

00544
7
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

INMUNOGENETICA EN LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN BIOQUIMICA CLINICA.

(INMUNOLOGIA).

PRESENTA

NORMA ALICIA SALGADO GALICIA.

México, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

LIC. ANTONIO DÍAZ GARCÍA
Jefe de la Unidad de Registro e Información.
Ciudad Universitaria
Presente.

Me es grato informarle que la alumna NORMA ALICIA SALGADO GALICIA, presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica, ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Jesús Guzmán García
Primer Vocal	Dr. Antonio Rafael Cabral Castañeda
Secretario:	Dra. Ma. Dolores Lastra A.
Primer Suplente:	Dra. Rebecca Franco
Segundo Suplente:	M. en C. Jorge Arellano Blanco

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 18 de marzo de 1996.

DR. ANDONI GARRITZ RUIZ
Director.

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

DEDICATORIAS.

A mis padres:
Por su apoyo incondicional.
Manuel Salgado Larios.
Hortensia Galicia Hernández.

A mis hermanos:
Por su apoyo y ejemplo.
Héctor,
Jorge Manuel,
Carlos Edgar.

A mi cuñada y
mis sobrinos.

Mis compañeros de Generación:
Lizbeth y Juan Manuel.

A mis maestros y amigos.

A todo el personal del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición. Gracias por el apoyo y enseñanzas brindadas.

A mis tutores:

Dr. Julio Granados Arriola.
Dr. Jorge Alcocer Varela.

INDICE.

RESUMEN.	1
INTRODUCCION	3
1. LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG).	3
2. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.	16
2.1 SUBREGIONES HLA A,B,C: MOLECULAS DE CLASE I.	19
2.2 ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE CLASE I.	20
2.3 GENES DE CLASE I.	23
2.4 SUBREGIONES HLA-DR, DQ, DP: MOLECULAS DE CLASE II.	25
2.5 ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE CLASE II.	26
2.6 GENES DE CLASE II.	28
2.6.1 SUBREGION DR.	30
2.6.2 SUBREGION DQ.	31
2.6.3 SUBREGION DP.	32
2.7 OTROS GENES DE CLASE II.	33
2.8 REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE CLASE II.	33
2.9 DESEQUILIBRIO DE UNION EN LA REGION DE CLASE II.	34
2.10 MOLECULAS DE CLASE III.	34
3. NOMENCLATURA.	36
4. GENETICA DEL HLA.	38
4.1 HAPLOTIPOS EXTENDIDOS.	39
5. ASOCIACION DEL MHC CON ENFERMEDADES.	40
6. ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS.	45
7. ASOCIACIONES DEL MHC CON EL LUPUS ERITEMATOSO.	
GENERALIZADO.	49
7.1 DEFICIENCIAS HEREDADAS DEL COMPLEMENTO.	49
7.1.1 DEFICIENCIA DE C1q.	51
7.1.2 DEFICIENCIAS DE C1s Y C1r.	53

7.1.3 DEFICIENCIA DE C2.	54
7.1.4 DEFICIENCIA DE C3 Y C5.	56
7.1.5 DEFICIENCIA DE C4.	57
7.1.5.1 C4 Y SU RELACION CON ENFERMEDADES REUMATICAS.	65
7.1.6 ASOCIACION DE MHC CLASE II CON LEG.	70
7.1.6.1 ANTICUERPOS ANTI-DNA.	72
7.1.6.2 AUTOANTICUERPOS Ro (SS-A) Y La (SS-B).	73
7.1.6.3 ANTICUERPOS ANTI-Sm Y nRNP.	76
7.1.6.4 ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDOS.	78
7.1.6.5 ANTICUERPOS A PROCOLAGENO TIPO VII.	80
7.1.7 GENES DE INMUNOGLOBULINAS.	80
7.1.8 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α .	81
7.1.9 GENES DEL RECEPTOR DE CELULAS T (TCR) EN LEG.	81
8. MATERIAL Y METODOS.	83
8.1 TIPIFICACION SEROLOGICA DE HLA.	84
8.2 CRIOPRESERVACION DE CELULAS.	94
8.3 EXTRACCION DE DNA GENOMICO MACROTECNICA.	96
8.4 EXTRACCION DE DNA GENOMICO MICROTECNICA.	99
8.5 CUANTIFICACION DE DNA Y RNA POR ESPECTROFOTO- METRIA.	100
8.6 PURIFICACION DE DNA	102
8.7 PROCEDIMIENTO PARA LA TIPIFICACION DE HLA-DRB1, DQB1, DPB1 POR HIBRIDIZACION CON SONDAS DE OLIGONUCLEOTIDOS SECUENCIA ESPECIFICA (SSO).	103
8.8 TIPIFICACION DE HLA-DR POR AMPLIFICACION POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA CON PRIMERS SECUENCIA ESPECIFICA (PCR-SSP).	134
9. RESULTADOS.	156

10. DISCUSION.	173
11. APENDICE DE REACTIVOS.	179
12. BIBLIOGRAFIA.	183

RESUMEN.

INTRODUCCION:

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune de origen desconocido, particularmente frecuente en mexicanos. Su fisiopatogenia es multifactorial y en ella se reconocen factores genéticos asociados con susceptibilidad. Dentro de estos se han descrito asociaciones de la enfermedad con alelos de los genes del complejo principal de histocompatibilidad. Dichas asociaciones varían de un grupo étnico a otro, sin embargo las más consistentes residen en alelos de los genes clase II (HLA-DR y DQ) y en particular con el HLA-DR3. En mexicanos se han descrito asociaciones con el DR3 y con deficiencias parciales del gen C4A (C4A*Q0) y del gen C4B (C4B*Q0).

OBJETIVO:

Este trabajo estudia en 181 pacientes los genes Clase I (HLA-A,B,C) y genes Clase II y los compara con los correspondientes 105 controles.

MATERIALES Y METODOS:

Los genes Clase I se estudiaron a nivel de la proteína por la técnica de microlinfotoxicidad y los genes Clase II a nivel del DNA utilizando la técnica de reacción en cadena de la Polimerasa que amplificó las regiones DRB1, DQA y DQB, la identificación de los alelos de cada uno de los genes se realizó mediante la hibridación con sondas de oligonucleótidos alelo específicas (SSO).

Las frecuencias génicas de cada uno de los loci se compararon mediante estadística no paramétrica (Chi cuadrada y Prueba exacta de Fisher) utilizando el paquete estadístico para computadora llamado EPI-INFO.

RESULTADOS:

En el locus HLA-DR se encontró disminución significativa de los pacientes con LEG del alelo HLA-DR5 ($pC= 2.0 \times 10^{-4}$) al compararse con los controles. De la misma manera se encontró disminución del alelo DRB1*1402 ($pC = 5.57 \times 10^{-3}$), disminución del alelo DQA*0601 ($pC=2.20 \times 10^{-7}$) y disminución del alelo DQB* 0602 ($pC = 3.11 \times 10^{-3}$) en los pacientes versus controles. El análisis por haplotipos mostró que el haplotipo característico de los pacientes mexicanos con LEG es el DRB1*0407, DQA*03, DQB*0302. Otros haplotipos presentes en los pacientes mexicanos con LEG fueron DRB1*0101, DQA*0101, DQB*0501; DRB1*0301, DQA*0501, DQB*0201 y DRB1* 1301, DQA*0103, DQB*0603.

DISCUSION:

El haplotipo marcado con DRB1* 0407 es frecuente en mexicanos particularmente en poblaciones indígenas, por lo que su origen probablemente es autóctono, el haplotipo marcado por el DRB1*1501 se ha descrito en pacientes españoles con LEG, por lo que su origen en mexicanos probablemente derive de mestizaje con individuos de España. El haplotipo marcado por el DRB1*0301 está asociado en individuos de origen caucásico con varias enfermedades autoinmunes (LEG, tiroiditis autoinmune, hepatitis crónica activa, diabetes insulino dependiente), por lo que su presencia en mexicanos probablemente derive del mestizaje con individuos de diverso origen étnico y sientan las bases de estudios ulteriores que revelen el mecanismo molecular de la forma en que dicho mestizaje desarrolla el LEG.

TESIS

COMPLETA

INTRODUCCION.

I. LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO. LEG.

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica de causa desconocida que puede afectar diferentes órganos (1).

El nombre de lupus se debe en parte al exantema facial que presentan los pacientes con este padecimiento, el cual se consideró emparentado con la tuberculosis cutánea (lupus vulgar) y a la naturaleza erosiva del padecimiento semejante al daño causado por la mordedura de un lobo. El término fué utilizado por primera vez por Kaposi al describir el lupus discoide (2).

Es probable que este síndrome haya sido observado varios hace varios siglos, ya que existen evidencia de LEG en la cultura Huari (890 d.c.), en Perú. Sin embargo no fue sino hasta 1875 que Kaposi reconoció una enfermedad separada del lupus discoide y asoció la erupción en ala de mariposa con “fiebre remitente e irregular...”. William Osler tuvo el mérito de describir la enfermedad como la conocemos actualmente: “lesiones cutáneas polimórficas, endocarditis y crisis gastrointestinales”. La recurrencia es una característica especial de esta enfermedad.

El descubrimiento por Hargraves (1948) del fenómeno LE orientó la investigación y permitió dilucidar la patogenia autoinmune de este síndrome (2).

La aplicación de los criterios de clasificación del LEG por la Asociación Americana de Reumatología (ARA) de 1971 y 1982, han permitido conocer mejor los aspectos de prevalencia, incidencia, distribución racial, edad, sexo y mortalidad de este síndrome (2).

La prevalencia, de acuerdo a diferentes series es de un caso por 2400 y la incidencia varía desde 1 a 7.6 casos por 100,000 habitantes. La tasa de prevalencia en mujeres entre 15 y 65 años de edad es de 1 por 700 en la raza blanca y 1 por 245 en la raza negra. La enfermedad se presenta en todas las razas, pero la incidencia y prevalencia es mayor en las razas negra, oriental y mestiza que en la blanca, y afecta principalmente a mujeres entre 15 y 35 años de edad en una proporción de 10 a 1 en relación con los varones, e incluso una proporción más alta (30 a 1) en la edad reproductiva (1,2).

La supervivencia a cinco años es mayor al 80% para la raza blanca, para orientales y mexicanos, y más del 70% para la raza negra (2).

PATOLOGIA.

El LEG parece ser la consecuencia de una alteración de regulación inmunológica que conduce a, o resulta de, una activación policlonal de las células B, lo que causa una producción exagerada de autoanticuerpos.

Se ha encontrado una serie de anomalías en la inmunoregulación de las células mononucleares periféricas que incluyen: linfopenia, tanto de las subpoblaciones CD4 como CD8, función supresora anormal, disminución en la producción y respuesta a diversas citocinas como interleucina-2 (IL-2), una respuesta pobre en la reacción en la mezcla de linfocitos autólogos, función defectuosa de células "asesinas" naturales (NK) y deterioro en la producción de IL-1 por parte de los monocitos.

Además de estos defectos de inmunoregulación, existe aumento en los factores estimuladores de las células B, lo que da lugar a un desequilibrio que podría activar la producción de autoanticuerpos por las células B.

Los pacientes con LEG producen gran variedad de autoanticuerpos, los más importantes son los antinucleares (ANA), que incluyen al DNA de cadena doble

(DNAcd), y DNA de cadena sencilla (DNAcs). Pueden encontrarse además otros autoanticuerpos contra diversos componentes nucleares como se muestra en el cuadro 1 (7).

CUADRO 1. AUTOANTICUERPOS Y ANTIGENOS EN LUPUS.

ANTIGENO		FRECUENCIA
Designación clínica	Identidad molecular	(%)
DNA nativo	DNA de cadena doble	40
DNA desnaturalizado	DNA de cadena sencilla	70
Histonas	H1, H2A, H2B, H3, H4	70
Sm	Proteínas 29(B ¹), 28(B), 16(D), 13(E) kD formando complejos con U1, U2, U4-U6 snRNAs.	30
RNP nuclear	Proteínas de 70, 33(A), 22(C) kD formando complejos con U1 snRNA.	32
SS-A/Ro	Proteínas de 60, 52 kD formando complejos con Y1, Y3-Y5 RNAs.	35
SS-B/La	Proteínas de 48 kD formando complejos con RNA naciente de la transcripción de RNA pol III.	15
Ku	Proteínas de 86, 66 kD; Proteínas de unión a DNA.	10
PCNA/ciclina	Proteína de 36 kD; proteína auxiliar de la DNA polimerasa w	3
RNP Ribosomal	Proteínas de 38, 16, 15 kD. Asociadas con ribosomas.	10
HSP 90	Proteína de choque térmico de 90 kD.	50

Eng M. Tan (7).

Estos autoantígenos no son tejido específicos y son componentes de todos los tipos celulares. Son proteínas altamente conservadas en diferentes especies y que

intervienen en funciones celulares importantes como la replicación del DNA, transcripción, edición del precursor del mRNA y traducción. El paciente con LEG presenta una pluralidad de anticuerpos, ya que presentan en promedio de 3 a 4 de estos autoanticuerpos. Estos inmunógenos conducen a una respuesta inmune contra partículas o agregados de partículas subcelulares como el edisoma (espliceosoma) que se ensambla durante el proceso de edición del precursor del mRNA. Estas partículas son exteriorizadas por muerte, daño celular u otras razones y pueden convertirse en blanco de la respuesta inmune contra uno o varios componentes de esta partícula, la cual puede ser regulada secundariamente por factores genéticos como los genes HLA Clase I (7).

También se desarrollan anticuerpos contra diversas células como: eritrocitos, plaquetas, linfocitos ó contra componentes no específicos de las membranas, como son los fosfolípidos. Es posible que estos autoanticuerpos participen en la patogénesis del LEG formando complejos inmunes que se depositan en las articulaciones de vasos pequeños y glomérulos, donde en interacción con el complemento pueden causar inflamación y necrosis. Además pueden interactuar directamente con antígenos específicos de la membrana de eritrocitos o plaquetas, y causar así anemia hemolítica o trombocitopenia, respectivamente. La reacción también puede presentarse con un antígeno depositado en las membranas basales, como se ha postulado para el DNA en la piel y en los glomérulos. Finalmente, los autoanticuerpos podrían interactuar con linfocitos causando linfopenia y de esta manera contribuir al trastorno de la inmunoregulación. También podría estar mediada por receptores Fc o por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (3).

Este defecto de inmunoregulación es producido por factores ambientales, hormonales y genéticos, donde estos factores muy probablemente actúan a nivel de los circuitos inmunoregulatorios de células T, que a su vez controlan la producción de anticuerpos y de autoanticuerpos (1).

Existen diversos datos que sugieren la participación de factores ambientales, por ejemplo se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos tanto en familiares consanguíneos como no consanguíneos que habitan con los pacientes con LEG (4), así como también en personal de laboratorio que trabaja con los sueros de pacientes con ésta enfermedad, lo que pudiera sugerir la participación de agentes virales en la patogénesis del LEG (5). Otros factores ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad son: la exposición a la luz solar (radiación ultravioleta) , las quemaduras térmicas y otros factores físicos. Algunos medicamentos como la hidralazina, procainamida, isoniazida, varios anticonvulsivos y la clorpromacina pueden inducir el desarrollo de una enfermedad sistémica semejante al LEG (1). Más recientemente se ha reconocido que los germinados de alfalfa pueden tener un efecto semejante, probablemente debido al efecto de aminoácido L-canavalina, el cual puede tener influencia sobre la inmunoregulación (6).

Como se mencionó la mayoría de los pacientes con LEG son mujeres, lo cual puede indicar alguna influencia de los factores hormonales en el desarrollo del LEG. A este respecto se ha reportado:

1. Un aumento de la hidroxilación del carbono 16 (C-16) de la estrona, que resulta en niveles aumentados de 16 α -hidroxiestrona y estriol, tanto en hombres como en mujeres con LEG.
2. Una disminución de la hidroxilación en C-2 de la estrona, que causa niveles menores de 2-hidroxiestrona y 2-metoxiestrona en mujeres con LEG.
3. Un aumento de la oxidación en C-17 de la testosterona con aumento de la C-17-O-testosterona en mujeres con LEG. En conjunto todas estas anormalidades juntas tenderían a producir efectos estrogénicos de mayor duración y androgénicos débiles en pacientes, sobre todo en mujeres, lo que podría producir una función más intensa de las células T supresoras, lo cual resultaría en alteraciones de la respuesta inmunológica que podría favorecer el desarrollo de autoanticuerpos (1).

El LEG es más común en ciertos grupos étnicos, particularmente entre los negros, posiblemente chinos y otras poblaciones asiáticas. Además se ha informado que la incidencia del LEG es mayor en ciertas familias (2). Aproximadamente 10 -12% de los pacientes con LEG tienen un familiar en primer grado con LEG. La agregación en casos familiares de LEG ha sido comprobada por estudios que muestran que 1.7 a 3.0% en familiares de primer grado, comparado con 0.2% a 0.3% en individuos normales. Existe además una alta concordancia para LEG entre gemelos monocigotos (24 a 69%) comparando con gemelos dicigotos (2 a 9 %) (8).

Se conoce también que pueden encontrarse autoanticuerpos y una disminución de la función de las células supresoras en familiares consanguíneos de pacientes con LEG (3, 14, 31).

Conforme se ha avanzado en el conocimiento de los factores genéticos que pueden actuar en el LEG, se hace más evidente que debe existir una contribución de múltiples genes, especialmente de aquellos que codifican elementos del sistema inmune, como pueden ser genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), del receptor de células T (TCR), de inmunoglobulinas y citocinas (8).

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de LEG se realiza mediante la aplicación de criterios de clasificación propuestos por Cohen en 1982, que corresponden a los criterios de la Asociación Americana de Reumatología ARA. La clasificación propuesta se basa en 11 criterios (Cuadro 2). Para fines de identificación de pacientes en estudio, se dice que una persona tiene lupus eritematoso generalizado si presenta cuatro o más de cualquiera de los 11 criterios, en forma seriada o simultáneamente durante cualquier intervalo de observación.

CUADRO 2. CRITERIOS PARA LA CLASIFICACION DEL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.

CRITERIO	DEFINICION
1. Eritema malar.	Eritema fijo plano o elevado sobre las eminencias malares, con tendencia a respetar los pliegues nasogenianos.
2. Eritema discoide.	Placas eritematosas levantadas con descamación queratósica adherente y taponamiento folicular; en las lesiones más antiguas puede haber cicatrización atrófica.
3. Fotosensibilidad.	Erupción cutánea a consecuencia de una reacción poco común a la luz solar, de acuerdo con la historia del paciente o la observación de un médico.
4. Ulceras orales.	Ulceración oral o nasofaríngea, habitualmente indolora, observada por un médico.
5. Artritis.	Artritis no erosiva que afecte a dos o más articulaciones periféricas caracterizada por dolor (hipersensibilidad) hinchazón (inflamación) o derrame.
6. Serositis.	a) Pleuritis-historia convincente de dolor pleurítico o frote pleural escuchado por un médico, o evidencia de derrame pericárdico. o b) Pericarditis-documentada por ECG o un frote o evidencia de derrame pericárdico.
7. Alteración renal	a) Proteinuria persistente de más de 0.5 gramos al día o mayor de 3+ si no se hace cuantificación. o b) Cilindros celulares- pueden ser de eritrocitos, de hemoglobina granulosos, tubulares o mixtos.
8. Alteración neurológica.	a) Convulsiones - en ausencia de medicamentos ofensivos o alteraciones metabólicas conocidas. p.ejem. uremia, cetoacidosis o desequilibrio electrolítico. o b) Psicosis- en ausencia de medicamentos ofensivos o alteraciones metabólicas conocidas. p.ejem. uremia, cetoacidosis o desequilibrio electrolítico.
9. Alteración hematológica.	a) Anemia hemolítica- con reticulocitosis. o b) leucopenia-menor de 4000/mm ³ (total) en dos o más ocasiones.

- o
 - c) Linfopenia-menor de 1500/mm³ en dos o más ocasiones.
 - o
 - d) Trombocitopenia - menor a 100 000/ mm³ en ausencia de medicamentos ofensivos.
- 10.Alteración inmunológica
- a) Fenómeno LE positivo.
 - b) Anti-DNA: anticuerpo contra DNA nativo a títulos anormales.
 - c) Anti-Sm: presencia de anticuerpo contra el antígeno nuclear Sm.
 - d) Prueba serológica positiva falsa para sífilis, que haya sido positiva por lo menos durante 6 meses y confirmada (como falsa) por inmovilización del *Treponema pallidum*: o prueba fluorescente de absorción de anticuerpos del Treponema.
- 11.Anticuerpos antinucleares
- Un título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en algún momento y en ausencia de medicamentos que se pueden asociar con el síndrome de "lupus inducido por medicamentos".

Tan, Cohen .1982.

El LEG es el más representativo de los procesos de naturaleza autoinmune y, al mismo tiempo el que presenta una mayor complejidad desde el punto de vista clínico, puesto que tiene una gran variedad de patrones de expresión, puede afectar cualquier órgano y evoluciona a brotes, con períodos de actividad y otros de inactividad. Su carácter multisistémico y la gran variedad de síntomas en que puede manifestarse requiere la aplicación de un cuidadoso estudio diagnóstico.

Esta variabilidad en las manifestaciones clínicas pueden deberse a que esta entidad no es una enfermedad como tal sino un síndrome en el que caben etiologías, fisiopatologías y pronósticos diferentes, y un aspecto importante es la presencia de determinados anticuerpos que se asocian de forma característica a diferentes subgrupos clínicos del LEG y que facilitan su individualización. (12)

SUBGRUPOS CLINICOS DEL LEG.

SINDROME LUPICO INDUCIDO POR FARMACOS.

Numerosas sustancias pueden inducir en el hombre un síndrome clínico similar al LEG (Cuadro 3). Se ha comprobado que el síndrome lúpico inducido por fármacos presenta ciertas características diferentes del LEG clásico. Por ejemplo, este síndrome normalmente remite tras la supresión del fármaco, se asocia con DR4 y su perfil de autoanticuerpos es diferente (generalmente los pacientes no tienen anticuerpos anti-DNA nativo ni anti-ENA, pero la mayoría poseen anticuerpos anti-histonas).

El mecanismo por el que ciertos fármacos pueden inducir la enfermedad es poco conocido. Se ha mencionado una interacción o reactividad cruzada entre esos medicamentos y los antígenos nucleares. Posiblemente el factor patogénico más importante en el desarrollo de este síndrome sea el fenotipo acetilador en los enfermos. Esto es particularmente importante en el caso de la hidralazina, que desencadena cuadros lúpicos con mayor frecuencia en los individuos acetiladores lentos.

CUADRO 3. FARMACOS INVOLUCRADOS EN LA INDUCCION DE LEG.

FARMACOS COMPROBADOS	FARMACOS PROBABLES.
-Frecuentes	-Fenitoína
. Procainamida	- Carbamacepina
. Hidralazina	- Penicilamina
- Poco frecuentes	-Sulfasalazina
. Isoniazida	- Carbonato de litio
. Clorpromacina	- Bloqueadores beta
	- Captopril
	- Fenilbutazona

Font, Cervera (1993).

LUPUS NEONATAL.

Es un subgrupo clínico del LEG que se caracteriza por la aparición de diversas alteraciones transitorias, como lesiones cutáneas similares a las del lupus eritematoso cutáneo subagudo, hematológicas y visceromegalias. Por el contrario, no resultan afectados ni el riñón ni el sistema nervioso central. Su incidencia es escasa y es más frecuente en los recién nacidos de sexo femenino. Aunque habitualmente es autolimitado, en ocasiones puede afectar el tejido de conducción cardíaco y provocar diversos grados de bloqueo auriculoventricular el cual es de naturaleza irreversible⁽¹³⁾.

Las madres de estos niños generalmente padecen LEG u otra enfermedad autoinmune y son portadoras de anticuerpos anti-Ro (SSA) o anti-La (SSB) y, en alguna ocasión, sólo anti-RNP.

La mayoría de las pacientes con anticuerpos anti-Ro (SSA) tienen hijos sin ningún tipo de alteración, por lo que se cree que sería precisa la coexistencia de ciertos antígenos HLA de clase III. Se considera que esta afección es consecuencia del paso transplacentario de anticuerpos maternos dirigidos contra antígenos celulares del tipo Ro (SSA) y/o La (SSB). Se ha demostrado la riqueza de estos antígenos en los tejidos cutáneo y miocárdico del feto. Las lesiones cutáneas suelen desaparecer a los 6 - 8 meses de edad, coincidiendo con la eliminación completa de los anticuerpos maternos. Sin embargo, existe una mayor incidencia de LEG en estos pacientes en la edad adulta.

LEG DE INICIO EN LA INFANCIA.

Diversos estudios sugieren que la edad de inicio modifica la expresión de la enfermedad por lo que se refiere a la presentación clínica, afección orgánica y patrón serológico. Los datos observados recientemente en un amplio estudio multicéntrico europeo de 1000 pacientes con LEG indican que aproximadamente el 8% de los pacientes desarrollan la enfermedad antes de los 14 años.

En este grupo, la relación mujeres/ varones no es tan pronunciada como en los adultos (7:1 en la infancia frente a 10:1 en edad adulta) y es más frecuente como forma de presentación la aparición de afección orgánica grave, sobre todo nefropatía, enfermedad neurológica, trombocitopenia y anemia hemolítica. Un aspecto a destacar es el retraso en que se incurre muchas veces hasta el diagnóstico de estos pacientes, probablemente debido a la ausencia de manifestaciones iniciales más típicas del LEG, como eritema y artritis.(13).

LEG DE INICIO TARDIO.

El LEG de inicio tardío (después de los 50-60 años de edad) engloba aproximadamente al 10-15% de los pacientes con esta afección y puede constituir un subgrupo distinto dentro de la población lúpica general.

La edad avanzada modifica también la expresión del LEG en cuanto a su presentación clínica y la gravedad. Los estudios más recientes ponen de manifiesto que estos pacientes no tienen una preponderancia tan marcada del sexo femenino (relación mujeres/varones de 5:1) y presentan una menor incidencia de las manifestaciones típicas, como eritema , fotosensibilidad, artritis y nefropatía, pero mayor incidencia de síndrome seco y miositis, por lo que asemeja más al cuadro clínico del Síndrome de Sjögren primario o a la polimialgia reumática. Las anomalías serológicas son tan importantes como en los demás grupos, es menor la frecuencia de hipocomplementemia y la elevación de los anticuerpos anti-DNA.

Estas diferencias se intentan explicar por dos mecanismos. El primero es que el anciano y el joven pueden tener diferentes determinantes genéticos de la enfermedad, y por ello, responder de forma diferente. La segunda posibilidad es que la

expresión clínica y serológica más atenuada en el LEG de los pacientes mayores podría reflejar una senectud del sistema inmune. Debido a que en muchas ocasiones no se piensa en la posibilidad de LEG en un anciano, junto con la diferencia en la presentación clínica, el diagnóstico suele demorarse o ser inicialmente erróneo (13).

LEG EN EL VARON

A pesar del papel de las hormonas sexuales en la patogenia del LEG y de las anomalías encontradas en su metabolismo en el varón, esto se traduce solamente en pequeñas diferencias clínicas o biológicas en ambos sexos. De manera que parece existir en los varones una mayor incidencia de serositis (pleuritis y pericarditis) como manifestación inicial, mientras que durante la evolución de la enfermedad es algo menos frecuente el desarrollo de artritis y lesiones cutáneas. Por este motivo, aunque no parece justificado considerar al LEG del varón como un subtipo independiente, si es cierto que las hormonas sexuales pueden variar ligeramente la expresión de la enfermedad.

LEG SIN ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

El perfil inmunológico también influye en la expresión clínica del LEG. Aunque la presencia de anticuerpos antinucleares es una de las características más importantes de esta enfermedad, en aproximadamente un 5% de de los pacientes lúpicos no se detectan estos anticuerpos en ningún momento de su evolución. Los estudios más amplios de pacientes sin anticuerpos antinucleares presenta más frecuentemente lesiones cutáneas discoideas o de lupus eritematoso cutáneo subagudo y fenómenos trombóticos (13).

LEG CON ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDOS.

Este es un subgrupo intensamente estudiado durante los últimos años y que incluye aproximadamente el 10-20% de los pacientes con LEG. Se caracteriza por presentar trombosis venosas y arteriales múltiples, abortos y muertes fetales de repetición

y trombocitopenia. Ocasionalmente también pueden desarrollar otras manifestaciones, como lesiones valvulares cardiacas, *livedo-reticularis*, corea y anemia hemolítica. La coexistencia de anticuerpos antifosfolipidos y las manifestaciones clinicas descritas han recibido el nombre de síndrome de antifosfolipido (13,114,119).

2. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC).

El término de “histocompatibilidad” se refiere a la participación que los antígenos del complejo de histocompatibilidad (MHC) tienen en el rechazo de órganos y tejidos.

La palabra “principal” se refiere a la presencia de rechazo de órganos entre individuos de la misma especie, que difieren en el MHC, el cual es muy rápido, en contraste con el papel que tienen los antígenos secundarios de histocompatibilidad en los que las diferencias en ellos llevan a un rechazo de tipo crónico, el cual puede controlarse mediante inmunosupresión.

Se le llama “complejo” porque agrupa a genes de función muy diversa, como el HLA, los genes del complemento, la enzima glioxilasa I, el factor de necrosis tumoral (TNF) α y β , la proteína de choque térmico de 70 kD (HSP70), etc. (8,9).

Estos genes en el humano se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6. Son los genes más polimórficos del genoma humano, es decir que en la población general existen muchos alelos (formas diferentes) en cada locus genético. El término de HLA proviene de sus siglas en inglés human leucocyte antigens, estos antígenos fueron los primeros en ser estudiados.

Dos características resaltan la importancia del HLA como regulador de la respuesta inmunitaria:

La primera es que la respuesta inmunitaria debe ser precisa, y para ello depende de la interacción de varios tipos de células; esta interacción sólo es factible cuando los alelos del MHC en estas células son idénticos.

Esta “restricción” comprende las interacciones, tanto entre linfocitos T y B, entre las células T y los macrófagos, como entre las células T citotóxicas y células blanco, que hubiesen sido modificadas químicamente o por infecciones virales.

La segunda característica es que muchas enfermedades están relacionadas con antígenos HLA de manera exclusiva. Este hallazgo sugiere que los antígenos HLA por sí mismos (o genes vecinos al HLA) tienen un papel preponderante en la susceptibilidad a enfermedades (9).

Los productos del MHC se han agrupado en tres clases I, II y III - basadas en su estructura, origen genético y función-. Las moléculas de clase I comprenden HLA-A, -B, -C; las de clase II, HLA-DR, -DQ, -DP, las cuales son moléculas expresadas sobre la superficie celular, y las de clase III abarcan los componentes del complemento ligados al MHC (C2, C4, BF), la 21 hidroxilasa (21OH) - enzima que interviene en la biosíntesis del cortisol - y el factor de necrosis tumoral (TNF) o caquectina - proteína de acción citostática o citotóxica sobre las células tumorales, y moduladora del crecimiento y actividad de dichas células (Fig. 1) (10,24).

2.1 SUBREGIONES HLA A,B,C: MOLECULAS DE CLASE I.

Los alelos de los locus HLA-A y B fueron los primeros alelos del MHC que fueron descritos. Aunque ya en los años de la década de 1920 se habían observado anticuerpos antileucocitarios humanos, no fué hasta la década de 1950 en que se inició su estudio sistemático. Jean Dausset fué el primero (1952) en demostrar convincentemente la presencia de anticuerpos antileucocitarios (leucoaglutininas) en la sangre de pacientes leucopénicos y de sugerir que se trataba probablemente de aloanticuerpos, debido a que no reaccionaban frente a los leucocitos del productor de anticuerpos, pero sí lo hacían con un porcentaje de leucocitos procedentes de individuos no emparentados y pertenecientes al grupo sanguíneo "O". Poco después, Rose Payne describió que los sueros de pacientes que habían presentado reacciones transfusionales febriles no hemolíticas contenían frecuentemente leucoaglutininas que demostraban aloespecificidad. En 1958, Dausset describió el primer aloantígeno HLA-MAC (Actualmente, HLA-A2 +A28) y demostró que estaba determinado genéticamente. Inicialmente se creyó que todas las especificidades leucocitarias eran el producto de un solo locus. Se estableció un modelo de dos locus, cada uno con alelos múltiples por identificación de los fenómenos de recombinación que separaban las dos series alélicas. Estas últimas se denominaron primera o LA (actualmente HLA-A) y segunda o serie cuatro (ahora HLA-B). Estos nombres provenían del hecho de que la serie alélica LA 1, 2, 3 fué descrita por Payne en 1967, y 1a, 4a, 4b, por van Rood en 1969. En 1970 se propuso por primera vez un tercer locus; sin embargo no pudo confirmarse por recombinación hasta 1975. Después del Taller Internacional de Histocompatibilidad de 1975 (International Histocompatibility Workshop) recibió la denominación de HLA-C.(11)

2.2 ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE CLASE I.

Las moléculas de clase I, denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C en el hombre, son heterodímeros que constan de una cadena pesada (44 kD) glucoproteica transmembranar que consta de 337 aminoácidos (aa), asociada de modo no covalente con β_2 -microglobulina (12 kD). La cadena pesada de la molécula de clase I cruza la membrana celular y se orienta con su aminoácido terminal sobre el exterior de la célula. La β_2 -microglobulina está relacionada con la región extracelular de la cadena pesada y es necesaria para la expresión sobre la superficie celular. La zona extracelular de la cadena pesada de clase I (aa. 1 a 281) está dividida en tres dominios denominados $\alpha 1$ (aa. 1 a 90), $\alpha 2$ (aa. 91 a 180) y $\alpha 3$ (aa. 181 a 271). El dominio aminoterminal $\alpha 1$ contiene un lugar de glucosilación a nivel del residuo de asparagina en la posición 86. Los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ contienen cada uno asas disulfuro de 63 y 86 aa. respectivamente. El segmento transmembranar, de 24 aa. (282 a 306), es sobre todo hidrofóbico, mientras que el segmento carboxilo-terminal intracelular de la molécula consta principalmente de residuos hidrofílicos con un cúmulo de residuos básicos adyacente a la superficie citoplasmática de la membrana celular (aa. 307 a 337). Se ha observado que otras moléculas unidas a la membrana tienen agrupamientos similares de residuos básicos, que, según se cree, fijan la molécula a la membrana por interacciones de su carga con la carga negativa de dicha membrana. La porción citoplásmica de la molécula puede sufrir fosforilación a nivel de residuos de serina, que teóricamente podrían transmitir señales durante la respuesta inmune.

Al estudiar la cristalización de la molécula de clase I se abrieron nuevas perspectivas sobre la forma en que la molécula de HLA interacciona con el antígeno (Bjorkman 1987). La estructura de la molécula consta de dos pares de dominios estructuralmente similares: $\alpha 1$ tiene la misma configuración terciaria que $\alpha 2$, hecho que se

repite en $\alpha 3$ y $\beta 2$ - microglobulina. Los dominios de estas dos últimas se componen ambos de dos láminas con pliegues β antiparalelos: uno con cuatro filamentos y el otro con tres, conectados por un puente disulfuro; estos dominios interaccionan mutuamente a través de las láminas con plegamiento β , y su estructura se asemeja estrechamente a la descrita para la región constante de las inmunoglobulinas. Los lados y el fondo del surco están constituidos por cadenas laterales de los aminoácidos y comprenden las hélices y las láminas con plegamiento β , situados en el fondo del surco y en las regiones helicoidales, desempeñan un papel en la unión de los fragmentos génicos, mientras que otros residuos en dichas regiones helicoidales del surco interaccionan con las células T (Figura 2).

