma seis humano (Yunis, 1988), que abarca aproximadamente 5000 kb. Se encuentra en la región 6p21.3 del cromosoma 6 humano (Morton *et al.*, 1984). Incluye a los genes de HLA-A, -B, -Cw (SPH de clase I) y a aquellos de HLA-DR, -DP y -DQ (SPH de clase II), cuyos productos se conocen como antígenos de histocompatibilidad. También incluye a los genes de las proteínas del complemento factor B, C2, C4A y C4B, y a los genes estructurales de la enzima 21-hidroxilasa A y B (SPH de clase III), así como al gen de la enzima glioxalasa I (GLO I) (figura 1).



**Figura 1.** Mapa del SPH humano. Las barras verticales indican las posiciones de los genes, cuyos nombres están debajo. Tomado de Abderrahim *et al.*, 1994.

La región de clase I abarca los genes de HLA-A, -B y -Cw, que codifican para proteínas que se asocian con la  $\beta$ 2-microglobulina y que se expresan en la membrana plasmática de todas las células nucleadas. Esta región contiene además otros 4 genes: HLA-E (Koller *et al.*, 1988), HLA-F (Koller *et al.*, 1989), HLA-G (Geraghty *et al.*, 1987) y HLA-H (Chorney *et*

*al.*, 1990), que también codifican para proteínas que se asocian con  $\beta$ 2-microglobulina, pero sus patrones de expresión son diferentes a los de las moléculas clásicas HLA-A, -B y -Cw y tienen menos polimorfismo. La clase I abarca al menos 2000 kb (Abderrahim *et al.*, 1994) (figura 2).

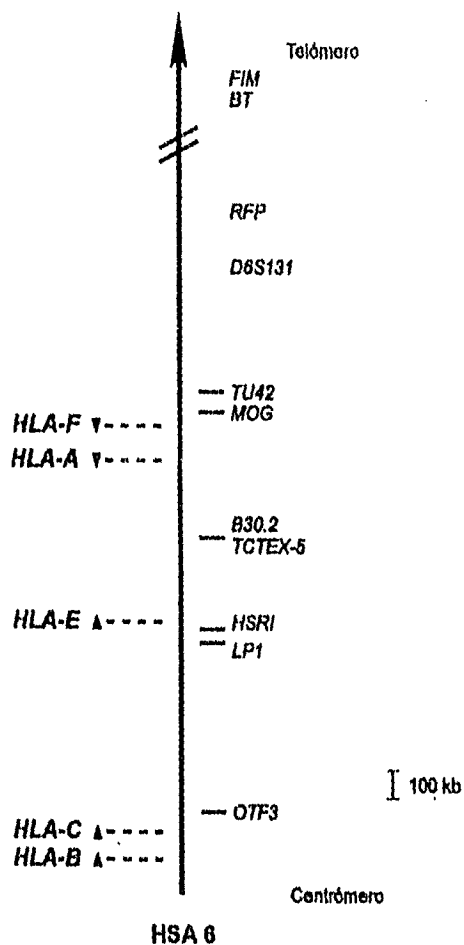


Figura 2. Mapa de la región del SPH humano de clase I. Incluye algunos de los genes encontrados recientemente. Las flechas indican la dirección transcripcional de los genes. Tomado de Amadou *et al.*, 1995.



Se han descrito otros genes de clase I. En humanos, así como en las demás especies de mamíferos estudiados, la mayoría de los miembros de clase I del SPH son pseudogenes o fragmentos génicos. El gen OTF3 está a 100 kb telomérico a HLA-Cw (Crouau-Roy *et al.*, 1994). El gen S está a 60 kb distal a OTF3 (Zhou y Chaplin, 1993). El gen TUBB está entre el gen S y el HLA-E (Volz *et al.*, 1994). El gen HSRI, que codifica para una proteína G, se localiza cerca de HLA-E (Vernet *et al.*, 1994). El gen B30-2 está entre HLA-A y HLA-E (Vernet *et al.*, 1993a).

Durante la búsqueda de nuevas secuencias codificantes en la región de clase I del SPH, se encontró un exón llamado B30-2, que codifica para un péptido de 166 aminoácidos, muy similar al dominio carboxilo-terminal de diversas secuencias, tales como el antígeno Ro (SS-A/Ro) nuclear humano de 52 kD del síndrome de Sjögren, cuyo gen está en el cromosoma 11p15.5 humano, y otras proteínas, como la llamada "ret finger protein" o RFP y la butirofilina, cuyos genes parecen estar en el cromosoma 6p22 humano (Vernet *et al.*, 1993b). La RFP está íntimamente asociada con la matriz nuclear y tiene actividad de unión con el DNA; la butirofilina es una glucoproteína de membrana que rodea a glóbulos de grasa de la leche y se expresa en glándula mamaria en lactación.

La región de clase I parece contener muy probablemente muchos genes y esto indica la posibilidad de que estas nuevas secuencias aún por conocer puedan participar en el desarrollo de diversas enfermedades ligadas al HLA (Venditti *et al.*, 1994).

La región de clase II abarca aproximadamente 1000 kb y es centromérica a la región de clase I (figura 3). Se divide en subregiones que tienen los genes que codifican para glucoproteínas  $\alpha$  y  $\beta$  de los heterodímeros polimórficos DP, DQ y DR, que se encuentran en la membrana de linfocitos B y de linfocitos T activados.

Se han identificado nuevos genes, los de la serie "RING" (genes TAP y LMP) y genes PFS, entre las subregiones DQ y DP. Parecen tener función de proteasas o participar en el transporte de péptidos (Glynne *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1991).

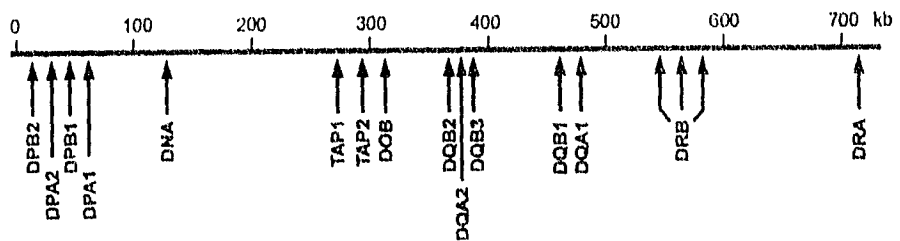


Figura 3. Mapa de la región del SPH humano de clase II. Tomado de Carter *et al.*, 1994.

Los genes TAP1 (antes RING4 ó PSF1) y TAP2 (antes RING11 ó PSF2) son genes de proteínas transportadoras asociadas con el procesamiento de antígenos (Trowsdale *et al.*, 1990; Deverson *et al.*, 1990). Codifican para proteínas requeridas para transferir péptidos antigénicos del citoplasma al retículo endoplasmático, donde se asocian con moléculas de HLA de clase I. La localización de los genes de proteínas transportadoras dentro de la región de la clase II, entre los *loci* DPA y DPB, y la identificación de polimorfismo alélico, indican que estos genes son candidatos para susceptibilidad a enfermedades relacionadas con el SPH (Caillat-Zucman *et al.*, 1993).

Los genes TAP podrían influir en el grado de expresión de complejos de péptidos y moléculas del SPH de clase I. En las ratas, el polimorfismo de TAP2 modifica el espectro de péptidos presentados en la superficie celular y su reconocimiento posterior por linfocitos T (Caillat-Zucman *et al.*, 1993).

Los genes LMP6 y LMP7, localizados en la misma región que TAP1 y TAP2, representan dos subunidades del complejo del proteasoma y participan en la degradación de proteínas endógenas antes de ser transportadas al retículo endoplasmático (Goldberg *et al.*, 1992). Las anomalías en esta vía también podrían asociarse con la predisposición genética a enfermedades (Caillat-Zucman *et al.*, 1993).

La región de clase III del SPH está entre las regiones I y II, y se divide en 2 subregiones. La región centromérica tiene 100 kb y contiene los genes C2, Factor B, C4A y C4B, así como 2 copias del gen de la 21-hidroxilasa (Carroll *et al.*, 1985). La región telomérica contiene al menos 20 genes, incluso los de los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF $\alpha$  y TNF $\beta$  o linfotóxina, LT), 3 genes de proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*) y el gen RD, así como otros genes aún no caracterizados (Spies *et al.*, 1989).

Los dos genes de TNF $\alpha$  y TNF $\beta$  están ligados y dispuestos en *tandem* en el genoma del humano, ratón y conejo, y se encuentran entre los genes de clase I y clase III (Spies *et al.*, 1986; Dunham *et al.*, 1987). El locus TNF humano tiene microsatélites de tamaño polimórfico y pueden usarse como marcadores de polimorfismo genético (Nedospasov *et al.*, 1991).

Se ha clonado la región de clase II del SPH en cromosomas artificiales de levadura (YACs, *yeast artificial chromosomes*), así como *loci* ligados a HLA-B y a HLA-Cw. Sin embargo, apenas en 1994 se logró un YAC de 4000 kb que abarcara todo el SPH y se pudo completar el mapa de la región de clase I a partir de 15 YACs que abarcaban 2000 kb. Se clonó el SPH completo por primera vez (Abderrahim *et al.* 1994).

Amadou *et al.* en 1995 reportaron un nuevo marcador (LP1) y un nuevo gen (TCTEX-5) entre HLA-Cw y HLA-A. Además mapearon 4 nuevos marcadores y genes teloméricos a HLA-F, que son: MOG, TU42, D6S131E y RFP.(figura 2). También demostraron que los genes PRL, H1.5 y BT (que se encuentran en el cromosoma humano 6p21.3-p22) y D6S105, se encuentran a 1 cMorgan telomérico de HLA-A y son teloméricos a RFP. Esto es importante en particular para la localización del locus de la hemocromatosis hereditaria, pues el locus HLA-A y D6S105 tienen una fuerte asociación alélica con esta enfermedad (Jazwinska *et al.*, 1993).

### **El SPH y enfermedades.**

Los trastornos autoinmunes se dividen en subgrupos según factores clínicos, serológicos y genéticos. Estos últimos pueden ser los elementos más poderosos que determinan el tipo y el curso de la enfermedad en cada paciente (Ruuska *et al.*, 1992).

Se ha observado que diversos alelos y haplotipos del MHC se asocian con más de 50 enfermedades. (Tiwari y Terasaki, 1985). Por ejemplo, la región de HLA-A se asocia con hemocromatosis; ciertas enfermedades autoinmunes multigénicas como la diabetes dependiente de insulina, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la miastenia grave, se asocian con alelos de DR o DQ; los genes de enfermedades monogénicas como deficiencias de C2 y C4 e hiperplasia adrenal, se localizan en la región de clase III del SPH.

Por otro lado, los hallazgos aparentemente confusos de las asociaciones de HLA con enfermedades que tienen características heterogéneas podrían explicarse al menos en parte por las asociaciones con autoanticuerpos (Genth *et al.*, 1990).

### **El SPH en mestizos mexicanos.**

La población normal mestiza mexicana se caracteriza por presentar un perfil de HLA particular. Se ha encontrado que los alelos más frecuentes en esta población son A2, B16, DR4 y DQw3 (De Leo *et al.*, enviado a publicación; Weckmann *et al.*, en prensa). Las frecuencias de estos alelos distinguen a los mestizos mexicanos de las poblaciones caucásicas.

Con respecto a enfermedades reumáticas, la población mexicana también tiene una susceptibilidad peculiar cuando se le compara con otros grupos étnicos. En pacientes con artritis reumatoide (AR), hay un aumento significativo de A1, DR3 y DQ2, y un decremento significativo de A31, cuando se comparan con controles (Ávila-Portillo *et al.*, 1994); en pacientes mexicanos con esclerosis generalizada progresiva (EGP), las frecuencias de DR5 y de DRw52 están aumentadas (Vargas-Alarcón *et al.*, 1995); y en pacientes mexicanos con lupus eritematoso generalizado (LEG), los alelos DR3 y DR7 se han encontrado

aumentados (Granados *et al.*, en prensa). Puesto que existen diferencias en las frecuencias de HLA entre distintos grupos étnicos, la determinación de dichas frecuencias en otras enfermedades autoinmunes en mexicanos tiene gran importancia.

## **II.2. ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO (EMTC)**

### **Definición.**

La enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) es un padecimiento autoinmune caracterizado por la presencia de títulos de hemaglutinación elevados de anticuerpos séricos contra ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (U-snRNPs) (Hoffman *et al.*, 1991), en particular contra el polipéptido de 70 kD asociado con el RNA U1. La existencia de la EMTC se propuso cuando se encontró que los pacientes que tenían características de dos o más enfermedades del tejido conectivo, tenían títulos elevados de anticuerpos contra el componente sensible a ribonucleasa de un antígeno extraíble del núcleo celular y se ha sugerido que la EMTC es una entidad clínica independiente (Sharp *et al.*, 1972). Los pacientes con EMTC tienen un conjunto de manifestaciones clínicas que los separan de otras enfermedades del tejido conectivo, tales como LEG, polimiositis/dermatomiositis (PM/DM), EGP y síndrome de Sjögren (SS).