El polimorfismo de las moléculas de clase I se define por el uso de:

1. Anticuerpos específicos clase I (aloantisueros y anticuerpos monoclonales).
2. Linfocitos T citotóxicos que reconocen y destruyen in vitro la respuesta a moléculas de Clase I extrañas o alogénicas.
3. Concentración isoelectrica de moléculas aisladas de clase I.
4. Secuenciación de los genes de clase I.

Gran parte del polimorfismo de los genes de clase I surge de las diferencias en la secuencia de aminoácidos agrupados en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada (Parham, 1988). En el modelo tridimensional de la molécula de clase I, los residuos variables forman el surco de unión antigénica (Bjorkman, 1987). La variabilidad en la secuencia de aminoácidos en estas regiones, que se encuentran en los productos alélicos de clase I, puede afectar la unión de determinados fragmentos antigénicos al comienzo de la respuesta inmunitaria. El dominio $\alpha 3$ se mantiene muy conservado (22,24).

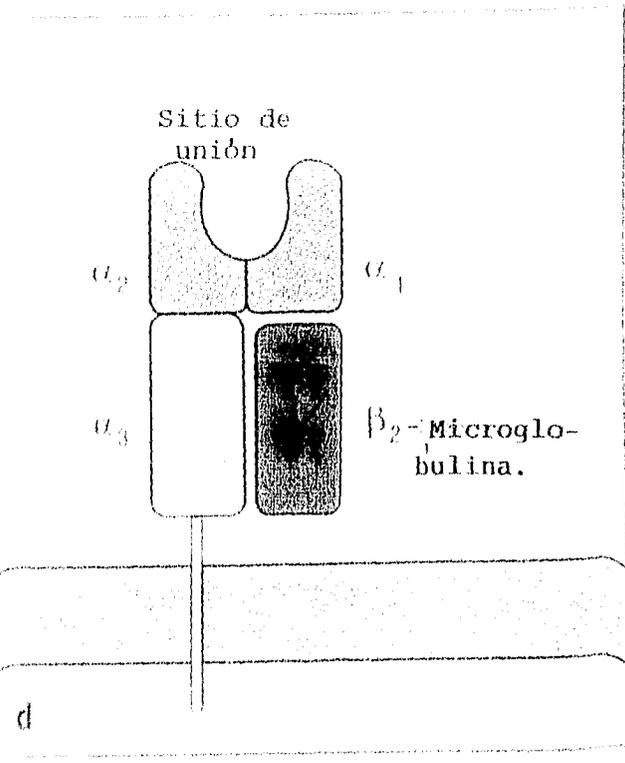
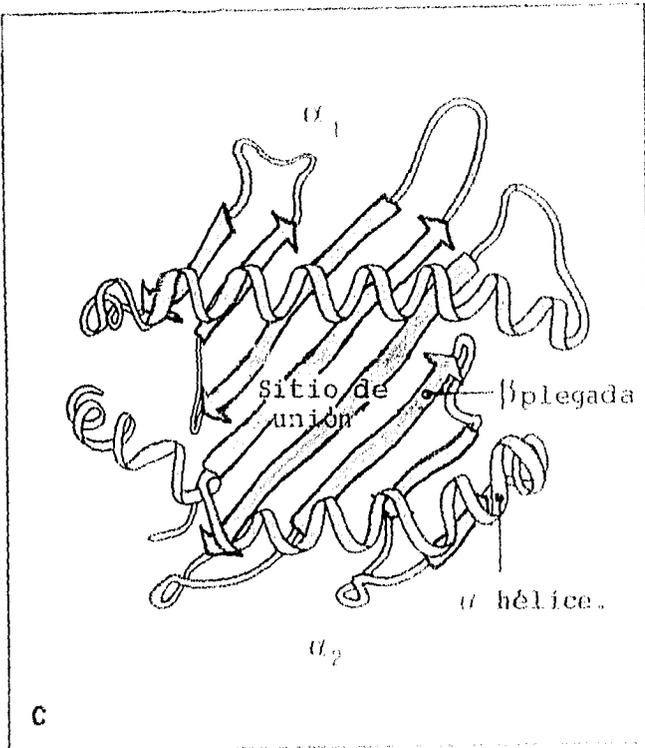
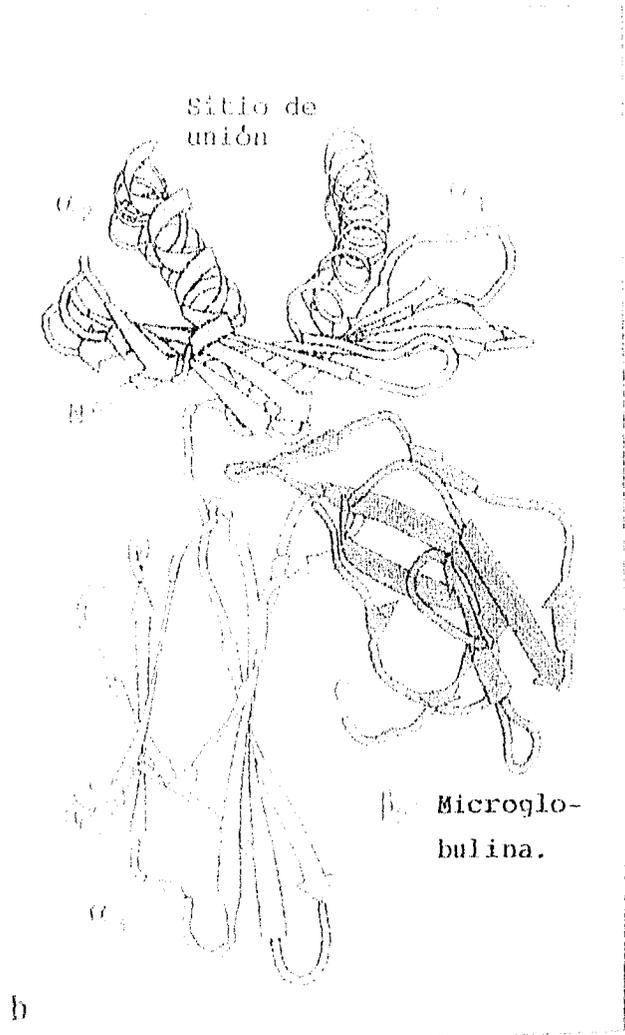
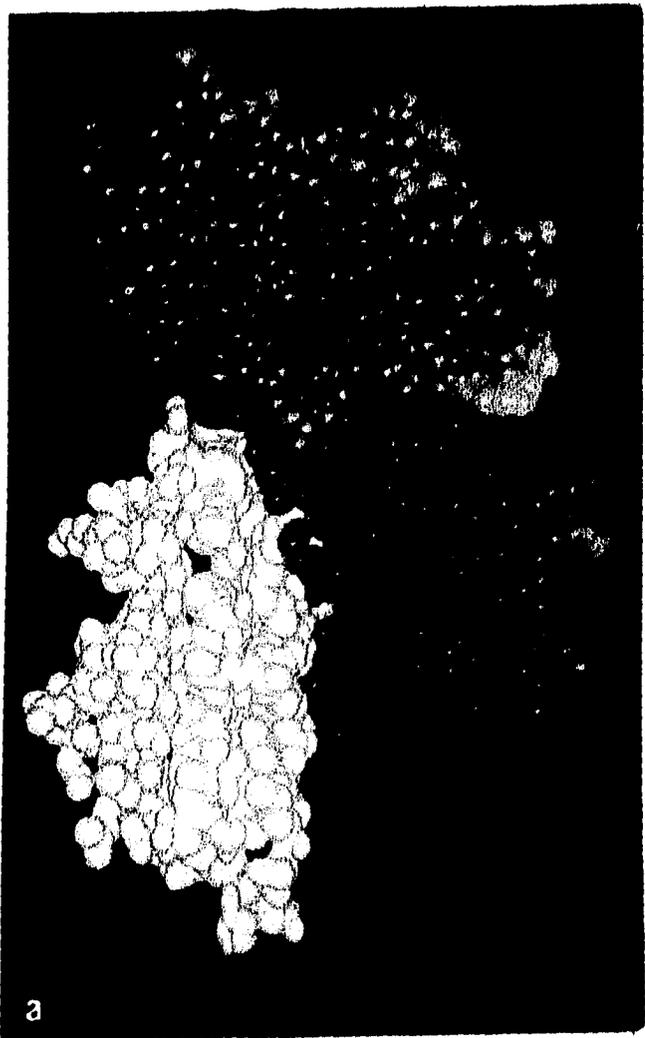


Figura 2. ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS CLASE I. (Thorpe)

Figura 2. El recuadro (a) muestra una representación gráfica molecular de la estructura de la molécula de clase I, HLA-A2, que fué desprendida de la superficie celular mediante la enzima papaina. El esquema (b) muestra la estructura secundaria, el esquema (d) la estructura esquemática. En el diagrama (c) se muestra la molécula en una vista desde arriba. Fotografía realizada por C. Thorpe (150).

2.3 GENES DE CLASE I.

Las cadenas pesadas son codificadas dentro del MHC en el brazo corto del cromosoma 6 y son muy polimórficas, mientras que la β_2 -microglobulina está codificada en el cromosoma 15 y no se ha observado que sea polimorfa en el hombre. Actualmente existen más de 27 alelos del locus A, más de 57 de locus B y 11 del locus C (8) y ha sido posible identificar hasta 20 locis adicionales de esta clase, tales como HLA-E, mediante clonación de genes. No está claro todavía si estos genes adicionales se expresan como productos de proteínas, por lo que se consideran pseudogenes.

El gen típico de clase I está codificado por los exones que corresponden a los segmentos de la molécula. El primer exón codifica la región 5' no traducida y un péptido delantero hidrofóbico. Los exones 2 a 4 codifican los tres dominios extracelulares; el 5, la región transmembrana; el 6 y 7, la región citoplásmica, y el 8, la región 3' no traducida, incluido el sitio de adición poli(A) (10). Las moléculas de clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas del organismo, así como las plaquetas (Figura 3) (11,8).

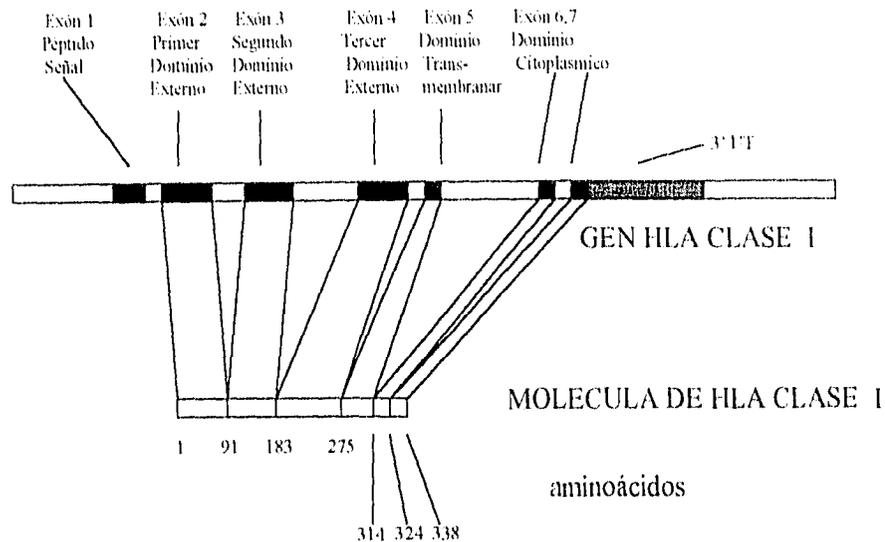


FIGURA 3. Representación esquemática de un gen de clase I.

2.4 SUBREGIONES HLA-DR, DQ, DP: MOLECULAS DE CLASE II.

Los antígenos de clase II humanos se reconocieron por vez primera por su capacidad de estimular las células T alogénicas en un cultivo linfocitario mixto (CML). Durante el Taller Internacional de Histocompatibilidad de 1975, se empleó el CML para definir las series alélicas HLA-D. Debido a que los cultivos linfocitarios mixtos requerían un plazo de 7 días para completar todo el proceso, se buscó un método de detección serológica rápida de HLA-D. En 1975 se averiguó que los aloantisueros contenían anticuerpos frente a las moléculas estrechamente relacionadas con las especificidades previamente identificadas como HLA-D mediante técnicas celulares. Después del Taller Internacional de Histocompatibilidad de 1975, estas especificidades serológicas se denominaron DR (D-related = en relación con D), por haberse observado que HLA-D y

HLA-DR estaban relacionados entre sí (sin ser idénticos). Por medio de otros reactivos serológicos, junto al empleo de técnicas genéticas e inmunoquímicas, se identificaron nuevas moléculas de clase II (MB1-3, MT1, DC-1 [ahora denominadas DQw1-3], MT2 [ahora, DRw52] y MT3 [actualmente DRw53]). Mediante técnicas celulares se identificó aún otra molécula de clase II hacia fines de la década de los 70. Estas moléculas (denominadas ahora DP) recibieron inicialmente el nombre de antígenos secundarios de las células B (SB), debido a que eran generalmente débiles, o no detectables, en un CML primario y requerían una fase secundaria de estimulación en el cultivo para ponerlos de manifiesto. Los productos alélicos DP no se encuentran todavía bien definidos serológicamente (Figura 1). (11, 19,24).

2.5 ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE CLASE II.

Las moléculas de clase II HLA-DR/DQ/DP son heterodímeros que se componen de dos glucoproteínas transmembranales asociadas de manera no covalente: una cadena α (33- 35 kD) y otra β (26 - 28 kD) (Kaufman, 1984; Brown, 1988). A diferencia de las moléculas de clase I, ambas cadenas del heterodímero se encuentran codificadas dentro del MHC. Las dos cadenas polipeptídicas cruzan la membrana celular y se orientan con sus terminales amino sobre el exterior de la célula. Las regiones extracelulares de los polipéptidos α y β están divididas en dos dominios, denominados $\alpha 1$ y $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, cada uno de los cuales consta aproximadamente de 90 aa. La cadena α contiene dos residuos de hidrato de carbono: un polímero de manosa y un glicano de tipo complejo, en los aminoácidos 78 y 118, respectivamente. Las cadenas β poseen un oligosacárido de tipo complejo en el aminoácido 19. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de las cadenas α y β , proximales a la membrana, se hallan muy conservados y son homólogos a las

regiones constantes de las inmunoglobulinas. Una región cuya longitud aproximada es de 12 aminoácidos, conecta el segundo dominio extracelular con la región hidrofóbica transmembrana (23 aminoácidos) y con un pequeño dominio intracitoplasmático (8 a 15 aa). Basándose en las similitudes existentes en la estructura primaria, se cree que las moléculas de clase II adoptan una disposición tridimensional semejante a las de clase I (Brown 1988) (Figura 4). Durante la biosíntesis, las moléculas de clase II se asocian intracelularmente con una tercera glucoproteína no polimórfica, conocida como cadena invariante, y con una molécula de proteoglicano azufrado. Todavía no se conoce bien la función de este intermediario biosintético (Figura 4) (19,23).

Al igual que las moléculas de clase I, las de clase II son altamente polimórficas. Este polimorfismo está definido por:

1. Anticuerpos específicos de clase II (aloantisueros y anticuerpos monoclonales);
2. Células T aloproliferativas que reconocen *in vitro* y proliferan en respuesta a moléculas extrañas de clase DR;
3. Concentración isoelectrónica, y electroforesis bidimensional en gel, de moléculas aisladas de clase II.
4. Hibridación empleando endonucleasas de restricción, mediante sondas específicas del locus (técnica que detecta el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción [RFLP]);
5. Hibridación de genes de clase II con sondas de oligonucleótidos aleloespecíficas (SSO).
6. Amplificación de genes de clase II con iniciadores de secuencia específica (SSP).
7. Secuenciación de los nucleótidos de los genes de clase II (11).

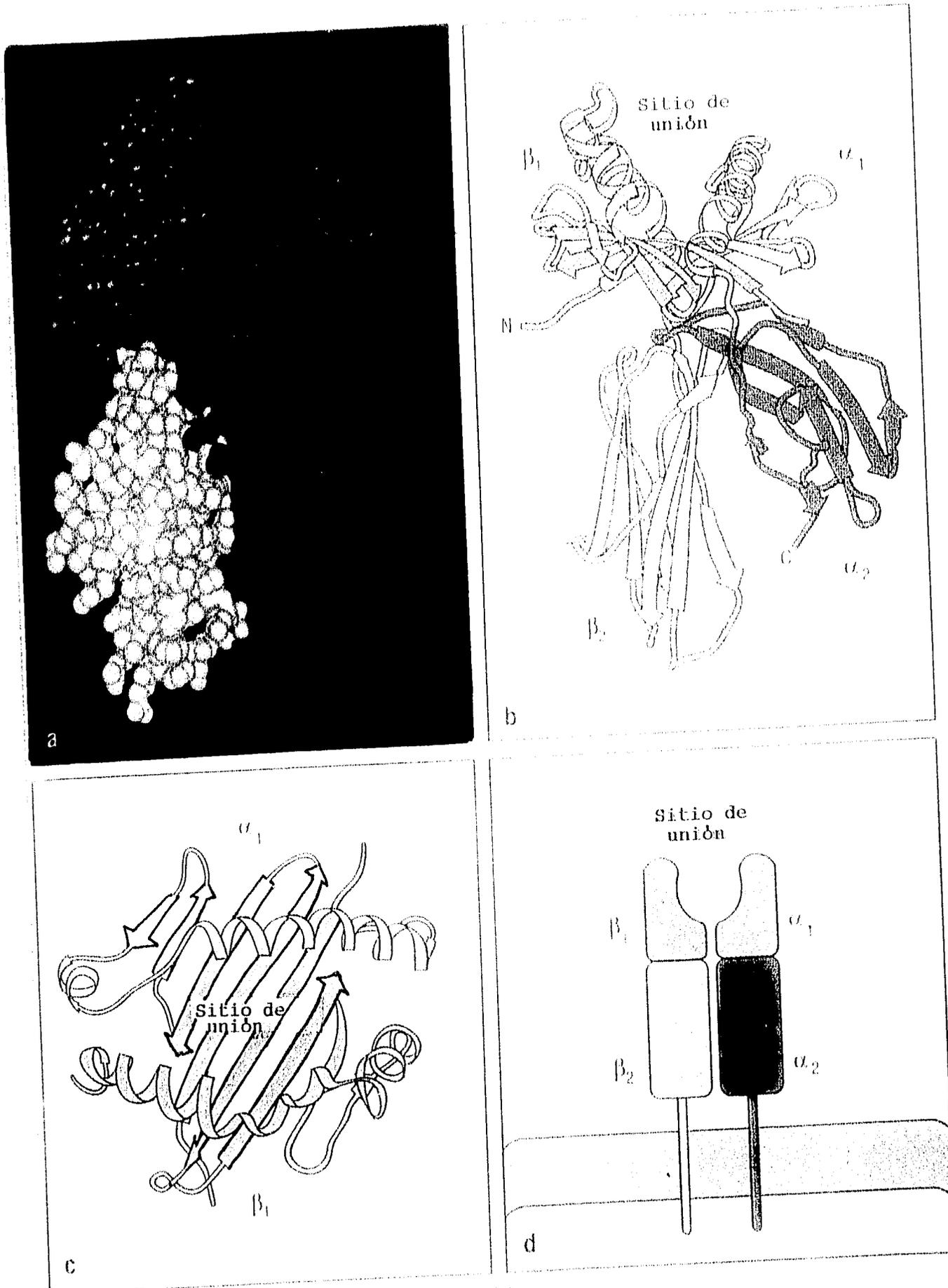


Fig. 4

Figura 4. La estructura de las moléculas de clase II es semejante a la de las moléculas de clase I. Las moléculas de clase II están compuestas de dos cadenas glicoproteicas transmembranales como se muestra esquemáticamente en el esquema (d). El esquema (a) muestra la representación computarizada de la molécula de HLA clase II (en este caso la proteína HLA-DR1), el esquema (b) muestra el diagrama equivalente de la estructura terciaria y secundaria de la molécula. Las dos cadenas se encuentran unidas por uniones no covalentes (diagrama c y d). Fotografía realizada por C. Thorpe (150).

2.6 GENES DE CLASE II.

Las cadenas α y β de las moléculas de clase II están codificadas en 1.100 kilobases del complejo MHC (Korman, 1985; Bell, 1985). La región comprende tres subregiones - DR, DQ y DP -, cada una de las cuales codifica al menos un gen expresado α y β . Otros genes de la región son pseudogenes, o bien no se han detectado sus productos de expresión. Las comparaciones de secuencias sugieren la existencia de una serie de duplicaciones de los genes durante la evolución de este complejo genético. La división original dió lugar probablemente a los genes primordiales α y β . Otras duplicaciones más recientes generaron las subregiones DR, DQ y DP, seguidas de otra duplicación para obtener los pares α/β dentro de las subregiones (Figura 5).

Un gen típico contiene 5 exones que codifican: 1) la región no traducida 5', la secuencia de señales y los primeros aminoácidos del polipéptido maduro; 2) el dominio $\alpha 1$; 3) el dominio $\alpha 2$; 4) el polipéptido de conexión, la región transmembrana, la cola citoplásmica y una porción de la región 3' no traducida incluida la señal de adición poli-A. Un gen típico de la cadena β es similar al de la cadena α , pero posee un exón extra para la cola citoplásmica (11,18).

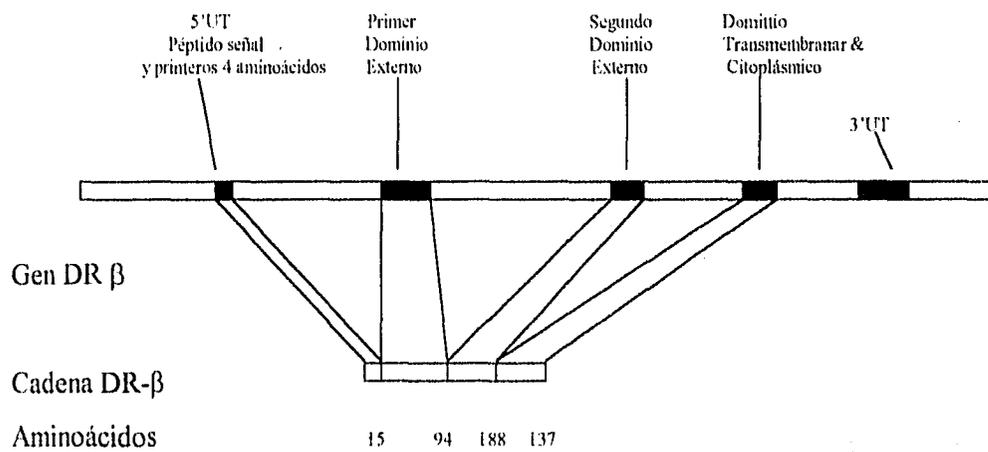
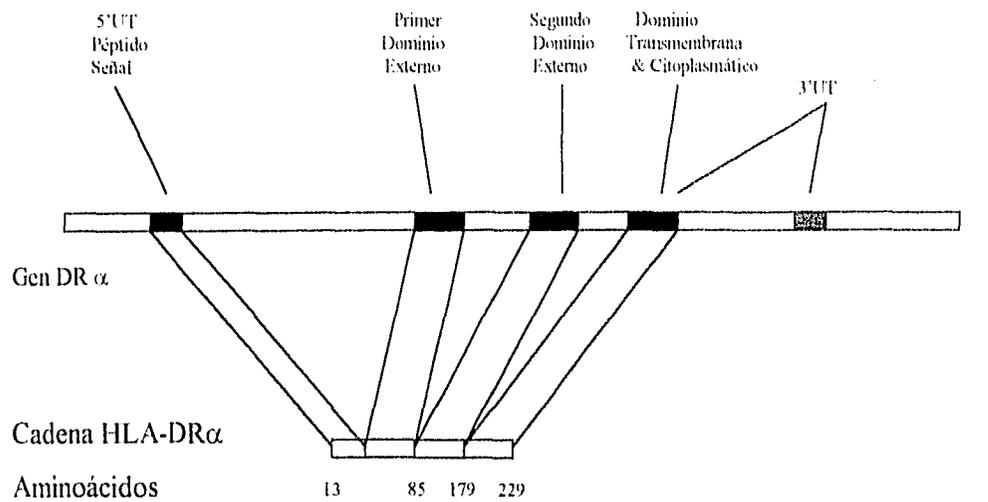


Figura 5. Representación esquemática de los genes DR α y DR β .

2.6.1 SUBREGION DR.

La subregión DR codifica una o dos moléculas DR, según el haplotipo. Algunos haplotipos, como DR1 y DR8, expresan un solo gen β DR, mientras que la mayoría de los haplotipos DR restantes expresan dos productos de los genes β -DR. La subregión contiene un solo gen expresado de la cadena α -DR, que es casi idéntico en los distintos haplotipos, los cuales difieren en una sola sustitución conservadora de un aminoácido, en el dominio citoplásmico.

El gen β -DR más centromérico, DRB1 codifica una cadena β notablemente polimorfa que, al asociarse con la cadena α , presenta especificaciones serológicas DR1-DRw18. Esta molécula suele ser la predominante de clase II sobre la superficie celular, ya que constituye aproximadamente el 65% de todas las moléculas de esta clase en dicha superficie. Existen múltiples diferencias secuenciales en los ácidos nucleicos y por lo tanto en los aminoácidos, de los productos alélicos DRB1; sin embargo, las diferencias se localizan principalmente en el dominio aminoterminal β y se agrupan en tres regiones variables que abarcan los aminoácidos 9 a 13, 26 a 37 y 67 a 74.

El gen β -DR localizado junto al gen α se expresa por parte de algunos haplotipos de clase II y es también polimorfo. Esta molécula representa aproximadamente el 15% de las moléculas de clase II de la superficie celular. En las células que expresan DR4, 7 y 9, esta segunda molécula DR se denomina DRw53 y es invariable en la secuencia de aminoácidos entre estos haplotipos (Cuadro 4). En las células que expresan DR3, 5 y 6 esta segunda molécula recibe el nombre de DRw52 expresados por diferentes haplotipos DR puede diferir ligeramente en la secuencia de aminoácidos de la cadena β . En la actualidad se han catalogado tres subtipos DRw52a, DRw52b y DRw52c. En las células que expresan un haplotipo DR2, esta segunda molécula DR exhibe también determinantes serológicos DR2. (10, 11, 18, 24).

CUADRO 4. ASOCIACIONES ENTRE LAS ESPECIFICIDADES SEROLOGICAS DR.

DRw52	DRw53
DRw17(3)	DR4
DRw18(3)	DR7
DRw11(5)	DR9
DRw12(5)	
DRw8	
DRw13(w6)	
DRw14(w6)	

2.6.2 SUBREGION DQ.

Existen dos genes α y β codificados en la subregión DQ. Una serie de genes α y β que portan las especificidades serológicas DQw1 - 9. Las moléculas DQ representan aproximadamente el 15 % de las moléculas de clase II sobre la superficie celular. Las diferencias entre los productos alélicos DQA1 están distribuidas por todo el primer dominio, con un foco de variabilidad en la región que codifica los aminoácidos 45 a 56. Las diferencias entre los productos alélicos DQB1, como DRB1, se encuentran agrupadas. Debido a que tanto DQA1 como DQB1 son polimorfos y pueden asociarse en posición *trans* o *cis*, los heterocigotos son potencialmente capaces de expresar cuatro moléculas DQ diferentes sobre la superficie celular. Las moléculas DQ que transportan la misma especificidad serológica DQ se encuentran asociadas a diversos haplotipos DR. Cuadro 5. Aunque estas moléculas llevan la misma especificidad serológica, pueden estar compuestas estructuralmente de diferentes cadenas α y β . Así por ejemplo, las moléculas codificadas por los haplotipos DRw15 (2) y DRw13 (w6) difieren en cuanto a la secuencia de aminoácidos. La segunda serie de genes α y β en la subregión DQ, DQA2 y DQB2

(denominada a veces DX), son muy similares en su estructura a los genes DQA1 y DQB1; sin embargo, no se conoce bien si estos genes expresan un producto funcional (10, 11, 18).

2.6.3 SUBREGION DP.

La subregión DP codifica también dos series de genes α y β . Una serie codifica el producto DP de las proteínas y la otra está compuesta por pseudogenes. En la actualidad, la Asociación Internacional para la tipificación de HLA sólo acepta 6 especificidades DP; sin embargo, el análisis secuencial del DNA ha permitido identificar al menos 14 alelos del sistema DP. El polimorfismo de DPA1 está limitado a tan sólo unas pocas formas alélicas. La cadena DPB1 es más polimorfa, y su variabilidad se encuentra agrupada en 5 regiones que codifican a los aminoácidos 8 a 11, 35 a 36, 55 a 57, 65 a 69 y 84 a 88 (Bugawan, 1988). Los alelos de DPB1 comparten desde ninguna secuencia (DPw1 frente a DPw2) a 4 de ellas (DPw3 frente a DPw6), en estas regiones variables. Debido a estas secuencias compartidas de aminoácidos, raramente se encuentran aloantisueros monoespecíficos que definan alelos DP. El nivel de expresión de DP sobre la superficie celular es muy bajo (5% del total de moléculas expresadas de clase II), y estas moléculas suelen detectarse mediante reactivos para la tipificación de linfocitos estimulados.

Las moléculas de Clase II se expresan sobre las células del sistema inmunitario, incluidos los macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos B y los linfocitos T activados (10, 11, 18, 24).

2.7 OTROS GENES DE CLASE II.

Se han descrito al menos otros dos genes de Clase II, DZ (o DN)- α y DO- β . No se sabe aún si estos genes se expresan como productos proteicos, aunque es probable que, si se codifican una cadena α y una β en estos dos locus, no constituyan una pareja α/β .

2.8 REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE CLASE II.

Los genes de clase II se expresan coordinadamente en las células linfoides, y pueden ser inducidas por la acción del interferón-g en la mayoría de tipos celulares. Las moléculas de clase II se modulan también por otras citocinas, como la interleucina 4 (IL-4), el factor de necrosis tumoral (TNF) y las prostaglandinas liberadas por las células T durante el reconocimiento del complejo MHC-antígeno. En todos los genes de clase II se encuentran dos o más secuencias de DNA altamente conservadas, en una región que provee las secuencias de codificación. En dichas secuencias se unen las proteínas que regulan la expresión de los genes de clase II. Se han descrito mutaciones, algunas de las cuales afectan las secuencias reguladoras, que simultáneamente eliminan la expresión de todos los genes de clase II, lo que da lugar a una forma de inmunodeficiencia grave combinada (10, 11, 18).

2.9 DESEQUILIBRIO DE UNION EN LA REGION DE CLASE II.

Ciertos alelos de DR y DQ se heredan conjuntamente con mayor frecuencia de la esperada. En el cuadro 5 se presenta una lista de las asociaciones comunes. La frecuencia de algunas de estas combinaciones (p.ejem. DRw11, DQw1; DRw9, DQw9 [w3]) difiere notablemente entre subpoblaciones de origen africano y euroasiático. Es común la unión de los loci DP y DR/DQ, lo que da lugar a asociaciones mucho más laxas entre los alelos DR/DQ y DP, excepto en el caso de una asociación entre DPw1 y DRw17 (11).

CUADRO 5. ASOCIACIONES DR / DQ COMUNES.

DQw1	DQw2	DQw3	DQw4.
DR1	DRw17 (3)	DR4	DRw18 (3)
DRw15 (2)	DR7	DRw11 (5)	DR4
DRw16 (2)	DR9	DRw12 (5)	DRw8
DRw13 (w6)		DR7	
DRw14 (w6)		DRw8	
DRw11 (5)		DRw13 (6)	
DRw8			

2.10 MOLECULAS DE CLASE III.

Aunque las moléculas de las clases I y II se distinguen por las similitudes estructurales y funcionales compartidas por los miembros de cada clase, las moléculas de clase III pueden definirse solamente como “ni I, ni II”, debido a que sus genes o productos no tienen características comunes (Alper, 1984). Las proteínas C2 y C4 de la vía clásica del complemento, y el factor B (BF) de la vía alterna están codificados en una región de 120 kb de DNA genómico, a unos 300 kb desde HLA-DR y a 650 kb desde HLA-B. C2 y el factor B muestran una considerable homología en la secuencia de aminoácidos y comparten una serie de características fisicoquímicas y funcionales, lo cual sugiere que ambos genes surgen por duplicación conjunta de un gen antecesor semejante al factor B. Los dos son proteasas de serina (pertenecientes a la familia SERPIN de las proteínas plasmáticas) e intervienen en la mediación del desdoblamiento de C3 durante la

activación de las respectivas vías. C4, está relacionado con C3 y C5; además, en virtud de que contiene un enlace tioéster interno muy reactivo, tiene relación con C3 y con el inhibidor de la proteasa α_2 - macroglobulina, aunque el gen para C3 está unido de forma laxa al MHC en el ratón, en el hombre se encuentra sobre un cromosoma completamente distinto del MHC (cromosoma 5). El C4 humano está codificado por dos locus altamente homólogos, denominados C4A y C4B. En posición 3' junto a cada locus C4 existe un locus para el citocromo P450-21 hidroxilasa, esteroide suprarrenal, conocida habitualmente como 21 hidroxilasa o 21OH. Se ha observado que los genes para el factor de necrosis tumoral (TNF) α y β , están localizados también en el MHC y se encuentran situados a 250 kb del HLA-B en dirección centromérica (11, 17).

3. NOMENCLATURA.

La terminología del HLA es designada por un comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS), basándose en los resultados de Simposios Internacionales en los que se intercambian los reactivos de tipificación entre los laboratorios participantes. La nomenclatura adoptada en 1975 se modificó ampliamente en 1987. Después del 10º Taller Internacional de Histocompatibilidad, se puso especial énfasis en la nomenclatura de la región HLA-D. Todos los genes de la región HLA-D están:

1. Prefijados por la letra D.
2. Seguidos por una letra que indica la subregión (definida por la posición y similitud de los genes dentro de una subregión, p. ejem. R, Q o P).
3. Seguidos de las letras A o B para indicar los genes de las cadenas α o β (o secuencias relacionadas en el caso de los pseudogenes).
4. Un número cuando existe más de un gen (o pseudogen) de dichas cadenas en una subregión.

A los nuevos genes de la región de clase I se les otorga designaciones de una sola letra en secuencia, con omisión de la D y con el prefijo HLA. Las asignaciones provisionales otorgadas por el simposio para las especificidades consisten en una "w" que precede al número. Después de cada Taller Internacional de Histocompatibilidad, se definen diversas especificidades antiguas, al irse refinando la definición, hasta que finalmente los reactivos logran definir un solo producto alélico. La definición más restringida de la especificidad se denomina especificidad subtípica; las especificidades más amplias y compartidas se califican de supertípicas. Por ejemplo, B44 y B45 son especificidades subtípicas de la especificidad supertípica B12.

Varios productos alélicos diferentes definidos por sus secuencias de nucleótidos presentan una especificidad única serológica o celular. Dado que la definición fundamental de un alelo está establecida por la secuencia de nucleótidos de un determinado gen, se desarrolló una nomenclatura para especificar estos alelos, definidos

molecularmente, pero no desde los puntos de vista serológicos ni celular. A cada alelo definido por una secuencia de nucleótidos se le otorga un número exclusivo, después de un asterisco que viene, a su vez, a continuación del nombre dado por el gen. Los primeros dos dígitos describen la especificidad serológica más estrechamente asociada, y los dos siguientes completan el número del alelo. Ello permite conservar lo más posible la relación entre los alelos y las especificidades serológicas. Así las designaciones formales de los alelos correspondientes a las variantes relacionadas con HLA-A2, definidas por el análisis secuencial de nucleótidos son: A*0201, A*0202, A*0203 y A*0204. Los criterios para aceptar una secuencia confirmada incluyen el poner a disposición general, por ejemplo, en bases de datos:

1. El gen clonado a partir del cual se derivó la secuencia.
2. La fuente de células a partir de donde se derivó el gen clonado.
3. La secuencia de nucleótidos del gen, o si no es posible, la secuencia de aminoácidos del producto alélico.

Obsérvese que no existe ningún 4 o 6 en las series alélicas A o B; ello se debe a que estos números se reservaron para el sistema leucocitario 4a, 4b, que se estaba investigando durante la época en que se desarrolló el sistema original de la nomenclatura, en 1967. Tan sólo hasta 1977 se realizaron experimentos en los que se demostró que las especificidades 4a (ahora Bw4) y 4b (ahora Bw6) residían en la misma molécula que las subtípicas del locus B, pero en un lugar diferente. Así pues, Bw4 y Bw6 son un sistema dialélico, y todas las moléculas del locus B llevan característicamente ya sea la especificidad w4 o la w6. (10).

Hasta 1995 se han reportado 41 alelos del locus A, 61 del locus B, 18 del locus C, en el locus D: 106 para DRB1, 4 para DRB3, 5 en DRB4, 5 para DRB5, 1 para DRA lo cual indica que este gen no es polimórfico, 26 para DQB1, 15 para DQA1, 59 de DPB1, 8 de DPA1, 4 para el locus DMA, 4 del locus DMB, así como 4 para TAP1, 3 para TAP2 y 2 para LMP2. (151)

4. GENETICA DEL HLA.

Aún cuando existen muchos alelos en los locus de HLA, todo el grupo de genes o HAPLOTIPOS se hereda como unidad (en un mismo cromosoma) en forma codominante. Por consenso general, los dos haplotipos del padre se designan como a y b y los dos genes de la madre como c y d. Los hijos por lo tanto podrán ser ac, ad, bc o bd. Cuando dos hijos heredan los mismos haplotipos (es decir, si son bc y bd) se dice que son haplo idénticos, y si no comparten ninguno (o sea si son ac y bd) se dice son haplodistintos (8).

Los cuatro genes del complemento en poblaciones de haplotipos, investigados en estudios de familias, muestran un significativo desequilibrio de enlace. No se ha evidenciado recombinaciones entre los genes del complemento. Por estos motivos, se consideran como unidades genéticas simples, y se designan por sus alelos BF, C2, C4A y C4B. Así, BF*S, C2*C, C4A*QO, C4B*I es un haplotipo que de modo abreviado se conoce como SCOI (10).

Se conoce, desde 1967, que ciertos antígenos HLA, al mismo tiempo que son característicos de una población (o sea, tienen una frecuencia elevada), prácticamente no existen en otra.

Los estudios de HLA en los Talleres Internacionales han permitido estudiar poblaciones tan disímiles como los pigmeos africanos y los esquimales, los sherpas de Nepal, los indios americanos, los aborígenes australianos, y en forma exhaustiva los diferentes grupos orientales.

Algunos antígenos como el A2 y B35 se encuentran en, prácticamente todas las poblaciones; otros, como el A1, A3, B8 y B27, caracterizan a caucásicos y negros y rara vez se presentan en orientales.

Ciertos antígenos son distintivos de la población negra como el B45, y el de los individuos chinos es el B46.

En la población caucásica, ciertos haplotipos son extremadamente frecuentes, como el A1-B8-DR3 o el A3-B7-DR2.

La ocurrencia de antígenos con una frecuencia mayor a lo esperado dadas sus frecuencias individuales, se les conoce como “desequilibrio de enlace”. Las causas de este fenómeno son muy diversas, y entre ellas deben considerarse: expansión de la población, migración, mezcla reciente de poblaciones heterogéneas (falta de tiempo para el desequilibrio), etc. pero también debe examinarse la posibilidad de que la selección natural sea la causa del desequilibrio de algunos de ellos (8).

4.1. HAPLOTIPOS EXTENDIDOS.

A los haplotipos extendidos que muestran desequilibrio de enlace entre alelos de los loci del sistema HLA y los complotipos, se les llama “haplotipos extendidos” para distinguirlos de los haplotipos que no incluyen todos los genes.

En la población caucásica, los haplotipos extendidos constituyen el 30% del total de los haplotipos.

Su importancia clínica se debe a que varias enfermedades se acompañan de estos haplotipos extendidos y, además porque cada grupo étnico posee haplotipos extendidos que le son exclusivos y por lo tanto característicos.

La cuadro 6 muestra haplotipos extendidos (haplotipos en desequilibrio de enlace) en varios grupos étnicos.

CUADRO 6. HAPLOTIPOS EXTENDIDOS.

Caucásicos	Japoneses	Mexicanos
B8, DR3, SC01	B53, DR2, SC20	B35, DR4, SC31
B7, DR2, SC31	B54, DR4, SC35	B16, DR2, SC31
B44, DR7, FC31	B44, DR13, FC31	B60, DR4, SC31
B44, DR4, SC30	B7, DR1, SC31	B35, DR8, SC42
B57, DR7, SC61	B62, DR4, SC31	B14, DR1, SC21
B38, DR4, SC21	B46, DR8, SC42	B16, DR8, SC32
B62, DR4, SC33	B61, DR9, SC31	B61, DR4, SC31

Granados J. (9)

Desde el punto de vista funcional, recientemente se demostró que dos individuos no emparentados, pero que comparten un haplotipo extendido, tienen un grado de proliferación igual que el generado por los hermanos HLA idénticos (9).

5. ASOCIACION DEL MHC CON ENFERMEDADES.

El MHC es el sistema más complejo y polimórfico conocido en el hombre. Además de su reconocida importancia en la aceptación y rechazo de aloinjertos se ha demostrado que el sistema HLA juega un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades, particularmente aquellas con una base inmunológica o autoinmune. Algunas enfermedades ocurren más frecuentemente en individuos que llevan genes particulares del MHC. Lilly en 1964 fué el primero en descubrir que el MHC en el ratón (H-2) contiene los genes que confieren resistencia a el virus de la leucemia murina de Gross (Rgv-1). Más tarde McDevit, Sela y Benacerraf (1969) demostraron que la respuesta inmune estaba genéticamente controlada en el ratón y en el cobayo.

En el humano, el primer reporte de una asociación débil entre HLA y enfermedad de Hodgkin fué efectuado por Amiel en 1967. Aunque a partir de esta fecha se empezó a estudiar la asociación de algunas enfermedades con los antígenos HLA, fueron los estudios de Brewerton y Schosstein en 1973, que revelaron una fuerte asociación entre la espondilitis anquilosante y el antígeno clase I HLA-B27 presente en 95% de los pacientes y en sólo el 5% de los individuos sanos, lo que inició una avalancha de estudios de asociación entre el sistema HLA y la susceptibilidad a varios cientos de enfermedades (de Vries 1995).

Posteriormente, junto con la mejor caracterización del locus D diferentes estudios permitieron descubrir que la asociación entre HLA y algunas enfermedades era más fuerte con los antígenos de clase II (DR). En la actualidad el estudio de otros antígenos de clase II como DQ y DP así como otros genes del sistema HLA (TAP y LMP) han hecho necesario que se investigue si estos genes podrían ser responsables de la asociación, esto es que se encuentren más fuertemente asociados con las enfermedades que los antígenos previamente estudiados (Batchelor y col. 1987, Svejgaard y col. 1983).

La asociación del sistema HLA con diferentes enfermedades se han clasificado en dos formas. La primera está basada en los mecanismos de patogénesis, que incluyen a las enfermedades:

- a) de etiología no autoinmune (deficiencia de 21-hidroxilasa),
- b) autoinmunes (artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino dependiente, espondilitis anquilosante, etc.) y
- c) de etiología desconocida (narcolepsia).

La segunda clasificación se realizó en base a la asociación con los diferentes antígenos HLA, así las enfermedades asociadas a los antígenos de clase I quedan incluidas principalmente las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27, en las enfermedades

asociadas a los antígenos de clase II que incluyen enfermedades de origen autoinmune, relacionadas especialmente con el locus HLA-DR y en las enfermedades asociadas con antígenos de clase III que incluyen deficiencias de C2, C4 y 21 OH (Lechler 1994, Vargas - Alarcón y Granados 1993).

Existen fundamentalmente dos métodos de estudios que son empleados para investigar la relación entre HLA y enfermedad:

1. **Estudios en población abierta.** La mayoría de los estudios de asociación entre HLA y enfermedad son estudios de población abierta en los cuales las frecuencias antigénicas HLA en un grupo de pacientes no relacionados se compara con las frecuencias obtenidas en un grupo testigo. Ambos grupos deben de consistir en individuos no consanguíneos, pertenecientes al mismo grupo étnico y que incluyan individuos del mismo rango de edad, nivel socioeconómico y sexo.
2. **Estudios familiares.** En éste método se investiga si el gen de susceptibilidad a la enfermedad se hereda dentro de la familia ligado a un haplotipo HLA. Los estudios familiares aunque son más informativos y permiten relacionar una enfermedad tanto con genes del sistema HLA como con genes no HLA en desequilibrio de enlace con genes HLA, generalmente son más difíciles de realizar y sólo se realizan una vez que se ha encontrado una asociación por estudios de población abierta.

Resulta esencial en estos estudios tener claros los criterios de inclusión de pacientes y controles. La prevalencia de la enfermedad usualmente determina el número de pacientes incluidos en el estudio. Para enfermedades comunes las muestras pueden obtenerse rápidamente, en enfermedades más raras resulta necesario incluir pacientes de diferentes regiones. Como regla general al menos 50 pacientes deben ser incluidos, sin embargo, el número puede ser menor para enfermedades raras, particularmente si

presentan una fuerte asociación con un antígeno HLA y sobre todo si existe la posibilidad de efectuar estudios familiares que suelen ser más informativos.

Deben de tenerse en cuenta la heterogeneidad clínica (p. ejem. en LEG) y los aspectos epidemiológicos de la enfermedad en estudio (p. ejem. prevalencia de la enfermedad en diversos grupos étnicos y de diversas áreas geográficas)(8).

Las enfermedades asociadas con el sistema HLA generalmente presentan las siguientes características: son de etiología desconocida, tienen tendencia a la cronicidad y presenta alteración de procesos inmunológicos. además de que pueden presentar un agrupamiento familiar y aparecer más de un caso entre consanguíneos.

A la fecha se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar los mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad:

1. Similitud molecular entre antígenos HLA y antígenos de agentes infecciosos:

Ebringer en 1976 encontró que *Klebsiella sp.* estaba presente en pacientes con espondilitis anquilosante, posteriormente Seager en Australia demostró que anticuerpos contra algunas cepas de *Klebsiella sp.* reaccionaron con los linfocitos sólo en pacientes que tuvieran HLA-B27 y espondilitis anquilosante, demostrando claramente la existencia de determinantes antigénicos comunes entre el HLA-B27 y algunas cepas de *Klebsiella sp.* En base a estos resultados es posible explicar la susceptibilidad como debida a reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno del sistema HLA.

2. Modificación de la estructura de los antígenos HLA: Una infección o agente químico puede afectar a un individuo en su capacidad de producir una respuesta inmune. Por otra parte, dichos agentes pueden producir alteraciones en las moléculas

HLA capaces de ser detectadas por el sistema inmunológico y conducir a una respuesta autoinmune contra las células alteradas capaz de generar una enfermedad.

3. **Antígenos de HLA como receptores:** Los antígenos HLA pueden actuar como receptores a algunos agentes infecciosos o a sus productos antigénicos, y de esta forma se establece el desarrollo de la enfermedad. Heleniud ha mostrado que antígenos HLA-A y HLA-B sirven como receptores para el virus *Semliki forest*.
4. **Deficiencias en la respuesta inmune:** Los antígenos del sistema HLA participan en la regulación de la respuesta inmune, por lo tanto, cualquier trastorno que se manifieste como aumento o defecto en la respuesta inmune podría involucrar a los antígenos HLA y explicar así su asociación con predisposición a la enfermedad.
5. **Deficiencias de los antígenos HLA clase III.** Las deficiencias de los antígenos de clase III pueden estar en desequilibrio génico con otro antígeno HLA, por ejemplo: la deficiencia de C2 en LEG se ha encontrado asociada con DR3 y en la hiperplasia adrenal congénita existe una asociación entre el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa y el antígeno HLA-B47 (Thorsby 1995). (11,12,24).

6. ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS.

En los reportes de las frecuencias de alelos de MHC es necesario conocer si existe un aumento significativo de determinado alelo en individuos que presentan alguna enfermedad con respecto a la frecuencia encontrada en la población normal. Para este tipo de análisis se emplea el método propuesto por Woolf en 1955 y que fué posteriormente modificado por Haldane.

El análisis de datos con respecto a un antígeno particular (p.ejem. A1, A2, etc.) inicia con una tabla de contingencia 2 X 2 de la manera siguiente:

	<u>Número de individuos.</u>	
	Positivos para el antígeno	Negativos para el antígeno
Pacientes	a	b
Controles	c	d

La incidencia de enfermedad en un individuo positivo para el antígeno es a/c X una constante y para individuos negativos para el antígeno es b/d X una constante. La incidencia relativa, X fué definida por Woolf como:

$$X = \frac{a/c}{b/d} = \frac{ad}{bc} \quad [1]$$

En la literatura sobre HLA y su asociación con enfermedades se ha empleado el término de riesgo relativo para describir X.

El riesgo relativo indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos positivos para un antígeno en comparación con individuos negativos para el mismo antígeno.

Cuando X es <1 el antígeno es menor en los pacientes. Sin embargo el valor calculado de X puede no ser significativamente diferente de la unidad, entonces es necesario emplear:

$$y = \log_e X \quad [2]$$

La varianza de la muestra (V), en función de y es:

$$V = \frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d} \quad [3]$$

w , es el peso de y

$$w = \frac{1}{v} \quad [4]$$

$$X^2_{1\text{gl}} = wy^2 \quad [5]$$

La significancia estadística de la diferencia de X con respecto a la unidad es probada mediante una X^2 con 1 grado de libertad.

Si esta X^2 es 3.84, se concluye que el riesgo relativo es significativamente diferente de 1 y el antígeno está asociado con la enfermedad. En otras palabras esta diferencia es significativa entre la frecuencia de los grupos de pacientes y controles.

En el estudio de los antígenos HLA, con frecuencia algunos de los valores para a , b , c y d son casi cero. Los números pequeños en la fórmula anterior puede

introducir un sesgo en la estimación del riesgo relativo. Esto también ocurre cuando todos los pacientes son positivos para un antígeno ($b = 0$), o bien que no existan individuos del grupo control positivos para el antígeno ($c = 0$), el riesgo relativo no puede definirse mediante la fórmula de Woolf. En estas situaciones debe emplear la modificación de Haldane. Con esta modificación el riesgo relativo es:

$$X = \frac{(2a+1)(2d+1)}{(2c+1)(2b+1)} \quad [6]$$

El valor de y es:

$$y = \log e^{\frac{(2a+1)(2d+1)}{(2c+1)(2b+1)}} \quad [7]$$

y la varianza de la muestra en función de y es:

$$V = \frac{1}{a+1} + \frac{1}{b+1} + \frac{1}{c+1} + \frac{1}{d+1} \quad [8]$$

y al igual que en la fórmula de Woolf.

$$w = \frac{1}{V} \quad [9]$$

$$X^2_{1gl} = wy^2 \quad [10]$$

NIVEL DE SIGNIFICANCIA Y VALORES DE p .

Si el valor calculado de X^2 en la ecuación [10] es >3.84 entonces se concluye que el riesgo relativo es significativamente diferente de 1 (el antígeno está asociado con la enfermedad). El nivel de significancia es reportado en términos de

probabilidad (valor de p). Para datos biológicos, la regla generalmente aceptada es que, para que una diferencia sea aceptada como significativa, el valor de p debe ser ≤ 0.05 . El valor de p correspondiente a la X^2 de 3.84 es 0.05. Un valor de p = 0.001 es considerado altamente significativo.

COMPARACIONES MULTIPLES Y VALOR CORREGIDO DE p:

En estudios de antígenos de HLA y asociación con enfermedad, cada individuo es estudiado para varios antígenos y el mismo dato es empleado para comparar la frecuencia de todos los tipos antigénicos. En esta comparación múltiple, es probable que la frecuencia de un antígeno resulte significativa (incrementada o disminuida, con un valor de $p= 0.05$), pero esta diferencia puede deberse a la casualidad, es decir que se tipifican pacientes y controles para los 92 antígenos conocidos del HLA, puede esperarse encontrar diferencias significativas debidas a la casualidad. Este error puede ser corregido empleando el método de Bonferoni. En este procedimiento los valores de p con “corregidos” mediante la multiplicación con en el número de antígenos comparados. Si el resultado corregido del valor de p para un antígeno es aún ≤ 0.05 entonces el antígeno es considerado como significativamente asociado con la enfermedad.

Otra forma de corregir la desviación debida a comparaciones múltiples es realizar un segundo estudio sobre la misma enfermedad y buscar una asociación con los antígenos que han resultado incrementados o disminuídos significativamente en el primer estudio. Si los valores de p en este segundo estudio son nuevamente ≤ 0.05 o menor, entonces estos antígenos pueden considerarse como significativamente asociados con la enfermedad. En este segundo estudio se plantea una hipótesis específica (“¿Está el antígeno “A” asociado con la enfermedad?”) y entonces la corrección por comparaciones múltiples no es necesaria⁽¹⁶⁾.

7. ASOCIACIONES DEL MHC CON EL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.

La complejidad de LEG es paralela a su heterogeneidad respecto a manifestaciones clínicas y serológicas. El reconocimiento de estas diferencias ha conducido a estudios de la interrelación entre varios subgrupos clínicos, de autoanticuerpos y genéticos de la enfermedad. Esta estrategia ha revelado subgrupos más homogéneos de la enfermedad y los recientes avances en biología molecular permiten ahora examinar estas asociaciones genéticas - autoanticuerpos - clínicas a un nivel más detallado. El concepto que actualmente se maneja es que el lupus representa un desorden complejo con características múltiples distintivas cuyas reacciones autoinmunes frecuentemente se sobreponen, cada una de estas está mediada por perfiles genéticos específicos (29, 30, 33, 35, 36, 38).

7.1 DEFICIENCIAS HEREDADAS DEL COMPLEMENTO.

Los defectos heredados de los genes del complemento, especialmente aquellos resultantes en deficiencias completas de componentes iniciales de la vía clásica, confieren predisposición genética a enfermedades semejantes al Lupus (Cuadro 7). Las deficiencias homocigóticas de C1, C4 y C2 se han asociado con ésta enfermedad. Hay también reportes de casos que sugieren una asociación con otras deficiencias del complemento, incluyendo el inhibidor de C1, C3 y los componentes finales de la vía C5-C9. Existe controversia respecto a si el polimorfismo hereditario resultante en el gen de CRI produce una pobre expresión del receptor CRI (C3b/C4b) y predisponer a LEG (48).

Las deficiencias del complemento son defectos genéticos raros que podrían explicar solamente una minoría de los casos de LEG.

Las características clínicas del lupus en estas instancias son frecuentemente atípicas (Cuadro 8).

CUADRO 7.

COMPONENTE DEL COMPLEMENTO	LOCALIZACION DEL CROMOSOMA	RIESGO RELATIVO
C1Q	1p	alto
C1r-C1s	12p	alto
C4 total	6q (MHC)	alto
C4A nulo homocigoto	6q (MHC)	17
C4A nulo heterocigoto	6q (MHC)	7
C2 nulo homocigoto	6q (MHC)	moderado
C2 nulo heterocigoto	6q (MHC)	bajo

Arnett, Reveille (1992).

CUADRO 8. CARACTERISTICAS QUE SUGIEREN LEG SECUNDARIO A DEFICIENCIAS DE FACTORES INICIALES DE LA CASCADA DEL COMPLEMENTO.

Inicio a edad temprana,
Hombres más frecuentemente afectados,
Rash extenso discoide o SCLE,
Fotosensibilidad,
Ausencia de inmunofluorescencia en la unión dermoepidérmica,
Nefritis moderada ó ausente,
Títulos de ANA bajos o negativos,
Anticuerpos anti- DNA negativos,
Anticuerpos anti- Ro (SS-A) positivos,
Infecciones recurrentes,
Complemento hemolítico (CH50) extremadamente bajo ó ausente.,

Arnett, Reveille (1992).

Estos subgrupos proporcionan importantes claves en la patogénesis de las formas más frecuentes de lupus. Los componentes iniciales del complemento normalmente tienen un papel importante en la estabilización y depuración de complejos inmunes. Los complejos inmunes que contienen IgG o IgM activan la vía clásica del complemento iniciando con la unión de C1q y posteriormente C1r, C1s, C4, C2 y C3b. Este complejo agregado se une al receptor CR1 (C3b/C4b) que se encuentra en los eritrocitos y entonces pueden ser eliminados por los macrófagos del sistema retículo endotelial antes de que puedan depositarse en órganos altamente vascularizados, tales como los riñones o los pulmones. Además una función de C3b es que puede rearrreglar estos grandes agregados en complejos de menor tamaño, los cuales son más solubles. La deficiencia de cualquiera de estos componentes puede conducir a una compleja deficiencia en el procesamiento, depuración y finalmente depósito en sitios inapropiados de complejos inmunes (8).

7.1.1 DEFICIENCIA DE C1q.

El componente del complemento C1 es una macromolécula que consiste de tres subcomponentes unidos en forma no covalente (C1q, C1r, C1s), los cuales son producto de 5 genes; 3 para C1q (cadenas A, B y C) y uno para cada componente C1r, C1s. Los tres polipéptidos que constituyen la molécula de C1q son codificados por tres genes altamente homólogos que se encuentran sobre el brazo largo del cromosoma 1 [(1p34.1 - 36.3 en el orden A-C-B (5'→ 3')). Cada gen de 2.6 kb está compuesto de 2 exones.

El gen que codifica para el componente C8 se encuentra cercano a este locus, sobre este mismo cromosoma pero distante del locus de C1q se encuentran los genes que codifican para reguladores de la activación del complemento (RCA), los cuales

incluyen CR1 (CD35), CR2 (CD21), proteína ligadora de C4 (C4bp), factor acelerador del decaimiento (DAF), proteína cofactor de membrana (MCP)(CD46) y Factor H.

Existe un número limitado de casos descritos de individuos con deficiencia de C1q. Esta deficiencia parece tener un patrón de herencia autosómico recesivo. Los individuos con esta deficiencia tienen niveles marcadamente reducidos de CH50 y actividad funcional de C1, mientras que los niveles séricos de otros componentes del complemento, incluyendo C1r y C1s, son generalmente normales. Se han descrito al menos dos formas de esta deficiencia: 1) no se detecta C1q ni por análisis funcionales ni por métodos inmunoquímicos; 2) la forma inmunoquímica está presente, pero no se detecta actividad de C1q (C1q disfuncional). Se han estudiado dos familias con C1q disfuncional las cuales mostraron una deficiencia antigénica comparada con C1q normal, esta molécula defectuosa no se une a inmunoglobulinas ni interacciona con las subunidades C1r, C1s. en ambas familias esta molécula presenta una masa relativa diferente entre sí y diferente C1q normal, por lo que esta deficiencia es genéticamente heterogénea.

En el estudio de una familia con esta deficiencia se describió una mutación puntual en la cadena β en el residuo 150 resultando en un codón de terminación, con la pérdida de un sitio de restricción detectable por Taq I. En una segunda familia se describió una mutación que genera también un codón de terminación en la cadena α y produce un patrón diferente en el análisis de RFLP con Pvu II. En tres estudios familiares de deficiencia de C1q los patrones de restricción fueron normales y no se logró detectar el defecto, por lo que al parecer existe una gran heterogeneidad en las modificaciones moleculares que conducen a la deficiencia de C1q. No está claro si existen otros genes polimórficos que no han sido detectados aún.

A la fecha han sido reportados 13 individuos con deficiencia total de C1q y 11 de ellos presentaron una enfermedad semejante al lupus. La mayoría presentaron síntomas a una edad temprana, tales como: rash en piel, fotosensibilidad, 8 manifestaron glomerulonefritis membranoproliferativa con deposición de inmunoglobulinas y complemento. Los títulos de ANA y anti-DNA sólo se manifestaron en la minoría y sólo 1 individuo de 4 estudiados presentó anti-Ro (SS-A). (8, 39, 40).

7.1.2 DEFICIENCIAS DE C1s y C1r.

Los genes para C1s y C1r se han mapeado juntos sobre el cromosoma 12 (12p13), están separados entre sí por 9.5 kb, estos dos genes son altamente homólogos y probablemente han sido generados por duplicación génica. La expresión de estos genes es regulada por separado.

Se ha descrito una deficiencia heredada de C1r en donde la concentración de esta molécula se encuentra marcadamente reducida (< 1% de lo normal). Esta deficiencia es heredada en forma autosómica recesiva. Los pacientes con deficiencia de C1r/ C1s tienen disminuido CH50 y la actividad de C1 en suero, mientras que los niveles de C1q son normales. Las bases de la asociación entre los niveles moderadamente reducidos de C1s y la ausencia de C1r es desconocida, pero quizá esté relacionada con la proximidad de los dos genes o a un efecto del metabolismo de C1r sobre la expresión de C1r.

Se ha reportado polimorfismo cuando se estudiaron estos genes con enzimas de restricción. Las deficiencias parecen presentarse juntas, pero no se han descrito bases moleculares en este defecto.

Al menos se ha reportado 11 casos con esta deficiencia de los cuales la mayoría presenta enfermedad similar al lupus. Estos pacientes presentan frecuentemente fotosensibilidad y glomerulonefritis, mientras que ANA y anti-DNA son poco frecuentes y sólo en un paciente se demostró anti-Sm.⁽⁸⁾

7.1.3 DEFICIENCIA DE C2.

C2 es una proenzima que consta de una cadena sencilla de un PM de 102,000. Está compuesta de 734 aa. y es codificada por especies de mRNA de 2.9 kb. El gen de C2 tiene una longitud de 18 kb. Este gen se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 entre los genes que codifican para factor B y la proteína de choque térmico 70 (HSP70).

Se ha detectado polimorfismo de C2 por isoelectroenfoque, la mayor parte de los individuos son homocigotos para la variante C1*C (frecuencia génica = 0.97). Sin embargo técnicas que estudian DNA genómico tales como el Southern blot con cDNA y sondas específicas han revelado que existe una gran variabilidad en el locus C2. Se han publicado mapas de RFLP mediante los cuales se subdividen los haplotipos que llevan el alelo C2*C.⁽⁴³⁾

Existen 9 variantes reportadas a la fecha, incluyendo 4 variantes ácidas raras y 3 variantes básicas raras.

La deficiencia de C2 es la más frecuente en el hombre. La incidencia de la deficiencia en forma homocigota ha sido estimada en 0.0025% - 0.01 % de la población normal. En los casos estudiados de LEG la deficiencia heterocigota de C2 se encontró en

el 6% de los pacientes, mientras que en forma homocigota se encontró que cerca de la tercera parte de los individuos que presentan un síndrome semejante al LEG. Los pacientes deficientes de C2 pueden presentar además dermatomiositis, vasculitis y púrpura de Henoch-Schölein.^(8, 41, 42)

Los pacientes con lupus asociados con una deficiencia homocigota de C2 presentan típicamente un síndrome predominantemente cutáneo como el lupus eritematoso cutáneo subagudo (SCLE) o lupus ANA negativo. La nefritis es infrecuente, se han detectado en el 70% de los pacientes auto-anticuerpos anti-Ro (SS-A), pero no anti-La (SS-B). Los ANA son frecuentemente negativos o presentan leve positividad, con un patrón moteado y los anticuerpos anti-DNA son negativos en la mayor parte de los pacientes. El alelo nulo de C2 frecuentemente se encuentra asociado con el haplotipo extendido HLA-B18, DR2, Bf*S, C2*QO, C4A*4, C4B*2 sugiriendo que la mayor parte de los pacientes con deficiencia de C2 poseen la misma mutación. En un estudio realizado por Cole (1985) no se encontró niveles detectables de mRNA de C2 en mononucleares de sangre periférica de individuos con esta deficiencia, lo que sugiere que el defecto es pre-transcripcional. Recientemente Johnson (1992) ⁽⁴⁴⁾ reportó dos casos de deficiencia de C2, en uno estudió una familia que presentaba el haplotipo antes mencionado, en los individuos deficientes demostró la presencia de mRNA de C2 tanto en fibroblastos como en mononucleares, la otra familia presentó haplotipos diferentes al mencionado y encontró mRNA de C2 pero no niveles detectables de la proteína, lo que sugiere que existe un bloqueo selectivo en la secreción de C2.

Con base en estas diferencias se han definido dos tipos de deficiencias, la tipo I en la cual la deficiencia es debida a un defecto en la traducción de mRNA, aunque es posible que exista un incremento selectivo intracelular del catabolismo de C2 (lo cual no se ha descartado formalmente). Este tipo de deficiencia segrega con el haplotipo mencionado en aproximadamente el 94%.

El defecto bioquímico tipo II es el resultado de un bloqueo selectivo en la secreción de C2. La diferencia entre estos dos tipos de deficiencia puede ser evidenciado por la medición de C2 intracelular (midiendo en lisados celulares) donde pueden demostrarse niveles aumentados de esta proteína, o bien determinar los niveles séricos mediante una técnica de alta sensibilidad como RIA, en donde pueden detectarse niveles de 0.5 a 4% de lo normal en la deficiencia de tipo II, mientras que no existen niveles detectables para la deficiencia de tipo I.

En las dos familias estudiadas con estos dos tipos de deficiencia de C2 , no se encontraron diferencias en las manifestaciones clínicas (8,44).

Sullivan (1993) (43) reportó una mutación en pacientes que mostraban deficiencia de C2 tipo I. Esta mutación consiste en una delección de 28 pb la cual provoca la terminación prematura de la transcripción. Este alelo mutado no es capaz de producir una proteína enzimáticamente activa, esta mutación fué encontrada con mayor frecuencia en caucásicos con LEG , y es responsable del 90% de los casos de alelos nulos de C2 en Norteamericanos. Esta mutación no ha sido encontrada en pacientes africo-americanos con LEG y se ha encontrado asociada al alelo DRB*1501 (42, 43, 44)

La presencia de un alelo nulo C2 está presente en el 1-2 % de individuos de raza blanca. Este estado se encuentra en desequilibrio de unión con el haplotipo HLA-A10 (A25), B18, DR2 y el complotipo Bf*S, C2*Q0, C4A*4, C4B*2.(8)

7.1.4 DEFICIENCIA DE C3 Y C5.

El gen de C3 tiene una longitud de 24 kb y codifica para un mRNA de aproximadamente 5.2 kb. Este gen se ha mapeado en el cromosoma 19. Existen varios

El defecto bioquímico tipo II es el resultado de un bloqueo selectivo en la secreción de C2. La diferencia entre estos dos tipos de deficiencia puede ser evidenciado por la medición de C2 intracelular (midiendo en lisados celulares) donde pueden demostrarse niveles aumentados de esta proteína, o bien determinar los niveles séricos mediante una técnica de alta sensibilidad como RIA, en donde pueden detectarse niveles de 0.5 a 4% de lo normal en la deficiencia de tipo II, mientras que no existen niveles detectables para la deficiencia de tipo I.

En las dos familias estudiadas con estos dos tipos de deficiencia de C2 , no se encontraron diferencias en las manifestaciones clínicas (8,44).

Sullivan (1993) (43) reportó una mutación en pacientes que mostraban deficiencia de C2 tipo I. Esta mutación consiste en una delección de 28 pb la cual provoca la terminación prematura de la transcripción. Este alelo mutado no es capaz de producir una proteína enzimáticamente activa, esta mutación fué encontrada con mayor frecuencia en caucásicos con LEG , y es responsable del 90% de los casos de alelos nulos de C2 en Norteamericanos. Esta mutación no ha sido encontrada en pacientes africo-americanos con LEG y se ha encontrado asociada al alelo DRB*1501.(42, 43, 44)

La presencia de un alelo nulo C2 está presente en el 1-2 % de individuos de raza blanca. Este estado se encuentra en desequilibrio de unión con el haplotipo HLA-A10 (A25), B18, DR2 y el complotipo Bf*S, C2*Q0, C4A*4, C4B*2.(8)

7.1.4 DEFICIENCIA DE C3 Y C5.

El gen de C3 tiene una longitud de 24 kb y codifica para un mRNA de aproximadamente 5.2 kb. Este gen se ha mapeado en el cromosoma 19. Existen varios

isotipos definidos por su movilidad electroforética, las más comunes son C3F y C3S. Los individuos deficientes de C3 sufren de infecciones bacterianas recurrentes. Sin embargo los monocitos de individuos deficientes de C3 pueden sintetizar una proteína, por lo que al parecer la deficiencia se debe a una delección grande o rearrreglo genético. Es sintetizado como una cadena sencilla compuesta de 1643 aa y contiene un enlace tioéster interno similar al que presenta C4. La molécula sufre un procesamiento por ruptura de un grupo de residuos básicos, formando 2 cadenas, forma en la que se encuentra en el plasma (cadena α - 645 aa; cadena β - 992 a).

C5 es sintetizado como una cadena polipeptídica sencilla de un PM de 180,000 D, esta molécula es procesada de manera similar que C3 formando una molécula constituida de dos cadenas, forma como se encuentra en el plasma. El estudio molecular de C5 muestra una semejanza importante con C3 y C4.^(8,142)

7.1.5 DEFICIENCIA DE C4.

El componente del complemento C4 es el único que es codificado por dos genes, denominados C4A y C4B, estos genes tienen una alta homología (99%). Todos los genes de C4A humanos analizados poseen una longitud de 22kb a diferencia de los genes de C4B presentan diferencia en su tamaño, ya que una tercera parte de estos genes son 6.5 kb más cortos debido a la pérdida de un intrón en el extremo 5' del gen C4B. Estos genes se presentan con mayor frecuencia en negros americanos. El gen C4 contiene 41 exones.

C4 es sintetizado como una cadena polipeptídica de 200,000 D., antes de su secreción es procesado por rompimiento en dos regiones que afectan a 4 aa básicos, formando una estructura con 3 cadenas (α , β , γ). La cadena de pro-C4 contiene 1725 aa. y el orden de las cadenas ha sido establecido como β - α - γ . Esta molécula contiene un enlace tioéster interno formado entre un residuo de cisteína en la posición 991 y una

glutamina en la posición 994 en la secuencia Cys-Gly-Glu-Gln. Una vez en circulación la molécula sufre la ruptura de un péptido de 21 residuos del extremo C-terminal de la cadena α .

Las tres proteínas codificadas por genes del MHC, C4 es la más polimórfica. Al menos existen descritos 13 alotipos de C4A y 22 de C4B, los cuales han sido definidos por diferencia de cargas (Mauff 1983). C4a y C4b difieren también serológicamente. En general C4A es normalmente Rodgers (Rg) positivo, Chido (Ch) negativo, mientras que C4B es normalmente Rg negativo, Ch positivo. Por medio de tipificaciones serológicas por pruebas de inhibición de hemaglutinación se han definido dos determinantes antigénicos para Rg y seis para Ch, los cuales están localizados en el fragmento C4d de la cadena α .