La EMTC tiene un grupo de manifestaciones principales que cuando ocurren en conjunto, permiten el diagnóstico aun en ausencia del autoanticuerpo marcador serológico. Cuando se presentan tres o más de estas manifestaciones, se reúnen los criterios para diagnosticar EMTC (Alarcón-Segovia y Villarreal, 1987; Alarcón-Segovia y Cardiel, 1989) (tabla 1).

La especificidad de los cinco criterios clínicos para EMTC mostrados en la tabla 1, sin considerar anticuerpos anti-RNP, ha sido de 99.5% contra LEG y de 100% contra todas las otras enfermedades del tejido conectivo (AR, EGP, PM/DM y SS). Con cuatro criterios, la especificidad es de 96% contra todas y con tres criterios es de 91.8%. La especificidad para EMTC contra todas las otras enfermedades alcanza 100% con cuatro ó cinco criterios y 99.6% con tres criterios cuando se incluyen anticuerpos anti-RNP. La sensibilidad es similar (Alarcón-Segovia, 1994).

Hay un predominio notable del sexo femenino en EMTC, que varía de 16:1 a 79:1 (proporción de mujeres a hombres) (Nakae *et al.*, 1987). Por otro lado, la EMTC se presenta en la segunda o tercera década de la vida, pero también puede presentarse en la niñez y en la vejez.

En el caso de la tríada de edema de manos,acroesclerosis y fenómeno de Raynaud, se requiere al menos una de las otras dos manifestaciones clínicas propuestas por Alarcón-Segovia y Villarreal en 1987 para poder distinguir a la EMTC de la esclerodermia.

Sharp (1987) y Kasukawa (1987) propusieron manifestaciones clínicas para proponer sus criterios para EMTC. Hay una muy buena concordancia entre estos criterios complejos y los más simples propuestos por Alarcón-Segovia y Villarreal (1987).

Existen algunas manifestaciones clínicas, radiológicas y patológicas que parecen ser más comunes en EMTC que en cualquier otra enfermedad del tejido conectivo. No son suficientemente frecuentes para incluirlas como criterios para EMTC, pero cuando se presentan en un paciente con una enfermedad aparente del tejido conectivo, indican la posibilidad de EMTC y la necesidad de determinar anticuerpos anti-RNP (Alarcón-Segovia, 1994). Dentro de estas manifestaciones se encuentran edema de la frente, perforación del septo nasal, neuralgia del trigémino, nódulos reumatoides numerosos en antebrazos y manos, calcinosis yuxtaarticular y otras.

#### **Controversias acerca del concepto de EMTC.**

Desde que surgió el concepto de EMTC, éste ha recibido diferentes críticas, acerca de si en realidad se trata de una entidad clínica distinguible (De Clerck *et al.*, 1989; Lázaro *et al.*, 1989; Black *et al.*, 1992) o si es una etapa intermedia de una enfermedad en evolución. Algunos autores afirman que la EMTC se diferencia en EGP, LEG o AR (Bennett *et al.*, 1980; Nimelstein *et al.*, 1980; Gendi *et al.*, 1995).

La existencia de la EMTC como una entidad particular no ha tenido reconocimiento amplio, en cambio, se le ha considerado como una enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (Black *et al.*, 1992). Hay autores que afirman que la EMTC representa una fase transitoria y temprana de una enfermedad mejor definida (LeRoy *et al.*, 1980). Esto puede deberse a una falta aparente de datos específicos, tanto clínicos como de laboratorio, y en particular a su prevalencia relativamente baja, lo que limita la experiencia clínica individual con la EMTC, así como la disponibilidad de suficientes pacientes para estudios clínicos a largo plazo y para pruebas terapéuticas (Alarcón-Segovia, 1994). Por otro lado, dos o más enfermedades del tejido conectivo podrían ocurrir simultáneamente o en secuencia en un mismo paciente, lo que constituiría los llamados síndromes de sobreposición (Alarcón-Segovia, 1994).

Lázaro *et al.* reportaron en 1989 un estudio sobre un grupo de 27 pacientes con manifestaciones clínicas de dos o más enfermedades del tejido conectivo. Evaluaron la presencia de anticuerpos anti-RNP para observar si identificaba a un grupo aislado de pacientes. No encontraron diferencias significativas en aspectos clínicos entre pacientes con o sin anticuerpos anti-RNP. No lograron identificar ningún subgrupo particular dentro del síndrome de sobreposición mediante la presencia de dichos anticuerpos, por lo que concluyeron que la EMTC no es una entidad propia.

Gendi *et al.* reportan en 1995 un trabajo en el que 25 de 39 pacientes con EMTC tuvieron "evolución" hacia una enfermedad más definida del tejido conectivo. Y con base en sus datos genéticos, hay un subgrupo de pacientes con EMTC que permanece "indiferenciado", según proponen debido a la falta de ciertos genes "facilitadores". Concluyen que el HLA podría ayudar a predecir la evolución de la EMTC, pues indican una asociación de antígenos de HLA con la evolución de la EMTC. Opinan que con el tiempo, los pacientes con EMTC indiferenciada se diferenciarán y que esto podrá observarse con un seguimiento de los pacientes por unos 20 años. No apoyan el concepto de la EMTC como entidad independiente.

También De Clerck *et al.* reportan en 1989 que en el seguimiento de 18 pacientes con EMTC, el 70% evolucionó a EGP o a LEG.

Por otro lado, Lundberg y Hedfors muestran en 1991 un índice bajo de diferenciación por 25 años en 32 pacientes con anticuerpos anti-RNP, a favor de que la EMTC sí es una entidad aislada.

Hay un modelo para explicar la heterogeneidad de manifestaciones clínicas y su sobreposición frecuente en EMTC: propone que uno o más factores etiológicos estimulan el desarrollo de la EMTC en un individuo susceptible, luego los alelos de HLA influyen en el conjunto de autoanticuerpos producidos y éstos influyen en las manifestaciones clínicas particulares de cada individuo (Harley *et al.*, 1989).

A este modelo, Hoffman *et al.* (1990) agregan que la producción de autoanticuerpos en EMTC podría resultar de una interacción más compleja de dos o más genes no ligados entre sí, con un agente etiológico desconocido. Podría tratarse de genes no ligados entre sí, como DR4 y el fenotipo Gm 1,3:5,21 (véase más adelante). La interacción de un agente etiológico desconocido con dos o más genes explicaría el riesgo relativo bajo de DR4 y la penetrancia débil de la producción de autoanticuerpos anti-UI-70-kD en familias.

Además de diferencias inmunogenéticas entre EMTC y LEG, también hay diferencias significativas en las frecuencias de ciertas características clínicas. En EMTC se ha encontrado mayor frecuencia ( $p < 0.001$ ) de fenómeno de Raynaud, edema de manos, hipomotilidad esofágica, reflujo gastroesofágico, miositis, telangiectasias ( $p < 0.007$ ) y esclerodactilia (Hoffman *et al.*, 1990).

Se ha encontrado que los pacientes con EMTC tienen hipergamaglobulinemia con mayor frecuencia que los pacientes con LEG o esclerodermia, pero presentan menor frecuencia de úlceras en la piel, serositis, nefritis, enfermedades del sistema nervioso central e hipocomplementemia que los pacientes con LEG (Hämeenkorpi *et al.*, 1993). Los



anticuerpos anti-RNP y las características clínicas en conjunto indican que la EMTC es un síndrome distinto desde el punto de vista tanto clínico como genético.

#### **Autoanticuerpos en EMTC.**

**Anticuerpos anti-RNP.** El marcador serológico de la EMTC es la presencia de anticuerpos anti-RNP. Estos anticuerpos dan un patrón nuclear moteado fino en inmunofluorescencia para anticuerpos antinucleares. Sin embargo, los anti-RNP pueden desaparecer durante el curso de la enfermedad y la detección de anti-RNP, en un análisis de síndromes de sobreposición, no ha ayudado a identificar a un subgrupo particular de pacientes en algunos casos.

Con frecuencia se encuentran autoanticuerpos contra componentes de ribonucleoproteínas (RNPs) en sueros de pacientes con enfermedades del tejido conectivo. Al principio se encontró que los anticuerpos estaban dirigidos contra la parte proteínica de las RNPs, pero después se describieron también anticuerpos dirigidos contra la porción de RNA.

Las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) consisten de un agregado heterogéneo de RNA y proteínas en complejos macromoleculares. En sueros de pacientes con EMTC, hay dos reactividades de anticuerpos dirigidos contra snRNPs: una dirigida contra el antígeno Sm y otra contra el llamado antígeno RNP. Éste último es un complejo que consiste de una sola especie de RNA, el U1, asociado con una proteína de 70 kD (antes llamada U1-68kD), la proteína A y la proteína C (Pettersen *et al.*, 1984; van Venrooij y Habets, 1985). Estos péptidos son esenciales para el procesamiento del pre-mRNA. Así, los anticuerpos anti-RNP reaccionan contra el conjunto de proteínas U1-70-kD, A y C.

El Sm es un complejo antigénico compuesto por RNAs U1, U2, U4/U6 y U5 (o sea, U1-U6), asociados con proteínas llamadas B/B, D, E, F y G. Los autoanticuerpos contra estas proteínas (anti-Sm) se encuentran típicamente en los sueros de cerca del 30% de los pacientes con LEG (Pettersen *et al.*, 1986). Algunos pacientes con EMTC tienen anticuerpos anti-Sm; se han encontrado anti-D, asociados a daño renal, característica más

común en LEG que en EMTC, por lo que aquellos pacientes con anti-D deben vigilarse por la posibilidad de presentar enfermedad renal (Takeda *et al.*, 1989).

Los métodos usados con frecuencia para estudiar anticuerpos anti-RNP y anti-Sm son inmunodifusión, contraelectroforesis, hemaglutinación pasiva con antígeno extraíble del núcleo (ENA, siglas en inglés) o con digestión previa con RNasa (Sharp *et al.*, 1976), así como ELISAs con proteínas individuales de las U1snRNPs, aisladas de extracto de timo de conejo (Takeda *et al.*, 1989).

En un estudio de la frecuencia de autoanticuerpos contra la proteína U1-70 kD en EMTC y LEG (Hoffman *et al.*, 1990), se encontró que el 14% de los 22 pacientes con anti-U1-70 kD y con EMTC (de los cuales dos tenían enfermedad indiferenciada), tenía reactividad con las proteínas B'/B y ninguno reaccionaba con la proteína D. De los 34 pacientes negativos para anti-U1-70 kD y con LEG, el 24% reaccionaba con la proteína D y el 75% lo hacía con B'/B. Los pacientes con EMTC positivos para anti-U1-70 kD tenían reactividad poco frecuente contra antígenos nucleares (18% reconocía SS-A [Ro] y 5% reconocía SS-B [La], ninguno reconocía Sm, DNA ni la proteína D). En cambio, los pacientes con LEG mostraron reactividades distintas, pues los que no reconocían a la proteína U1-70 kD, sí reconocían al DNA, RNP, Sm y SS-A, con frecuencias mayores de 25%. Esto concuerda con los hallazgos de Van Venrooij *et al.* de 1987, que muestran que algunos sueros de pacientes con EMTC reaccionan con el polipéptido de 70-kD con mayor frecuencia que los sueros anti-RNP<sup>+</sup> de pacientes con LEG.

En un grupo de 38 pacientes con EMTC, 12 con LEG y 9 con una enfermedad indiferenciada del tejido conectivo, se asociaron concentraciones elevadas de anti-70-kD con miositis e hipomotilidad esofágica, así como concentraciones elevadas de anti-B'/B y anti-D con compromiso renal y pleuritis/pericarditis. En cambio, el fenómeno de Raynaud se asocia con poca reactividad contra B'/B y D (Takeda *et al.*, 1989). En los pacientes adultos con enfermedades del tejido conectivo, los autoanticuerpos anti-U1-70-kD con títulos altos tienen asociaciones significativas con la presencia de esclerodactilia, edema de manos,

fenómeno de Raynaud y telangiectasias. Así, las características clínicas de EMTC se asocian con mayor frecuencia con anti-U1-70-kD y las de LEG, con anti-B'/B o anti-D.