C4A y C4B difieren significativamente en su actividad funcional. Esto es debido a una importante diferencia en la reactividad del enlace tioéster de los dos isotipos. A pH neutro C4A reacciona predominantemente con grupos amino, mientras que C4B reacciona comparablemente con grupos amino e hidroxilo. Esta diferencia intrínseca en la afinidad del enlace covalente resulta en un aumento (3 a 4 veces) la unión de C4B a glóbulos rojos de carnero sensibilizados, particularmente ricos en grupos hidroxilo, lo que explica su bien conocida alta reactividad en el ensayo hemolítico clásico. Las diferencias entre éstas dos moléculas se explican por cambios en aminoácidos específicos (8,142).

La comparación de una secuencia completa de ambos alelos ha revelado una variación de nucleótidos < 1%. Se encontraron diferencias sólo en 15 nucleótidos, 12 de los cuales se encuentran en la región del fragmento C4d de la cadena α sobre el lado C-terminal del enlace tioéster. Esta diferencia de 12 nucleótidos causa un cambio de 9 aa, otras diferencias adicionales han sido encontradas en el fragmento C4d y una cerca del extremo C-terminal de la cadena β . En la secuencia de la proteína completa pro-C4 se han

definido 18 posiciones susceptibles de cambios de aa, dos en la cadena β , una en la cadena γ y los restantes 15 en el fragmento C4d.

La secuenciación de cDNA de cuatro C4A y cinco C4B ha ayudado al establecimiento de patrones de polimorfismo del fragmento C4d y ha proporcionado las bases para la observación de las diferencias serológicas y funcionales entre los isotipos de C4. De importancia a este respecto ha resultado la clonación y el análisis de secuencias de dos alelos inusuales C4A*1 y C4B*5, los cuales poseen sus propiedades específicas y tienen esencialmente invertido el patrón de antigenicidad Rg y Ch. Los aa de varias posiciones polimórficas en el fragmento C4d de algunos alotipos se muestran en la cuadro 9.

CUADRO 9. RESUMEN DE LAS DIFERENCIAS EN AMINOACIDOS EN EL FRAGMENTO C4d EN LOS DIFERENTES ALOTIPOS DE C4.

ALOTIPOS DE C4

Posición	A3a	A3b	A4	A1	B3	B5	B2	B1a	B1b	Secuencia Proteica
1054	Asp	Asp	Asp	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Gly	
1090	Ser	Ile								
1091	Gln	Ala								
1101*	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
1102*	Cys	Cys	Cys	Cys	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
1105*	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	
1106*	Asp	Asp	Asp	Asp	His	His	His	His	His	
1157	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	
1182	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	
1191	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	
1267	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	ND	ND	
1281	Arg	Arg	Ag	Arg	Arg	Arg	Arg	ND	ND	Val
1286	Thr	ND	ND	Gly						
1277	Val	ND	ND	Gly						

* residuos isotópicos

Cambell, 1988 ⁽¹⁴⁸⁾

ND= no determinado.

La comparación de estas secuencias reveló que los aminoácidos de las posiciones 1101-1106 son específicas para C4A ó C4B. C4 tiene la secuencia *Pro-Cys-Pro-Val-Leu-Asp* mientras que C4B tiene la secuencia *Leu-Ser-Pro-Val-Ile-His*. La diferencia entre estos 4 aminoácidos en un total de 1725 es la responsable de las diferencias funcionales y de reactividad entre C4A y C4B. Las restantes diferencias de aminoácidos en el fragmento C4d está relacionada con las diferencias antigénicas de los alotipos. Las secuencias de DNA que codifican para los tipos Rg y Ch ya han sido secuenciados y es posible deducir la localización de 2 Rg y 6 Ch determinantes antigénicos. Cuatro determinantes de Ch (Ch 1, 4, 5 y 6) son probablemente epitopes continuos (secuenciales), mientras que los determinantes Ch 2 y 3 son epitopes discontinuos (conformationales). La localización de los epitopes Rg1 y Rg2 fueron deducidas de observaciones de su comportamiento serológico, la molécula de C4 Rg1 parece ser excluyente de Ch1, mientras que Rg2 puede excluir alternativamente a Ch6 ó Ch3. (Figura 7). (8,142)

Aminoácido

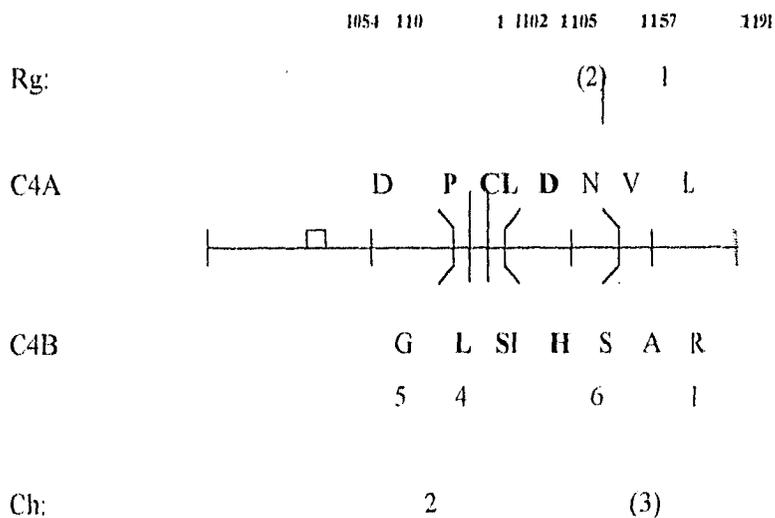


Figura 7. Diagrama esquemático del fragmento C4d (aminoácidos 938-1317) de C4, se ilustra la posición de los residuos isotípicos que definen C4A y C4B (negritas). También se muestran los residuos polimórficos en el fragmento C4d que involucran los determinantes antigénicos de Ch y Rg. La localización del enlace tioéster se muestra como un cuadrado abierto. Cambel, 1988. (142)

Se han definido dos alotipos diferentes de C4A los cuales difieren en la posición 1267 por un cambio de Ala/Ser, y los alotipos definidos para C4B*1 difieren en la posición 1157 por una sustitución Asn/Ser.

Los genes de C4A y C4B se encuentran separados por 20 kb y probablemente fueron generados por una duplicación génica que involucró aproximadamente 28 kb de DNA. Estos locus se denominan como locus I para C4A y II para C4B. Estos genes son transcritos en mRNA con una variación aproximada de 5.5 kb, debido a la presencia de genes de 22 kb y 16 kb. De los genes de C4A analizados hasta la fecha todos tienen aproximadamente 22 kb, mientras que C4B pueden ser de longitud variable de 16 y 22 kb, debido a la presencia o ausencia de un intrón de 6 a 7 kb situado cerca de 1.5 kb del extremo 5'. Las especies grandes de C4 incluyen genes C4B*1 de la mayor parte de los haplotipos C4A*3 C4B*1 y también los alelos C4B*Q0. Ambas especies son frecuentes, la naturaleza de este intrón es aún desconocida pero se ha sugerido que pudiera ser un miembro de largas secuencias interpuestas (LINE ó LI). Estas secuencias se repiten cerca de 10^4 veces en el genoma haploide y tiene homología con la transcriptasa reversa de retrovirus (retrosposones). Sin embargo el 70% de los genes de C4 presentes en haplotipos pueden llevar dos diferencias en los locus C4. Esto fué originalmente demostrado por la duplicación de los niveles de la proteína C4B como C4B*1, C4B*2 y fué encontrado con el haplotipo B14; DR2; Bf*S; C2*C; C4A*2; B*1,2 (Raum 1984, Rittner 1984, Uring-Lambert 1984). La frecuencia estimada del gen resultó de 1 - 2 %. Esta condición se demostró por análisis con RFLP (Schneider 1986) y por clonación de cósmidos encontrándose 1 gen C4A y 2 C4B en un mismo haplotipo (Carroll 1984).

La deficiencia completa de C4 en humanos es un desorden raro, sólo se han reportado 16 casos en la literatura mundial. Existen 4 eventos genéticos que pueden resultar en la deficiencia de C4 (C4 null; C4*Q0), incluyendo deleciones, duplicaciones, conversión génica, o la presencia de un alelo intacto no funcional. La recombinación de genes deletados explica cerca de la mitad de este estado. Un ejemplo es el del haplotipo

HLA extendido que lleve una delección de 28 kb en que se pierde información tanto del gen C4A como de 21-OHA. La duplicación del alotipo C4A*3,2,B*QO se encuentra frecuentemente asociada con HLA-B35, DR1; mientras que la conversión génica (C4B a C4A) ocurre en el haplotipo HLA-B44, DR6, C4B*QO (64). Los alelos funcionales presuntamente resultan de una mutación puntual, corrimiento de lectura o errores en la traducción. (8, 50, 54, 56, 60, 71)

En los siguientes cuadros se muestran las frecuencias de los locus humanos de C4A y C4B en diferentes razas (Cuadros 10 y 11).

CUADRO 10. FRECUENCIA DE LOS ALELOS DE C4A EN VARIOS GRUPOS ÉTNICOS.

Frecuencia en:

Alelo	Caucásicos	Mongoles	Negros
C4A*1	0.3	0	3.7
C4A*2	6.4	1.9	6.2
C4A*3	70.2	67.0	71.2
C4A*4	6.1	7.7	1.2
C4A*6	3.8	1.3	1.2
C4A*12	0	12.2	0
C4A*13	0.5	0	0
C4A*51	0.2	0	4.9
C4A*QO	12.5	9.9	11.6
Tamaño de muestra	557	154	83

KLEIN, 1986 (144).

CUADRO 11. FRECUENCIA DE LOS ALELOS C4B EN VARIOS GRUPOS ÉTNICOS.

Frecuencia en:

Alelo	Caucásicos	Mongoles	Negros
C4B*1	71.4	65.4	68.5
C4B*2	9.1	22.1	8.4
C4B*3	3.2	0.7	3.6
C4B*4	0.7	0	0
C4B*5	0.7	0	0
C4B*6	0.4	0	0
C4B*7	0.2	0	0
C4B*11	0.2	0	0
C4B*12	0.2	0	0
C4B*51	0.2	0	0
C4B*QO	113.7	11.2	19.5
Tamaño de muestra.	557	154	83

Klein, 1988 (144)

El nivel sérico total de C4 es el resultado de la expresión de ambos genes C4A y C4B. Individuos que poseen un gen nulo presentan una ligera disminución de los niveles de C4 séricos, pero que pueden ser considerados dentro del rango normal. Aquellas personas que poseen 2 genes nulos poseen niveles séricos de C4 significativamente más bajos que aquellos individuos que poseen los 4 alelos funcionales. Es raro encontrar individuos con deficiencia completa de C4 en donde no hay producción ni de C4A ni de C4B. (8, 142, 144)

Otros factores pueden alterar los niveles séricos de C4, por ejemplo Moulds reportó niveles más altos en pacientes con LEG y en individuos controles negros

cuando se les compara con la contraparte de individuos blancos. Truedsson especula que pueden existir otros elementos reguladores especificados por el haplotipo extendido. Finalmente la producción de C4A y C4B puede ser afectada por citocinas tales como el interferón α , así como también la actividad de la enfermedad.^(8, 142)

7.1.5.1 C4 Y SU RELACIÓN CON ENFERMEDADES REUMATICAS.

Los componentes tempranos de la cascada del complemento (tales como C4) tienen un papel crucial en el procesamiento de complejos inmunes (CI). C4A y C4B difieren en su reactividad hacia CI, su deficiencia o variación puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

Las variantes electroforéticas de C4 (alotípicas) se han asociado con varias enfermedades de naturaleza autoinmune. Algunas de estas asociaciones muestran desequilibrio de unión. Este desequilibrio de unión se define como la combinación de alelos de MHC que se presentan con una frecuencia mayor que la esperada en base a sus frecuencias individuales.

La asociación de alelos nulos de C4 y su papel en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes, especialmente LEG se ha ido incrementando. La deficiencia total de C4 (homocigotos para C4A*QO y C4B*QO) es muy rara, sin embargo de 18 casos reportados, 14 presentaron LEG. Sólo pocos casos han sido estudiados a nivel molecular y en uno de estos estudios se encontró una delección de los genes de C4B, pero intactos los genes de C4A. Goldstein ⁽⁶⁹⁾ no encontró evidencia de delección en los genes C4 en los casos que estudió por la técnica de RFLP. Solo se ha reportado un caso (Welch) ⁽⁶⁷⁾ donde un individuo con esta deficiencia expresa solo el fenotipo paterno para las proteínas codificadas por el MHC (HLA y GLO), con un cariotipo 46XX sin delección detectable. Los análisis moleculares de la familia empleando enzimas de restricción o la técnica de RFLP y marcadores para el cromosoma 6 mostraron patrones distintivos para los genes paternos y maternos, sin embargo el propóitus sólo mostró las bandas

características de un gen paterno, el análisis de RFLP empleando marcadores cromosómicos para otros cromosomas mostró contribución tanto materna como paterna. Estos datos son consistentes con una isodisomía 6 uniparental (herencia de dos cromosomas idénticos "o provenientes de un solo progenitor) que presenta un patrón de herencia recesiva.(67)

Este concepto de isodisomía uniparental fué introducido en 1980 por Engel, quien hipotetiza que la unión ocasional de gametos disómicos con un gameto nulisómico puede resultar en un producto euploide con un gran número de alelos homocigotos. En teoría, esto puede resultar en la expresión de características recesivas en un individuo que presente alelos provenientes de un sólo progenitor. Este evento ha sido demostrado en pacientes que presentan Síndrome de Down en mosaico. Esto demuestra que en ausencia completa de estudios familiares, marcadores homocigotos para HLA no implica necesariamente consanguineidad.(67)

La deficiencia heterocigota de C4 tanto para C4A y C4B ocurre en 10% a 15% en pacientes blancos con LEG y confiere un riesgo relativo de 10 a 20. La deficiencia parcial ocurre en 50 a 80 % de los pacientes con LEG y confiere un riesgo relativo pequeño pero significativo (2 a 4). Los alelos nulos de C4A se han asociado a LEG en diversas poblaciones étnicas, las cuales incluyen blancos americanos, ingleses y australianos, negros americanos, chinos, japoneses, México-americanos y mexicanos (8,45,46,47,48,50,51,52,53,58,59,63 66,68,142). Los alelos nulos de C4B se han descrito como factor de riesgo para LEG en chinos, aborígenes australianos y negros americanos, sin embargo parece haber predominio en la asociación de C4A y LEG.(8, 142)

En el estudio realizado por Briggs (1991) (61) se encontró un mecanismo adicional por medio del cual los genes nulos de C4 pueden predisponer al LEG, y éste es el deterioro de la activación de C4, ya que se encontró que los niveles de C4 no correlacionan con la condición de heterocigotidad para alelos nulos de C4, sin embargo la medición de C4d (parámetro que se empleó como marcador de activación de C4) mostró

niveles bajos que correlacionan mejor con el estado de alelo nulo, preferentemente con C4A*QO, lo que indica además que existe una condición de pobre activación de C4. La inhibición de la precipitación de CI puede tener lugar en dos estados, con efecto aditivo: A través del deterioro de la activación de C4 que parece estar asociada con ambos alelos C4A*QO y C4B*QO, y a que los sujetos con alelos nulos para C4B pueden compensar este defecto mediante un estado activado de la vía clásica que utiliza la habilidad de C4A para prevenir el defecto de la formación de CI insolubles, C4A tiene reacción de transacetilación con los grupos amino en CI, mientras que C4B tiene mayor avidez por los grupos hidroxilos que se encuentran en carbohidratos, por lo que C4A es más efectivo que C4B en la solubilización de agregados inmunes. Esta consideración puede ayudar a explicar la prevalencia de C4A*QO sobre C4B*QO en estados patológicos como el LEG.

Se ha reportado una delección de los genes de C4A y 21-OHA en una gran mayoría de casos con LEG (50%) y alelos nulos para C4A. Esta es una delección de 28 kb y se presenta con el haplotipo extendido HLA-B8, DR3, C4A*QO, C4B*1 en caucásicos.

En el caso del alelo C4B*QO se ha encontrado asociado al haplotipo HLA-B44, C2*C, Bf*S, C4A*3, C4B*QO, DR6.

En estudios con RFLP y con la endonucleasa de restricción N1aIV, pueden distinguirse alelos que codifican para C4A y C4B, donde el alelo de C4B*QO presenta un patrón consistente con el que codifica el isotipo C4A. Esto sugiere sobre las bases fenotípicas expresados por los individuos, que el alelo C4B*QO podría codificar otro isotipo de C4A*3. Otro evento que se describió fué que donde han sido asignados haplotipos con alelos C4A*QO fenotípicamente, estos genes pueden codificar productos similares a los del locus contiguo. En este ejemplo, el alelo C4A*QO del haplotipo C4A*QOB1 codifica otro alotipo de C4B*1. Por estas razones es importante realizar un tipificación cuidadosa combinada por análisis de RFLP empleando N1aIV para confirmar la presencia de un alelo nulo de C4.

Haplotipos que expresan dos diferentes alotipos de C4A, p.ejem. C4A*3, C4A*2 ó C4A*5, C4A*2 con un alelo nulo en el locus C4B se han descrito en algunos estudios. Esto sugiere que este evento podría explicarse por un entrecruzamiento entre cromosomas homólogos lo que resulta en una duplicación de los genes del locus de C4A y deleción del locus C4B. Por análisis detallado con Southern blot se demostró que los locus presentes son normales, pero el segundo también codifica para un isotipo C4A, en otro estudio realizado en haplotipos C4A*3, C4A*2, B*QO se encontró la presencia de tres locus C4 que presentaron fragmentos de diferente intensidad en análisis de Southern blot.

Inicialmente la deficiencia de C4 fué descrita en desequilibrio de unión con DR3, sin embargo en investigaciones posteriores se encontró que la asociación de C4*QO con LEG es independiente de DR3. Por ejemplo en Japoneses donde el alelo nulo de C4A constituye un factor de riesgo para LEG y el alelo DR3 no es frecuente en esta población. (63, 66)

Otra evidencia que apoya esto último es que pacientes que han sido sometidos a terapias largas con hidralazina o isoniazida desarrollan un síndrome semejante al LEG, estas drogas pueden reducir la actividad de C4 mediante una interacción con su enlace tioéster. Speir reportó que individuos con alelos nulos para C4 tienen un mayor riesgo de desarrollar LEG, debido a la disminución de la actividad total de C4 y la posterior inactivación de C4 por metabolitos de las drogas.

Los inmunoensayos (EIA) han permitido el estudio de los niveles de C4A y C4B selectivamente, en pacientes con LEG activo no parece haber selectividad en el empleo de C4A o C4B; ambos isotipos se elevan y decaen en forma paralela con la actividad de la enfermedad.

C4B es más eficiente en el procesamiento de cierto tipo de complejos inmunes. La remoción de complejos inmunes requiere de la interacción entre el antígeno, anticuerpo, complemento y sistema retículo endotelial, por lo que cualquier deficiencia de

los componentes iniciales de la cascada del complemento conduce a una disminución en la eficiencia de depuración de CI (8,48, 50, 51, 52, 56, 57, 58,112)

7.1.6 ASOCIACION DE MHC CLASE II CON LEG.

El primer reporte de asociación de un marcador genético con LEG fué realizado en 1971 por Drumet quien menciona al alelo de HLA clase I B8. Estudios posteriores mostraron que la correlación es mayor con alelos de clase II con especificidades HLA-DR2 y HLA-DR3, posteriormente se encontró que existía un desequilibrio de unión de estos alelos con B8. Esta asociación con LEG fué más evidente en individuos blancos con ancestros de Europa occidental, pero en otros grupos raciales las frecuencias de los antígenos HLA fueron diferentes. Existe una gran cantidad de literatura en los últimos años acerca de este tipo de asociaciones en diferentes grupos étnicos.

Se han caracterizado una gran variedad de autoanticuerpos en pacientes con LEG y se han establecido subclases de autoanticuerpos en relación con las manifestaciones clínicas. Algunos estudios han mostrado que los alelos HLA clase II se asocian principalmente con ciertos autoanticuerpos y no propiamente con la enfermedad. Los autoanticuerpos Ro (SS-A) y La (SS-B) se presentan en pacientes con LEG y Síndrome de Sjögren y tienen una fuerte correlación con HLA-DR2, HLA-DR3, y con los alelos HLA-DQ (DQw1 y DQw2) en forma heterocigota. Es notorio que estos alelos se encuentran en desequilibrio de unión, por lo que se presentan frecuentemente en el mismo haplotipo.

Con los recientes avances de la tecnología molecular, los genes de MHC se han estudiado más extensamente. Su organización genética se conoce mejor y la mayoría de los alelos se han clonado y secuenciado. El método de RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) ha sido de gran ayuda en la definición de algunos alelos de MHC clase II. La tipificación por medio de RFLP quedó pronto obsoleta, pero con la aplicación de la PCR (Polymerase Chain Reaction) y sondas de oligonucleótidos ha sido posible la determinación de las secuencias alélicas a nivel del DNA. Un avance importante

ha sido la elucidación de la estructura tridimensional de los alelos de MHC clase I y la proposición de un modelo similar para las moléculas de clase II.

Las moléculas de MHC forman un complejo trimolecular conjuntamente con el péptido procesado y el TCR. Los dominios externos de las moléculas de clase II contienen tres regiones hipervariables polimórficas que forman una hendidura donde puede unirse el péptido procesado y es presentado a los linfocitos T cooperadores (TH) mediante su TCR. De esta manera las moléculas de clase II restringen la respuesta específica de las células TH. En contraste las moléculas de MHC clase I restringen la respuesta específica de las células T citotóxicas (TC). Bajo circunstancias normales, un autoantígeno se une a una molécula de MHC no debe inducir una respuesta inmune cuando es presentada a una célula TH. En lupus y en otras enfermedades autoinmunes, ciertos autoantígenos, de naturaleza aún no bien definida puede iniciar y perpetuar una respuesta autoinmune. Este tipo de respuestas parecen ser antígeno específicas y dependientes de linfocitos T. El polimorfismo encontrado en el sitio de unión al antígeno de las moléculas de MHC clase II es la base de su asociación con enfermedad, el cual debe jugar un importante papel en el fenómeno de autoinmunidad.

La determinación precisa de las secuencias polimórficas del MHC que confieren susceptibilidad a autoanticuerpos específicos en pacientes con LEG adquieren gran importancia. La localización de las secuencias críticas que confieren susceptibilidad a enfermedad han sido difíciles de determinar debido a la complejidad de la región génica del MHC, como son:

1) Existen tres grupos funcionales de heterodímeros de clase II (DR, DQ, DP) cuyos locus se encuentran muy cercanos, especialmente DR y DQ, presentándose un amplio desequilibrio de unión. Todos estos locus α y β de MHC clase II muestran un polimorfismo alelico variable, excepto para el gen DR α (DRA), pero los genes β (DRB1, DQB1 y DPB1) son los más polimórficos. De esta manera la asociación con enfermedad por ejemplo DR3 puede presentar una secuencia de susceptibilidad en los alelos DRB1

(DR3) ó DRB3 (DRw52) o en los alelos adyacentes como DQB1*0201 ó DQA1*0501 (HLA-DQw2.1). Afortunadamente, estos mismos HLA-DR y HLA-DQ pueden presentarse en diferentes combinaciones haplotípicas, especialmente en otros grupos étnicos.

Con técnicas moleculares que definen con precisión cada alelo, los locus o alelos asociados con enfermedad pueden ser fácilmente localizados.

2) Las mismas secuencias polimórficas pueden ser codificadas por diferentes alelos de HLA. Es decir que los alelos de HLA muestran secuencias que difieren dentro de los distintos alelos, las cuales deben ser examinadas cuando se busca susceptibilidad para alguna enfermedad. Finalmente, si se ha delineado una respuesta autoinmune homogénea es probable que la secuencia de susceptibilidad pueda explicar la respuesta de todos o casi todos los pacientes. Estas estrategias se han aplicado recientemente en la asociación de MHC clase II con subgrupos de autoanticuerpos en LEG (8, 84, 85, 94, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110).

7.1.6.1 ANTICUERPOS ANTI-DNA.

Anticuerpos contra DNA de doble cadena (DNAcd) se presentan de un 40 a 60% en pacientes con LEG y correlacionan con glomerulonefritis difusa proliferativa, una lesión donde los complejos inmunes DNA:anti-DNA probablemente juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Estos anticuerpos pueden estar también asociados con rash malar, serositis lúpica, pneumonitis, y artritis deformante (Síndrome de Jaccoud).

Los estudios realizados con el fin de relacionar la presencia de anticuerpos anti-DNAde con antígenos de HLA han sido difíciles por el hecho de que los niveles de estos autoanticuerpos son más inestables que otros, se elevan y caen dramáticamente en

relación con la actividad de la enfermedad y la eficacia del tratamiento. Por lo que los pacientes deben ser observados en periodos de actividad severa de la enfermedad para determinar si producen o no anticuerpos anti-DNAc.

Recientemente, empleando técnicas moleculares Khanduja y col. examinaron los genes de HLA-DR y DQ en 126 pacientes con LEG, los cuales se categorizaron de acuerdo a los títulos de anti-DNAc en alto, moderado-bajo ó ausentes durante periodos activos de la enfermedad. HLA-DR3 y DQw2.1 presentaron un incremento significativo en el grupo de pacientes con niveles altos de anti-DNAc, en los individuos negativos para estos alelos se presentó DQw6 (DQB1*0602) como segunda especificidad. Los alelos DQB1*0201 y DQB1*0602 se encontraron en el 90% de los pacientes con niveles altos de anti-DNAc, y los pacientes restantes poseían la especificidad DQB1*0302 (DQw8). Estos tres alelos de DQB1 muestran metionina en la posición 14 y leucina en la posición 26.

Un alelo adicional de HLA-DQ, el DQB1*0502 (DQw5-AZH) el cual se presenta con una frecuencia alta en individuos con ascendencia de Europa Occidental, se han asociado con nefritis lúpica. Además, estudios de pacientes griegos con LEG y anti-DNAc sugieren una asociación con el alelo DQB1 (DQB1*0502) el cual no muestra las mismas secuencias comunes que DQB1*0201, *0602 y *0302 encontrados por Khanduja y col.

7.1.6.2 AUTOANTICUERPOS Ro (SS-A) Y La (SS-B).

El autoanticuerpo Ro es una ribonucleoproteína nuclear y citoplásmica de función desconocida que se presenta en aproximadamente el 25 al 50% de pacientes con LEG y del 50 al 90% de los pacientes con Síndrome Primario de Sjögren. Los autoanticuerpos La, constituyen un factor de terminación para la RNA polimerasa II, y frecuentemente se acompañan de anticuerpos anti-Ro, especialmente en el Síndrome de Sjögren y se presentan sin anti-Ro en forma muy rara.

La respuesta anti-Ro con o sin asociación con anti-La está relacionada con una erupción de la piel característica denominada lupus eritematoso cutáneo subagudo (SCLE), el cual puede presentarse con o sin síntomas sistémicos. Este mismo rash puede también encontrarse en pacientes con LEG y participar directamente en la producción de lesiones de piel en el Síndrome de Lupus Neonatal, una condición en la que se presentan lesiones similares y que son producidas por la transferencia transplacentaria de anticuerpos anti-Ro maternos. Puede presentarse además un bloqueo cardíaco congénito debido a lesiones inflamatorias en el corazón fetal, lo cual está asociado casi siempre con anti-Ro. Otras asociaciones de anti-Ro(+)/ anti-La(-) incluyen vasculitis neutrofílica, citopenias hematológicas, hiperglobulinemia policlonal y niveles altos de factor reumatoide IgM e IgG.

En varios estudios donde se emplearon tipificaciones serológicas, se demostró que HLA-DR3 y en menor grado HLA-DR2, se encuentran fuertemente asociados con anticuerpos anti-Ro y anti-La más que con LEG y SS. Además, la combinación heterocigota de HLA-DQw1 y DQw2, los cuales muestran desequilibrio de unión con HLA-DR2 y DR3, respectivamente, correlacionan con niveles séricos altos de anti-Ro y anti-La. Se ha hipotetizado que esta combinación heterocigota de DQ puede representar un ejemplo de complementación génica "trans-alélica". En algunos estudios se ha mostrado que tanto la cadena DQ α como DQ β son codificadas por haplotipos opuestos (trans) y que pueden aparearse para formar un heterodímero híbrido sobre la superficie celular, de esta manera se puede explicar la fuerte predisposición a presentar niveles altos de autoanticuerpos Ro y La, conferidos por el estado heterocigoto de DQw1/DQw2.

Estudios moleculares más recientes de los genes MHC clase II en pacientes con anticuerpos anti-Ro y La han extendido las asociaciones serológicas previas con alelos de HLA. Estudios de RFLP sobre individuos blancos o negros americanos con anti-Ro(\pm La) confirman la asociación de HLA-DR3 y heterocigotos DQw1/DQw2 con estos

autoanticuerpos en ambas razas pero mostraron mayor especificidad los subtipos DQ involucrados, p.ejem. DQw6 más que DQw5 (dos formas de DQw1) y DQw2.1 (presentes en haplotipos con DR3) más que DQw2.2 (haplotipos con DR7). No se ha encontrado asociación con alelos DP determinados por oligotipificación (SSO) en las respuestas de anti-Ro y anti-La de individuos con LEG.

Subsecuentemente, Reveille y col. emplearon una combinación de RFLP, PCR, SSO y secuenciación de nucleótidos para definir los genes HLA-DR y DQ en un gran número de pacientes negros y blancos con LEG y SS con o sin anti-Ro. En ambas razas, HLA-DR3 y DQw2.1 así como también heterocigotos DQw6/DQw2.1 se presentaron en aproximadamente 25% de individuos anti-Ro ± La pero en solamente en 2 al 5% de otros pacientes con LEG o individuos normales. En individuos negros con anti-Ro, se encontró incremento del haplotipo caucásico HLA-DR3 (DRw17), DQw2.1 en comparación con el haplotipo africano HLA-DR3 (DRw18) el cual difiere en sólo 4 aminoácidos, por lo que se hipotetizó que HLA-DRB1 no es el locus primario que confiere susceptibilidad de anti-Ro, mientras que el locus DQ parece ser un mejor candidato.

En estudios posteriores de estos pacientes, se eliminaron los pacientes HLA-DQw2.1 positivos (incluyendo heterocigotos DQw6/DQw2.1), los pacientes restantes Anti-Ro positivos, HLA-DQw6 (pero no DR2 o DRw6, los cuales se encuentran en desequilibrio de unión con DQw6) emergieron como elemento significativo en la asociación con la respuesta de este anticuerpo, incluyendo algunos homocigotos DQw6. Los pacientes restantes DQw2.1 y DQw6 negativos con anti-Ro, mostraron HLA-DQ1*0302 (DQw8) o DQA1*0401 (DQw4), esto último especialmente en negros.

Los alelos HLA-DQA1 y DQB1 comprenden DQw2.1 (DQA1*0501, DQB1*0201) y DQw6 (DQA1*06) los cuales se presentan en una gran variedad de haplotipos diferentes a HLA-DR3 y -DR2, como son DQB1*0302 y DQA1*0401. Todos los pacientes con anti-Ro con o sin anti-La mostraron uno o más, generalmente tres o

cuatro de estos alelos relevantes. El análisis de las secuencias de nucleótidos asociados a estos alelos DQ mostraron que el 100% de individuos anti-Ro positivos tienen un residuo de glutamina en la posición 34 en el dominio exterior de la cadena DQA1 y leucina en la posición 26 de la cadena DQB1.

De esta manera la respuesta anti-Ro y La parece mostrar una asociación mayor con alelos HLA-DQ que con DR. Los alelos HLA-DQA1 que poseen glutamina en la posición 34 y alelos DQB1 con leucina en la posición 26 parecen constituir un requerimiento mínimo para esta respuesta autoinmune. Probablemente se requieren alelos adicionales de MHC, ya que existe cierta jerarquía en la asociación alélica de HLA (DQw2.1 > DQw6 > DQw8, etc) que contienen estos aminoácidos. Ambos residuos se encuentran en DQA1 y DQB1 en la segunda región hipervariable, estos aminoácidos se encuentran en el fondo del surco donde se une el péptido antigénico dentro del modelo propuesto para las moléculas MHC de clase II. Debe enfatizarse que estos residuos en HLA-DQ se han asociado con anticuerpos anti-Ro, pero son necesarios más estudios para probar que estos participan en la mediación de la respuesta autoinmune (82, 88, 89, 91, 92).

7.1.6.3 ANTICUERPOS ANTI-Sm Y nRNP

Autoanticuerpos contra enzimas encargadas de la edición del mRNA como U-snRNP (ribonucleoproteínas pequeñas nucleares ricas en uridina), se presentan frecuentemente en LEG. Los anticuerpos anti-Sm están dirigidos a autoepítopes sobre snRNPs de U1, U2, U4, U5 y U6 y anti-nRNP a diferentes antígenos solo sobre U1-snRNP. El anticuerpo anti-Sm es altamente específico para LEG y el anti-nRNP se presenta también en otras enfermedades autoinmunes, incluyendo escleroderma, polimiositis y enfermedad mixta del tejido conectivo. Existen algunos patrones de combinación de estos autoanticuerpos en LEG, específicamente anti-Sm sin anti-nRNP, anti-Sm y anti-nRNP, y anti mRNA sin anti-Sm.

No se ha encontrado asociaciones entre las características clínicas de LEG con la presencia de anti-Sm, aunque el fenómeno de Reynaud, miositis y baja frecuencia de nefritis se han reportado en pacientes que presentan anti-nRNP. Ambos anticuerpos se presentan más frecuentemente en individuos negros que en blancos con LEG.

No se han encontrado asociaciones entre HLA y anti-Sm, sin embargo en un estudio se reportó incremento en la frecuencia de HLA-DR7. Para anti-nRNP, algunos estudios HLA serológicos han reportado un incremento de DR4.

Recientemente, Kaneoka y col. emplearon para determinar genes de MHC clase II SSO y secuenciación en pacientes con autoanticuerpos del antígeno de 70kD de UI-RNP y encontró un incremento en las frecuencias de HLA-DR4 y DR2. Estos investigadores han propuesto que algunas secuencias en la segunda y tercera región hipervariable de los alelos DRB1 presentes en DR4 y DR2 pueden constituir epitopes de susceptibilidad, específicamente los aminoácidos mostrados por DRB1 en las posiciones 26, 28, 30 a 32, 70 y 73.

Olsen y col. realizaron un estudio con RFLP y SSO de pacientes con LEG y anti-Sm comparando con pacientes que presentan solo anti-nRNP, encontraron una fuerte asociación de anti-Sm, especialmente en negros con HLA-DR2, DQw6, mientras que en presencia de anti-nRNP se asoció con el incremento de la frecuencia de HLA-DQw5 tanto en pacientes blancos como en negros y adicionalmente HLA-DQw8 en blancos. Estos investigadores propusieron la hipótesis de que estas asociaciones de MHC pueden ser explicadas por la diferencia de carga entre las cadenas DQA1 y DQB1. Específicamente las secuencias de DQA1*0102 de DQw6 (asociación con anti-Sm) las cuales difieren de DQA1*0101 de DQw5 (asociado con anti-nRNP) en un sitio, la posición 34. El alelo α asociado con anti-Sm (DQA1*0102) posee un aminoácido neutro (glutamina), mientras que el alelo α asociado con anti-nRNP (DQA1*0101) posee un aminoácido con carga negativa (ácido glutámico). Similarmente, la cadena DQB1*0602 de DQw6 (asociado con

anti-Sm) muestra secuencias comunes con las cadenas DQB1*0501 (DQw5) y DQB1*0302 (DQw8) (asociadas con anti-nRNP) excepto en las posiciones 9, 57 y 87. Las diferencias de aminoácidos en las posiciones 9 y 87 consisten en sustituciones conservadas (sustituciones neutras). En contraste, la cadena de DQB1*0602 en la posición 57 contiene un aminoácido cargado negativamente (ácido aspártico) asociado a anti-Sm, mientras que DQB1*0501 posee un aminoácido neutro (valina) en la posición 57 y alanina (aminoácido neutro en DQB1*0302 asociado con anti-nRNP). La comprobación de esta hipótesis requiere de estudios posteriores. Es importante señalar que esta hipótesis es similar a lo que se ha propuesto para la diabetes mellitus tipo I, en donde el alelo DQB1 muestra un ácido aspártico en la posición 57 el cual confiere resistencia, mientras que el encontrar un aminoácido neutro en esta posición confiere susceptibilidad (98).

7.1.6.4 ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDOS.

Los anticuerpos antifosfolípidos (APAs) se encuentran en aproximadamente del 34 al 44% de los pacientes con LEG y menos frecuentemente en otras enfermedades del tejido conectivo. Los APAs se han reconocido como la causa de falsos positivos en la prueba de sífilis (VDRL) y anticoagulante lúpico. Por medio de la cuantificación de anticardiolipinas o detección de anticoagulante lúpico los APAs han mostrado una fuerte asociación con eventos trombóticos intravasculares, abortos espontáneos recurrentes, endocarditis de Libman-Sacks, “*livedo reticularis*” y trombocitopenia. Por lo que es posible atribuir un efecto causal para estos anticuerpos en las complicaciones de esta enfermedad. El Síndrome Primario de Antifosfolípidos (PAPS) se ha propuesto en base a los pacientes que presentan características clínicas en asociación con APAs, pero que no llenan los criterios para LEG y otras enfermedades autoinmunes.

Son pocos los estudios que existen de las frecuencias de antígenos de HLA en pacientes con APAs. Empleando tipificaciones serológicas para DR. Savi reportó un incremento en la frecuencia de HLA-DR7 en italianos con LEG y anticuerpos anti-

cardiolipina, McHugh y Maddison encontraron un aumento de DR4 en Gran Bretaña, McNeil encontró resultados similares con DR4 en Australia. Ambos alelos DR7 y DR4 se encuentran en desequilibrio de enlace con el alelo de HLA-DRB4 DRw53 (DRB4*0101) lo que sugiere que DRw53 puede tener una asociación primaria con la enfermedad. Goldstein, empleó RFLP para definir alelos de clase II y reportó un aumento significativo de DRw53 en pacientes con LEG y anticardiolipinas positivas. Similarmente Asherson y col. empleando RFLP y oligotipificación en 13 pacientes con PAPS (anticardiolipina y anticoagulante lúpico positivos), reportó una fuerte asociación con HLA-DR4 y DRw53.

Arnett y col. empleando RFLP para definir genes de HLA-DR y DQ en 20 pacientes con anticoagulante lúpico circulante, encontraron un incremento significativo en la frecuencia de HLA-DR5, -DRw52b, -DQw7, los que muestran desequilibrio de enlace, mientras que HLA-DR4, -DR7 y -DRw53 no mostraron incremento significativo. La frecuencia de HLA-DQw7 se encontró incrementada significativamente en pacientes con LEG y anticoagulante lúpico positivo cuando se comparó en pacientes con LEG y con la presencia de anti-Ro, anti-La, anti-DNA, anti-Sm y anti-nRNP (U1.RNP). El análisis de los alelos de DQA1 (DQA1*0301 ó *0501) y el alelo DQB1 (DQB1*0301) que comprenden la especificidad DQw7 demostraron fuerte asociación con DQB1*0301. Los pacientes HLA-DQw7 negativos con anticoagulante lúpico presentaron los alelos HLA-DQw8 (DQB1*0302) y DQw6 (DQB1*0602). El análisis de las secuencias de nucleótidos reveló que HLA-DQB1*0301 (DQw7), *0302 (DQw8) y *0602 (DQw6) mostraban secuencias relacionadas muy estrechamente en las posiciones 71-77 en la tercera región hipervariable. Con estas evidencias se propuso que esta región puede constituir el "epítotope" para la mediación de esta respuesta autoinmune. Existen otras secuencias candidatas para conferir susceptibilidad, las cuales se encuentran en la misma molécula de DQB1, y que incluyen tirosina en la posición 30 y alanina en la posición 38 (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120).

EL PAÍS DE LOS
SERIOS DE LA BUNOTEROS

7.1.6.5 ANTICUERPOS A PROCOLAGENO TIPO VII.

La epidermolisis bulosa adquirida (EBA) es una enfermedad bulosa de la piel donde anticuerpos circulantes contra procolágeno tipo VII en la epidermis parece ser la causa. Los pacientes con LEG desarrollan en forma rara lesiones bulosas en piel, y en estos casos se ha encontrado este mismo anticuerpo. Casi todos los pacientes con esta respuesta autoinmune, ya sea con EBA o LEG se han asociado con DR2. No se ha reportado una localización molecular de algún alelo específico de HLA.

7.1.7 GENES DE INMUNOGLOBULINAS.

Existen asociaciones múltiples de alotipos de cadenas pesadas (Gm) y algunas cadenas ligeras kappa (Km) con LEG. En general, algunos de los estudios realizados a este respecto son contradictorios. Se ha demostrado reactividad cruzada entre los idiotipos de anticuerpos anti-DNA tanto en pacientes con LEG no relacionados como en miembros de familias con LEG, lo que sugiere que puede existir alguna influencia entre los genes de inmunoglobulinas y LEG. Se ha mencionado la relación de un idiotipo particular de anticuerpos anti-DNA (IdGN2) y alelos de MHC clase II en pacientes con nefritis y lesiones glomerulares. Recientemente Olee y col. describieron una delección homocigota en el gen humano *Humhv*, que codifica para factor reumatoide en el 20% de pacientes con LEG y en 2% de individuos normales. Son necesarios estudios posteriores respecto a los genes de inmunoglobulinas para garantizar claramente su asociación con LEG, especialmente aquellos relacionados con autoanticuerpos específicos (121, 122, 123, 124).

7.1.8 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α .

Los genes del factor de necrosis tumoral (TNF) α y β (linfotóxina) se han mapeado dentro de la región de genes MHC clase III. Jacob y col. describieron la asociación de un polimorfismo de TNF α en desequilibrio de unión con el haplotipo HLA-DR2, DQw1 que resulta en niveles bajos de TNF, mientras que niveles altos de TNF se han asociados con HLA-DR3 y DR4. Estudios realizados en ratones revelaron un efecto desequilibrio de unión similar entre los niveles de TNF α y H-2. Y en ratones lúpicos que mostraron niveles bajos de TNF α y que fueron suplementados con TNF exógeno, presentaron una enfermedad semejante al lupus (125, 126, 127, 128, 129, 130).

7.1.9 GENES DEL RECEPTOR DE CELULAS T (TCR) EN LEG.

Existen dos tipos de TCR. El TCR $\alpha\beta$ expresado en el 95 % de las células T y que interacciona con moléculas de MHC. Y el TCR $\gamma\delta$ presente en un pequeño grupo de células T CD4(-), CD8(-) y que reconocen proteínas de choque térmico propias y bacterianas. Originalmente no se encontró restricción con moléculas de MHC, aunque algunos datos recientes sugieren que existen algunas interacciones con las moléculas de MHC para al menos algunas respuestas inmunes.

Los genes humanos del TCR no se encuentran en el mismo cromosoma que los del MHC. Los genes de las cadenas α y γ del TCR se encuentran en el cromosoma 14 y de las cadenas β y δ dentro el cromosoma 7. El conocimiento sobre el polimorfismo de los genes del TCR es aún limitado. Sin embargo, algunos estudios realizados en estos genes empleando RFLP se han reportado en pacientes con LEG. No se ha encontrado

ninguna asociación definida, ni se han detectado deleciones en el gen β del TCR contrastando con lo reportado en ratones blancos de Nueva Zelanda (NZW). Dukley y col. investigaron los patrones de RFLP para las cadenas α , β y γ sin encontrar asociación con LEG o alelos específicos de MHC. Tebib y col. por otro lado, reportó un incremento significativo en patrón de RFLP en la cadena α empleando la endonucleasa de restricción PstI en pacientes blancos americanos, aunque no así en mexicanos con LEG. Frank y col. reportaron un incremento significativo en la combinación de los patrones de RFLP con las endonucleasas TCR β BglIII y TCR β KpnI en pacientes con LEG / anticuerpos anti-Ro, comparados con individuos anti-Ro negativos. En un estudio de familias de casos múltiples no pudo demostrarse ninguna asociación con los genes de las cadenas α , β y γ del TCR en pacientes con LEG (131, 132, 133, 134).

8. MATERIALES Y METODOS.

Se estudiaron 181 pacientes con diagnóstico de Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y 105 individuos sanos como controles, los cuales fueron tipificados serológicamente para moléculas de HLA clase I por medio de la técnica de linfomicrocitotoxicidad de acuerdo a lo descrito por Terasaki ; los genes de MHC clase II fueron determinados a nivel de DNA utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar las regiones correspondientes a los genes DRB1, DQA, y DQB, la identificación de los alelos correspondientes a cada gen se determinó mediante el empleo de Sondas de Oligonucleótidos Alelo Específicas (SSO).

Se determinó la frecuencia génica de cada uno de los loci y se compararon mediante los métodos estadísticos no paramétricos Chi cuadrada y Prueba exacta de Fisher, empleando el paquete estadístico para computadora EPI-INFO y la p calculada fué corregida por el método de Bonferroni para comparaciones múltiples, el número de alelos comparados en este trabajo fué de 22.

Las técnicas metodológicas se describen con detalle a continuación.

8.1 TIPIFICACION SEROLOGICA DE HLA.

TECNICAS PARA LA DETECCION DE ANTIGENOS HLA - A,B,C,DR, DQ .

La prueba de citotoxicidad para linfocitos en microplacas fué introducida en 1964 por Terasaki y McClelland y presentada en el primer Congreso Internacional de Histocompatibilidad (1978) y desde entonces es universalmente aceptada como un método sencillo, sensible y reproducible para tipificar antígenos HLA.

El principio de la técnica de citotoxicidad es una reacción Ag-Ac, dependiente de complemento. Los linfocitos son incubados con un suero específico anti-HLA seguido por la adición de suero de conejo como fuente de complemento, el complemento se une a la superficie celular que previamente ha sido reconocida por un anticuerpo, destruyendo la membrana. Las células muertas son identificadas por medio de un colorante supravital, el cual es capaz de penetrar la membrana alterada de la célula lisada, los linfocitos no reconocidos permanecerán viables y no permiten la entrada de colorante a su interior (reacción negativa).

PROCEDIMIENTO:

PREPARACION DE LAS PLACAS PARA TIPIFICACION:

Los antisueros empleados son anticuerpos anti-antígenos HLA, que preferiblemente deben ser monoespecíficos. Estos antisueros se obtienen de pacientes con transplantes previos, multitransfundidos, o bien de placentas de mujeres multíparas.

Los sueros deben ser caracterizados empleando paneles de referencia de células tipificadas. En muchas ocasiones es difícil encontrar sueros monoespecíficos, por lo que se emplean sueros poliespecíficos, en cuyo caso es necesario emplear una combinación de antisueros que permita distinguir los diferentes antígenos HLA.

Para una adecuada tipificación de los antígenos de HLA deben emplearse por lo menos 2 diferentes antisueros de la misma especificidad. Si se van a determinar antígenos de clase II es indispensable la adsorción del suero con un pool de plaquetas humanas con el fin de adsorber anticuerpos dirigidos contra antígenos de clase I y de esta manera obtener un antisuero específico para clase II.

Como control se puede emplear:

1. Un pool de suero normal que se prueba con 100 células y no muestra ninguna reactividad.
2. Suero de un varón sano de grupo sanguíneo AB que no presente actividad citotóxica en pruebas con 100 linfocitos.

El antisuero empleado como control positivo corresponde a un suero monoclonal HLA monoespecífico anti-humano fuertemente citotóxico, también puede emplearse una combinación de sueros de pacientes altamente sensibilizados a los que se les ha probado una alta citotoxicidad.

Para la tipificación de moléculas de clase II se debe incluir en el panel de antisueros un control anti-linfocitos B, el cual es un anticuerpo monoclonal que no presenta reactividad contra: granulocitos, linfocitos T, plaquetas, monocitos y hematíes. Es aconsejable también incluir controles anti-monocitos, granulocitos y linfocitos T, de esta manera es posible valorar la contaminación con otro tipo celular diferente de linfocitos B.

Antes de adicionar los antisueros en la placa de Terasaki es importante centrifugarlos a alta velocidad para eliminar lípidos o cualquier contaminante que pueda dificultar la lectura de la placa.

Se debe adicionar 5 μ l de aceite mineral a cada pozo de la placa para evitar la evaporación de la cantidad tan pequeña de antisuero y facilitar la mezcla de éste con la suspensión celular.

Se adiciona 1 μ l de los respectivos antisueros en cada uno de los pozos de la placa y se realiza un mapa donde se especifique la posición y especificidad de cada

antisuero, la cual deberá ser empleada para la anotación de los resultados y su interpretación.

Las placas se almacenan a -70°C hasta el momento de su uso. Deben descongelarse 15 minutos antes a temperatura ambiente y deben emplearse en no más de 30 minutos desde su descongelación. No deben volverse a congelar, tampoco conservarse en hielo seco si no están debidamente selladas, ya que el CO_2 ocasiona acidez, destruyendo la actividad del suero.

Las placas pueden adquirirse comercialmente ya preparadas.

OBTENCION DE LINFOCITOS:

1. Obtener de 10 a 20 ml de sangre anticoagulada (EDTA.Na_2 , heparina o preferiblemente ACD). Colocar la muestra en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Diluir la sangre con PBS pH= 7.4 ó solución salina isotónica en relación 1:1.
3. Introducir una pipeta Pasteur hasta el fondo del tubo y agregar 15-20 ml (una tercera parte de la muestra de Ficoll Radialar ó Ficoll -Hypaque a través de la pipeta). O bien colocar el Ficoll en otro tubo y agregar la sangre diluida por la pared del tubo de manera que se formen dos fases bien definidas.
4. Centrifugar 30 minutos a 1500 rpm.
5. Con una pipeta Pasteur recuperar la capa de mononucleares, la cual se observa como un anillo turbio intermedio en la fase formada por el PBS y el suero.
6. Llenar el tubo con PBS (50 ml) para realizar un lavado de las células, mezclar suavemente.
7. Centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm.
8. Decantar el sobrenadante.

9. Resuspender el paquete celular en 1 ml de medio RPMI suplementado o medio de MacCoy.

NOTA: Si las células no van a ser tipificadas en ese momento, agregar aproximadamente 7.5 ml de medio y guardar en refrigeración, las células permanecen viables por 3 días. O bien congelarlas si deben almacenarse por un periodo más prolongado (para la técnica de criopreservación ver más adelante).

10. Transferir la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1.0 ml.

11. Centrifugar (en microcentrifuga) aproximadamente 1 seg (prender y apagar rápidamente) a 7000 rpm. Este procedimiento elimina los polimorfocitos remanentes, así como los monocitos.

12. Transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1 ml.

13. Centrifugar por 1 min a 1,200 rpm. Este procedimiento permite eliminar plaquetas.

14. Transvasar el sobrenadante al tubo Eppendorf anterior que contiene el primer paquete celular. (Se recomienda conservar estas fracciones, ya que en caso de un error se pueden obtener más linfocitos, repitiendo el proceso de separación por centrifugación).

15. Resuspender el botón celular en aproximadamente 1 ml de medio RPMI o MacCoy.

NOTA: Si el botón celular contiene eritrocitos (se observa de color rojizo) agregar 1 ml de solución AKC antes de agregar el medio RPMI, resuspender e incubar por 5 min a 37°C.

Centrifugar por 2 min a 5000 rpm

Desechar el sobrenadante. Agregar 1 ml de PBS y centrifugar nuevamente por 1 min a 5000 rpm, para lavar las células.

Resuspender el botón celular en 1 ml de medio RPMI y continuar con el protocolo.

16. Ajustar la suspensión celular a una concentración de $2 \text{ a } 3 \times 10^6$ células por ml.

Para este procedimiento se puede emplear una cámara de Neubauer. La cual se carga con una mezcla de la suspensión celular y colorante azul de tripán en relación 1:1. Mediante este procedimiento se puede realizar el conteo celular y la determinación de la viabilidad celular.

Contar 5 cuadrados de la cuadrícula central (para glóbulos rojos), el cual corresponde a un volumen de 0.02 mm^3 .

El número de células por mm^3 se calcula de la manera siguiente

$$\text{No. de células / ml} = \frac{(n) \times 1000 \text{ mmc} \times \text{dilución}}{0.02 \text{ mmc} \times 1 \text{ cc}}$$

donde:

n= número de células contadas

dilución = en este caso corresponde a 2.

Para el ajuste se realiza una regla de 3 simple, por ejemplo:

Si se tiene una suspensión celular con 6×10^6 células por ml y se desea ajustar a 2.5×10^6 células por ml, entonces:

$$\begin{array}{r} 6 \times 10^6 \text{ -----} 1000 \mu\text{l} \\ 2.5 \times 10^6 \text{ -----} \quad \quad \quad X \end{array}$$

entonces $X = 416.67 \mu\text{l}$.

Para ajustar la suspensión se requieren 416.67 μ l de la suspensión anterior + 583.33 μ l de medio RPMI.

PRUEBA DE LINFOTOXICIDAD PARA DETECTAR ANTIGENOS HLA-ABC.

1. Descongelar las placas de Terasaki que se emplearan para la tipificación.
2. Mezclar la suspensión de linfocitos previamente aislados y contados.
3. Añadir 1 μ l de la suspensión celular a cada pozo de la placa.
4. Incubar las placas a temperatura ambiente (22 a 25 °C) durante 30 minutos.
5. Añadir 5 μ l de complemento de conejo a cada uno de los pozos.
6. Incubar a temperatura ambiente por 60 minutos.
7. Añadir 5 μ l de solución de Eosina Y y esperar que se tiñan las células (aproximadamente 3 minutos).
8. Agregar 5 μ l de formalina amortiguada.
9. Dejar reposar las placas por 20 minutos para permitir el asentamiento de las células.
10. Leer en microscopio invertido con contraste de fases.

EVALUACION MICROSCOPICA DE LA PRUEBA DE TIPIFICACION.

Una reacción positiva se observa cuando las células aparecen teñidas, de mayor tamaño, observándose prácticamente solo el contorno celular.

En una reacción negativa las células aparecen intactas, sin teñir y refringentes.

La intensidad de la reacción se califica mediante una escala, de la siguiente manera:

PUNTOS	REACCION	(%) DE CEL. MUERTAS.
1	NEGATIVA	0 - 10
2	NEGATIVA +/-	11-20
4	DEBILMENTE POSITIVA	21-40
6	POSITIVA	41-80
8	FUERTEMENTE POSITIVA	80-100

TIPIFICACION DE MOLECULAS DE HLA CLASE II.

INTRODUCCION:

La tipificación de moléculas clase II serológica se realiza mediante la técnica de citotoxicidad cuyo fundamento es el mismo que la para la técnica de tipificación de las moléculas de clase I. Las moléculas de clase II son expresadas en células como los linfocitos B, líneas celulares linfoblastoides de estirpe B, monocitos, macrófagos, células endoteliales, células de Langerhans, linfocitos T activados. La tipificación de éstas moléculas se realiza principalmente en linfocitos B, las cuales pueden ser aisladas de una muestra de sangre periférica.

Existen varios métodos para separar linfocitos T de B como pueden ser: formación de rosetas con glóbulos rojos de carnero, métodos de adherencia a placa de petri, esferas magnéticas, columnas de nylon, empleando un coctel de anticuerpos monoclonales linfo-kwik.

En la técnica que se describe a continuación la separación de linfocitos B se realiza mediante la técnica de LINFO-KWIK. Cuyo principio está basado en el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra células no deseadas más complemento. Las células no deseadas son lisadas y separadas de los linfocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad.

PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LINFOCITOS B.

1. Aislar de 5 a 20 millones de linfocitos totales por medio de la técnica de Ficoll descrita anteriormente.
2. Centrifugar los linfocitos en tubo Fisher a 1000 g por 1 minuto. Descartar el sobrenadante.
3. Agregar 0.8 ml del reactivo 1 y mezclar bien.

4. Incubar a 37 ° C por 60 minutos, mezclar ocasionalmente por inversión.
5. Colocar una capa de 0.2 ml de PBS sobre la superficie del reactivo 1.
6. Centrifugar a 2000 g por 2 minutos.
7. Descartar la capa de células muertas y el sobrenadante.
8. Agregar 0.5 ml del reactivo 2, mezclar bien.
9. Centrifugar a 2000 g por 2 minutos.
10. Descartar el sobrenadante y resuspender los linfocitos con 1 ml de PBS.
11. Centrifugar a 1000 g por 1 minuto.
12. Resuspender los linfocitos en medio de RPMI.
13. Ajustar la suspensión a una concentración de 2 a 3 millones por cm^3 .

PROCEDIMIENTO PARA LA TIPIFICACION DE HLA- DR.

1. Descongelar las placas para tipificación clase II.
2. Agregar 1 μl de la suspensión de linfocitos B a cada pozo.
3. Incubar las placas a temperatura ambiente (22/25°C) por 1 hora.
4. Agregar 5 μl de complemento de conejo para clase II a cada pozo.
5. Incubar las placas a temperatura ambiente por dos horas.
6. Agregar 5 μl de eosina, esperar 3 minutos para que se realice la tinción.
7. Agregar 5 μl de formaldehído .
8. Dejar reposar las placas por 20 minutos para que se asienten las células.
9. Realizar la lectura en el microscopio.
10. La evaluación se realiza de la misma manera que para las moléculas de clase I.

PROBLEMAS Y RECOMENDACIONES:

1. Alta muerte celular (background) se puede deber a:
 - Células maltratadas durante el aislamiento, almacenamiento o transporte.

- La muerte celular puede ser consecuencia de la presencia de sustancias tóxicas como detergentes, solventes o productos generados por contaminación bacteriana.
- 2. El exceso o falta de células suficientes en cada pozo de reacción. Debe existir un equilibrio entre la cantidad de antisuero y células para que la reacción se lleve a cabo.
- 3. La contaminación bacteriana causa reacciones falsas positivas, lo mismo ocurre en caso de reactivos contaminados.
- 4. Inadecuada temperatura de incubación .
- 5. Complemento manejado en forma inadecuada .
- 6. Contaminación por arrastre de antisueros durante la siembra celular, al tocar con la aguja de la pipeta los antisueros.
- 7. Almacenamiento prolongado de las placas de tipificación ya que el suero libera CO_2 , ocasionando la producción de burbujas en los pozos, lo cual dificulta la lectura.
- 8. La contaminación con eritrocitos dificultará la lectura ya que es difícil distinguir los eritrocitos de los linfocitos.
- 9. Otro problema que se presenta cuando la preparación está contaminada con eritrocitos es la presencia natural en el suero de anticuerpos naturales contra el grupo sanguíneo ABO, dando como resultado lisis de eritrocitos, indistinguible de la lisis linfocitaria.
- 10. El excesivo número de granulocitos, plaquetas y eritrocitos puede consumir complemento y provocando reacciones falsas negativas.
- 11. La contaminación con granulocitos frecuentemente ocasiona falsos positivos ya que éstas células son muy sensibles al efecto citotóxico del complemento de conejo.
- 12. Emplear complemento de conejo específico para la tipificación de clase II, ya que este complemento es extraído de conejos recién nacidos y carecen de anticuerpos heterófilos que pudieran lisar células por reacción inespecífica.

8.1 CRIOPRESERVACION DE CELULAS.

Cuando se requiere almacenar las células para ser tipificadas posteriormente, o cuando se requiere tener un banco de células ya tipificadas, éstas pueden ser congeladas. El rango de recuperación de las alicuotas congeladas es de 50 al 95%.

MATERIALES:

Solución congelante: 10% v/v dimetil-sulfóxido (DMSO) en suero fetal bovino. Preparar el día de su uso y mantener a 4°C.

PROCEDIMIENTO:

1. Aislar los linfocitos mediante la técnica de Ficoll- Hypopaque, descrita anteriormente.
2. Resuspender las células en medio de RPMI y realizar un conteo.
3. Centrifugar a 100 g por 5 minutos a temperatura ambiente.. Desechar el sobrenadante.
4. Agregar por cada 1×10^6 células 1 ml de solución congelante (solución fresca fría, mantener en hielo). Transvasar a un criotubo (Nunc #3-63401), en alicuotas de 0.5 ml.
5. Mantener la suspensión en hielo seco / etanol y glicerol por un periodo de 60 min.
6. Transferir a nitrógeno líquido.

RECUPERACION DE CELULAS CONGELADAS.

MATERIALES:

- RPMI suplementado (ver apéndice de reactivos).
- Incubador con humidificador a 37°C y 8% de CO₂.

PROCEDIMIENTO:

1. Descongelar completamente los criotubos en un baño de agua a 37°C, sumergiendo los tubos solamente hasta el nivel de la muestra.
2. Una vez descongelada la suspensión, transvasar el contenido en ambiente estéril a un tubo cónico de 15 ml y añadir 5 ml de RPMI a 37°C.
3. Centrifugar 5 minutos a 100 g.
4. Aspirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 5 ml de RPMI a 37°C.
5. Centrifugar a 100 g por 5 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y volver a resuspender en medio de RPMI.
7. Diluir con azul de tripano 1:1, verificar viabilidad celular, contar y ajustar a la concentración de trabajo.

RECOMENDACIONES:

- La solución de congelamiento debe ser preparada justo antes de su empleo.
- El DMSO que contiene la solución de congelamiento es tóxica para las células cuando están en contacto a temperatura ambiente por un periodo mayor de 20 minutos. Por lo que se aconseja trabajar con rapidez y en un baño de hielo.
- Emplear solamente criotubos, ya que estos recipientes están diseñados para soportar tan bajas temperaturas.

8.3 EXTRACCION DE DNA GENOMICO MACROTECNICA.

INTRODUCCION:

El aislamiento del DNA es la parte fundamental para el desarrollo de los estudios de DNA, gracias a los logros alcanzados con la tecnología del DNA se ha brindado apoyo a la medicina, originándose lo que se conoce como medicina molecular. La medicina molecular pretende esclarecer cual es la causa de las enfermedades a nivel molecular. Su aplicación, ayuda a la identificación genes, conocer su secuencia nucleotídica y a descubrir cuales son la mutaciones que se presentan con mayor frecuencia en un gen.

FUNDAMENTO:

La extracción de DNA está basada en la lisis de membranas celulares y la degradación de las proteínas asociadas al DNA, las cuales son extraídas durante pasos de purificación, para posteriormente ser precipitado mediante sales de sodio (cloruro ó acetato de sodio) y etanol.

PROCEDIMIENTO:

1. Tomar 20 ml de sangre total, llevar hasta un volumen de 50 ml de PBS, con la finalidad de lavar.
2. Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
3. Desechar el sobrenadante (mediante una bomba de vacío).
4. Resuspender el paquete (botón celular) y llevar hasta un volumen de 50 ml con AKC. Mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Agitar de vez en cuando. En este paso se lisan los eritrocitos.
5. Centrifugar 10 min a 1500 rpm.

6. Desechar el sobrenadante.
7. Resuspender el botón celular con 50 ml de PBS, para lavar nuevamente.
8. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
9. Desechar el sobrenadante. Resuspender el botón celular con 50 ml de AKC.
10. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
11. Desechar el sobrenadante. Resuspender el botón celular con PBS.
12. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm,
13. Desechar el sobrenadante. Al botón celular adicionar 3 ml de RSB, mezclar suavemente para resuspender las células.
14. Agregar 300 µl de SDS al 10 % y 100 µl de proteinasa K (1 mg/ml). Mezclar e incubar toda la noche a Baño María entre 65 y 70 °C.
15. AL SIGUIENTE DIA: Saturar fenol con TRIS base 0.5 M pH=8.0, empleando una relación 1:1.
16. Adicionar 3.0 ml de fenol saturado a la mezcla (trabajar en campana de extracción). Mezclar por inversión. Este paso tiene el objeto de desproteinizar.
17. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm
18. Con una pipeta Pasteur extraer la fase inferior y desechar.
19. A la fase acuosa (lechosa) adicionarle 3.0 ml de fenol saturado. Mezclar por inversión,
20. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
21. Extraer la fase inferior y desechar.
22. Añadir a la fase acuosa 2 ml de bufer TE y 5 ml de cloroformo-alcohol isoamílico. Mezclar.
23. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
24. Extraer la fase inferior y desechar. Agregar nuevamente 5 ml de cloroformo-alcohol isoamílico.

25. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm. Repetir este paso hasta que la fase acuosa quede cristalina.
26. Agregar la décima parte del volumen final de muestra de NaCl 5 M para obtener una concentración final 0.5 M (p.ejem. para 5 ml de fase acuosa, agregar 500 μ l de NaCl 5 M. Mezclar.
27. Agregar 3 volúmenes de etanol absoluto frío. (p. ejem. 15 ml de alcohol para 5 ml de fase acuosa). El DNA precipita inmediatamente.
28. Separar el DNA y colocar en un tubo Eppendorf.
29. Lavar el precipitado con etanol al 70%.
30. Retirar la mayor cantidad posible de etanol.
31. Colocar el Eppendorf en un desecador a temperatura ambiente, hasta su completo secado.
32. Disolver el DNA en agua bidestilada.
33. Congelar hasta su uso.

8.4 EXTRACCION DE DNA GENOMICO MICROTECNICA.

PROCEDIMIENTO:

1. En un tubo Eppendorf adicionar 300 μ l de buffer de lisis y 150 μ l de sangre total (anticoagulada con EDTA). Mezclar por inversión e incubar por 5 min a 60°C.
2. Adicionar 450 μ l de cloroformo. Agitar 2 minutos.
3. Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.
4. Con una pipeta Pasteur extraer el sobrenadante (fase acuosa) y depositar en otro tubo Eppendorf.
5. Agregar al sobrenadante 450 μ l de agua destilada y 50 μ l de CTAB. Mezclar suavemente por inversión por 2 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos a 10 000 rpm.
7. Decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 10 μ l de NaCl 1.2 M y añadir 375 μ l de etanol absoluto frío. Agitar suavemente. El DNA se observa en forma de hilos.
8. Centrifugar 10 minutos a 14 000 rpm.
9. Decantar el sobrenadante. Adicionar al precipitado 500 μ l de etanol frío al 70%. Mezclar por inversión.
10. Centrifugar 5 minutos a 10 000 rpm.
11. Decantar el sobrenadante. Secar el DNA en un desecador.
12. Resuspender el DNA en 50 μ l de agua bidestilada. Una vez disuelto, congelar.

8.5 CUANTIFICACION DE DNA Y RNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

FUNDAMENTO:

Este método es empleado para estimar la concentración de DNA ó RNA por espectrofotometría de absorción ultravioleta, ya que los ácidos nucleicos tienen una absorbancia máxima a 260 nm, mediante éste método es posible también conocer su pureza ya que las proteínas tienen una absorbancia máxima a 280 nm, por lo que la relación de estas lecturas nos da una idea de la pureza de los ácidos nucleicos. Este procedimiento tiene un rango de sensibilidad de 5 ng DNA/ml a 50 µg DNA/ml.

Las lecturas de absorbancia a 325 nm pueden detectarnos partículas presentes en la solución o suciedad de las cubetas de lectura, mientras que los contaminantes que contienen enlaces peptídicos o moléculas aromáticas como las proteínas y fenol absorben a 230 nm.

PROCEDIMIENTO:

1. Pipetear 1 ml agua o buffer TNE (según sea el diluyente de la muestra) en una cubeta de cuarzo. Leer absorbancia a 325 nm y ajustar el cero del espectrofotómetro.
2. Tomar 5µl de la muestra de DNA o 4 µl de RNA y añadir 995 µl de agua destilada. Mezclar y transferir a una celda de espectrofotómetro. Leer absorbancia a 280, 260 y 230 nm.

3. Emplear la absorbancia a 260 para calcular la concentración de DNA. Para DNA una A_{260} de 1 corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$, ~ 37 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de cadena sencilla, 0 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA.
4. La concentración de DNA o RNA en microgramos por microlitro de muestra será 10 veces la lectura de absorbancia. Por ejemplo; si la absorbancia de la muestra diluida es 0.2 a 260 nm la muestra original contiene 2 μg de DNA ó RNA por microlitro.
5. La concentración de oligonucleótidos cortos de secuencia conocida pueden también ser determinados empleando A_{260} . Debe tenerse en cuenta que la composición de bases del oligonucleótido puede tener efectos significativos sobre la absorbancia. La absorbancia total es la suma de las contribuciones individuales de cada base.

COEFICIENTES DE EXTINCION MOLAR DE BASES DE DNA.

BASE	$\epsilon_{260\text{nm}}$
Adenina	15200
Citocina	7050
Guanina	12010
Timina	8400

El empleo de la relación A_{260}/A_{280} y A_{230} , A_{325} pueden auxiliar en la estimación de la pureza de la muestra de ácidos nucleicos. Valores de la relación A_{260}/A_{280} de 1.8 y 1.9 para DNA y de 1.9 a 2.0 para RNA nos indica que tenemos una preparación de alta pureza, ya que los contaminantes que absorben a 280 nm (proteínas) reducen el valor de ésta relación, en cuyo caso debe purificarse la preparación mediante el método descrito a continuación.

NOTA: Si la muestra contiene menos de 0.1 μ l / ml, la lectura de DO será tan baja que es poco confiable. En este caso usar una dilución menor y ajustar los cálculos acordemente.

8.6 PURIFICACION DE DNA.

PROCEDIMIENTO:

1. Añadir a la muestra de DNA disuelto en agua un volumen de fenol saturado más un volumen de cloroformo. Mezclar, por inversión para no fragmentar el DNA.
2. Centrifugar por 1 minuto a 15 000 rpm.
3. Remover la fase acuosa y transferirla a otro tupo Eppendorf.
4. Añadir a la fase acuosa la décima parte de NaCl 5M (a pH 7), para tener una concentración final de NaCl 0.5 M.
5. Añadir 2.5 volúmenes de etanol. Refrigerar por varias horas, para favorecer la precipitación.
6. Centrifugar por 10 min a 4 °C a 15 000 rpm.
7. Descartar cuidadosamente el sobrenadante, para remover las sales residuales, lavar el precipitado con etanol al 70%, mezclar.
8. Centrifugar 2 minutos a 4°C a 15 000 rpm.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Colocar el precipitado en un desecador.
11. Una vez seco el DNA, disolver en agua bidestilada.

8.7 PROCEDIMIENTO PARA LA TIPIFICACION DE HLA-DRB1, DQB1 Y DPB1 POR HIBRIDIZACION CON SONDAS DE OLIGONUCLEOTIDOS SECUENCIA ESPECIFICA (SSO).

INTRODUCCION:

Los estudios de biología molecular de los genes de MHC han dado las bases para el estudio de la gran diversidad de estos antígenos a nivel molecular. El análisis de la región HLA-D ha conducido a la identificación de un gran número de alelos de los genes DR, DQ, DM, DN y DO. Estos estudios también han proporcionado las herramientas necesarias para realizar el análisis del polimorfismo de sistema HLA a nivel molecular (genotipificación) empleando el método de hibridación con sondas de oligonucleótidos secuencia específica (SSO, oligotipificación de HLA).