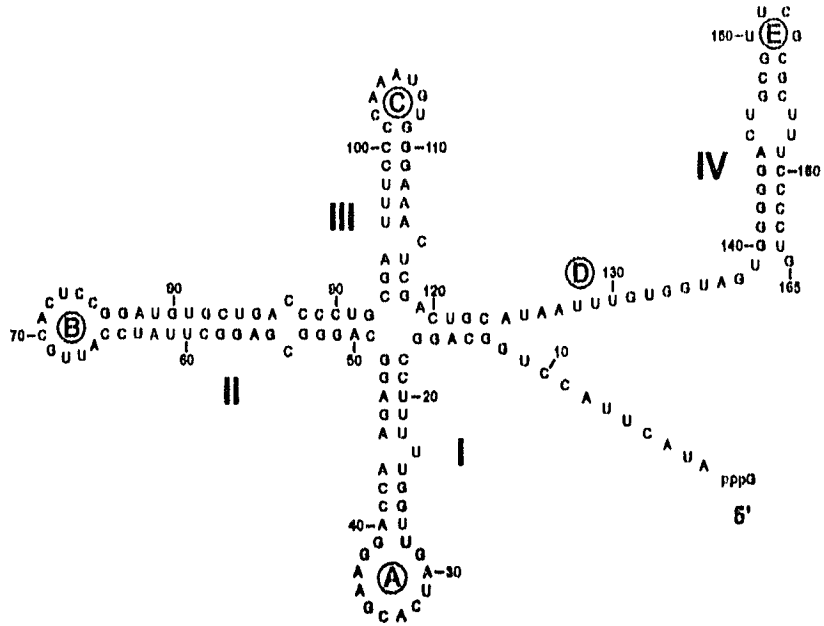
Los anticuerpos anti-RNP de pacientes con EMTC que parecen ser más específicos de la enfermedad son los que reaccionan con la proteína de 70 kD. Aunque este autoanticuerpo puede encontrarse en algunos pacientes con LEG, lo común es observarlo en títulos mucho menores que en EMTC (Yasuma *et al.*, 1991); además, se ha observado que los pacientes con EMTC activa tienen actividad anti-70-kD (antes conocida como anti-68-kD) mayor que pacientes con EMTC inactiva, con LEG o con una enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (Takeda *et al.*, 1989). Los autoanticuerpos contra la proteína U1-70 kD son predominantemente de isotipo IgG.

***Epítomos de la proteína de 70 kD.*** Se ha usado una proteína recombinante de U1-70 kD y mutantes de la misma para mapear los epítomos de la especificidad fina de autoanticuerpos humanos anti-U1-70 kD. Con el uso de ELISAs e inmunotransferencia (Takeda *et al.*, 1989; Netter *et al.*, 1988; Guldner *et al.*, 1988), se ha encontrado que hay una diversidad considerable en la especificidad de estos anticuerpos, lo cual es típico de una respuesta inmune dirigida por antígeno.

***Epítomos del RNA.*** Es importante conocer las regiones precisas del RNA U1 que son blancos de anticuerpos, pues se ha observado que la concentración del anticuerpo contra ciertos epítomos del RNA U1 correlaciona con la actividad de la enfermedad y por ende, dichos epítomos podrían participar en la patogénesis de la enfermedad. Además, la definición clara de los epítomos podría tener valor diagnóstico. Por otro lado, la definición de los epítomos sería útil para estudiar interacciones entre el RNA y proteínas en las RNPs (Hoet *et al.*, 1992).

Al hacer inmunoprecipitación del RNA U1 y de sus dominios de RNA I, II, III y IV, con sueros de pacientes con EMTC o con síndrome de sobreposición, la mayoría de los sueros reconocieron la estructura de tallo y asa II y el dominio IV del RNA U1 (Hoet *et al.*, 1992)

(figura 4). Para distinguir los anticuerpos contra el dominio de unión de Sm, de los anticuerpos contra el dominio IV, se usaron mutantes moleculares que carecían del dominio de unión de Sm. Se demostró que los anticuerpos reconocen el dominio IV y no el dominio de unión de Sm. Con esta información se hizo un mapeo de los epítomos del U1 RNA para los autoanticuerpos.



**Figura 4.** Estructura secundaria del RNA U1 humano. Los números I-IV indican las regiones de tallo y asa. Las letras A-E indican dominios de cadena sencilla. Tomado de Hoet *et al.*, 1992.

En el dominio de tallo y asa II, el principal epítomo está en la porción de tallo (el asa o rizo del dominio II no es importante). En el dominio IV, la parte superior del tallo y el llamado rizo E son importantes para el reconocimiento por autoanticuerpos. Es interesante que este rizo E está conservado en muchas especies, como en rRNAs (RNAs ribosomales) de *Escherichia coli*.

También se mostró por inmunoprecipitación que los sueros de los pacientes con EMTC tenían reactividad no cruzada contra los dominios II y IV del RNA UI, había por lo menos dos poblaciones de anticuerpos anti-RNA UI específicos. Se encontró que la conformación de ambos dominios II y IV es necesaria para el reconocimiento por los anticuerpos, es decir, sólo podían eliminarse pocos nucleótidos del RNA sin que hubiera pérdida de reactividad con los sueros.

Los autoanticuerpos contra el RNA UI podrían originarse por mimetismo molecular, esto es, por una respuesta contra un antígeno extraño que compartiera epítopos con el RNA UI o podrían surgir como una respuesta contra un autoantígeno en sí (mecanismo dirigido por antígeno). En el caso de los dominios II y IV, no sólo la secuencia de nucleótidos, sino también la estructura terciaria son importantes para el reconocimiento.

Tanto para niños como para adultos, parece que hay manifestaciones clínicas similares entre individuos con títulos altos de autoanticuerpos contra la proteína U1-70 kD (Hoffman *et al.*, 1993a).

La asociación primarin de alelos de HLA podría no ser con los síndromes clínicos en sí, sino con los autoanticuerpos encontrados (Smolen *et al.*, 1987; Genth *et al.*, 1987). Los autoanticuerpos que parecen asociados con HLA incluyen los anticuerpos contra SS-A (asociados con DR3) y RNP (asociados con DR4). En algunos estudios (Genth *et al.*, 1987), la asociación de DR4 con anti-RNP es muy fuerte y los pacientes anti-RNP positivos, con o sin EMTC, tienen la misma frecuencia de DR4.

**Otros autoanticuerpos.** Los pacientes con EMTC pueden tener otros autoanticuerpos además de los anti-U1-70 kD. Éstos incluyen anticuerpos contra otras RNPs, conocidas como RNPs heterogéneas nucleares (hnRNP), pero estos anticuerpos no son tan específicos para EMTC como los anticuerpos contra la proteína de 70 kD (Fritzler *et al.*, 1984).

**Anticuerpos antinucleares.** En 1995, Gendi *et al.* reportaron anticuerpos antinucleares en 16 pacientes con EMTC estudiados y tenían títulos desde 1:80 hasta más de 1:1,280.

**Factor reumatoide.** El factor reumatoide es otro autoanticuerpo presente con frecuencia en sueros de pacientes con EMTC. Ocurre hasta en el 70% de los pacientes y tiene muchas fluctuaciones, los títulos cambian durante el curso de la enfermedad sin razón aparente (Alarcón-Segovia, 1994). En 1995, Gendi *et al.* reportaron factor reumatoide umbral (título 1:80) en 8% y fue positivo (1:60 a 1:5,120) en 13%. Este anticuerpo no correlacionó con DR4 ni con el tipo de artritis que presentaban los pacientes con EMTC.

**Anticuerpos anti-fosfolípido.** También se han descrito anticuerpos anticardiolipina (aCL) en EMTC. Los aCL de isotipo IgG están presentes en EMTC con una  $p < 0.01$  con respecto a individuos sanos. En LEG, los aCL IgG o IgM son más frecuentes que en EMTC. El perfil de aCL en EMTC es similar al de pacientes con LEG. En ambas enfermedades, las concentraciones altas de IgG e IgM son más comunes que niveles bajos y la frecuencia de aCL IgG es mayor que aquella de aCL IgM. En cambio, en EMTC no se encuentran anticoagulante lúpico ni VDRL falso positivo, mientras que en LEG se encuentran en 14.7% y 7.7%, respectivamente (Doria *et al.*, 1992).

En un estudio de 28 pacientes con EMTC (Doria *et al.*, 1992) se reportó una prevalencia de aCL IgG (con concentración alta) de 17.8% y de IgM de 7.1%. El 10.7% de los pacientes con EMTC tenían historia de trombosis recurrente y sólo un paciente, de aborto recurrente.

Hay una correlación significativa entre positividad de aCL y trombocitopenia en EMTC, de acuerdo con lo conocido también para LEG, pero no se ha encontrado correlación entre anticuerpos antifosfolípido y trombosis o aborto recurrente en EMTC (Doria *et al.*, 1992).

### **Inmunología Celular en EMTC.**

Se conocen menos aspectos acerca de las anormalidades del sistema inmune celular en EMTC que de las anormalidades serológicas (Becker *et al.*, 1992).

**Linfocitos B.** La proporción de autoanticuerpos contra RNP sobrepasa con claridad la de todos los otros autoanticuerpos combinados, lo que sugiere una activación oligoclonal más que policlonal de linfocitos B (Alarcón-Segovia, 1994).

Muchas clonas de linfocitos B que producen IgM anti-RNP reaccionan también con otros antígenos, como DNA de doble cadena y de cadena sencilla (Okawa-Takatsuji et al., 1992). Se cree que estos anticuerpos IgM polirreactivos pertenecen a los anticuerpos naturales, que están codificados por genes de inmunoglobulinas de línea germinal y que reaccionan con componentes celulares estructurales conservados, que incluyen a las RNPs.

Se han analizado las frecuencias de células precursoras de linfocitos B que producían inmunoglobulinas anti-RNP, en sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunes generalizadas, que incluían a la EMTC entre otras. Las frecuencias de precursoras de linfocitos B, activados con virus de Epstein-Barr, que producían IgG anti-RNP, correlacionaron con los títulos de los sueros (Okawa-Takatsuji et al., 1992).

**Linfocitos T.** La asociación de autoanticuerpos anti-RNP con ciertos alelos de HLA sugiere que los linfocitos T podrían ser importantes en la producción de autoanticuerpos. Los hallazgos son compatibles con una respuesta inmune dirigida por antígeno y restringida por HLA (Hoffman et al., 1993b).

Se han estudiado los circuitos inmunorreguladores de linfocitos T en sangre periférica de pacientes con EMTC y se ha encontrado que difieren de aquellos de pacientes con LEG, EGP, PM/DM, AR o SS (Alarcón-Segovia *et al.*, 1985).

En un análisis de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EMTC (Becker et al., 1992), se encontró que del total de células CD4+, los porcentajes de linfocitos CD4+CD45RA+ eran mayores que en controles sanos, mientras que el subgrupo de linfocitos CD4+CD29+ estaba disminuido. En EMTC, las células CD4/CD45 tendían a estar

inversamente correlacionadas con células CD4/CD29. Las cantidades absolutas de CD4+CD29+ eran significativamente menores en EMTC y también en EGP, que en sanos; los valores absolutos de células CD4+CD45RA+ no tenían diferencias significativas.

La distribución de subgrupos de células CD4+ de los pacientes con EMTC fue constante en intervalos de 3 a 6 meses y no se modificó con corticosteroides. No hubo correlación entre diferentes características clínicas y niveles de células CD4-CD45RA ó CD4-CD29.

Por otro lado, al cultivar las células mononucleares de pacientes con EMTC en presencia de fitohemaglutinina, la cantidad de linfocitos CD4+CD29+ aumentó de manera notable y este incremento fue menor en controles y en pacientes con EGP. El aumento de expresión de CD29 podría provocar la acumulación de células de memoria CD4+ en tejidos y la disminución de las mismas en sangre periférica en EMTC.

Los sobrenadantes de células tratadas con fitohemaglutinina, de pacientes con EMTC, tenían concentraciones similares de IL-2 que los sobrenadantes de pacientes con EGP, pero mayores que aquellos de sanos. Se pensó que las diferencias de secreción de IL-2 podrían estar relacionadas con la cantidad de células CD4+CD45RA+.

Los pacientes con EMTC tenían menos linfocitos CD8+ que controles, similar a lo observado por Melendro *et al.* en 1983, pero el cociente CD4/CD8 y la cantidad de linfocitos CD4+CD25+ no tenían diferencias significativas.

Falta aclarar si el desequilibrio de células CD4+ podría causar disminución de la función supresora de linfocitos T en EMTC (véase "Función supresora").

Con respecto a las clonas T autorreactivas, se ha estudiado la respuesta proliferativa de clonas T reactivas contra polipéptidos purificados de snRNP (el de 70 kD y los polipéptidos A, B/B y D). Las respuestas proliferativas fueron específicas y todas las clonas tenían el fenotipo de células Th, restringidas por HLA-DR (Hoffman *et al.*, 1993b). Se podría precisar



el elemento de restricción de HLA usado por cada clona T, mediante experimentos con células L (murinas) cotransfectadas con genes de cadenas HLA- $\alpha$ /HLA- $\beta$ .

Se han reportado células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EMTC que proliferan en presencia de una proteína de fusión del polipéptido U1-70-kD e incluso se ha mapeado en éste un epítipo de células T que abarca 63 aminoácidos de la porción carboxilo terminal (O'Brien *et al.*, 1990). Hacen falta estudios acerca de la especificidad fina de los péptidos antigénicos reconocidos por las clonas T.

Se piensa que la expansión de estas clonas T reactivas contra snRNP, dirigida por antígeno, podría participar *in vivo* en la inmunopatogenia de EMTC y de LEG.

Por otro lado, se ha analizado la acumulación de clonas de células T y su uso de genes de la cadena V $\beta$  del receptor de la célula T (TCR-V $\beta$ ), en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EMTC (Okubo *et al.*, 1994). Se encontró que se acumuló un mayor número de clonas T que en individuos sanos. Los genes V $\beta$  usados con frecuencia fueron V $\beta$ 1, 3, 4, 5.2, 14 y 16. Además, los linfocitos T mostraron respuestas proliferativas en cultivo con la proteína A de RNP recombinante y las clonas así estimuladas mostraron un uso más restringido de genes de TCR-V $\beta$  que las clonas no estimuladas.

Estos resultados mostraron un uso restringido de TCRs dirigidos hacia ciertos autoantígenos. Puede ser que la selección negativa de células T autorreactivas en el timo no sea perfecta y que éstas escapen de la eliminación ("delección") y proliferen en la periferia.

**Función supresora.** Se ha demostrado que los anticuerpos anti-RNP de sueros de pacientes con EMTC penetran a las células mononucleares vivas a través de receptores Fc (Alarcón-Segovia *et al.*, 1978). El mecanismo de entrada podría ser también mediante la unión de los anticuerpos con residuos de RNPs en la superficie celular. No se sabe si esta penetración de anticuerpo tiene una repercusión patogénica, pero después de entrar a las células, los autoanticuerpos alcanzan su antígeno y modifican funciones celulares (Koelle *et al.*, 1991).

Después de la penetración de anticuerpos antinucleares IgG a células T, se pierde la función supresora, lo que a su vez permite una mayor producción de anticuerpos antinucleares (Alarcón-Segovia y Ruiz-Argüelles, 1980).

La penetración del anticuerpo a células T por el receptor Fc causa su "delección" y la eliminación de la función supresora (Alarcón-Segovia *et al.*, 1979). Existe función supresora en EMTC y LEG, pero no en AR. Las alteraciones de la función supresora celular parecen participar en el desarrollo de autoinmunidad.

En un estudio de 11 pacientes con EMTC, todos ellos mostraron disminución de linfocitos T, comparados con sanos (Alarcón-Segovia y Ruiz-Argüelles, 1980). Dentro de la población de linfocitos T, aquellos con baja afinidad por eritrocitos de carnero estuvieron más disminuidos y la disminución dependía de la baja de células T con receptores Fc. También había menos células no T con receptores Fc. Además, la función supresora, que aparecía espontáneamente a los 7 días de cultivo, disminuyó en EMTC. La adición de anti-RNP clase IgG a cultivos de células mononucleares, disminuyó aún más la función supresora en EMTC.

Por lo tanto, se concluyó que la eliminación de la función supresora se debe a la penetración del anticuerpo anti-RNP y que hay una subsecuente eliminación de linfocitos T FcγR+.

La disminución de la función supresora existe en EMTC y en LEG, pero esta función es normal en EGP, AR y SS.

**Células NK.** La función de células NK en EMTC tiene un patrón particular: aunque la función NK es normal en ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr con células K562, las células NK responden poco a IL-2 (González-Amaro *et al.*, 1984).

**Monocitos.** Los monocitos de sangre periférica de la mayoría de los pacientes con EMTC producen IL-1 espontáneamente, lo que indica su activación *in vivo*. Esto también se

observa en EGP, pero sólo en pocos pacientes con LEG y en cerca de dos tercios de los pacientes con PM/DM (Alarcón-Segovia, 1994).

### **EMTC y HLA.**

Ciertos autores han reportado asociaciones de antígenos de HLA con EMTC. Sasazuki *et al.* (1979) reportaron una asociación con HLA-B7 y HLA-Dw1. Takasaki *et al.* (1983) reportaron una asociación con HLA-Bw55, aunque este hallazgo no pudo ser confirmado por otro grupo (Juji *et al.*, 1986). En Inglaterra, se encontró que el DR4 estaba incrementado significativamente en EMTC (Black *et al.*, 1988), en particular en pacientes con artritis, y también, las frecuencias de alotipos Gm fueron distintas en pacientes con EMTC comparados con controles.

Nishikai y Sekiguchi reportaron en 1985 una asociación de DQw3 con anticuerpos anti-RNP en un grupo de pacientes con diferentes enfermedades del tejido conectivo, incluyendo EMTC y LEG.

Los pacientes con EMTC que tienen autoanticuerpos IgG aumentados contra el polipéptido U1-70 kD tienen una prevalencia incrementada del antígeno DR4, comparados con controles (Hoffman *et al.*, 1990).

No se han encontrado diferencias en las frecuencias de antígenos de HLA-A, -B, o -Cw de pacientes con EMTC y con anti-U1-70-kD, comparadas con aquellas de pacientes con LEG sin este anticuerpo o con controles sanos (Hoffman *et al.*, 1990).

Se ha observado que los pacientes caucásicos con EMTC que tienen anticuerpos contra el polipéptido de 70 kD, presentan los antígenos de histocompatibilidad HLA-DR4 ó DR2 con mayor frecuencia que individuos sanos o que pacientes que carecen de dichos anticuerpos (Hoffman *et al.*, 1990). Se ha reportado asociación entre DR4 y anti-RNP, pero no entre DR4 y EMTC en particular (Ruuska *et al.*, 1992).

Se ha encontrado una frecuencia de 64% de DR4 en pacientes con EMTC y con anti-U1-70-kD; en cambio, en pacientes con LEG y sin este anticuerpo, DR4 tiene frecuencia de 18% y es de 30% en individuos sanos, en un estudio de caucásicos (Hoffman *et al.*, 1990). Las diferencias son significativas. El alelo DRw53 también es más común en EMTC cuando hay anti-U1-70-kD (82%) que en LEG sin este anticuerpo (47%) o en sanos (53%).

La asociación entre positividad para anti-U1-70-kD en EMTC y DR4 ó DRw53 puede sugerir que la asociación es, ya sea con DR4 ó con DRw53 y en cada caso, el otro alelo se asocia por estar ligado al primero. Quizá la asociación sea en realidad incluso con otro gen ligado al haplotipo DR4-DRw53 (Hoffman *et al.*, 1990).

Además de asociación con alelos de HLA, Genth *et al.* reportaron en 1987 un estudio de 35 pacientes anti-RNP positivos alemanes, que incluían a 23 pacientes con EMTC, en los que estudiaron los fenotipos de las cadenas pesadas de IgG. Encontraron asociación entre el fenotipo Gm 1,3:5,21 y reactividad anti-RNP, así como asociación entre anti-RNP y DR4.

Como ya se mencionó, algunos autores proponen que la EMTC es un subgrupo de LEG o que la EMTC evoluciona hacia una enfermedad del tejido conectivo más definida. Con respecto a esto, Gendi *et al.* han reportado en 1995 que los antígenos del SPH participan en la diferenciación de la EMTC: encontraron que el DR5 estaba asociado con el desarrollo final de EGP, DR4 con diferenciación hacia AR, y DR3 con evolución hacia LEG. No obstante, otros han hallado que desde un punto de vista inmunogenético, la EMTC es distinta del LEG. Ruuska *et al.* reportaron en 1992 que los alelos A3, B35, Cw4 y DR4 estaban aumentados, y que B8 y DR3 estaban disminuidos en pacientes con EMTC, comparados con pacientes con LEG. Estos últimos autores también reportaron que DR4, así como el haplotipo B15-DR4, estaba incrementado de modo significativo en pacientes con EMTC comparados con controles sanos.

En contraste con los pacientes con EMTC y anti-U1-70-kD, los pacientes con LEG y sin dicho anticuerpo tienen mayor frecuencia de DR3, DR5 y DRw52. Además el LEG se

asocia con A1, B8, DR3, Dw3 y alelos nulos de C4A (Fielder *et al.*, 1983; Bell *et al.*, 1984; Smolen *et al.*, 1987; Seuchter *et al.*, 1991; Batchelor, 1993). Hämeenkorpri *et al.* reportaron en 1993 que DR4 y Dw4 eran más frecuentes en EMTC que en LEG, EGP, SS o individuos sanos.

La inmunogenética ayuda a distinguir a la EMTC de la EGP. Se ha observado asociación de EGP con el haplotipo A1, B8, DR3 (Genth *et al.*, 1990), con los alelos A9, B35, DR1, y asociación significativa sólo con DR5 (Black *et al.*, 1984); también se ha reportado asociación en pacientes con EGP, de anticuerpos anti-DNA-topoisomerasa I (Sc170) y DR2. Hoffman *et al.*, en 1990 reportaron que no encontraron asociación entre EMTC (pacientes con anti-U1-70-kD) y ningún alelo de HLA reportado para EGP, es decir, HLA-A1, -B8, -DR3 ó -DR5.

**EMTC y Biología Molecular del HLA.** Se ha encontrado por estudios de biología molecular, que la EMTC se asocia con el subtipo DRB1\*0401 (de DR4, que corresponde a Dw4) (Black *et al.*, 1988; Ruuska *et al.*, 1992; Dong *et al.*, 1993). La AR también se asocia con el subtipo DRB1\*0401 (Dw4), pero incluso con DRB1\*0404 (Dw14), DRB1\*0405, así como con el subtipo DRB1\*0101 (de DR1, que corresponde a Dw1) (Watanabe *et al.*, 1989).

En el caso de la AR, los subtipos de DR4 asociados presentan un epítipo compartido en la tercera región hipervariable del gen DRB1 (de la cadena DR $\beta$ ) y contribuye al sitio de unión del antígeno (Gregersen *et al.*, 1987).

Los análisis de genética molecular (Lanchbury *et al.*, 1990) han demostrado que la mayoría de los pacientes con EMTC y con fenotipo DR4 ó DR2 presentan también una región de homología en el gen DRB1, que corresponde a 7 aminoácidos en la proteína que se codifica. Este epítipo compartido de las moléculas de DR de los pacientes con EMTC podría ser importante para regular la respuesta autoinmune contra el antígeno de 70 kD de las ribonucleoproteínas (U1-70-kD) (Kaneoka *et al.*, 1991).

En el trabajo de Kaneoka *et al.* (1992) se encontró también la asociación entre anticuerpos anti-UI-70-kD y EMTC, y se encontró el epítipo compartido de 7 aminoácidos en subtipos moleculares de DR2 ó DR4, excepto en los subtipos DRB1\*1601 y DRB1\*1602 (subtipos de DR2) y en el subtipo DRB1\*0402 (de DR4). Por otro lado, Gendi *et al.* reportaron en 1995 que 4 pacientes con EMTC tenían el subtipo DRB1\*0103 de DR1, que es idéntico en la tercera región hipervariable al subtipo DRB1\*0402, o sea que se podría tratar de otro epítipo compartido.

El epítipo compartido por los subtipos de DR2 y DR4 asociados con EMTC consiste de 7 aminoácidos que tienen una relación espacial en el sitio de unión del antígeno, de la molécula de HLA-DR. Estos aminoácidos se encuentran en las posiciones 26F, 28D, 30Y, 31F, 32Y (residuos que contribuyen a la lámina  $\beta$  plegada) y en las posiciones 70Q y 73A (que contribuyen a la porción de  $\alpha$  hélice de la bolsa de unión del antígeno).

El hallazgo del epítipo común de 7 aminoácidos en las moléculas de DR en los pacientes podría indicar un tipo de respuesta inmune dirigida por antígeno (Kaneoka *et al.*, 1992). La asociación entre la EMTC y más de un alelo de HLA podría explicarse por medio de este epítipo compartido entre distintos fenotipos.

Otro estudio de EMTC en japoneses demuestra también la asociación con el subtipo DRB1\*0401 (de DR4) (Dong *et al.*, 1993). En este trabajo de 64 pacientes con EMTC y 53 con LEG, se encontraron frecuencias incrementadas en EMTC de DRB1\*0401, DRB1\*0901, DRB4\*0101 y DQA1\*03, así como frecuencias disminuidas de DRB1\*0405 y DQB1\*0401. En LEG estaban aumentados los subtipos DRB1\*1501, DRB5\*0101 y DQB1\*0602.