La introducción de un paso de amplificación sobre el DNA blanco por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha hecho posible el empleo rutinario de esta técnica en la tipificación de HLA encausado al trasplante de órganos y médula ósea, así como en estudios a gran escala de la asociación de enfermedades con HLA o bien genética de poblaciones.

Este procedimiento se puede realizar básicamente en dos pasos, mediante los cuales se puede identificar la mayor parte de los alelos de DRB1, DRB3/B5, DQB1 y DPB1.

El primer paso (oligotipificación del DR genérico) identifica las principales especificidades serológicas DR1-14. Incluyendo 2 a 5 oligonucleótidos secuencia específica adicionales, la tipificación genérica puede resolver las especificidades DR1-16 ó DR1-18 respectivamente.

El segundo paso consiste en escoger sondas apropiadas dependiendo el DR genérico para obtener la identificación de los alelos DRB1, B3/B5, DQB1 y DPB1.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

(PCR).

El volumen total de la mezcla de reacción es de 50 µl el cual contiene:

1 µl de DNA genómico.

10 µl de Buffer de amplificación 5X.

1 µl de dNTPs 10 mM (0.2 mM).

1 µl de cada primer (25 pmol).

1 U de Taq polimerasa.

Las condiciones de los ciclos dependen de los primer empleados y se ennumeran en el cuadro 10.

Las muestras son calentadas primero a 100°C por 7 minutos antes de la adición de la Taq polimerasa. En todas las series de PCR se incluyen blancos para monitorear contaminación por arrastre. La eficiencia del PCR se prueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % en buffer TE.

La mezcla de reacción puede ser preparada con anterioridad (buffer de amplificación, dNTPs y primers), pueden ser irradiados con luz UV y almacenados a -20 °C en alícuotas de 100 microlitros.

INMUNOPUNTO.

Se mezcla una alícuota de 2.5 µl del amplificado con 50 µl de acetato de amonio 1M, ésta mezcla es aplicada manualmente sobre un filtro (Nytran, Schleicher & Schuell). La membrana se desnaturaliza en NaOH 0.4 N por 10 minutos, posteriormente se neutraliza con acetato de amonio 1M por 10 minutos y se seca a temperatura ambiente. Deben incorporarse controles tanto positivos como negativos para la hibridación en cada membrana que se emplee.

MARCAJE DE OLIGONUCLEOTIDOS.

El marcaje se realiza empleando [³²P] g-ATP y polinucleótido cinasa. La marca en estas condiciones se realiza en el extremo 5' del oligonucleótido. Cada reacción contiene 6 pmoles del oligo, 25 mCi de ATP, 1 ml de buffer cinasa (0.5M Tris-HCl, pH=7.6, 0.1 M de MgCl₂, 50 mM de ditioneitol (DTT), 1mM de espermidina, 1 mM de EDTA) y 5U de T4 polinucleótido cinasa (Pharmacia). Se incuba por 30 minutos a 37 °C y el oligo marcado se purifica sobre una columna de DE52 (Whatman, Cat. no. 4057-050). Después de pasar el oligo por la columna, ésta se lava con 10 ml de buffer de lavado (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH= 7.8, 10 mM EDTA) y el oligo purificado es eluido con fracciones de 0.2 ml del buffer de elución (1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH=7.8, 1 mM EDTA).

Puede realizarse también un marcaje no radioactivo en el extremo 3' empleando digoxigenina -11-2',3'- dideoxy - uridina -5'- trifosfato (DIG - 11 - ddUTP, Boehringer) y una transferasa terminal. La mezcla de reacción contiene 4 ml de buffer de marcado (200mM de K-cacodilato, 25mM Tris-HCl, pH=6.6, 0.25 mg/ml BSA), 4 ml de CoCl₂ (100 nmol), 100 pmol SSO, y 1 nmol DIG-11-ddUTP y 25 U de transferasa terminal

(TdT) en un volumen total de 20 μ l. La reacción se incuba a 37 °C por 20 minutos e inmediatamente se congela a -20 °C.

HIBRIDIZACION CON SSOs CON MARCA RADIOACTIVA.

1. PREHIBRIDIZACION: 30 minutos a 54 °C en buffer de hibridización de cloruro de tetrametilamonio (TMAC)
1. HIBRIDIZACION: 1 a 3 horas a 54 °C en buffer de hibridización TMAC con 0.5×10^6 cpm/ ml de la sonda SSO marcada. El buffer de hibridización TMAC contiene 50 mM Tris-HCl, pH=8.0, 3 M TMAC (Fluka), 2 mM EDTA, pH=8.0, solución Denhardt 5X, 0.1 % de dodecil sulfato de sodio (SDS), 100 mg/ ml de DNA desnaturalizado de esperma de salmón. La solución se filtra a través de un papel Whatman 3MM.

Las manchas se lavan dos veces por 10 minutos a temperatura ambiente en solución de SSPE 2X-0.1% SDS, una vez con buffer TMAC por 10 minutos a temperatura ambiente y dos veces en buffer TMAC a una temperatura dependiente del tamaño del oligo empleado (p, ej. 58 °C para 18 bases, 59 °C para 19 bases y 60 °C para 20 bases).

HIBRIDIZACION CON SSOs MARCADOS CON DIG.

1. Bloqueo: incubar las membranas por 30 min a 54 °C en solución de bloqueo (SSPE 4X, 1% de reactivo de bloqueo [Boehringer], 0.1% de laurilsarcosina [Sigma]).
2. Prehibridización: 30 min a 54 °C en buffer TMAC.
3. Hibridización: 4 horas a 54 °C en buffer de TMAC que contiene 2 pmol/ml de SSO-marcado con DIG. Buffer TMAC (50 mM Tris - Hcl, pH= 8.0, 3M TMAC, 0.1% SDS, 2 mM EDTA) . La membrana se lava 10 minutos a temperatura ambiente en SSPE 2X - 0.1% SDS y por 15 minutos en buffer TMAC a la temperatura adecuada según el tamaño del oligo (entre 58 - 60 °C , igual que en el caso anterior).

DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA.

Los siguientes pasos deben ser realizados en un incubador rotatorio a temperatura ambiente.

1. Lavar las manchas 5 minutos con el buffer 1.
2. Incubar por 30 minutos en el buffer 2.
3. Incubar por 1 hora en el buffer 2 con anti-digoxigenina marcada con fosfatasa alcalina en dilución 1:5000 (Boehringer). Esta solución puede reusarse, para lo cual debe conservarse a 4°C.
4. Lavar dos veces en buffer 1 por periodos de 15 minutos.
5. Incubar dos minutos en el buffer 3.
6. Cubrir las manchas con 0.5ml/ 15 cm² de solución AMPPD (dilución 1:100 en buffer 3 por 5 a 15 minutos a 37°C).
7. Secar las membranas y exponerlas a una película de rayos X por 90 minutos a temperatura ambiente.
8. Revelar.

Buffer 1: 0.1 M Tris-HCl, pH=7.5 - 0.15 M NaCl.

Buffer 2: 0.1 M Tris-HCl, pH= 7.5 - 0.15 M NaCl - 1% solución de bloqueo.

Buffer 3: 0.1 M Tris-HCl, pH=9.5 - 0.1 M NaCl - 50 mM MgCl₂.

Las membranas pueden reutilizarse después de un proceso de deshibridización por 30 minutos en NaOH 0.4 N y posterior neutralización en Tris-HCl 0.2 M pH= 7.5 - 0.1 X SSPE - 0.5 % SDS por 30 minutos a 42 °C.

MARCAJE NO RADIOACTIVO CON BIOTINA-dUTP.

Alternativamente, las sondas SSO pueden ser marcadas con biotina-11-dUTP y una transferasa terminal como se describió para el marcaje con DIG. La

hibridización se realiza bajo las mismas condiciones que para DIG-SSOs (TMAC) y la detección es realizada mediante un conjugado de avidina-fosfatasa alcalina y AMPPD como sustrato.

INTERPRETACION:

La identificación de los principales grupos de DR (DR1-DR14 Figura 8) (DR genérico) es realizado después de la amplificación del exón del primer dominio de DRB por medio de PCR empleando los primers DRP1 y DRP2 (Cuadro 10). El DNA amplificado es hibridado con 14 sondas SSO (Cuadro 11), mediante lo cual es posible la identificación de las especificidades de DR1-DR14, incluyendo los alelos raros tales como DRB1*0103, 1102/03, o 1303 (Cuadro 12). Algunas combinaciones raras pueden ser indistinguibles cuando se emplea el sistema de tipificación con 14 sondas-DR (Cuadro 13). Todas ambigüedades pueden ser resueltas mediante la hibridización con SSOs S57, E28 y R71 (Cuadro 11) o, alternativamente por PCR-grupo específico. La inclusión de dos sondas SSOs adicionales permite la detección de los alelos DRB5*0101 y 02, lo que aumenta la resolución de DR1 a DR16. La inclusión de tres SSOs para identificar los subtipos de DR52a, -52b, y 52c (Cuadro 11) permite la identificación de 28 especificidades de DR, incluyendo los subtipos de DR1, DR2, DR13 y DR14.

SUBTIPOS DE DR1.

Los tres subtipos de DR1 (0101,0102,0103) pueden identificarse por medio de la tipificación genérica empleando las sondas L11, E71 y AV86 (Cuadro 14). En individuos que presentan un segundo alelo positivo con E71 (ejem. DR13) o AV86 (ejem. DR12), sondas adicionales permiten la resolución de los subtipos de DR1 nQR71 (0101+0102) y G86 (0101+0103). Alternativamente el análisis de los subtipos de DR1 puede ser realizado por hibridización después de la amplificación específica de DRB1-DR1 por PCR.

SUBTIPOS DE DR2.

LOCUS DRB1.

Se realiza un PCR grupo específico empleando los primers DR2B1 y DRP2 (Cuadro 10) seguido de una hibridización con 5 sondas SSO para discriminar entre los alelos 1501, 1502, 1503, 1601, y 1602 (Cuadro 15). Los alelos más comunes 1501 y 1601 son identificados por una hibridización positiva con SSO V86 y F67, respectivamente.

LOCUS DRB5.

Los subtipos de DR2 pueden ser identificados después del PCR genérico empleando SSO D37 (DRB5*0101) y AV86 (DRB5*02). Una muestra positiva con DR11 (DR2), pero negativa con D37 y AV86 se tipifica como DRB5*0102 (Cuadro 15). Debido al fuerte desequilibrio de enlace entre DRB1 y DRB5 en caucásicos, la identificación de DRB1* 1501, 1502 y 16 puede ser resuelta por la oligotipificación de DRB5 con las sondas D37 y AV86. Alternativamente puede emplearse un PCR específico DRB1-DR2 o bien un PCR específico DRB5-DR2. Los haplotipos raros que pueden estar presentes en asociación con DRB1*0101-DRB5*0101, pueden ser tipificados como tripletes DR1/DR2/DRx dentro de la tipificación genérica.

SUBTIPOS DE DR4.

Todos los subtipos de DR4 son detectados después de la amplificación específica de DRB1-DR4 por PCR empleando los primers DRP4 y DRP2 (Cuadro 10) y posteriormente se realiza la hibridización con un panel de 8 sondas de oligos. Los patrones esperados para los 12 alelos de DR4 se muestran en el Cuadro 16.

ALELOS DRB1 Y DRB3 ASOCIADOS A DR52.

El grupo de DR52 comprende los antígenos definidos serológicamente como DR8, DR11, DR12, DR13, DR14, DR17 y DR18 codificados por el locus DRB1. Con excepción de DR8, todos estos antígenos están asociados con uno de los alelos DRB3 que codifica los alelos de DR52. Los análisis de secuenciación de DNA ha revelado que existe una gran diversidad dentro de los tipos serológicos, con un alto polimorfismo dentro de DR6. Se han descrito un total de 35 alelos DRB1 y 4 DRB3 dentro del grupo DR52. Algunos de estos alelos representan variaciones en sustituciones silenciosas, las cuales no son analizadas por éste método.

La tipificación genérica de DR con 17 SSOs, incluyendo las sondas para 52a, 52b y 52c, permite la identificación de algunos de los tipos más comunes DRB1 subtipos por la tipificación directa del locus DRB1 (0301, 1101/04, 1102/03, 1303, 1304, 1401/04) o por desequilibrio de unión con alelos de DR52 (0302,1301,1302). Una tipificación confiable para todos los alelos DRB1 asociados a DR52 puede realizarse después del PCR específico de grupo empleando un primer 5' correspondiente a la primera región hipervariable (HPV) de los alelos DRB1 asociados a DR52.

El cuadro 17 muestra 27 patrones de hibridización para para los subtipos alélicos DRB1 asociados a DR52 empleando 19 sondas SSO, incluyendo 8 sondas SSO del protocolo de tipificación de DR genérico.

Los dos subtipos de DR3 (N77 - y N37 positivos) son discriminados por la sonda E28 la cual identifica 0302 (y 1402, 1403, 1406), así como también DRB3*0301. El alelo DRB3*0301 es idéntico a 0302 excepto por un cambio en el aminoácido 86 de Gly a Val.

Los subtipos de DR11 son detectados empleando una combinación de siete sondas que identifican las secuencias de los polimorfismos en los codones 67, 71 y 86, incluyendo SSO G13 para la detección de DRB1*1105. En el 11 Taller Internacional de Histocompatibilidad se incluyeron subtipos adicionales de DR11: 11.5, idéntico a 1101, excepto para las posiciones 85-86 (Ala-Val), y 11.6; idéntico a 1102, excepto para la presencia de Gly en la posición 86.

Los alelos DRB1*1105 y 1202 (L37 positivos) son diferenciados por SSO F67/I67.

Los seis subtipos de DR13 pueden ser identificados por hibridación con nueve sondas SSO E71, K71, y N37 incluidos en el protocolo de tipificación de DR genérico. Para la diferenciación entre 1305 y 1306 y entre 0801 y 0803 se emplea SSO Y67 en lugar de Y 67-2, el cual identifica la secuencia I-DE.

Se requieren un gran número de sondas para la diferenciación de los subtipos de DR14. Como se muestra en la tabla 8, 11 SSO permiten diferenciar 7 patrones de hibridación diferentes que corresponde a los alelos 1401-1407.

Los cinco subtipos de DR8 (L74 y G13 positivos) se detectan mediante cinco sondas que identifican las secuencias polimórficas a las posiciones 57, 67 y 86. Los alelos 0804 y 0805 aparentemente se encuentran solamente en poblaciones descendientes de Africanos.

Las ambigüedades en la asignación de alelos, particularmente heterocigotos (Cuadro 17) se resuelven mediante el empleo de primer para PCR diseñados para amplificar selectivamente los subgrupos de alelos asociados a DR52. Primers específicos 5' EYSTS (aa 9 a 13) (Cuadro 10). ó EYSTG amplifica selectivamente haplotipos DR3+11+13+14 ó haplotipos DR8+12+1404, respectivamente. Alternativamente, pueden

simetizarse primer reversos en base a las diferencias en la posición 86, permitiendo la amplificación de subgrupos con las especificidades antes mencionadas. En los casos en que existe indeterminación que involucra a los alelos 1301/1302 (ejem. la combinación 1101/1301 contra 1104/1302), la asignación de 1302 puede deberse a una unión conservada de DRB1*1302 con DRB3* 0301.

Los tres subtipos de DR52 se diferencian después del PCR genérico mediante las sondas R11, H30 y E28 (Cuadro 11). La diferenciación de DRB3*0201 de 0202 (Val/Gly86) requiere de un PCR grupo específico empleando el primer 5' DRBAMP-52 95' CCCAGCACGTTTCTTGGAGCT 3') y el primer 3' DRBAMP-B (Cuadro 10) (alineación del primer: 60 °C; 1.5 mM MgCl₂).

OLIGOTIPIFICACION DE DQB1.

Sobre la base de las secuencias alélicas de DNA publicadas se ha designado una batería de 15 sondas SSO (Cuadro 11) las cuales permiten después de un paso de amplificación por PCR la diferenciación de 17 alelos DQB1 (Cuadro 18). La PCR es realizada con los primer DQBAMP-A y DQBAMP-B mencionados en el cuadro 10, y las sondas de oligos (Cuadro 11) que incluye 12 SSOs (19 nucleótidos) descritos anteriormente. La sonda L23 puede añadirse para discriminar 0401 de 0402. Además algunos patrones de hibridización indeterminados (ejem. 0502/0502 de 0502/0504, o 0603/0603 de 0602/0603, o 0301/0301 de 0301/0303, o 0602/0602 de 0602/0604) pueden resolverse con la inclusión de las sondas L26 y D57-3. Un alternativa para la oligotipificación de DQB1 el cual resuelve 14 alelos DQB1, se realiza mediante una amplificación selectiva con primers específicos 3' (aa 83 a 89) de DQB1*05 + 06 y de los alelos DQB1*03, respectivamente.

OLIGOTIPIFICACION DE DPBI.

El polimorfismo del locus DPBI está localizado en el exón del primer dominio y consiste en seis regiones hipervariables A (aa 8 a 11), B (aa 33 a 36), C (aa 55 a 57), D (aa 65 a 69), E (aa 76) y F (aa 84 a 87). La tipificación de DPBI se realiza mediante un PCR locus específico con primer DPBAMP-A y DPBAMP-B (Cuadro 10) y una posterior hibridización con un set de 16 SSOs (Cuadro 11), los cuales cubren la región hipervariable A (4 SSOs), B (1 SSO), C (4 SSOs), D (4 SSOs), E (1 SSO) y F (2 SSOs). Dos sondas adicionales (E1 y E3) se añaden al grupo para resolver indeterminaciones raras, las cuales se enumeran en la nota de la cuadro 20. Este protocolo de tipificación, el cual se ha adaptado para el análisis de haplotipos caucásicos, permite la resolución de los 22 alelos DPBI claramente (Cuadro 20). La identificación de la totalidad de alelos DPBI (37) puede requerir un total de 26 sondas SSO que cubran todas las regiones polimórficas del exón del primer dominio (cuatro sondas en la región A, cinco sondas en la región B, cinco sondas en la región C, seis sondas en la región D, tres sondas en la región E y tres sondas en la región F).

Lista de Primers (Secuencia 5' - 3') para oligotipificación de DRB/DQB/DPB.

Cuadro 10.

DR Genérico	DRP1: CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG DRP2: TCGCCGCTGCACTGTGAAG	Condición A	292 bp
DR2-DRB1	DR2B1: GTGGCAGCCTAAGAGGGAG DRP2: TCGCCGCTGCACTGTGAAG	B	259 bp
DR4-DRB1	DRP4: GAGCAGGTAAACATGAGTIG DRP2: TCGCCGCTGCACTGTGAAG	A	258 bp
DR52-DRB1	DRBAMP-3: CAGGTTTCFTGGAGTACTCTAC DRBAMP-B: CCGCTGCACTGTGAAGCCT	C	263 bp
DR3/11/6-DRB1	DRP5: GGAGTACTCTACGTCTGAG DRP2: TCGCCGCTGCACTGTGAAG	A	259 bp
DQB1	DQBAMP-A: CATGTGCTACTTCACCAACGG DQBAMP-B: CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC	B	214 bp
DPB1	DPBAMP-A: GAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT DPBAMP-B: GCCGGCCCAAAGCCCTCACTC	D	327 bp

Condiciones para PCR:

- A: 2 mM MgCl₂, dNTPs 200 μM, 95°C 1 min/55°C 0.5 min/72°C 0.5 min, 33 cycles
- B: 1 mM MgCl₂, dNTPs 50 μM, 95°C 1 min/55°C 0.5 min/72°C 0.5 min, 33 cycles
- C: 2 mM MgCl₂, dNTPs 200 μM, 95°C 1 min/63°C 0.5 min/72°C 1 min, 33 cycles
- D: 1.5 mM MgCl₂, dNTPs 200 μM, 95°C 1 min/60°C 0.5 min/72°C 0.5 min, 33 cycles

Lista de SSOs para oligotipificación de HLA clase II.

Cuadro 11.
Sondas SSO para tipificación genérica de HLA-DR.

	Oligo sec. 5' - 3'	AA	Especificidad.
L11	TTCAAACITTAAGCTGCCAC	9-14	DR1
D11	CTCATACTTATCTGCTGC	9-14	DR2
N77	TCTGCAGTAGTGTGCCACC	75-80	DR3
H33	CTCTGGTGATAGAAGTATC	29-35	DR4
E58	CCAGTACTCCTCATCAGGC	56-61	DR11
L37	AGCGCAGGAGCTCCTCCIG	34-39	DR12
G11	CTTATACTTACCCIGCCAC	9-14	DR7
L74	GTGTCCACCAGGGCCCGCC	71-77	DR8 (+1403)
Y26	CTGTGCAGATACCGCACCC	23-29	DR9
V11	CTCAAACITTAACCTCCTCC	9-14	DR10
E71	GGCCCGCTCGTCTCCAGG	68-73	DR13 (1301, 1302, 1304) DR1 (0103) DR4 (0402, 0414) DR11 (1102, 03)
K71	CGGCCCGCTGTCTCCAG	68-73	DR13-11AG (1303)
H60	GTTCAGTGTCCCGCAGCA	57-62	DR14 (1401, 04, 07)
N37	AGCGCACGTCTCCTCCIG	34-39	DR3 DR13 (1301, 02, 04, 06) DR14 (1402, 03, 06)
D37	GAAGCGCAAGTCTCCTCT	34-40	DR2 (DRB5*0101)
AV86	GCTCTCCACAGCCCCGTAG	83-88	DR2 (DRB5*02) DR1 (0102) DR12

Sondas SSO para el análisis de los subtipos de DRB1, DRB3, DRB5.

Cuadro 11 (Continuación).

	Oligo sec. 5' - 3'	AA	Especificidad.
G13	ACACTCACCCGTAGAGTAC	9-14	0801-0805, 1105, 1201, 1202, 1101
H30-2	ATAGAAGTGTCTGTCCAGG	27-32	1503
N37	AGCGCACGTTCTCCTCTTG	34-39	0301, -02, 1301, 1302, 1305, 1306, 1402, 1403, 1406
S37	AGCGCACGGACTCCTCTTG	34-39	0106
S57	GCCTAGCGCCGAGTACTG	56-61	0105, 0409-0412, 0801, 0803, 0805, 1303, 1304
H60	GTCCAGTGTCTCCGCAGCA	57-62	1401, 1401, 1407
F67	CTCCAGGAAGTCTCTCTG	64-69	1601, 1101, 1103-1105, 1202, 1305
I67	CTCCAGGATGTCTCTCTG	64-69	0803, 1102, 1201, 1301-1304, 1306, 0412
I67-2	ACATCCTGGAAGACGAGC	66-71	0103, 0402, 0414, 1102, 1301, 1302, 1304
E71	GGCCCGCTCGTCTCCAGG	68-73	0103, 0402, 0414, 1102, 1103, 1301, 1302, 1304
K71	CGGCCCGCTGTCTCTCCAG	68-73	1303
QK71	CGGCCCGCTGTCTCCAG	68-73	0401, 0409, 0413
QR71	CGGCCCGCCGCTCTCTCTC	69-74	0401, 0405, 0408, 0410-0411
QR71-2	CGGCCCGCCGCTCTCTCCAG	68-73	0101, 0102, 0403-0408, 0410, 0411, 1402, 1406
R71	GGCCCGCCGTCTCTCCAGG	68-73	1101, 1104, 1105, 1305, 1306, 0801-0805, 1403, 0412
R71-2	CGCCGGCGCGCCGTCTCTC	69-74	1601, 1602, DRB5*0101, 0102
RR71	AGCGGAGGCGGGCCGAGG	69-74	1401, 1404, 1405, 1407 (DRB*0101)
E74	GTGTCCACCTCGGCCCGCC	71-77	0403, 0406, 0407, 0411, 1401, 1104, 1405, 1407
L74	GTGTCCACCAAGGCCCGCC	71-77	0801-0805, 1403, 0412
V86	AACTACGGCGTGTGGAG	82-87	Val86
G86	AACTACGGCGTGTGGAG	82-87	Gly86
AV86	GCTCTCCACAGCCCCGTAG	83-88	0102, 1201, 1202 DRB5*02

Tabla 11.
(Continuación).
Lista de SSOs para oligotipificación de HLA Clase II.

	Oligo sec. 5' - 3'	AA	Especificidad
R11	CTCAGACTTACGCAGCTCC	9-14	DRB3*0101
H30	GGAAGTGTCTCTCCAGGAAC	26-31	DRB3*0201, 02
E28	GGAAGTATCTCTCCAGGAAC	26-31	DRB3*0301 DRB1*0302, 1402, 1403, 1406

Sondas SSO para oligotipificación de DQB1.

L23	GACCCGAGCTCGTGGGGGG	21-26	0101
L26	CGTCTTGTGACCAGATAC	25-30	0602, 0302, 0303
V27	GTGTCTGGTACAAAGACGC	25-30	0603, 0604
D37	AGCGCACGTCCACCACTCG	34-39	0601
I37	AGCGCACGATCTCTCTCG	34-39	0201
V38	GGAAGCGCACGTACTCCTC	35-40	0501, 0502, 05031, 05032
E45	CGGTACACCTCCACGTCGC	42-49	0301, 0304
A49	CGCGGTCACTGCCCGGTAC	47-52	0501
L56	CGCGGTCAAGCCGCCCCAG	53-58	0401, 0402
D57	GTACTCGGCATCAGGCCGC	55-60	0602, 0603, 05032
D57-2	GTACTCGGCATCAGGCCGC	54-60	0301, 0303
D57-3	GCGGCGCTGACCGCGAGT	54-59	0601, 05031
S57	GTACTCGGCGCTAGGCCGC	55-60	0502, 0504
V57	GTACACGGCAACAGGCCGC	55-60	0501, 0604, 0605
A57	CACGGCGGCAGGCCGCCCC	54-59	0302, 0304

Sondas SSO para oligotipificación de DPB1.

Tabla 11.

	Oligo Sec. 5' - 3'	AA	Especificidad.
A1	TCCCTGGAAAAGGTAATTC	7-12	0401, 0402, 0201, 0202, 0801, 0501, 1601, 1901, 2301, 2401
A2	CGTAACTGGTACACGTAAT	6-12	0301, 0601, 1101, 1301, 2001
A3	GCCGICCCCTGGTACACGTA	7-12	0101, 1501, 1801
A4	GCCGTAAC1GGTGCACGTA	7-12	0901, 1001, 1401, 1701
B1	CGAAGCGCGCGAAC1CCTC	33-38	0401, 2401
C1	AGTACTCCCGCAGCAGGCCG	53-58	0101, 1101, 0101, 1301, 1501, 2301
C2	AGTACTCCTCATCAGGCCG	53-58	0402, 0201, 0801, 1001, 1601, 1801
C3	AGTACTCCGCCCTCAGGCCG	53-54	0202, 0501, 1901, 2401
C4	CCAGTAGTCCCTCATCAGGC	54-59	0301, 0601, 0901, 1401, 1701, 2001
D1	CTGCCCGCTTCTCCTCCAG	66-71	0401, 0402, 0501, 0301, 0101, 1401, 1801, 2001, 2301, 2401
D2	CTGCCCGCTCCTCCTCCAG	66-71	0201, 0202, 0801, 0601, 0901, 1001, 1301, 1601, 1701, 1901
D3	CGCTICTCCTCCAGGAGGTC	64-69	0301, 1401, 2001
D4	CCTCCAGGAGGTCCTTCTG	62-67	0301, 0601, 1101, 1401, 1501, 2001
E1	GGACAGGATGTGCAGACA	73-79	0201, 0202, 0401, 0402, 0501, 0601, 1101, 1501, 1601, 1701, 1801, 1901, 2001, 2301, 2401
E2	GGACAGGGTATGCAGACA	73-79	0101, 0301, 0801, 0901, 1001, 1401
E3	GGACAGGATA1GCAGACA	73-79	1301, 1901
F1	AGGGTCATGGCC1CCGCCA	83-89	0401, 0402, 0201, 0202, 2301, 2401
F2	AGGGTCACGGCCCTCGTCCA	83-89	0101, 0301, 0501, 0601, 0801, 0901, 1001, 1101, 1301, 1401, 1601, 1701, 1901, 2001

14 Tipificaciones Genéricas de SSOs-HLA-DR (DR1 a DR14).

Tabla 12.

	L11	D11	N77	H33	G11	L74	Y26	V11	E58	L37	E71	K71	H60	N37
DR1 (0101, 02)	+													
DR1 (0103)	+													
DR2 (DRB5)		+												
DR3			+											
DR4				+										
DR4 (0102, 14)					+									
DR7						+								
DR8							+							
DR9								+						
DR10									+					
DR11 (1101, 04, 05)										+				
DR11 (1102, 03)									+		+			
DR12										+				
DR13 (1301, 02)											+			+
DR13 (1304)											+			
DR13 (1305, 06)														+
DR13 (1303)												+		
DR14 (1401, 04, 07)													+	
DR14 (1402, 06)														+
DR14 (1403)						+								+

14 Tipificaciones Genéricas de SSOs-HLA-DR (DR1 a DR14).

Tabla 12.

	L11	D11	N77	H33	G11	L74	Y26	V11	E58	L37	E71	K71	H60	N37
DR1 (0101, 02)	+													
DR1 (0103)	+													
DR2 (DRB5)		+												
DR3			+											
DR4				+										
DR4 (0102, 14)					+									
DR7					+									
DR8						+								
DR9							+							
DR10								+						
DR11 (1101, 04, 05)										+				
DR11 (1102, 03)									+		+			
DR12										+				
DR13 (1301, 02)											+			+
DR13 (1304)											+			
DR13 (1305, 06)														+
DR13 (1303)												+		
DR14 (1401, 04, 07)													+	
DR14 (1402, 06)														+
DR14 (1403)						+								+

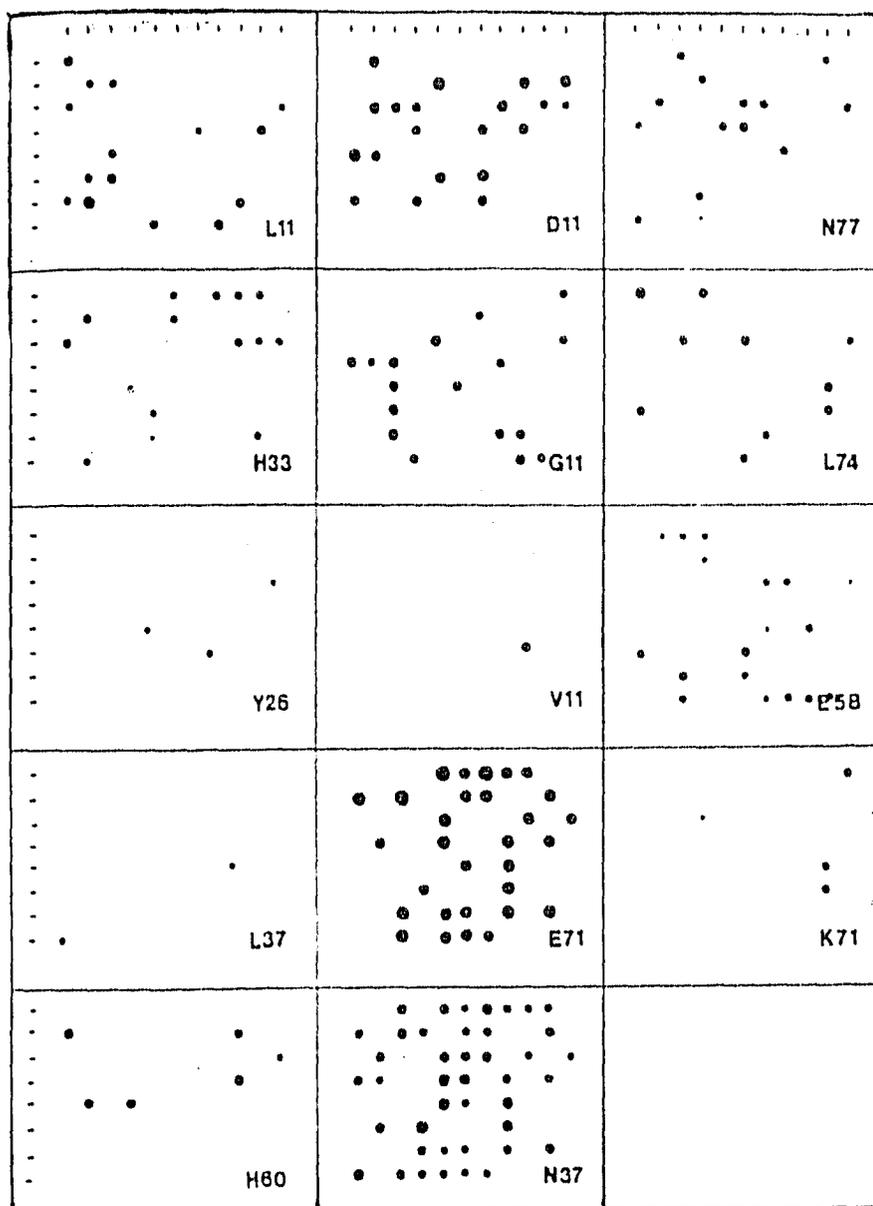


Figura 9.

Catorce análisis de tipificación de SSOs-DR genético. 64 muestras de DNA de donadores voluntarios de médula ósea se analizaron por PRC para DR genérico (primers DRP1 y DRP2). El DNA amplificado fué analizado por - inmunopunto sobre 14 membranas de nylon e hibridizadas con sondas SSO marcadas con $14[^{32}\text{P}]$.

Cuadro 13.
Lista de patrones de hibridización con interpretaciones alternativas.
(Tipificación de DR-genérico con 14 SSOs).

SSOs positivos		Interpretación alternativa.
L11 + E71	0103/0101,02 ó 03	- 1304/0101, 02 ó 03 ^a
H33 + E71	0402/04	- 1304/04 ^a
E58 + E71	11/1102,03	- 11/1304 ^a
N77 + N37	0301,02/-	- 0301, 02/1305, 06 ó 1402, 06 ^b
E71 + N31	1301,02 ó 04/-	- 1301, 02 ó 04/1305, 06 ó 1402, 06 ^b
L11 + E71 + N37	0101/1301, 02	-0103/1305, 06 ó 1402, 06 ^b
H33 + E71 + N37	04/ 1301, 02	- 0402/1305, 06 ó 1402, 06 ^b
E58 + E71 + N37	1101,04/1301, 02	- 1102, 03/1305, 06 ó 1402, 06 ^b

^a Estas ambigüedades pueden ser resueltas hibridando con SSO s57, la cual identifica el alelo 1304.

^b Estas ambigüedades se resuelven hibridando con SSO E28 la cual identifica a los - alelos 1402,03,06 y R71 identifica 1305,06.

Cuadro 14.
Oligotipificación para subtipos de DR1.

		L11	E71	AV86	QR71	G86
PCR	0101	+	-	-	+	+
Genérico	0102	+	-	+	+	+
	0103	+	+	-	-	+

Oligotipificación para subtipos de DR2.

Cuadro 15.