La tipificación en este trabajo sugiere que la susceptibilidad a EMTC está asociada fuertemente con el haplotipo HLA-DRB1\*0401-DRB4\*0101-DQA1\*03-DQB1\*0301 y la

susceptibilidad al LEG se asocia con el haplotipo DRB1\*1501-DRB5\*0101-DQA1\*0102-DQB1\*0602. Esto apoya el concepto de que la EMTC es una entidad distinta del LEG.

*EMTC en niños.* De Rooij *et al.* reportaron en 1989 un estudio de 5 niños con autoanticuerpos anti-U1-70-kD y describieron que presentaban artralgias o artritis, edema de manos, fenómeno de Raynaud y anomalías de la función pulmonar.

En un reporte de EMTC en niños (Hoffman *et al.*, 1993a) se estudiaron 10 niñas y 1 niño con edades promedio de 12.9 años. Las manifestaciones clínicas más notables fueron artralgias/artritis, edema de manos, fenómeno de Raynaud, capacidad de difusión anormal para monóxido de carbono y esclerodactilia, hallazgos similares a los de De Rooij *et al* reportados en 1989. Los niños presentaban con poca frecuencia nefritis, enfermedad cardíaca, trombocitopenia, esclerosis difusa y enfermedad del sistema nervioso central. En cuanto a la inmunogenética, 6 de 9 pacientes (67%) tenían el alelo DR2 y 44% el DR4. Estos 9 tenían ya fuera DR2 ó DR4, a diferencia de 52% en controles. Un sólo paciente era heterocigótico DR4/DR2. Aunque los 11 pacientes tenían prevalencia alta de artritis y había positividad para factor reumatoide en 8 de los 11, estos últimos tenían baja frecuencia de DR4. Ninguno tenía artritis erosiva, similar a lo observado en adultos con enfermedades del tejido conectivo y autoanticuerpos anti-U1-70-kD. La asociación de DR4 y DR2 con EMTC en niños y sus características clínicas son semejantes a las reportadas para adultos con autoanticuerpos anti-U1-70-kD.

Por otro lado, los 11 niños con EMTC tenían autoanticuerpos anti-U1-70-kD, 3 tenían anticuerpos contra el polipéptido D del antígeno Sm y 9 reconocían los polipéptidos B/B. En este último caso, se pensó que esta reactividad en la mayoría era una especificidad por un epítipo distinto del asociado con autoanticuerpos anti-Sm característicos de LEG.

Los niños con enfermedad grave o que fallecieron tenían autoanticuerpos anti-DNA de doble cadena y contra el polipéptido D de las snRNPs. Sólo 3 pacientes tuvieron enfermedad renal, los cuales presentaban anticuerpos IgG anti-D y tenían además el alelo DR2.

### **III. OBJETIVOS**

Las diferencias en las frecuencias de HLA entre distintos grupos étnicos apoyan la necesidad de determinar el perfil de HLA de diferentes poblaciones, tanto en la salud como en la enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Tipificar el HLA de clase I y de clase II de pacientes con EMTC, mediante técnica serológica, para conocer las frecuencias de los diferentes alelos.
2. Averiguar si existen asociaciones entre alelos de HLA y la EMTC en pacientes mestizos mexicanos, o entre el HLA y las variables clínicas o serológicas de los pacientes con EMTC.
3. En caso de encontrar asociaciones, observar si el HLA ayuda a distinguir a la EMTC de otras enfermedades autoinmunes similares, como LEG, AR, EGP o PM/DM, lo que apoyaría el concepto de que la EMTC es una entidad independiente.



## **IV. MÉTODOS**

### **IV.1. PACIENTES.**

Se seleccionaron 52 pacientes con EMTC que han acudido al Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. De los 52 pacientes, 30 fueron escogidos (y el resto eliminados), debido a que eran los que reunían claramente los criterios de EMTC y éstos conformaron el grupo de este estudio de HLA. La clasificación fue realizada según definiciones estrictas. Todos los casos fueron clasificados por un reumatólogo certificado, con experiencia en este tipo de pacientes, según los criterios propuestos por Alarcón-Segovia y Villarreal en 1987. Esta clasificación fue ciega a los resultados de HLA.

Debido a que existe una enorme controversia sobre la integridad de la EMTC como entidad clínica distinta, se realizó un análisis de subgrupos. Los pacientes se clasificaron en cinco subgrupos clínicos de acuerdo con sus manifestaciones clínicas predominantes. Cada subgrupo incluía a aquellos pacientes con EMTC cuyas manifestaciones clínicas predominantes correspondían a los criterios de una de las siguientes cinco enfermedades reumáticas: EMTC (criterios de Alarcón-Segovia y Villarreal, 1987), LEG (criterios de Tan *et al.*, 1982), EGP (criterios del subcomité para los criterios de esclerodermia, del comité de criterios diagnósticos y terapéuticos de la Asociación Americana de Reumatismo, 1980), AR (criterios de Arnett *et al.*, 1988) o PM/DM (criterios de Bohan y Peter, 1975). Esta clasificación fue realizada por el mismo evaluador antes mencionado. También se estudiaron los pacientes con EMTC que reunían los criterios para la clasificación de las cuatro enfermedades reumáticas además de EMTC.

### **IV.2. CONTROLES.**

El grupo control estuvo constituido por 100 individuos mestizos mexicanos sanos, tipificados en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (Weckmann *et al.*, en prensa; De Leo *et al.*, enviado a publicación).

#### **IV.3. TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE HLA.**

Se tipificaron los antígenos de HLA de clases I y II mediante ensayos convencionales de microlinfocitotoxicidad con células mononucleares de sangre periférica (McCloskey *et al.*, 1993). Los antígenos de clase II se tipificaron con linfocitos B aislados de sangre periférica.

#### **IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se obtuvo la frecuencia de cada antígeno de HLA (frecuencia fenotípica) por cuenta directa. Las frecuencias de HLA se determinaron en el grupo final de 30 pacientes con EMTC, así como en cada subgrupo clínico, y en cada uno de los criterios de las cinco enfermedades reumáticas. Se compararon estas frecuencias con aquellas de los controles. La comparación estadística de las frecuencias se realizó mediante prueba de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher, usando tablas de contingencia. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  menor de 0.01. La distribución de las frecuencias de alelos de HLA-A, -B, -DR y -DQ entre los subgrupos clínicos de EMTC, LEG y EGP, y controles, se comparó usando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Mendenhall *et al.*, 1994).

## V. RESULTADOS

### V.1. GRUPO TOTAL DE 30 PACIENTES.

Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 2.

#### **Locus HLA-A.**

La tabla 3 muestra las frecuencias de los alelos de HLA-A, -B, -DR y -DQ. En el locus HLA-A, el alelo A2 se encontró incrementado en el grupo de 30 pacientes, comparados con controles, aunque el valor de  $p$  no fue significativo (0.034). A2 tuvo una frecuencia de 0.70 en los pacientes y representó el alelo más común en este locus. Los alelos A9, A19 y A28, que son muy comunes en la población normal mestiza mexicana (Weckmann *et al.*, en prensa), no fueron significativamente distintos en los pacientes con EMTC. El alelo A1, que se ha encontrado reiteradamente aumentado en diversas enfermedades autoinmunes, incluso LEG, tuvo una frecuencia casi idéntica en pacientes con EMTC y en controles.

#### **Locus HLA-B.**

No se encontraron diferencias significativas en los pacientes cuando se compararon con controles. El alelo más frecuente en los pacientes con EMTC fue B35 (0.48), seguido de B5 (0.31) y B16 (0.21). Los alelos B35 y B16 son los antígenos más comunes del locus HLA-B en la población normal mestiza mexicana (Weckmann *et al.*, en prensa). Cuando se compararon con controles, B5 y B35 estaban incrementados y B16 estaba un poco disminuido en los pacientes. El alelo B8, asociado con enfermedades autoinmunes, tuvo una frecuencia similar en pacientes y controles.

#### **Locus HLA-DR.**

El alelo más frecuente en los pacientes con EMTC fue DR5 (0.33), el cual se ha reportado como asociado con esclerodermia (Gladman *et al.*, 1981); estaba aumentado, aunque no significativamente al comparar con controles. Ninguna frecuencia en el locus HLA-DR fue significativamente distinta en los pacientes, aunque ciertos alelos estaban incrementados o disminuidos. El alelo DR4, que se ha asociado con EMTC, no estaba aumentado en los

pacientes. De hecho, su frecuencia estaba disminuida (0.38) al comparar con controles (0.57). El DR4 es el alelo más común en este locus en la población normal mestiza mexicana. Otros alelos aumentados en los pacientes fueron DR1 (0.29), DR2 (0.29) y DR8 (0.24). En este grupo de pacientes, el alelo DR3 no tuvo una frecuencia significativamente distinta cuando se comparó con controles.

#### **Locus HLA-DQ.**

En este locus, se encontró un aumento significativo del alelo DQw1 en los pacientes con EMTC comparados con controles (0.71 vs. 0.38,  $p=0.0051$ , razón de nomios: 4.08; intervalo de confianza del 95%: 1.34 a 13.82). Los alelos DQw2 y DQw3 estaban disminuidos y el alelo DQw4 estaba aumentado en los pacientes, pero sin significancia estadística.

#### **V.2. SUBGRUPOS CLÍNICOS.**

Los 30 pacientes con EMTC se clasificaron en 5 subgrupos clínicos: subgrupo de EMTC, subgrupo de LEG, subgrupo de EGP, subgrupo de AR y subgrupo de PM/DM. Cada subgrupo incluyó sólo aquellos pacientes cuyas manifestaciones clínicas predominantes correspondían a la enfermedad reumática que dio nombre al subgrupo: el subgrupo de EMTC incluyó 12 pacientes, el subgrupo de LEG incluyó 8, el subgrupo de EGP incluyó 5, el subgrupo de AR incluyó 2 y el subgrupo de PM/DM incluyó 2. Uno de los 30 pacientes tuvo manifestaciones predominantes de esclerodermatomiositis y no se incluyó en ninguno de estos subgrupos. De nuevo, los alelos más comunes de HLA de clase I en los subgrupos fueron A2 y B35 (tabla 4). Hubo también heterogeneidad en las frecuencias de los alelos del locus HLA-DR, como se observó en el grupo global de 30 pacientes. Los alelos más comunes de este locus fueron DR4, DR5 ó DR2. En cuanto a HLA-DQ, el DQw1 destacó en los subgrupos de EMTC y de LEG, y en cambio el DQw3 destacó en los 2 pacientes del subgrupo de AR, en los 4 tipificados del subgrupo de EGP, en los 2 del subgrupo de PM/DM y en la paciente con predominio de esclerodermatomiositis. Puede ser que se distinguan así dos conjuntos de pacientes: uno con pacientes con predominio de EMTC o de

LEG, que tengan DQw1, y otro conjunto de pacientes con predominio de AR, EGP o PM/DM, que tengan DQw3. Sin embargo, los subgrupos son pequeños para poder concluir esto.

Los subgrupos de EMTC, LEG y EGP, y los controles se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los subgrupos de AR y de PM/DM no se incluyeron en este análisis debido a que sus tamaños de muestra eran pequeños. No hubo diferencias significativas en la distribución de las frecuencias de HLA-A, -B, -DR y -DQ entre los 3 subgrupos y los controles.

### **V.3. PACIENTES QUE REUNIERON LOS CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE EMTC Y DE OTRAS 4 ENFERMEDADES REUMÁTICAS.**

Se obtuvo la frecuencia de pacientes que reunieron los criterios para la clasificación de cualquiera de las otras 4 enfermedades reumáticas además de EMTC (es decir, LEG, AR, EGP o PM/DM, tabla 5), independientemente de que se clasificaran también en subgrupos clínicos.

Las frecuencias de HLA también se analizaron en cada uno de los criterios para la clasificación de EMTC (6 criterios), de LEG (11 criterios), de EGP (4 criterios), de AR (7 criterios), y de PM/DM (5 criterios) (datos no mostrados).

Los alelos más frecuentes de cada locus de HLA tuvieron frecuencias muy similares en los diferentes criterios de clasificación de EMTC. Es decir, A2 tuvo alrededor de 0.70, B35 alrededor de 0.45, DR5 alrededor de 0.35, y DQw1 alrededor de 0.70 en todos los criterios de EMTC. Además, estas frecuencias son cercanas a aquellas del total de 30 pacientes. Esto puede indicar que hay homogeneidad en los 30 pacientes, quienes no se distinguen al separarlos por los criterios de clasificación.

No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de HLA entre los pacientes que reunían cada uno de los criterios y los 30 pacientes en total. Sin embargo, es interesante hacer notar que los 3 criterios de aumento de una enzima de músculo esquelético en suero (creatin-fosfocinasa o CPK, lactato-deshidrogenasa o LDH, o glutamato-oxaloacetato-transaminasa o GOT), que son criterios para la clasificación de PM/DM, mostraron un aumento no significativo en la frecuencia de DR2 en los pacientes, comparados con los controles.

#### V.4. TABLAS

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos para EMTC (Alarcón-Segovia y Villarreal, 1987).

Criterios Serológicos	Criterios Clínicos
Títulos elevados de anti-RNP ( $\geq$ 1:1600 por hemaglutinación o un equivalente con otro método)	Edema de manos
	Sinovitis
	Miositis (probada con biopsia o CPK elevada)
	Fenómeno de Raynaud de 2 ó 3 fases
	Acroesclerosis

*El diagnóstico de EMTC requiere serología positiva más 3 ó más criterios clínicos*

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes con EMTC estudiados. N=30

Edad en años (X, SD, min-max)	42, 12.04, 21-67
Sexo: F/M	27/3
Seguimiento en años (X, SD, min-max)	13.27, 7.83, 3-29
Duración de la enfermedad en años antes del diagnóstico definitivo (mediana, min-max)	6, 1-24

**Tabla 3.** Frecuencias de alelos de HLA en pacientes con EMTC y controles sanos.

Alelo de HLA	Frecuencia		<i>p</i>
<b>HLA-A</b>	<b>EMTC (N=30)</b>	<b>Controles (N=100)</b>	
A1	0.13	0.15	no significativa
A2	0.70	0.48	"
A3	0.10	0.12	"
A9	0.13	0.29	"
A10	0.17	0.11	"
A11	0.10	0.08	"
A19	0.30	0.36	"
A28	0.13	0.23	"
<b>HLA-B</b>	<b>EMTC (N=29)</b>	<b>Controles (N=100)</b>	
B5	0.31	0.18	"
B7	0.07	0.12	"
B8	0.07	0.07	"
B12	0.03	0.14	"
B13	0	0.04	"
B14	0.03	0.14	"
B15	0.10	0.12	"
B16	0.21	0.28	"
B17	0.03	0.04	"
B18	0.07	0.07	"
B21	0.10	0.09	"
B22	0.03	0.01	"
B27	0.03	0.05	"
B35	0.48	0.25	"
B37	0.03	0.01	"
B40	0.10	0.20	"
B41	0.03	0.02	"
B42	0.03	0.02	"
B47	0.03	0	"
B48	0	0	"
B53	0.03	0.02	"
<b>HLA-DR</b>	<b>EMTC (N=21)</b>	<b>Controles (N=100)</b>	
DR1	0.29	0.15	"
DR2	0.29	0.15	"
DR3	0.05	0.13	"
DR4	0.38	0.57	"
DR5	0.33	0.19	"
DR6	0.05	0.13	"
DR7	0.95	0.13	"
DR8	0.24	0.19	"
DR9	0.05	0.04	"
DR10	0.95	0.04	"
<b>HLA-DQ</b>	<b>EMTC (N=21)</b>	<b>Controles (N=100)</b>	
DQw1	0.71	0.38	0.0051 *
DQw2	0.05	0.23	no significativa
DQw3	0.71	0.84	"
DQw4	0.19	0.10	"

\*Razón de nomios: 4.08; intervalo de confianza del 95%: 1.34 a 13.82

**Tabla 4.** Frecuencias (%) de alelos de HLA en los subgrupos clínicos de pacientes con EMTC.

ALELO HLA	SUBGRUPO CLÍNICO					
	EMTC (N=12)	LEG (N=8)	EGP (N=5)	AR (N=2)	PM/DM (N=2)	E-DM (N=1)
A1	16.66	0	20.0	0	50.0	-
A2	<b>58.33</b>	<b>62.5</b>	<b>100</b>	<b>100.0</b>	50.0	+
A3	8.33	0	20.0	0	0	-
A9	25.0	0	0	0	50.0	-
A10	16.66	25.0	0	50.0	0	-
A11	25.0	0	0	0	0	-
A19	16.66	25.0	60.0	0	50.0	+
A28	0	37.5	0	0	0	-
B5	25.0	<b>50.0</b>	20.0	50.0	0	-
B7	0	12.5	20.0	0	0	-
B8	16.66	0	0	0	0	-
B12	0	12.5	0	0	0	-
B13	0	0	0	0	0	-
B14	0	0	20.0	0	0	-
B15	8.33	12.5	20.0	0	0	-
B16	33.33	25.0	0	0	0	-
B17	0	0	20.0	0	0	-
B18	0	12.5	0	0	50.0	-
B21	8.33	0	0	50.0	50.0	-
B22	8.33	0	0	0	0	-
B27	0	0	20.0	0	0	-
B35	<b>41.66</b>	<b>50.0</b>	<b>60.0</b>	<b>50.0</b>	0	+
B37	0	0	0	0	0	-
B40	8.33	0	0	50.0	0	+
B41	8.33	0	0	0	0	-
B42	0	0	20.0	0	0	-
B47	8.33	0	0	0	0	-
B53	8.33	0	0	0	0	-

ALELO HLA	SUBGRUPO CLÍNICO					
	EMTC (N=6)	LEG (N=6)	EGP (N=4)	AR (N=2)	PM/DM (N=2)	E-DM (N=1)
DR1	<b>33.33</b>	33.33	<b>50.0</b>	0	0	-
DR2	<b>33.33</b>	33.33	0	0	<b>100.0</b>	-
DR3	16.66	0	0	0	0	-
DR4	16.66	<b>50.0</b>	25.0	50.0	50.0	+
DR5	<b>33.33</b>	33.33	25.0	<b>100.0</b>	0	-
DR6	0	0	0	0	50.0	-
DR7	0	0	25.0	0	0	+
DR8	16.66	16.66	25.0	50.0	0	-
DR9	16.66	0	0	0	0	-
DR10	16.66	0	25.0	0	0	-
DQ1	<b>100</b>	<b>83.33</b>	<b>75.0</b>	0	50.0	-
DQ2	16.66	0	0	0	0	-
DQ3	50.0	66.66	<b>75.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	+
DQ4	16.66	16.66	25.0	50.0	0	-

EMTC = enfermedad mixta del tejido conectivo; LEG = lupus eritematoso generalizado; EGP = esclerosis generalizada progresiva; AR = artritis reumatoide; PM/DM = polimiositis/dermatomiositis; E-DM = esclerodermatomiositis.  
 No se encontró ningún valor de  $p$  significativo en el análisis de varianza de Kruskal-Wallis.



**Tabla 5.** Número y frecuencia de pacientes con EMTC que reunieron los criterios de 5 enfermedades reumáticas diferentes.

ENFERMEDAD O CRITERIO DE CLASIFICACIÓN	Número de pacientes que reunieron el (los) criterio(s) (%)
<b>I. EMTC (Alarcón-Segovia y Villareal, 1987)</b>	30 (100)
ENA $\geq$ 1:1600	30 (100)
Acroesclerosis	22 (73)
Miositis	19 (63)
Sinovitis	28 (93)
Edema de manos	26 (87)
Fenómeno de Raynaud	29 (96)
<b>II. LEG (Tan <i>et al.</i>, 1982)</b>	22 (73)
Fotosensibilidad	10 (33)
Eritema malar	10 (33)
Eritema discoide	1 (3)
Úlceras orales	17 (56)
Artritis	26 (86)
Disfunción renal	7 (23)
Disfunción neurológica	1 (3)
Disfunción hematológica	22 (73)
Serositis	12 (40)
Células LE	1 (3)
VDRL falso positivo	1 (3)
Anticuerpos anti-DNA	15 (50)
Anticuerpos anti-Sm	5 (16)
Anticuerpos antinucleares (título $\geq$ 1:40)	16 (53)
<b>III. AIU (Arnett <i>et al.</i>, 1988)</b>	16 (53)
Rigidez matutina	13 (43)
Artritis en más de 3 articulaciones	19 (63)
Artritis simétrica	19 (63)
Nódulos reumatoides	6 (20)
Artritis en articulaciones interfalángica proximal, metacarpofalángica o de la muñeca	17 (56)
Factor reumatoide	17 (56)
Cambios radiográficos: erosiones o descalcificación ósea localizada	2 (6)
<b>IV. EGP (ARA, 1980)</b>	1 (3)
Esclerodermia proximal	7 (23)
Esclerodactilín	22 (73)
Cicatrices digitales	1 (3)
Fibrosis pulmonar basilar bilateral	3 (10)
<b>V. PM/DM (Bohan and Peter, 1975)</b>	2 (6)
Debilidad muscular	18 (60)
Evidencia por biopsia de músculo	7 (23)
Aumento de enzimas de músculo esquelético en suero (CPK, GOT o LDH)	22 (73)
Lesiones dermatológicas	5 (16)
Tríada electromiográfica de unidades motoras cortas	3 (10)
<b>VI. Sólo EMTC (no LEG, no AR)</b>	5 (16)

EMTC=enfermedad mixta del tejido conectivo; LEG=lupus eritematoso generalizado; AR=artritis reumatoide; EGP=esclerosis generalizada progresiva; PM/DM=polimiositis/dermatomiositis; ENA=antígeno extraíble del núcleo; CPK=creatin-fosfoquinasa; GOT=glutamato-oxaloacetato-transaminasa; LDH=lactato-deshidrogenasa; ARA= American Rheumatism Association

## VI. DISCUSIÓN

El presente estudio analiza los alelos de HLA en un grupo de 30 pacientes mexicanos con EMTC. Debido a la controversia que existe sobre la definición de la EMTC, un reumatólogo experimentado del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición realizó una clasificación estricta y cuidadosa. En todos los pacientes se estudiaron no sólo los criterios para la clasificación de EMTC, sino también aquellos para la clasificación de LEG, AR, EGP y PM/DM. Los pacientes también se clasificaron en subgrupos de acuerdo con sus manifestaciones clínicas predominantes.

En los 30 pacientes, el único alelo de HLA que estuvo incrementado significativamente con respecto a controles sanos fue el DQw1. Hasta ahora, esta asociación no había sido reportada. Sin embargo, es interesante mencionar que Olsen *et al.* reportaron en 1993 que en negros con LEG hallaron una asociación de DQA1\*0101 y DQB1\*0501 (subtipo de DQw1) con anticuerpos anti-RNP. En este caso, la aparente asociación de anti-RNP y DQw1 se presenta en LEG, no en EMTC y muestra que la relación puede ser del HLA con un anticuerpo dado, no con una enfermedad específica.

También Baek *et al.* reportaron en 1995 que en negros y blancos con LEG y anti-RNP, está aumentado DQB1\*0501. Estos autores mencionaron que el HLA de clase II determina el perfil de autoanticuerpos anti-RNP y anti-Sm en LEG, pues los anticuerpos anti-RNP se asociaron con DRB1\*0802 y DRB1\*0804 en blancos, y con DRB1\*0101 en negros, mientras que DRB1\*0104 se asocia con anti-Sm en negros. Es posible que el aumento de DQw1 encontrado en el presente trabajo sobre EMTC indique que los pacientes que cuentan con este alelo tienen susceptibilidad para producir anticuerpos anti-RNP, que se asocian con el desarrollo de EMTC. De este modo, el marcador DQw1 (y principalmente sus subtipos moleculares) podría apoyar un diagnóstico de autoinmunidad en la que se presenten anticuerpos anti-RNP y también entonces, una posible predisposición a la EMTC, ya que estos anticuerpos son más frecuentes en EMTC que en LEG.

El aumento de DQw1 en EMTC en mestizos mexicanos podría indicar que proviene de la mezcla de poblaciones nativas mexicanas con otros grupos étnicos, como los negros, ya que en estos últimos, el DQw1 también se asocia con anti-RNP (aunque en LEG).

Por otro lado, el aumento de DQw1 en pacientes mexicanos con EMTC podría indicar la existencia de una susceptibilidad genética particular del grupo étnico. Los pacientes estudiados no mostraron un incremento significativo de DR4 (de hecho, este alelo estaba disminuido), como se ha reportado previamente en otros estudios de EMTC (Black *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1990; Ruuska *et al.*, 1992). Esto podría mostrar que las diferencias en la susceptibilidad a enfermedades entre distintas poblaciones podrían ser el resultado de diferencias genéticas entre etnias, y las similitudes, el resultado de mezclas entre diferentes etnias. No obstante, la hipótesis del epítipo compartido aún podría aplicarse en el caso de DQw1, el cual podría compartir secuencias con otros alelos de susceptibilidad del HLA.