		D11	D37	AV86					
PCR	DRB5*0101	+	+	-					
Genérico	0102	+	-	-					
	0201/02	+	-	+					

		D11	H30-2	D37	F67	R71-2	V86	G86	AV86
PCR	1501	-	-	-	-	-	+	-	-
Específico	1502	-	-	-	-	-	-	+	-
DRB1	1503	-	+	-	-	-	+	-	-
	1601	-	-	-	+	+	-	+	-
	1602	-	-	-	-	+	-	+	-

PCR	0101	+	-	+	+	+	-	+	-
Específico	0102	+	-	-	+	+	-	+	-
DRB5	0201/02	+	-	-	-	-	-	-	+

Oligotipificación para subtipos de DR4.

Cuadro 16.

	S37	S57	E71	QR71	QK71	E74	G86	V86
0401	-	-	-	-	+	-	+	-
0402	-	-	+	-	-	-	-	+
0403	-	-	-	-	-	+	-	+
0404	-	-	-	+	-	-	-	+
0405	-	+	-	+	-	-	+	-
0406	+	-	-	-	-	+	-	+
0407	-	-	-	-	-	+	+	-
0408	-	-	-	+	-	-	+	-
0409	-	+	-	-	+	-	+	-
0410	-	+	-	+	-	-	-	+
0411	-	+	-	-	-	+	-	+
0412	-	+	-	-	-	-	-	+
0413	-	-	-	-	+	-	-	+
0414	-	-	+	-	-	-	+	-

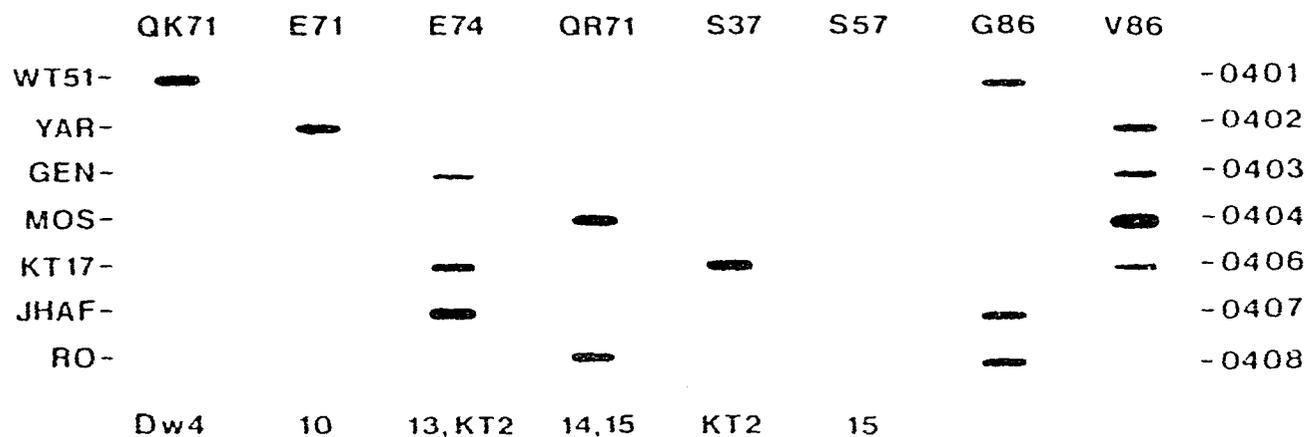


Figura 10. Oligotipificación para subtipos de DR4. Muestras de DNA de individuos homocigotos (WT51, YAR, KT17, JHAF) ó heterocigotos (GEN, MOS, RO) fueron amplificadas con los primers DRP4, DRP2, transferidas a membranas de nylon e hibridizadas con SSOs marcadas con 8[³²P] para la discriminación de subtipos de DR4.

Oligotipificación de alelos DRB1 del grupo DR52.

Cuadro 17.

	N77	E58	L37	E71	K71	H60	L74	N37	G13	E28	S57	I67	I67	I67-2	R71	QR71-2	RR71	V86	G86
0301	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
0302	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0303	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1102	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
1103	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
1104	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
1105	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1201	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1202	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1301	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
1302	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
1303	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
1304	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
1305	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1306	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
1401	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1402	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1403	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
1404	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
1406	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
1407	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

(Continuación).

Cuadro 17.

	N77	E58	L37	E71	K71	H60	L74	N37	G13	E28	S57	F67	I67	I67-2	R71	QR71-2	RR71	V86	G86
0801	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
0802	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
0803	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
0804	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
0805	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-

Nota: Las siguientes combinaciones presentan patrones de hibridización semejantes con las 20 sondas SSO empleadas para la tipificación de alelos DRB1 (DR52).

- 0801/1201 = 0803/1202
- 0801/1101 = 0802/1104
- 0802/1301 = 0804/1302
- 1101/1301 = 1104/1302 = 1102/1305
- 1101/1401 = 1104/1407
- 1101/1406 = 1101/1402
- 1301/1402 = 1302/1406
- 1301/1407 = 1302/1401
- 1401/— = 1401/1405
- 1401/1402 = 1406/1407
- 1401/1401 = 1401/1405
- 1401/1407 = 1405/1407

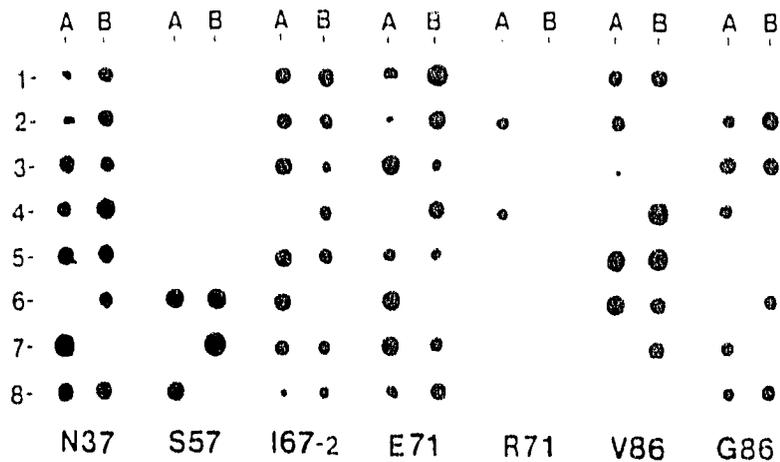


Figura 11. Oligotipificación para subtipos de DR13. Se seleccionaron voluntarios heterocigotos cuya tipificación genérica era compatible con DR13 (SSOs E71, K71, N37). Las muestras se amplificaron con los primers DRBAMP-3 y DRBAMP-B, transferidas a membranas de nylon, e hibridizadas con 7 sondas - marcadas con DIG. Las tipificaciones de las células son:- A1: DRB1*0401/1301; A2: 1101/1301; A3: 04/1302; A4: 1601/1305; A5: 07/1301; A6:1001/ 1304; A7:07/ 1302; A8: 1302 / 1301; B1: 0404/1301; B2: 1501/1302; B3: 1501/1302; B4 07/1301; B5: 07/1301; B6: 0301/1303; B7: 07/1304; B8: 1501/-1302.

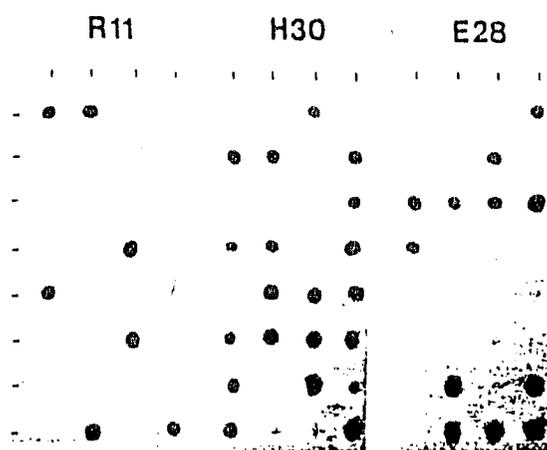


Figura 12.

Ejemplo de oligotipificación de DRB3. Las muestras de DNA fueron amplificadas con los primer DRP1 y DRP2 -- (tipificación genérica de DR), transferidas paralelamente en filtros e hibridizadas con las sondas SSO R11 (52a), H30 (52b) y E28 (52c), marcadas con DIG.

Cuadro 18.
Oligotipificación para alelos DQB1.

	L23	L26	V27	D37	I37	V38	E45	A49	L56	D57	D57-2	D57-3	S57	V57	A57
0501	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
0502	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
05031	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
05032	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
0601	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
0602	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0603	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0604	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
0605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
0201	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0301	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
0302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
03031/32	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
0304	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
0401	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
0402	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Cuadro 19.
Asociaciones Alternativas de DRB1-DQB1

DRB1*0103	DQB1*0501 or 0301
DRB1*0401/0403	DQB1*0301 or 0302
DRB1*07	DQB1*0201 or 0303
DRB1*1104	DQB1*0301 or 0603 or 0501
DRB1*1301	DQB1*0603 or 0301
DRB1*1302	DQB1*0604 or 0605
DRB1*1501	DQB1*0602 or 0502 or 0603

OLIGOTIPIFICACION PARA 22 ALELOS DE DPB1.

Cuadro 20.

	A1	A2	A3	A4	B1	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4	E2	F1	F2
0401	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
0402	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
0201	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
0202	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
0101	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
0301	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
0501	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
0601	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
0801	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
0901	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
1001	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
1101	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1301	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
1401	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
1501	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1601	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
1701	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
1801	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1901	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
2001	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
2301	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
2401	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-

NOTA:SSO E1 es empleado para resolver las siguientes combinaciones ambiguas
 0101/0901 ó 1701, 0301/0901 ó 1701,
 1001/0901 ó 1707, 0301/0101 ó 1501.
 SSO E3 es empleado para resolver la combinación:
 0201/0501 de 0402/1901.

OLIGOTIPIFICACION PARA 22 ALELOS DE DPB1.

Cuadro 20.

	A1	A2	A3	A4	B1	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4	E2	F1	F2
0401	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
0102	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
0201	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
0202	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
0101	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
0301	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
0501	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
0601	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
0801	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
0901	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
1001	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
1101	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1301	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
1401	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
1501	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1601	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
1701	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
1801	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
1901	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2001	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
2301	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
2401	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-

NOTA:SSO E1 es empleado para resolver las siguientes combinaciones ambiguas
 0101/0901 ó 1701, 0301/0901 ó 1701,
 1001/0901 ó 1707, 0301/0101 ó 1501.
 SSO E3 es empleado para resolver la combinación:
 0201/0501 de 0402/1901.

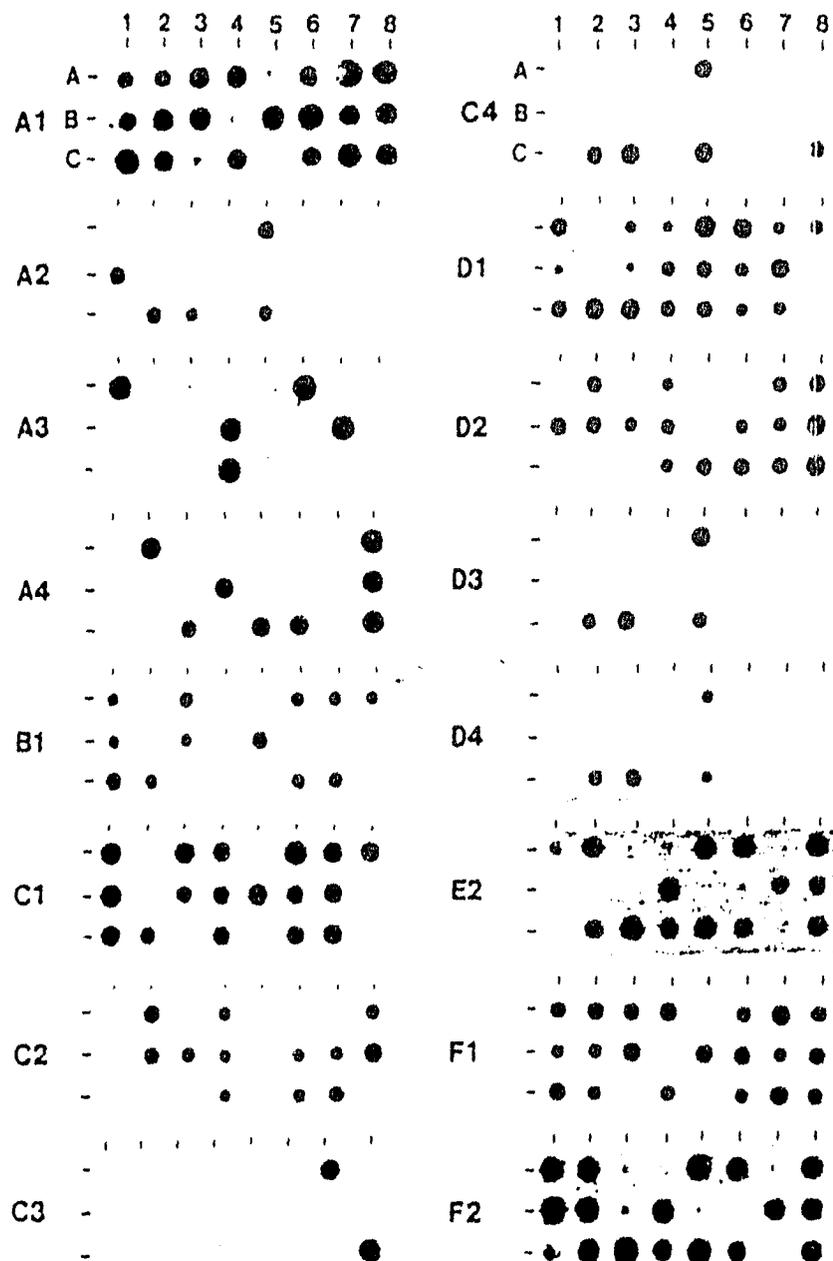


Figura 13. Oligotipificación para alelos DPB1, 24 muestras de DNA fueron amplificadas con los primers DRPAMP-A y DPBAMP-B, transferidos a 16 filtros e hibridizadas con sondas SSOs radioactivas. La tipificación obtenida a través de un programa de computadora es la siguiente: A1: 0101/0401; A2: 0201/1001; A3: 0401/-; A4: 0201/2301; A5: 0301/- : A6: 0101/0401; A7:0202/0401; A8:-0401/1001; B1: 0401/1301; B2: 0201/1601; B3: 0201/0401; B4: -0101/1001; B5: 0401/-: B6: 0201/2301; B7: 0101/0201: B8: 0201/1001; C1: 0401/-: C2: 0301/0401; C3: 0301/1401; C4: 0101/0201 C5: 0301/0901; C6: 0401/1001; C7: 0201/0401; C8: 0202/0901.

8.8 TIPIFICACION DE HLA-DR POR AMPLIFICACION POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA CON PRIMERS SECUENCIA ESPECIFICA (SSP).

INTRODUCCION:

La variación alélica ha sido tradicionalmente determinada fenotípicamente, pero actualmente es más seguro investigarla mediante técnicas de biología molecular, tanto indirectamente por medio del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) o directamente mediante las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la determinación del polimorfismo alélico por amplificación por PCR con primers secuencia específica (PCR-SSP), los primers (iniciadores) de oligonucleótidos son diseñados para obtener la amplificación de alelos específicos o grupos de alelos. El método de tipificación está basado en el principio de que un primer que es perfectamente complementario es más eficiente cuando se emplea en una reacción de PCR que cuando se emplean primers con una o varias diferencias en la secuencia complementaria del primer, especialmente durante los primeros ciclos que son críticos (Figura 14). La especificidad del sistema de tipificación es parte de la PCR, la cual reduce la postamplificación de las muestras procesadas. La asignación de los alelos está basada en la presencia o ausencia del producto amplificado, el cual se detecta mediante una electroforesis en gel de agarosa y fluorescencia.

La amplificación PCR alelo-específica es capaz de distinguir entre dos alelos - "silvestre" y "mutante" -, esta técnica fue inicialmente descrita para el diagnóstico de la anemia de células falciformes, deficiencia de α_1 antitripsina y fibrosis cística. En los últimos años, el sistema se ha introducido para la tipificación de HLA clase II, por Olerup y col. para subtipos de DRB1*01, para la identificación de los alelos DRB1 subgrupos de DRw53 (DRB1*0401-DRB1*0411, DRB1*07 Y DRB1*0901 y tipificación PCR-SSP para DR de "baja resolución" (p.ejem. identificación de la variabilidad alélica correspondiente a las series definidas serológicamente DR1-DR18) y para otras asignaciones de los muchos alelos de DRB1, para subtipos de DRB3 y para tipificación de DR1-DR18 empleando dos rutinas de amplificación por PCR.

MÉTODOS.

PRIMERS PARA AMPLIFICACION:

Las secuencias, localización y especificidades de los alelos y grupos de primers específicos empleados para la tipificación PCR-SSP de DR de "baja resolución", p.ejem. asignación de la variabilidad alélica correspondiente a SRI-DRw18, así como también las superespecificidades DRw52, DRw53 y DRw51, subtipos de DR4 y DR1 se enumeran en las tablas 21 a 23.

Cada reacción de PCR incluyen pares de primers que amplifican el tercer intrón de los genes DRB1. Estos dos primers son complementarias a secuencias no alélicas y funcionan como un control positivo interno de amplificación. El primer-5' C5 3' TGC CAA GTG GAG CAC CCA A 3' (complementario a los codones 173 a 179 en el extremo

3' del exon 3) y el primer - 3' 5' GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT³ (complementario a los codones 193 a 200 en el extremo 5' del exon 4) los cuales producen un fragmento de 796 pb (pares de bases). La concentración de los primers control C3 y C5 se mantienen en una concentración 5 veces menor que los primers alelo- y grupo-específicos para incrementar la especificidad y reducir los falsos negativos debido a una reacción de competencia. La aparición de productos amplificados alelo o grupo-específicos pueden estar acompañados por una eficiencia de amplificación reducida de el par de primers control.

Es importante que los primers que van a ser empleados en la tipificación PCR-SSP se purifiquen por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para disminuir los amplificados que pueden causar falsos positivos o falsos negativos. Es recomendable también que los primers sean probados con un panel de DNAs representativos. 1 μ M de un primer puede ser suficiente para 10,000 tipificaciones (si la reacción se realiza en un volumen final de 13 μ l).

MEZCLAS DE PRIMERS.

Preparar la mezcla de primers, que contiene todos los componentes para la reacción de PCR, excepto la Taq polimerasa y DNA, conservada en alícuotas de 1 ml, la cual es suficiente para 100 tipificaciones. Esta mezcla puede ser almacenada por meses a -20 °C, evitando la descongelación repetida. Durante las tipificaciones la mezcla debe mantenerse a 4 °C. Es recomendable que cada lote de mezcla sea probado con controles de DNAs (dos positivos y dos negativos).

Composición de la mezcla de primers.

1. Buffer PCR 10X, 120 μ l (500 mM KCl/100 mM Tris-HCl, pH=8.3/15 mM MgCl₂/ 0.01% p/v gelatina).
2. dATP, dCRP, dGTP y dTTP (10 mM) 26 μ l de cada uno.
3. Primers alelo- y grupo específicos, 1 μ M.
4. Primer control C3 y C5, 0.2 μ M.
5. Agua destilada autoclaveada cbp 1 ml.

Una mezcla de primers de 1 ml es suficiente para 100 reacciones de PCR de 13 μ l, p.ejem. para un volumen final de 1.3 ml. Las concentraciones de los primers alelo- y grupo-específicos y los primers control deben ser 1 y 0.2 μ M del volumen final de la mezcla de reacción.

Mezcla de primers para tipificación PCR-SSP para DR de "baja resolución".

Se emplean 21 mezclas de primers: 17 para la asignación de DR1-DRw18 y 3 para la identificación de los grupos de alelos DRB3, DRB4 y DRB5 (Cuadro 21). La última mezcla de primers sirve como un control negativo y contiene solamente el par de primers control. La mayor parte de mezclas de primers contienen un primer 5' un primer 3', y algunos pocos contienen 3-4 primers. Todos excepto 2 (marcados por "*" en el cuadro) de las 17 mezclas de primers se emplean en la identificación de DR1-DRw18, amplifican solamente los alelos de las especificidades definidas serológicamente.

Mezclas de primers para la subtipificación de DR4.

Son necesarias ocho mezclas de primers para la identificación de las 11 especificidades de los alelos de DR4 (DRB1*0401 - DRB1*0411). Todos contienen el mismo primer 5' pero diferentes primer 3' (Cuadro 22).

Mezcla de primers para la subtipificación de DR1.

Para la subtipificación de DR1 (DRB1*0101 - DRB1*0103) se emplean cuatro mezclas de primers. Todos contienen el mismo primer 5' pero diferentes primers 3' (Tabla 3).

Mezclas de reacción.

La reacción de amplificación se simplifica enormemente debido a que las mezclas de reacción se preparan con anterioridad. Todos los componentes se pipetea a temperatura ambiente. Agregar los componentes para la reacción de amplificación en el siguiente orden:

1. 10 μ l de mezcla de primers, mezclar la solución en un Vortex.
2. 2 μ l de DNA, 50 ng/ μ l. Emplear el DNA disuelto en agua (no disolver el DNA en buffer TE ya que el EDTA inhibe la Taq polimerasa).
3. 0.5 U de AmpliTaq (Perkin-Elmer Cetus Corporation) en 1 μ l de solución (diluir la enzima 1:10 en buffer para PCR 1X).

Colocar todos los componentes de reacción en el fondo de un tubo para PCR. Cambiar la punta de la pipeta al adicionar cada componente. No es necesario

mezclar los componentes de la reacción. Cuando se emplea el sistema termociclador para PCR Gene-Amp 9600 (Perkin Elmer Cetus Corporation), no es necesario colocar aceite mineral.

Parámetros para los ciclos de PCR.

Se emplean los mismos parámetros para todas las reacciones de tipificación PCR-SSP para tipificación de DR de “baja resolución”, subtipos de DR4 y DR1.

La amplificación convencional se realiza por 30 ciclos a las siguientes temperaturas : desnaturalización a 94 °C por 20 seg, alineación a 65 °C por 50 seg. y extensión a 72 °C por 20 seg. Para DNA extraído por métodos rápidos se emplean 32 ciclos: desnaturalización a 94 °C por 20 seg. y un paso combinado de alineación y extensión a 65 °C por 60 seg.

No se requieren pasos de desnaturalización o de extensión final.

El sistema para la tipificación de DR PCR-SSP se ha desarrollado para la segunda generación de termocicladores. Las principales ventajas de estos termocicladores son: tienen un bajo gradiente de calentamiento en la placa térmica, requieren bajos volúmenes de reacción, son más rápidos, más seguros y no es necesario el empleo de aceite mineral. Los termocicladores antiguos pueden usarse si no existe un gradiente de temperatura mayor de 1 °C en la placa de calentamiento, incrementando el volumen de reacción a 25 µl, utilizar aceite mineral sobre la preparación, se prefiere el empleo de tubos de reacción de pared delgada, los pasos de los ciclos de la PCR deben en la mayor parte de los casos extenderse, y la temperatura de alineación debe incrementarse de 1° a 2°C.

Visualización de los amplificadores mediante electroforesis en gel de agarosa.

La ausencia o presencia de productos de PCR son visualizados por electroforesis en gel de agarosa.

1. Preparar un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 0.5 X (89 mM Tris base/89 mM de ácido bórico/2 mM de EDTA, pH= 8.0):
 - Disolver la agarosa por calentamiento. Enfriar a 60 °C. Agregar bromuro de etidio (0.5 µg/ml de solución de gel).
 - Vaciar la agarosa sobre el molde para el gel, formando una capa de aproximadamente 4 mm de grosor y pozos de 3 mm. Dejar gelificar por un periodo de 10 a 20 min.
2. Los productos de amplificación se colocan en el gel después de la adición de 2.5 µl de buffer de carga (30% v/v glicerol, teñido con azul de bromofenol y xilen-cyanol) a cada tubo de PCR.
3. Correr los gels en buffer TBE (sin recirculación de buffer), los minigeles (8.5 X 10 cm) por 10 a 15 min a 15 V/ cm; los gels grandes (20 X 20 cm) por 25 a 30 minutos de 7 a 8 V/ cm.

Examinar los gels en un transiluminador con luz ultravioleta (UV) y fotografiar.

RESULTADOS ESPERADOS.

No se han encontrado falsos positivos ni falsos negativos con ésta técnica. La frecuencia de fallas técnicas es baja, aproximadamente del 1%. La concordancia entre la tipificación por PCR-SSP para DR “de baja resolución” y el análisis por RFLP con TaqI para DRB-DQA-DQB es del 100% en 30 líneas celulares y en individuos. La

concordancia entre las subtipificaciones de DR1 y DR4 empleando la técnica de PCR-SSP o una amplificación por PCR grupo específica seguida por hibridización con sondas de oligonucleótidos secuencia específica (SSO) es también 100%.

Tipificación por PCR-SSP para DR de “baja resolución”.

Este método es capaz de distinguir la variabilidad alélica correspondiente a las especificidades definidas serológicamente DR1-DRw18, con una mezcla de primers para cada especificidad serológica, excepto para DRw13 y DRw14. Debido a que el grupo de DRw6 muestra secuencias diferentes dentro de los alelos DRB1, deben emplearse dos mezclas de primers para DRw13 y DRw14. Todas las mezclas de primers amplifican solamente alelos pertenecientes a la misma especificidad serológica, excepto las mezclas de primers 18* y 14.2* (Cuadro 21). Como puede observarse en el Cuadro 21, el alelo raro DRB1*1305 no puede distinguirse de los alelos DRB1*1402 y DRB1*1403 por el grupo de mezclas de primers empleados.

El DNA de individuos homocigotos amplifica solamente en una de las 17 reacciones de PCR (DR1-DRw18), a excepción de DR3 y algunos DR6. El DNA de individuos DRw17 positivos puede amplificar con las mezclas de primers 3 y 17, mientras que una muestra de DNA de un individuo DRw18 puede amplificarse con las mezclas de primers 3 y 18. Una muestra DRB1*1302 puede ser amplificada por la mezcla de primers 18* y 13.1. El hecho de que el alelo DRB1*1302 se amplifique con la mezcla de primers 18*, mientras que DRB1*1301 no, permite la diferenciación de éstas dos especificidades

La inclusión de mezclas de primers 52, 53 y 51 (Cuadro 21), amplifica los alelos DRB3, DRB4 y DRB5, respectivamente, en el grupo de reacciones de PCR realizadas para tipificación de DR de “baja resolución” da un control adicional sobre la

especificidad tipificada. DNA de individuos positivos para DRw11, DRw12, DRw13, DRw4, DRw17, DRw18 pueden amplificarse empleando la mezcla de primers 52. El DNA de individuos DRw8 que reaccionan con el antisuero DRw52, no son amplificados por la mezcla de primers 52, ya que el haplotipo DRw8 no lleva el gen DRB3. La mezcla 53 puede producir productos de amplificación en todos los individuos DR4, DR7, y DR9, ya que expresan el gen DRB4. Finalmente el DNA de individuos DRw15 y DRw16 se amplifica mediante la mezcla 51. Todas las especificidades de DR excepto DR1, DRw8 y DRw10 se amplifican mediante una de las mezclas de primers 51, 52 o 53.

Todas las posibles combinaciones heterocigotas para DR1 a DRw18 deben producir un patrón de amplificación único, fácilmente distinguible uno de otro y además mostrar patrones de amplificación de homocigotos. La excepción es para los alelos DRB1*1305, DRB1*1402 y DR1*1403 que tienen patrones de amplificación idénticos. Una mezcla de primers específicos DRB1*1305 permite la asignación de todas las combinaciones homo- y hetero-cigotas, sin embargo una persona homocigota para 1305 es indistinguible de individuos heterocigotos a 1305/1402-1403.

Ya que la asignación es realizada por la presencia de un producto de amplificación en el sistema de tipificación PCR-SSP, deben incluirse un par de primers no alélicos como control positivo en cada reacción y es esencial para la identificación de individuos homocigotos para DR. La ausencia de amplificación alelo específica en presencia de amplificación del par de primers control, demuestra que el proceso enzimático está funcionando correctamente, validando la asignación de homocigosidad.

Subtipificación de DR4.

Individuos heterocigotos DR4.

Los 11 alelos reconocidos (DRB1*0401 a DRB1*0411) reconocidos en 1991 producen productos de amplificación únicos en individuos heterocigotos para DR cuando se emplean las mezclas de primers 4:01 a 4:08 (Cuadros 22 a 24). Los patrones producidos son fácilmente distinguibles.

Individuos homocigotos para DR4.

En individuos homocigotos para DR4 solamente 27 de las 66 combinaciones posibles para homo y -heterocigotos son únicas cuando se emplean las 8 mezclas de primer para DR4 (4:01 a 4:08) (Cuadro 25). Las combinaciones homo- y heterocigotas más frecuentemente encontradas DRB1*04 muestran los patrones de amplificación DRB1*0401/DRB1*0401 y DRB1*0401/DRB1*0408 (Cuadro 25).

De las 39 combinaciones DRB1*04 que muestran los patrones de amplificación, 24 pueden ser diferenciados mediante el uso de 3 primers 3' adicionales (Cuadro 25). Las restantes 15 combinaciones DRB1*04 no pueden ser separadas aún cuando 11 reacciones DR4 pueden realizarse en forma individual, con primers complementarios a la región alélica variable del segundo exón. Para diferenciar las combinaciones restantes de DRB1*04 deben determinarse las localizaciones *cis* y *trans* de tres regiones polimórficas, lo cual puede acompañarse de un segundo tratamiento asimétrico sobre los productos amplificados por PCR empleando las mezclas de primer 4:07 ó 4:08 (Cuadro 25).

Subtipificación de DR1.

Para la tipificación de individuos DR1 son necesarias cuatro mezclas de primers 1:01 - 1:04 (Cuadro 23) para distinguir individuos heterocigotos y homocigotos, sin embargo para la tipificación de individuos homocigotos puede prescindirse de las mezclas 1:01 y 1:03.

CONSIDERACIONES:

La calidad y la pureza de los primers para la PCR y la seguridad del termociclador son los factores más importantes para la realización adecuada de la tipificación por PCR-SSP. Se recomienda purificar los primers mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y que exista un gradiente de temperatura menor de 1 °C en el la placa de calentamiento de termociclador, para obtener resultados reproducibles.

La cantidad y calidad del DNA también es importante en los resultados. Cantidades menores de 50 ng de DNA en una mezcla de reacción de 13 µl puede producir amplificaciones inespecíficas. Cuando no se emplea un DNA de una pureza adecuada, p.ejem. en muestras que han sufrido calentamiento o lisis de leucocitos es frecuente que falle la amplificación y se incremente la posibilidad de amplificaciones falsas positivas.

La temperatura de alineación es crítica. La mayor parte de las mezclas de primers empleadas para la tipificación de DR de “baja resolución”, DR4 y DR1 pueden tolerar una variación en la temperatura hasta de 2 °C. Sin embargo el rango de temperatura de varias mezclas de primers puede sobreponerse, por lo que la temperatura de alineación debe mantenerse dentro de un rango de ± 5 °C. Una temperatura de

alineación menor puede resultar en amplificaciones falsas positivas, mientras que una temperatura de alineación mayor puede conducir a la obtención de resultados falsos negativos.

VENTAJAS DEL METODO:

Esta metodología comparada con otras técnicas empleadas para la tipificación de HLA clase II como PCR-SSO, inmunopunto reverso, PCR-RFLP, secuenciación directa, PCR "fingerprints" y polimorfismo conformacional de cadena sencilla, ofrece varias ventajas como son:

1. La técnica tiene un alto grado de resolución. Cada reacción de PCR, p. ejem. cada par de primers define dos sitios polimórficos cercanos en posición *-cis*, lo cual facilita la tipificación de individuos heterocigotos y en muchos casos pueden proporcionar mayor información que, por ejemplo, una amplificación genérica de DRB seguida de una hibridización con SSO.
2. Las tipificaciones por PCR-SSP son muy fáciles de interpretar en individuos heterocigotos para DR.
3. La eficiencia de la Taq polimerasa para la extensión empleando primers complementarios en su totalidad, es una reacción química más precisa que la hibridización con SSOs, las cuales dependen solamente de las condiciones astringentes empleadas.
4. La especificidad de la técnica PCR-SSP es parte de la reacción de la PCR, donde el análisis posterior a la amplificación es muy rápido y simple comparado con otras tipificaciones basadas en la PCR, donde debe realizarse un paso de gran especificidad posterior a la PCR. El método PCR-SSP puede automatizarse, especialmente si el paso

de detección en el gel de agarosa es reemplazado por un sistema de lectura basado en fluorescencia.

5. La técnica no es costosa y no requiere de un trabajo intenso. El costo de la tipificación de un individuo es independiente del número de individuos analizados simultáneamente.

Cuadro 21.
Secuencias de nucleótidos, Localización y Especificidades de los Primers empleados en la Tipificación PCR-SSP para DR de " Baja Resolución "

Mezcla Primers	Primer 5'	Secuencia	Loc. Codones	Primer 3'	Secuencia	Loc. Codones	Tamaño PCR Producción	Especificidad.
1	5'01	5'TGTGCGCAGCTTAAGTTTGAAT ^{3'}	8-15	3'047	5'CTGCAC ^{3'} CTGTGAAGCTCTCAC ^{3'}	86-92	255	DRBI*0101-
15	5'02	5'TCCTGTGGCAGCCTAAGAG ^{3'}	7-13	3'018	5'CTGCAC ^{3'} CTGTGAAGCTCTCCA ^{3'}	86-92	255	DRBI*0103-
16	5'02	5'TCCTGTGGCAGCCTAAGAG ^{3'}	7-13	3'01	5'CCCGCGCTGTCTCCAGGAT ^{3'}	67-72	197	DRBI*1501- DRBI*1502
3	5'03	5'TACTTCCATAACCAGGAGGAGA ^{3'}	30-37	3'02	5'AGGTCTCCACCGCGCGG ^{3'}	72-78	213	DRBI*1601- DRBI*1602
17	5'06	5'GACGGAGCGGGTGCGGTA ^{3'}	20-26	3'03	5'TCCAGTAGTTGTCCACCCG ^{3'}	74-80	151	DRBI*0301- DRBI*0302
18 ^{*2}	5'03	5'TACTTCCATAACCAGGAGGAGA ^{3'}	30-37	3'048	5'CTGCAC ^{3'} CTGTGAAGCTCTCCA ^{3'}	86-92	217	DRBI*0301
				3'017	5'CTGCAC ^{3'} CTGTGAAGCTCTCAC ^{3'}	86-92	189	DRBI*0302, DRBI*1302, DRBI*1305, DRBI*1402, DRBI*1403
4	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA ^{3'}	6-13	3'047	5'CTGCAC ^{3'} CTGTGAAGCTCTCAC ^{3'}	86-92	260	DRBI*0401-
7	5'07	5'CCTGTGGCAGCGTAAGTATA ^{3'}	7-14	3'048	5'CTGCAC ^{3'} CTGTGAAGCTCTCCA ^{3'}	86-92	260	DRBI*0411
				3'029	5'CCCGTAGTGTGTCTGTACAC ^{3'}	78-81	232	DRBI*0701- DRBI*0702
8	5'08	5'AGTACTCTACGGGTGAGTGTT ^{3'}	9-16	3'05	5'CTGCAGTAGGTGTCCACCAG ^{3'}	74-80	214	DRBI*0801- DRBI*0804

Cuadro 21.
(continuación)
Secuencia de nucleótidos, Localización y Especificidades de los Primers empleados
para tipificación por PCR-SSP para DR de "Baja Resolución".