En el presente trabajo, el DQw1 permaneció aumentado en los subgrupos clínicos, excepto en el subgrupo de AR (N=2) y en el de PM/DM (N=2), en los que DQw3 fue el alelo más común; esto podría deberse al pequeño número de muestra de estos 2 subgrupos.

Además del DQw1, los alelos A2 y B35 se encontraron incrementados consistentemente en los 30 pacientes, en los subgrupos clínicos y en todos los criterios de clasificación de las enfermedades reumáticas, además de la EMTC. Este aumento no fue significativo. Esta homogeneidad en las frecuencias del HLA está a favor del concepto de que la EMTC es una entidad independiente, puesto que desde un punto de vista inmunogenético, no hubo diferencias entre los 30 pacientes y los subgrupos clínicos cuando se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Por consiguiente, el argumento de que el HLA podría predecir la "diferenciación" de la EMTC hacia otra enfermedad reumática (Gendi *et al.*, 1995) no se aplica a este estudio.

Por otro lado, el incremento no significativo de A2 y de B35 en los pacientes es interesante, ya que estos 2 alelos de HLA son los más frecuentes en los mestizos mexicanos normales.

Ya también se había reportado la asociación de B35 con EMTC, junto con A3, Cw4 y DR4 en pacientes caucásicos (Ruuska *et al.*, 1992). El aumento de B35 podría reflejar un ligamiento genético con otros alelos de HLA, tales como A2 ó DR4, más que una asociación directa con la enfermedad.

El hecho de que el DR2 se haya encontrado aumentado en los pacientes que tenían aumento de las enzimas CPK, LDH o GOT en suero, puede indicar que este alelo está asociado con susceptibilidad a miositis, independientemente de la EMTC. Los dos pacientes con EMTC que reunieron los criterios para PM/DM tenían el alelo DR2.

Este trabajo define un grupo de pacientes mexicanos, clasificados cuidadosamente, en un análisis inmunogenético. La asociación de DQw1 con EMTC en pacientes mexicanos distingue a la EMTC del LEG, la AR, y la EGP: se ha encontrado con anterioridad que en pacientes mexicanos, el LEG se asocia con DR3 y DR7 (Granados *et al.*, en prensa), la AR se asocia con A1, DR3 y DQ2 (Ávila-Portillo *et al.*, 1994) y la EGP se asocia con DR5 y DRw52 (Vargas-Alarcón *et al.*, 1995). De este modo, en pacientes con el mismo trasfondo genético y étnico, los alelos de HLA distinguen a estas enfermedades reumáticas diferentes, incluso a la EMTC.

Para profundizar en el análisis de la asociación entre EMTC y DQw1 en mestizos mexicanos, sería interesante estudiar los subtipos moleculares de DQw1 en los pacientes, ya sea mediante estudios de hibridación de DNA genómico amplificado, con oligonucleótidos específicos de secuencias de subtipos de DQw1, o mediante secuenciación del DNA.

También podrían estudiarse otros genes del SPH en EMTC, tales como los encontrados más recientemente, pues la asociación entre EMTC y SPH o entre anticuerpos anti-RNP y SPH, puede incluir un(os) gen(es) ligado(s) a DQw1 en un mismo haplotipo. Por ejemplo, los genes B30-2 y RFP, que codifican para antígenos nucleares, podrían intervenir en la autoinmunidad. Incluso podría estudiarse si existe polimorfismo en los genes TAP y LMP,

que pudiera relacionarse con la EMTC. El estudio de microsatélites del DNA también podría aplicarse para analizar las asociaciones entre EMTC y SPH.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abderrahim H, Sambucy J-L, Iris F, Ougen P, Billault A, Chumakov IM, Dausset J, Cohen D, Le Paslier D. Cloning the human major histocompatibility complex in YACs. *Genomics* 23(3):520-527, 1994.
- Alarcón-Segovia D. Mixed connective tissue disease and overlap syndromes. *Clin Dermatol* 12:309-316, 1994.
- Alarcón-Segovia D, Alcocer-Varela J, Díaz-Jouanen E. The connective tissue diseases as disorders of immune regulation. *Clin Rheum Dis* 11:451-469, 1985.
- Alarcón-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease: a study of 593 patients. *J Rheumatol* 16: 328-334, 1989.
- Alarcón-Segovia D, Ruíz-Argüelles A. Suppressor cell loss and dysfunction in mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 23:314-318, 1980.
- Alarcón-Segovia D, Ruíz-Argüelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 271:67, 1978.
- Alarcón-Segovia D, Ruíz-Argüelles A, Llorente L. Antibody penetration into living cells II. Anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into T gamma cells causing their deletion and the abrogation of suppressor function. *J Immunol* 122:1855-1863, 1979.
- Alarcón-Segovia D, Villarreal M. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. En: Kasukawa R., Sharp GC (eds). *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam. Excerpta Medica: 33-40, 1987.
- Amadou C, Ribouchon MT, Mattei MG, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Avoustin P, Pontarotti P. Localization of new genes and markers to the distal part of the human major histocompatibility complex (MHC) region and comparison with the mouse: new insights into the evolution of mammalian genomes. *Genomics* 26(1):9-20, 1995.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Keplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-324, 1988.
- Ávila-Portillo LM, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Alarcón-Segovia D, Granados J. Linkage disequilibrium of HLA-DR3 and HLA-DR4 with HLA-B alleles in Mexican patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 12: 497-502, 1994.
- Baek K, Petri M, Schneckpeper B. HLA DR/DQ associations with anti-Sm and anti-RNP in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 38(9):S171, 1995.

- Batchelor JR. Systemic lupus erythematosus and genes within the HLA region. *Br J Rheumatol* 32:13-15, 1993.
- Becker H, Langrock A, Federlin K. Imbalance of CD4+ lymphocyte subsets in patients with mixed connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 88:91-95, 1992.
- Bell DA, Rigby R, Stiller CR, Clark WF, Harth M, Ebers G. HLA antigens in systemic lupus erythematosus: relationship to disease severity, age at onset, and sex. *J Rheumatol* 11:475-479, 1984.
- Bennett RM, O'Connell DJ. Mixed connective tissue disease: a clinico-pathologic study of 20 cases. *Semin Arthritis Rheum* 10:25-51, 1980.
- Black CM, Isenberg DA. Mixed connective tissue disease: good-bye to all that. *Br J Rheumatol* 31:695-700, 1992.
- Black CM, Maddison PJ, Welsh KI, Woodrow JC, Pereira RS. HLA and immunoglobulin allotypes in mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 31:131-134, 1988.
- Black CM, Welsh KI, Maddison PJ, Jayson MIV, Bernstein RM. HLA antigens, autoantibodies and clinical subsets in scleroderma. *Br J Rheumatol* 23:267-271, 1984.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. (First of two parts). *New Engl J Med* 292 (7): 344-347, 1975.
- Caillat-Zucman S, Bertin E, Timsit J, Boitard C, Assan R, Bach JF. Protection from insulin-dependent diabetes mellitus is linked to a peptide transporter gene. *Eur J Immunol* 23(8):1784-1788, 1993.
- Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping 21 hydroxylase genes adjacent to complement C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:521-525, 1985.
- Carter CA, Murphy G, Fabre JW, Lund T. Physical mapping of the rat MHC class II genes shows a high level of interspecies conservation. *Genomics* 22(2):451-455, 1994.
- Chorney MJ, Sawada I, Gillespie GA, Srivastava R, Pan J, Weissman SM. Transcription analysis, physical mapping and molecular characterization of a non classical human leucocyte antigen class I gene. *Mol Cell Biol* 10:243-253, 1990.
- Crouau-Roy B, Amadou C, Bouissou C, Clayton J, Vernet C, Ribouchon MT, Pontarotti P. Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. *Genomics* 21:241-243, 1994.
- De Clerck LS, Meijers KAE, Cats A. Is mixed connective tissue disease a distinct entity? Comparison of clinical and laboratory findings in MCTD, SLE, PSJ and RA patients. *Clin Rheumatol* 8:29-36, 1989.
- De Leo C, Castelán N, López M, González N, Weckmann AL, Melín-Aldana H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R. HLA class I

and class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizos established from serological typing of fifty families. *Hum Biol*: enviado a publicación.

de Rooij DJ, Fiselier TH, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Juvenile-onset mixed connective tissue disease: clinical, serological and follow-up data. *Scand J Rheumatol* 18:157-160, 1989.

Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348:738-741, 1990.

Dong RP, Kimura A, Hashimoto H, Akizuki M, Nishimura Y, Sasazuki T. Difference in HLA-linked genetic background between mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 41(1):20-25, 1993.

Doria A, Ruffatti A, Calligaro A, Del Ross T, Ghirardello A, De Zambiasi P, Gambari P. Antiphospholipid antibodies in mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol* 11(1):48-50, 1992.

Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7237-7241, 1987.

Fielder AHL, Walport MJ, Batchelor RJ, Rynes RI, Black CM, Dodi IA, Hughes GRV. Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Br Med J* 286:425-428, 1983.

Fritzler MJ, Ali R, Tan EM. Antibodies from patients with mixed connective tissue disease react with heterogenous nuclear ribonucleoprotein or ribonucleic acid (Hn RNP/RNA) of the nuclear matrix. *J Immunol* 123:1216-1219, 1984.

Gendi NST, Welsh KI, Van Venrooij WJ, Vancheeswaran R, Gilroy J, Black CM. HLA type as a predictor of mixed connective tissue disease differentiation. *Arthritis Rheum* 38(2):259-266, 1995.

Genth E, Mierau R, Genetzky P, von Mühlen CA, Kaufmann S, von Wilmowsky H, Meurer M, Krieg T, Pollmann H-J, Hartl PW. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 33(5):657-665, 1990.

Genth E, Zarnowski H, Mierau R, Wohltmann D, Hartl PW. HLA-DR4 and Gm (1,3,5,21) are associated with U1-snRNP antibody positive connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 46:189-196, 1987.

Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9145-9149, 1987.

Gladman DD, Keystone EC, Baron M, Lee P, Cava D, Mervert H. Increased frequency of HLA-DR5 in scleroderma. *Arthritis Rheum* 24:854-856, 1981.



- and class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizos established from serological typing of fifty families. *Hum Biol*: enviado a publicación.
- de Rooij DJ, Fiselier TH, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Juvenile-onset mixed connective tissue disease: clinical, serological and follow-up data. *Scand J Rheumatol* 18:157-160, 1989.
- Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348:738-741, 1990.
- Dong RP, Kimura A, Hashimoto H, Akizuki M, Nishimura Y, Sasazuki T. Difference in HLA-linked genetic background between mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 41(1):20-25, 1993.
- Doria A, Ruffatti A, Calligaro A, Del Ross T, Ghirardello A, De Zambiasi P, Gambari P. Antiphospholipid antibodies in mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol* 11(1):48-50, 1992.
- Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7237-7241, 1987.
- Fielder AHL, Walport MJ, Batchelor RJ, Rynes RI, Black CM, Dodi IA, Hughes GRV. Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Br Med J* 286:425-428, 1983.
- Fritzier MJ, Ali R, Tan EM. Antibodies from patients with mixed connective tissue disease react with heterogenous nuclear ribonucleoprotein or ribonucleic acid (Hn RNP/RNA) of the nuclear matrix. *J Immunol* 123:1216-1219, 1984.
- Gendi NST, Welsh KI, Van Venrooij WJ, Vancheeswaran R, Gilroy J, Black CM. HLA type as a predictor of mixed connective tissue disease differentiation. *Arthritis Rheum* 38(2):259-266, 1995.
- Genth E, Mierau R, Genetzky P, von Mühlen CA, Kaufmann S, von Wilmowsky H, Meurer M, Krieg T, Pollmann H-J, Hartl PW. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 33(5):657-665, 1990.
- Genth E, Zarnowski H, Mierau R, Wohltmann D, Hartl PW. HLA-DR4 and Gm (1,3;5,21) are associated with U1-snRNP antibody positive connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 46:189-196, 1987.
- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9145-9149, 1987.
- Gladman DD, Keystone EC, Baron M, Lee P, Cana D, Mervert H. Increased frequency of HLA-DR5 in scleroderma. *Arthritis Rheum* 24: 854-856, 1981.

Glynn R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-related gene between two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353:357-360, 1991.

Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357:375-379, 1992.

González-Amaro R, Alcocer-Varela J, Martínez-Cordero E, Alarcón-Segovia D. Natural-killer cell-mediated activity in mixed connective tissue disease and its response to induction by interleukin-2. *J Clin Immunol* 4:273-279, 1984.

Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Melín-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus: en prensa*.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205-1213, 1987.

Guldner HH, Netter HJ, Szostecki C, Lakomek HJ, Will H. Epitope mapping with a recombinant human 68kDa (U1) ribonucleoprotein antigen reveals heterogeneous autoantibody profiles in human autoimmune sera. *J Immunol* 141:469-475, 1988.

Harley JB, Sestak AL, Willis LG, Fu SM, Hansen JA, Reichlin M. A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus: relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease. *Arthritis Rheum* 32:826-836, 1989.

Hämeenkorpi R, Ruuska P, Forsberg S, Tiilikainen R, Makitalo R, Hakala M. More evidence of distinctive features of mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 22(2):63-68, 1993.

Hoet RM, De Weerd P, Gunnewiek JK, Koornneef I, Van Venrooij WJ. Epitope regions on U1 small nuclear RNA recognized by anti-U1RNA-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 90:1753-1762, 1992.

Hoffman RW, Cassidy JT, Takeda Y, Smith-Jones EI, Wang GS, Sharp GC. U1-70-kD autoantibody-positive mixed connective tissue disease in children. A longitudinal clinical and serologic analysis. *Arthritis Rheum* 36(11):1599-1602, 1993a.

Hoffman RW, Rettenmaier LJ, Takeda Y, Hewett JE, Petterson I, Nyman U, Luger AM, Sharp GC. Human autoantibodies against the 70-kD polypeptide of U1 small nuclear RNP are associated with HLA-DR4 among connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 33(5):666-673, 1990.

Hoffman RW, Sharp GC, Irrin WS, Anderson SK, Hewett JE, Pandey JP. Association of immunoglobulin Km and Gm allotypes with specific antinuclear antibodies and disease susceptibility among connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 34:453-458, 1991.

Hoffman RW, Takeda Y, Sharp GC, Lee DR, Hill DL, Kaneoka H, Caldwell CW. Human T cell clones reactive against U-small nuclear ribonucleoprotein autoantigens from connective tissue disease patients and healthy individuals. *J Immunol* 151(11):6460-6469, 1993b.

Jazwinska EC, Lee SC, Webb SI, Halliday JW, Powell LW. Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Am J Hum Genet* 53:347-352, 1993.

Juji T, Naohara T, Musada M, Takahashi K. HLA antigens in Japanese patients with MCTD. En: Kasukawa R, Sharp GC (eds.). *Proc Int Symp Mixed Connective Tissue Disease and Anti-Nuclear Antibodies*. Tokyo: capítulo 1, 1986.

Kaneoka H, Hsu K, Takeda Y, Sharp GC, Hoffman RW. Molecular genetic analysis of HLA-DR and HLA-DQ genes among anti-U1-70 kD autoantibody-positive connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 35:83-94, 1992.

Kaneoka H, Lee DR, Hsu K, Sharp GC, Hoffman RW. Solid-phase direct DNA sequencing of allele-specific polymerase chain reaction amplified HLA-DR genes. *BioTech* 10:30-34, 1991.

Kasukawa R, Tojo T, Miyawaki S, Yoshida H, Tanimoto K, Nobunaga M, Suzuki T, Takasaki Y, Tamura T. Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. En: Kasukawa R, Sharp GC (eds.). *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam. Excerpta Medica: 41-47, 1987.

Kelly A, Powis SH, Glynne R, Radley E, Beck B, Trowsdale J. Second proteasome related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-668, 1991.

Koelle MS, Kumar V, Beutner EH, Chorzelski TP. In vivo epidermal nuclear reactions: a selective process. *Brit J Dermatol* 125:48-52, 1991.

Koller BH, Geraghty DE, De Mars R, Duvick L, Rich SS, Orr HT. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J Exp Med* 169:469-480, 1989.

Koller BH, Geraghty DE, Shimizu Y, De Mars R, Orr HT. HLA-E: A novel HLA class I gene expressed in resting lymphocytes. *J Immunol* 141:897-904, 1988.

Lanchbury JSS, Hall MA, Welsh KI, Panayi GS. Sequence analysis of HLA-DR4B1 subtypes: additional first domain variability is detected by oligonucleotide hybridization and nucleotide sequencing. *Hum Immunol* 27:136-144, 1990.

Lázaro MA, Cocco JAM, Catoggio LJ, Babini SM, Messina OD, Morteo OG. Clinical and serologic characteristics of patients with overlap syndrome: is mixed connective tissue disease a distinct clinical entity? *Medicine* 68:58-65, 1989.

LeRoy EC, Maricq HR, Kahaleh MB. Undifferentiated connective tissue syndromes. *Arthritis Rheum* 23:341-343, 1980.

Lundberg I, Hedfors E. Clinical course of patients with anti-RNP antibodies: a prospective study of 32 patients. *J Rheumatol* 18:1511-1519, 1991.

McCloskey DJ, Brown J, Navarrete C. Serological typing of HLA-A, -B, and -C antigens. En: Hui M, Bidwell JL (eds.). Handbook of HLA typing techniques. Boca Raton, FL. CRC Press: 175-247, 1993.

Melendro EI, Saldade C, Rivero SJ, Alarcón-Segovia D. T-cell subpopulations in the peripheral blood of patients with connective tissue diseases as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies. Clin Immunol Immunopathol 27:340-347, 1983.

Mendenhall W, Wackerly DD, Scheaffer RL. Estadística Matemática con Aplicaciones. Grupo Editorial Iberoamérica. México, DF: 650-654, 1994.

Morton CC, Kirsh IR, Nance WE, Evans GA, Korman AJ, Strominger JL. Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 81:2816-2820, 1984.

Nakae K, Furusawa F, Kasukawa R, Tojo T, Homma M, Aoki K. A nationwide epidemiological survey on diffuse collagen diseases: Estimation of prevalence rate in Japan. En: Kasukawa R, Sharp GC (eds.) Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies. Amsterdam. Excerpta Medica: 9-13, 1987.

Nedospasov SA, Udalova IA, Kuprash DV, Turetskaya RL. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. J Immunol 147 (3): 1053-1059, 1991.

Netter HJ, Guldner HH, Szostecki C, Lakomek HJ, Will H. A recombinant autoantigen derived from the human (U1) small nuclear RNP-specific 68-kd protein: expression in *Escherichia coli* and serodiagnostic application. Arthritis Rheum 31:616-622, 1988.

Nimelstein SH, Brody S, McShane D, Holman HR. Mixed connective tissue disease: a subsequent evaluation of the original 25 patients. Medicine 59(4):239-248, 1980.

Nishikai M, Sekiguchi S. Relationship of autoantibody expression and HLA phenotype in Japanese patients with connective tissue diseases. Arthritis Rheum 28:579-581, 1985.

O'Brien RM, Cram DS, Coppel RL, Harrison LC. T-cell epitopes on the 70-kDa protein of the (U1)RNP complex in autoimmune rheumatologic disorders. J Autoimmunity 3:747, 1990.

Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Uwatoko S, Sumiya M, Yokohari R. The B cell repertoire in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-inducible circulating precursors that produce autoantibodies against nuclear ribonucleoprotein (nRNP). Clin Exp Immunol 90:415-421, 1992.

Okubo M, Kurokawa M, Ohto H, Nishimaki T, Nishioka K, Kasukawa R, Yamamoto K. Clonotype analysis of peripheral blood T cells and autoantigen-reactive T cells from patients with mixed connective tissue disease. J Immunol 153(8):3784-3790, 1994.

COPIES TO BE MADE  
BY THE LIBRARY

Olsen ML, Arnett FC, Reveille JD. Contrasting molecular patterns of MHC class II alleles associated with the anti-Sm and anti-RNP precipitin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 36: 94-104, 1993.

Pettersson I, Hinterberger M, Mimori T, Gottlieb E, Steitz JA. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins: identification of multiple protein components reactive with anti-(U1) ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies. *J Biol Chem* 259:5907-5914, 1984.

Pettersson I, Wang G, Smith EI, Wigzell H, Hedfors E, Horn J, Sharp GC. The use of immunoblotting and immunoprecipitation of (U) small nuclear ribonucleoproteins in the analysis of sera of patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus: a cross-sectional, longitudinal study. *Arthritis Rheum* 29:986-996, 1986.

Ruuska P, Hämeenkorpri R, Forsberg S, Julkunen H, Mäkitalo R, Ilonen J, Tiilikainen A. Differences in HLA antigens between patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 51:52-55, 1992.

Sasazuki T, Kaneoka H, Ohta N, Hayase R, Iwamoto I. Common HLA haplotypes and their association with diseases in the Japanese population. *Transplant Proc* 11: 1871, 1979.

Seuchter SA, Knapp M, Hartung K, Coldevey R, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Deicher H, Baur MP. Testing for association in SLE families. *Genet Epidemiol* 8:409-416, 1991.

Sharp GC. Diagnostic criteria for classification of MCTD. En: Kasukawa R, Sharp GC (eds.). *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam: Excerpta Medica: 23-32, 1987.

Sharp GC, Irvin WS, May CM, Holman HR, McDuffie FC, Hess EV, Schmid FR. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med* 295:1149-1154, 1976.

Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 52:148-159, 1972.

Smolen JS, Klippel JH, Penner E, Reichlin M, Steinberg AD, Chused TM, Scherak O, Graninger W, Hartter E, Zielinski CC, Wolf A, Davey RJ, Mann DL, Mayr WR. HLA-DR antigens in systemic lupus erythematosus: association with specificity of autoantibody responses to nuclear antigens. *Ann Rheum Dis* 46:457-462, 1987.

Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243:214-216, 1989.

Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JD. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8699-8702, 1986.

Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria committee: preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23: 581-590, 1980.

Takasaki Y, Suzuki M, Tsuda H, Matsumoto T, Nasu H, Hashimoto H, Shiokawa Y, Terasaki PI, Iwaki Y. MCTD and HLA. En: *Proc Symp Animal Reports of Research Group for MCTD*. Tokyo: 24, 1983.

Takeda Y, Wang GS, Wang RJ, Anderson SK, Pettersson I, Amaki S, Sharp GC. Enzyme-linked immunosorbent assay using isolated (U) small nuclear ribonucleoprotein polypeptides as antigens to investigate the clinical significance of autoantibodies to these polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 50:213-230, 1989.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277, 1982.

Tiwari JL, Terasaki PI. *HLA and disease associations*, New York:Springer-Verlag, 1985.

Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature* 348:741-744, 1990.

Van Venrooij WJ. Autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein components. *J Rheumatol* 14(S13):78-82, 1987.

Van Venrooij WJ, Habets WJ. Detection of nuclear antigens recognized by human autoantibodies. *Scand J Rheumatol* 56:S32-S41, 1985.

Vargas-Alarcón G, Granados J, Ibáñez de Kasep G, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. Association of HLA-DR5 (DR11) with systemic sclerosis (scleroderma) in Mexican patients. *Clin Exp Rheumatol* 13: 11-16, 1995.

Venditti CP, Harris JM, Geraghty DE, Chorney MJ. Mapping and characterization of non-HLA multiene assemblages in the human MHC class I region. *Genomics* 22(2):257-266, 1994.

Vernet C, Ribouchon MT, Chimini G, Jouanolle AM, Sidibe I, Pontarotti P. A novel coding sequence belonging to a new multicopy gene family mapping within the human MHC class I region. *Immunogenetics* 38(1):47-53, 1993a.

Vernet C, Boretto J, Mattei MG, Takahashi M, Jack LJW, Mather IH, Rouquier S, Pontarotti P. Evolutionary study of multigenic families mapping close to the human MHC class I region. *J Mol Evol* 37(6):600-612, 1993b.

Vernet C, Ribouchon MT, Chimini G, Pontarotti P. Structure and evolution of a member of a new subfamily of GTP-binding proteins mapping to the human MHC class I region. *Mamm Genome* 5:100-105, 1994.

Volz A, Weiss E, Trowsdale J, Ziegler A. Presence of an expressed beta-tubulin gene (TUBB) in the HLA class I region may provide the genetic basis for HLA-linked microtubule dysfunction. *Hum Genet* 93:42-46, 1994.

Watanabe Y, Tokunaga K, Matsuki K, Takeuchi F, Matsuta K, Maeda H, Omoto K, Juji T. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. *J Exp Med* 169:2263-2268, 1989.

Weckmann AL, Vargas-Alarcón G, López M, González N, De Leo C, Castelán N, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R. Frequencies of HLA-A and HLA-B in a Mexico City Mestizo sample. *Am J Hum Biol*: en prensa.

Yasuma M, Harada S, Takasaki Y, et al. . Clinical significance of IgG subclasses of anti Sm and UI-ribonucleoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *J Clin Immunol* 11:317-325, 1991.

Yunis EJ. MHC haplotypes in biology and medicine. 1987 Philip Levine Award Lecture. *AJCP* 89(2):268-275, 1988.

Zhou Y, Chaplin DD. Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9470-9474, 1993.