Mezcla Primers	Primer 5'	Secuencia	Loc. codones	Primer 3'	Secuencia	Loc. codones	Tamaño PCR produc	Espe- cifi- cidad.
9	5'09	5'GTTTCTTGAAGCAGGATAAGTTT ^{3'}	6-13	3'079	5'CCCCIAGTGTGTCCTGCACAC ^{3'}	78-81	236	DRB1*0901
10	5'10	5'CGGTTCCTGGAAAGACGGC ^{3'}	25-31	3'017	5'CTGCACCTGTGAACCTCTCAC ^{3'}	86-92	204	DRB1*1001
11	5'05	5'GTTTCTTGGAGTACTCTACGGTC ^{3'}	6-13	3'06	5'CTGGCTGTTCACAGTACTCCT ^{3'}	58-64	176	DRB1*1101 - DRB1*1104
12	5'08	5'AGTACTCTACGGGTGAGTGT ^{3'}	9-16	3'08	5'CACTGGGAAGCTCTCCACAG ^{3'}	85-91	218	DRB1*1201 - DRB1*1202
13.1	5'03	5'TACTTCCATAAACCAGGAGGAGA ^{3'}	30-37	3'10	5'CCCGCTCGTCTTCCAGGAT ^{3'}	67-73	130	DRB1*1301 - DRB1*1302
13.2	5'05	5'GTTTCTTGGAGTACTCTACGGTC ^{3'}	6-13	3'015	5'TGTTCACACTACTCGGCCGT ^{3'}	57-63	174	DRB1*1303 - DRB1*1304
14.1	5'05 5'08	5'GTTTCTTGGAGTACTCTACGGTC ^{3'} 5'AGTACTCTACGGGTGAGTGT ^{3'}	6-13 9-16	3'11	5'TCTGCAATAGGCTGTCCACCT ^{3'}	74-80	221 215	DRB1*1401 - DRB1*1404 DRB1*1405
14.2*2	5'03	5'TACTTCCATAAACCAGGAGGAGA ^{3'}	30-37	3'12	5'TCCACCCGGCCCGCC ^{3'}	71-76	140	DRB1*1305, DRB1*1402, DRB1*1403
52	5'52.1 5'52.2	5'TTTCTTGGAGCTGGGTAAGTC ^{3'} 5'GTTTCTTGGAGCTGCTTAAGTC ^{3'}	6-13 6-13	3'13 3'14	5'CTGTTCACAGGACTCGGCCGA ^{3'} 5'GCTGTTCACAGTACTCGGCAT ^{3'}	57-63 57-63	171 173	DRB3*0101 - DRB3*0301

Cuadro 21.

(Continuación)

Secuencia de nucleótidos, Localización y Especificidades de los Primers empleados para tipificación por PCR-SSP para DR de "Baja Resolución".

Mezcla primers	Primer 5'	Secuencia	Loc. codones	Primer 3'	Secuencia	Loc. codones	Tamaño PCR Produc.	Especi- dad.
53	5'53	5'GAGCGAGTGTGGAAACCTGA3'	22-28	3'018	5'CTGCACGTGTGAAGGCTCTCCA3'	86-92	213	DRB4*0161
51	5'51	5'GTTTCTTTCAGCAGGATAAAGTA3'	6-13	3'01	5'CCGGCCCTGCTCCAGGAT3'	67-72	200	DRB5*0101
				3'16	5'CCGGCCGCGCCCTGTCT3'	69-75	207	DRB5*0202

149

1 La mayor parte de las mezclas de primers contienen un primer 5' y uno 3', algunos - contienen 3 a 4 primers. Las mezclas de primers se han denominado posteriormente a la definición de la especificidad serológica de los amplificados.

2 Todas las mezclas de primers amplifican los alelos de la misma especificidad serológica, excepto las mezclas de primers 18* y 14.2 *, las cuales están indicadas por un "*".

Cuadro 22.

Secuencia de Nucleótidos, Localización y especificidades de los Pares de Primers empleados en la subtipificación de DR4 por la Técnica de PCR-SSP.

Mezcla Primers	Primer 5'	Secuencia	Loc. codones	Primer 3'	Secuencia	Loc. codones	Tamaño PCR produc.	Especificidad.
4:01	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA3'	6-13	3'011	5'GTCCACCCGGGCCCGCT3'	71-76	212	DRB1*0401, DRB1*0402, DRB1*0409
4:02	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA3'	6-13	3'012	5'CGCCGCCCGCTCCGCT3'	69-74	206	DRB1*0402
4:03	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA3'	6-13	3'013	5'TGCAGTAGGCTGTCCACCT3'	74-80	222	DRB1*0403, DRB1*0406, DRB1*0407, DRB1*0411
4:04	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA3'	6-13	3'014	5'CTGCAGTAGGCTGTCCACCG3'	74-80	223	DRB1*0401, DRB1*0402, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, DRB1*0409, DRB1*0410
4:05	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA3'	6-13	3'045	5'TGTTCCAGTACTCCGCCCT3'	57-63	171	DRB1*0405, DRB1*0409, DRB1*0410, DRB1*0411
4:06	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA3'	6-13	3'016	5'CCCTGTCCGAAGCCACCG3'	37-43	111	DRB1*0406

Cuadro 22

(Continuación).

Secuencia de nucleótidos, Localización y Especificidades de los Pares de Primers empleados en la subtipificación de DR4 por la Técnica de PCR-SSP.

Mezcla Primers	Primer 5'	Secuencia	Loc. codones	Primer 3'	Secuencia	Loc. codones	Tamaño PCR. codones	Espe- cifi- dad.
4.07	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA'	6-13	3'017	5'CTGCACCTGGAAGCTCTCAC'	86-92	260	DRB1*0101, DRB1*0105, DRB1*0107, DRB1*0108, DRB1*0109
4.08	5'04	5'GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA'	6-13	3'018	5'CTGCACCTGGAAGCTCTCCA'	86-92	260	DRB1*0102, DRB1*0103, DRB1*0104, DRB1*0106, DRB1*0110, DRB1*0111

Cuadro 23.
Secuencia de Nucleótidos, Localización y Especificidades de los Pares de Primers
empleados en la Subtipificación de DR1 por la Técnica de PCR-SSP.

Mezcla Primers	Primer 5'	Secuencia	Loc. codones	Primer 3'	Secuencia	Tamaño		Especi- fici- dad.
						Loc. codones	PCR Produc	
1:01	5'01	5'TTG TGG CAG CTTAAGTTTGAAT3'	8-15	3'07	5'CTG CACTGTGGAAGCTCTCAC3'	86-92	255	DRB1*0101, DRB1*0103
1:02	5'01	5'TTG TGG CAG CTTAAGTTTGAAT3'	8-15	3'08	5'CTG CACTGTGGAAGCTCTCCA3'	86-92	255	DRB1*0102
1:03	5'01	5'TTG TGG CAG CTTAAGTTTGAAT3'	8-15	3'15	5'CCG CTCCTGCTCCAGGAG3'	67-72	195	DRB1*0101, DRB1*0102
1:04	5'01	5'TTG TGG CAG CTTAAGTTTGAAT3'	8-15	3'19	5'CCG CTCCTGCTCCAGGAT3'	67-73	196	DRB1*0103

Cuadro 24.
Patrones de amplificación alelo-específico de DRB1*0401 a DRB1*0411.

DRB1*04	Mezcla de Primers.							
	4:01	4:02	4:03	4:04	4:05	4:06	4:07	4:08
DRB1*0401	+	-	-	+	-	-	+	-
DRB1*0402	+	+	-	+	-	-	-	+
DRB1*0403	-	-	+	-	-	-	-	+
DRB1*0404	-	-	-	+	-	-	-	+
DRB1*0405	-	-	-	+	+	-	+	-
DRB1*0406	-	-	+	-	-	+	-	+
DRB1*0407	-	-	+	-	-	-	+	-
DRB1*0408	-	-	-	+	-	-	+	-
DRB1*0409	+	-	-	+	+	-	+	-
DRB1*0410	-	-	-	+	+	-	-	+
DRB1*0411	-	-	-	-	+	-	-	+

Cuadro 25.

Ilustración de las 66 posibles combinaciones DRB1*04 Homo- y Heterocigotos en individuos DR4 homocigotos.

DRB1*04 Alelos	*0401	*0402	*0403	*0404	*0405	*0406	*0407	*0408	*0409	*0410	*0411
*0401	<i>i</i>										
*0402	<i>ii</i>	<i>iii</i>									
*0403											
*0404		<i>iii</i>									
*0405	<i>iv</i>	<i>v</i>	<i>vi</i>	<i>vii</i>	<i>viii</i>						
*0406			<i>ix</i>			<i>ix</i>					
*0407				<i>x</i>							
*0408	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>x</i>		<i>viii</i>						
*0409	<i>iv</i>	<i>v</i>	<i>xi</i>	<i>xii</i>	<i>iv</i>			<i>iv</i>	<i>iv</i>		
*0410	<i>xii</i>		<i>xiii</i>	<i>xiv</i>	<i>vii</i>		<i>vi</i>	<i>vii</i>	<i>xii</i>	<i>xiv</i>	
*0411	<i>xi</i>		<i>xv</i>	<i>xiii</i>	<i>vi</i>			<i>vii</i>	<i>xi</i>	<i>xiii</i>	<i>xv</i>

Combinaciones sin numerales Romanos (27 de 66) muestran patrones de amplificación únicos. Estos alelos DRB1*04 pueden ser asignados con el empleo de ocho mezclas - de reacción (4:01 a 4:08). Las combinaciones con el mismo numeral Romano denotan combinaciones de DRB1*04 homo- y/o heterocigotos mostrados en los patrones de - - amplificación por PCR-SSP. Estas combinaciones pueden ser diferenciadas empleando tres primers 3' adicionales (numerales Romanos en negritas) o por una segunda amplificación asimétrica (numerales Romanos italicizados).

Cuadro 26.

Patrones de amplificación Alelo-Específico de los alelos DRB1*0101 a DRB1*0103.

DRB1*01 Alelo	Mezcla de Primers.			
	1:01	1:02	1:03	1:04
DRB1*0101	+	-	+	-
DRB1*0102	-	+	+	-
DRB1*0103	+	-	-	+

9. RESULTADOS.

La tabla 1 muestra las frecuencias génicas de los alelos del locus HLA-DR genéricos en 181 pacientes con LEG, puede notarse que el más común de los alelos fue el HLA-DR4 (f.g. 0.230) seguida del DR6 (f.g. 0.204), DR2 (f.g. 0.127), DR8 (f.g. 0.110) y DR3 (f.g. 0.100); el resto de los alelos tuvo una frecuencia menor al 10%. Al compararse con el grupo de controles ninguna de esas diferencias fue significativa desde el punto de vista estadístico, el DR4 incluso estuvo ligeramente disminuido en el grupo de pacientes, mientras que el DR6, DR2 y DR3 estuvieron ligeramente aumentados.

Es notoria la disminución significativa del DR5 en el grupo de pacientes con respecto a los controles ($pC = 2.0 \times 10^{-4}$).

La tabla 2 muestra las frecuencias génicas (%) relevantes de los subtipos moleculares de la cadena DRB1 en 181 pacientes con LEG y su comparación con controles puede notarse que de todos los alelos del HLA-DR4, el subtipo molecular más frecuente fue el DRB1*0407 (9.4 %) la que al compararse con controles (4 %) si bien estuvo aumentada, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el caso del DR6 los alelos más comunes fueron el DRB1*1406 y DRB1*1301 (4.9 % en ambos casos) las que al compararse con controles (1% en ambos casos) no fue estadísticamente significativa, por otra parte, la frecuencia del alelo HLA-DRB1*1402 resultó disminuido en el grupo de pacientes comparada con controles (1% vs 7% respectivamente) esta disminución fue estadísticamente significativa ($pC = 5.57 \times 10^{-3}$).

De los alelos HLA-DR2, el más común fue el DRB1*1501 aunque su frecuencia al compararse con controles fue exactamente la misma.

En el caso de los subtipos del HLA-DR8 lo único diferente fue la disminución del DRB1*0802 (4.4 %) con respecto a los controles ($pC = 0.02$), aunque después de la

corrección no resultó significativa. El resto de los alelos se distribuyó de manera semejante en pacientes y controles.

La tabla 3 muestra los subtipos moleculares del HLA-DQA en 181 pacientes con LEG y su comparación con controles; el alelo más común fue el HLA-DQA* 0501 (28 %) cuya frecuencia al compararse con controles no fue estadísticamente significativa; en orden decreciente le siguieron DQA*03 (23%), DQA*0101 (13%) y de DQA* 0401 (10%), las que al compararse con controles tampoco fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, el alelo HLA-DQA*0102 resultó significativamente disminuido en los pacientes al compararse con el grupo de controles ($pC=2.2 \times 10^{-7}$), lo mismo ocurrió con el DQA*0601 que estuvo presente solo en un paciente y cuya frecuencia en los controles fue 15%.

La tabla 4 muestra las frecuencias génicas de los subtipos moleculares del HLA-DQB en pacientes mexicanos y controles. El subtipo más común en pacientes fue el HLA-DQB*0301 (27%) y le siguieron en orden decreciente el DQB*0302 (23%), DQB*0201 (17%), DQB*0402 (10%), DQB*0501 (10%); ninguna de estas frecuencias fue estadísticamente significativa al compararse con las de los controles. En la misma tabla 4 pueden notarse la disminución del subtipo DQB*0602 en el grupo de pacientes (4%) la que al compararse con controles (9%) resultó estadísticamente significativa ($pC=3.11 \times 10^{-3}$).

La tabla 5 muestra los haplotipos de genes HLA clase II en 181 pacientes mexicanos con LEG y muestra a los correspondientes a los grupos DR1, DR2 y DR3. En el grupo DR1, el haplotipo más común fue el DRB1*0101, DQA*0101, DQB*0501, el cual apareció como parte del HLA-B14 en el grupo DR2, el haplotipo más común fue el DRB1*1501, DQA*0102, DQB*0602, el cual preferentemente fue parte del HLA-B27. Puede notarse una gran variedad de haplotipos DRB1*1501 y muy restringida de los subtipos DRB1*1601 y 1602, éstos últimos formaron parte del HLA-B15. En el grupo DR3, prácticamente todos los pacientes correspondieron al subtipo DRB1*0301,

DQA*0501, y DRB*0201, sólo un paciente resultó ser DRB1*0302, DQA*0101, DQB*0201, todos ellos cuales fueron parte del HLA-B8 y el HLA-B18.

En la tabla 6 se muestran los subtipos de los grupos DR4 y DR5; con respecto al grupo DR4, existieron una gran variedad de subtipos DRB1 siendo el más frecuente el DRB1*0407, DQA*03, DQB*0302, todos los subtipos moleculares del DR4 formaron parte de los alelos HLA-B35, HLA-B39 y HLA-B40. En el grupo DR5, los subtipos moleculares más comunes fueron DRB1*1102 y DRB1*1201 cuyos haplotipos incluyeron al DQA*0501 y DQB*0301 y formaron parte del HLA-B7 y HLA-B39.

La tabla 7 muestra a los subtipos moleculares de los grupos DR6 y DR7; de los subtipos de DR6 el más común fué el DRB1*1301 que tuvieron una distribución variada con respecto a los alelos DQA y DQB y formaron parte del HLA-B5; en este mismo grupo de DR6, otro alelo común fué el DRB1*1406 que se asoció preferentemente con el subtipo DQA*0501, siendo éste subtipo el más común en el locus DQA. En la misma tabla puede notarse que todos los subtipos moleculares del DR7 fueron del mismo subtipo el cual fué DRB1*0701, DQA*0201, DQB*0201, dichos alelos fueron parte del HLA B12, B13 y B35.

Finalmente la tabla 8 muestra finalmente los haplotipos correspondientes a los grupos HLA-DR8, DR9, y DR10. Con respecto al grupo DR8 el alelo más común fué el DRB1*0802, DQA*0401, y DQB*0402, los cuales fueron parte del HLA-B35 y B40.

Sólo un paciente perteneció al grupo DR9 y su haplotipo fué DRB1*0901, DQA*03, DQB*0302, de la misma manera sólo un paciente perteneció al grupo DR10 y su haplotipo fué DRB1*1001, DQA*0101, DQB*0302 el cual formó parte del HLA-B35.

La tabla 9 muestra los haplotipos clase II en pacientes mexicanos (M) con LEG y su comparación con caucásicos (C), negros (N) y orientales (O), puede notarse que el haplotipo más común del grupo DR1 en mexicanos (DRB1*0101, DQA* 0101,

DQB*0501) está presente en todos los grupos étnicos. En lo que se refiere a los haplotipos del grupo DR2, el más común en mexicanos (DRB1*1501, DQA*0102, DQB*0602) también está presente en todos los grupos étnicos; sin embargo, verse claramente que los pacientes mexicanos con LEG tienen una gran heterogeneidad de haplotipos DRB1*1501 los que parecen ser particularmente frecuentes en los pacientes mexicanos y que su distinción con otros grupos étnicos reside en los subtipos moleculares del locus HLA- DQB pues los mexicanos no muestran el alelo DQB*0602 ni el alelo DQB*0502 o su frecuencia en ellos es muy baja.

La tabla 10 muestra que el haplotipo más común del grupo DR3 en mexicanos es también el que está presente en Caucásicos, Negros y Orientales. Con respecto a los subtipos moleculares del grupo HLA-DR4 es muy notoria la gran heterogeneidad de todos los subtipos moleculares de este alelo. De los 18 subtipos moleculares detectados en todos los grupos étnicos sólo el DRB1*0403 y el DRB1*0406 no se encontraron en los pacientes mexicanos, siendo el primero de ellos característico de la población caucásica y el segundo de la población oriental; más aún, el haplotipo más común de los mexicanos (DRB1*0407, DQA*03, DQB*0302) parece ser exclusivo de los mexicanos, ya que su frecuencia sólo está presente en ellos y ocasionalmente en algunos grupos de individuos de origen Caucásico.

La tabla 11 muestra los haplotipos clase II pertenecientes a los grupos DR5 y DR6. Con respecto al grupo DR5 claramente se nota las diferencias en los distintos grupos étnicos, ya que el subtipo DRB1*1102 presente en los mexicanos parece ser de origen negroide, lo mismo que los haplotipos marcados por el alelo DRB1*1201. En lo que se refiere a los subtipos del grupo DR6, el más común en mexicanos (DRB1*1301, DQA1*0103, DQB*0603), está presente también en los otros tres grupos étnicos. En los alelos de este grupo se nota que los pocos casos del subtipo DRB1*1302 en mexicanos son de origen negroide, mientras que los del alelo DRB1*1402 lo son de origen oriental. Existiendo también los alelos DRB1*1406 y DRB1*1407 en mexicanos cuyo origen está aún por determinarse y que pudieran ser autóctonos.

La tabla 12 muestra el origen de los subtipos moleculares pertenecientes a los grupos DR7, DR8, DR9 y DR10.

En lo que se refiere a los haplotipos del grupo DR7 presentes en mexicanos (DRB*0701, DQA*0201, DQB*0201), puede notarse que lo son también en el resto de los grupos étnicos. En lo que corresponde a los subtipos del grupo DR8 es interesante notar que el más común de los mexicanos (DRB1*0802, DQA*0401, DQB*0402) es compartido con la población oriental y en cierta medida también por la caucásica, por su parte los subtipos DRB1*0801 y 0804 son compartidos con la población negroide.

El haplotipo perteneciente al grupo DR9 ocurrido en mexicanos parece ser particular de este grupo ya que no está presente en ninguno de los otros tres, lo mismo que con el haplotipo perteneciente al grupo DR10, es interesante, que ambos haplotipos tienen el mismo alelo del HLA-DQB (DQB*0302) el cual es característico de la población mexicana.

TABLA 1: FRECUENCIAS GENICAS DE LOS GRUPOS DE GENES HLA CLASE II (DR) EN 181 MEXICANOS CON LEG.

DR GENERICICO	PACIENTES N=181/362		CONTROLES N=105/210		pC	OR
	n	fg (%)	n	fg (%)		
DR4	42	(23)	74	(37)	NS	
DR6	37	(20.4)	15	(7.5)	NS	
DR2	23	(27)	15	(7.5)	NS	0.88
DR8	20	(11)	20	(10)	NS	
DR3	18	(10)	14	(7)	NS	
DR7	15	(8.3)	13	(6.5)	NS	
DR1	14	(7.7)	18	(9)	NS	
DR5	8	(4.4)	22	(11)	2.0×10^{-4}	0.18
DR9	1	(0.05)	4	(2)	NS	
DR10	1	(0.05)	4	(2)	NS	

OR: Razón de momios.

pC: p corregida.

NS: No significativo.

TABLA 2. FRECUENCIAS GENICAS MOLECULARES RELEVANTES DE LA CADENA DRB1 EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

GRUPO	SUBTIPO DRB1	PACIENTE S N=181/362		CONTROLES N=105/210		pC	OR
		n	f.g.(%)	n	f.g.(%)		
DR4	0407	17	(9.4)	9	(4)	NS	1.1
DR6	1406	9	(4.9)	2	(1)	NS	2.69
	1301	9	(4.9)	2	(1)	NS	2.69
	1402	1	(<1)	10	(7)	5.57 X 10 ⁻³	0.05
DR2	1501	15	(8.3)	11	(8)	NS	
DR8	0802	8	(4.4)	12	(8)	NS	0.36
	0801	4	(2.2)	1	(<1)	NS	
DR3	0301	17	(9.4)	9	(8)	NS	
DR7	0701	15	(8.3)	10	(7)	NS	
DR1	0101	12	(6.6)	9	(6)	NS	
DR5	1104	2	(1.1)	4	(2)	NS	

OR: Razón de momios

pC: p corregida.

NS: No significativo.

TABLA 3. SUBTIPOS MOLECULARES RELEVANTES DE DQA EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG Y SU COMPARACION CON CONTROLES.

LOCUS DQA SUBTIPOS	PACIENTES N=181/362 n f.g.(%)	CONTROLES N=105/210 n f.g.(%)	pC	OR
0501	52 (28.3)	52 (25)	NS	
03	42 (23.2)	40 (19)	NS	
0101	24 (13)	31 (15)	NS	
0401	18 (10)	23 (11)	NS	
0201	15 (8.3)	17 (8)	NS	
0102	11 (6)	33 (16)	2.2×10^{-7}	0.14
0103	8 (4)	10 (5)	NS	
0601	1 (<1)	31 (15)	2.2×10^{-8}	0.001

OR: Razón de momios.

pC: p corregida.

NS: No significativo.

TABLA 4. FRECUENCIAS GENICAS RELEVANTES DE LOS SUBTIPOS MOLECULARES DE HLA-DQB EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG Y SU COMPARACION CON CONTROLES.

SUBTIPO DQB	PACIENTES N=181/362 n f.g.(%)	CONTROLES N=105/210 n f.g.(%)	pC	OR
0301	49 (27)	42 (20)	NS	
0302	41 (23)	44 (21)	NS	
0201	21 (17)	33 (16)	NS	
0402	18 (10)	21 (10)	NS	
0501	18 (10)	23 (11)	NS	
0602	8 (4)	19 (9)	3.11×10^{-3}	0.21
0603	8 (4)	11 (5)	NS	
0601	5 (3)	2 (1)	NS	
0604	4 (2)	8 (4)	NS	
0502	1 (<1)	6 (3)	NS	
0503	1 (<1)	6 (3)	NS	
0308	1 (<1)	NI	NS	

OR: Razón de nomios

pC: p corregida.

NS: No significativo

NI: No identificado.

TABLA 5. HAPLOTIPOS DE GENES HLA-CLASE II EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

GRUPO DR1 n=14 (f.g. 0.077).

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
0101	0101	0501	11	0.061
0101	0101	0603	1	0.005
0103	0101	0501	1	0.005
-	0101	0301	1	0.005

GRUPO DR2 n=23 (f.g. 0.127)

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
1501	0101	0501	1	0.005
1501	0101	0602	1	0.005
1501	0102	0502	1	0.005
1501	0102	0601	1	0.005
1501	0102	0602	7	0.039
1501	0102	0603	1	0.005
1501	0103	0601	1	0.005
1501	0501	0601	1	0.005
1501	0501	0603	1	0.005
1502	0102	0603	1	0.005
1502	0103	0601	1	0.005
1601	0501	0501	2	0.010
1602	0501	0301	1	0.005
1602	0501	0501	2	0.010
-	0101	0503	1	0.005

GRUPO DR3 n=18 (f.g. 0.100)

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
0301	0501	0201	16	0.089
0302	0101	0201	1	0.005
0301			1	0.005

TABLA 6. HAPLOTIPOS DE GENES HLA-CLASE II EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

GRUPO DR4 n= 42 (f.g. 0.230)

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
0401	03	0302	5	0.028
0402	03	0301	1	0.005
0402	03	0302	1	0.005
0402	03		1	0.005
0404	03	0302	3	0.017
0405	03	0302	1	0.005
0407	03	0302	17	0.094
0408	03	0302	1	0.005
0409	03	0302	2	0.011
0411	03	0301	1	0.005
0411	03	0302	2	0.011
0411	03	0501	1	0.005
0411	03	0302	1	0.005
0412	03	0302	1	0.005
0415	03	0302	1	0.005
0418	03	0308	1	0.005
-	03	0302	4	0.022

GRUPO DR5 n= 8 (f.g. 0.044).

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
1102	0501	0301	2	0.011
1104	0501	0301	2	0.011
1201	0101	0301	1	0.005
1201	0501	0301	1	0.005
-	0101	0301	2	0.011

TABLA 7. HAPLOTIPOS DE GENES HLA-CLASE II EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

GRUPO DR6 n= 37 (f.g. 0.204)

DRB	DQA	DQB	N	f.g.
1301	0102	0604	2	0.011
1301	0103	0301	1	0.005
1301	0103	0501	1	0.005
1301	0103	0603	4	0.022
1301	0501	0301	1	0.005
1302	0102	0604	2	0.011
1302			2	0.011
1303	05011	0301	1	0.005
-	0501	0301	1	0.005
-	0501	-	2	0.011
1401	0501	0301	1	0.005
1402	0501	0301	1	0.005
1403	0501	0301	2	0.011
1406	0501	0301	6	0.033
1406	0501	0503	2	0.011
1406	0601	0301	1	0.005
1407	0101	0301	1	0.005
1407	0501	0301	1	0.005
-	0501	0301	1	0.005
-	0501	0601	1	0.005

GRUPO DR7 n= 15 (f.g. 0.083)

DRB	DQA	DQB	N	f.g.
0701	0201	0201	15	0.083

TABLA 8. HAPLOTIPOS DE GENES HLA-CLASE II EN 181 PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

GRUPO DR8 n=20 (f.g. 0.110)

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
0801	0101	0302	1	0.005
0801	0401	0402	3	0.017
0802	0401	0402	8	0.044
0804			1	0.005
-	0401	0402	5	0.028

GRUPO DR9 n= 1 (f.g. 0.005)

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
0901	03	0302	1	0.005

GRUPO DR10 n=1 (f.g. 0.005)

DRB1*	DQA*	DQB*	n	f.g.
1001	0101	0302	1	0.005

TABLA 9. HAPLOTIPOS CLASE II EN PACIENTES MEXICANOS (M) CON LEG Y SU COMPARACION CON CAUCASICOS (C), NEGROS (N) Y ORIENTALES(O).

GRUPO DRI

DRB1*	DQA*	DQB*	C	N	O	M
0101	0101	0501	+	+	+	+
0101	0101	0603				+
0102	0101	0501	+	+	+	+
0103	0101	0301	+			+
0103	0101	0501				+

GRUPO DR2

DRB1*	DQA*	DQB*	C	N	O	M
1501	0101	0501				+
1501	0101	0602				+
1501	0102	0502				+
1501	0102	0601				+
1501	0102	0602	+	+	+	+
1501	0102	0603				+
1501	0103	0601				+
1501	0501	0601				+
1501	0501	0603				+
1501	0102	0602	+	+	+	
1502	0102	0601			+	
1502	0102	0603				+
1502	0103	0601	+		+	+
1503	0102	0602		+		
1601	0102	0502	+			
1601	0501	0501				+
1602	0102	0502			+	
1602	0102	0502		+	+	
1602	0501	0301			+	+
1602	0501	0501				+
-	0101	0503				+

TABLA 10. HAPLOTIPOS CLASE II EN PACIENTES MEXICANOS (M) CON LEG Y SU COMPARACION CON CAUCASICOS (C), NEGROS (N) Y ORIENTALES(O).

GRUPO DR3

DRB1*	DQA*	DQB*	C	N	O	M
0301	0501	0201	+	+	+	+
0302	0101	0201				+
0302	0401	0402		+		+

GRUPO DR4

DRB1*	DQA*	DQB*	C	N	O	M
0401	03	0301	+		+	
0401	03	0302	+		+	+
0402	03	0301				+
0402	03	0302	+	+	+	
0403	03	0301	+			
0404	03	0302	+			+
0405	03	0302		+	+	+
0406	03	0302			+	
0407	03	0302	+			+
0408	03	0302				+
0409	03	0302				+
0411	03	0301				+
0411	03	0302				+
0411	03	0501				+
0412	03	0302				+
0415	03	0302				+
0418	03	0308				+

TABLA II. HAPLOTIPOS CLASE II EN PACIENTES MEXICANOS (M) CON LEG Y SU COMPARACION CON CAUCASICOS (C), NEGROS (N) Y ORIENTALES (O).

GRUPO DR5

DRB1*	DQA*	DQB*	C	N	O	M
1101	0501	0301	+	+	+	
1101	0102	0602	+	+		
1102	0501	0301	+	+		+
1102	0501	0301		+		
1103	0501	0301	+			
1104	0501	0301	+	+		+
1201	0101	0301	+	+		+
1201	0501	0301	+	+	+	+
1202	0601	0301			+	

GRUPO DR6

DRB	DQA	DQB	C	N	O	M
1301	0102	0604				+
1301	0103	0301				+
1301	0103	0501				+
1301	0103	0603	+	+	+	+
1301	0501	0301				+
1302	0102	0604	+	+		+
1302	0102	0501	+	+		
1303	05011	0301	+	+		+
1303	0201	0201		+		
1305	0201	0201		+		
1401	0101	0503	+	+	+	
1401	0501	0301				+
1402	0501	0301			+	+
1403	0501	0301	+		+	+
1406	0501	0301				+
1406	0501	0503				+
1406	0601	0301				+
1407	0101	0301				+
1407	0501	0301				+

TABLA 12. HAPLOTIPOS CLASE II EN PACIENTES MEXICANOS (M) CON LEG Y SU COMPARACION CON CAUCASICOS (C), NEGROS (N) Y ORIENTALES (O).

GRUPO DR7

DRB	DQA	DQB	C	N	O	M
0701	0701	0201	+	+	+	+
0701	0201	0303	+	+	+	+
0701	0301	0201		+		

GRUPO DR8

DRB	DQA	DQB	C	N	O	M
0801	0101	0302				+
0801	0401	0402	+	+		+
0802	0401	0402	+		+	+
0803	0103	0601			+	
0804	0401	0402	+	+		+

GRUPO DR9

DRB	DQA	DQB	C	N	O	M
0901	03	0201	+	+		
0901	03	0302				+
0901	03	0303	+		+	

GRUPO DR10

DRB	DQA	DQB	C	N	O	M
1001	0101	0302				+
1001	0101	0501	+	+	+	

10. DISCUSION.

Este trabajo muestra la disminución del alelo DR5 el cual de manera característica es el segundo más frecuente en la población normal mexicana y ninguno de los subtipos moleculares de este alelo es responsable de dicha disminución, también es notoria la disminución del subtipo DRB1*0802 y del subtipo molecular DRB1*1402 (DR6), los cuales pudieran tener un efecto protector ó alternativamente reflejar sólo que su origen no es mexicano y que su presencia en los controles mexicanos simplemente refleja un mestizaje en particular ya que ambos son frecuentes en los grupos de individuos normales de origen oriental. En locus DQA también fueron notorias la disminución del alelo DQA*0102 y DQA*0601, la presencia del primero de ellos en la población normal mexicana parece corresponder a mestizaje de origen negro y del último es desconocida. Este mismo mestizaje de origen negroide también se refleja en la disminución en los pacientes del alelo DQB*0602 (4%), mientras que en los controles es del 9%.

En los haplotipos correspondientes a cada grupo es notorio la gran heterogeneidad de los subtipos correspondientes al grupo DR2, sobre todo del subtipo DRB*1501 y prácticamente todos los haplotipos pertenecientes al grupo DR3 fueron del subtipo DRB1*0301, el cual es conocido su desequilibrio genético con el DQA*0501 y DQB*0201, dicho haplotipo en este grupo de pacientes mostró desequilibrio genético con el HLA-B8 y con el HLA-B18, ambos haplotipos muy característicos de la población caucásica, por lo que su presencia en mexicanos refleja el mestizaje con este grupo étnico.

Del grupo DR4 que es el alelo más común en la población normal mexicana, prácticamente todos los subtipos de este grupo, están presentes en los individuos de origen mexicano (pacientes y controles) y el más común (DRB1*0407) parece ser el subtipo relevante en la población mexicana. Este origen autóctono se refleja por la asociación que tienen todos estos subtipos con los alelos del locus del HLA-B que son: HLA-B35, B39 y B40, los más comunes en la población normal mexicana (Weckmann y

col.). Más aún, la población normal mexicana contiene subtipos moleculares tanto del HLA-B35 como del B-39 cuyas secuencias de nucleótidos han sido detectadas exclusivamente en individuos de origen mexicano (Vargas Alarcón y col). De hecho sólo los subtipos DRB1*0403 no estuvo presente en individuos mexicanos (pacientes y controles) el cual es característico de la población caucásica, ni el DRB1*0406 el cual es característico de la población oriental.

Es notorio el desequilibrio genético de todos los subtipos moleculares del DR4 con los alelos de DQB*0302 y *0301.

En lo que compete al DR5 los subtipos moleculares están restringidos al DRB1*1102 y *1201 ambos probablemente de origen negroide (ver más abajo).

Los subtipos moleculares del DR6 representados por el DRB1*1301 y *1403 sustentan este hecho de mestizaje con poblaciones de distinto origen étnico, el primero de ellos de origen negroide y el segundo de origen oriental; la existencia del subtipo DRB1*1406 parece reflejar un origen autóctono (ver más abajo).

Dichos efectos de mestizaje , también se reflejan en los desequilibrios mostrados por los alelos del DQA y DQB en este mismo grupo de DR6, pues mientras los alelos DRB1*1403 y *1406 tienen desequilibrios con DQA*0501 y *0301, los correspondientes al DRB1*1301 son marcadamente heterogéneos, tanto en el DQA como en el DQB.

Todos los subtipos moleculares del DR7 pertenecen al mismo subtipo y al mismo haplotipo (DRB1*0701, DQA*0201, DQB*0201), los que sin embargo tuvieron varios alelos del locus HLA-B (B12, B13 y B35), esto sugiere que en estos haplotipos

debe existir un mecanismo que fija el desequilibrio genético en la región correspondiente a los genes clase II, pero que se mueve libremente en las poblaciones de todo el mundo, asociándose de manera aleatoria con los alelos del HLA-B que pertenezcan a cada grupo étnico. Los haplotipos de los grupos DR8, DR9 y DR10 nuevamente reflejan diversos grados de mestizaje. El DR8 es el tercer alelo más común de la población normal mexicana (de Leo y col.), por lo que es de esperarse que la población mexicana muestre heterogeneidad en los subtipos moleculares, prácticamente todos estos subtipos están presentes en individuos mexicanos (pacientes y controles), con excepción del DRB1*0803 el cual es de origen oriental.

El hecho de que los individuos del grupo DR9 y DR10 muestren el mismo alelo del locus DQB (DQB*0302) sugiere que ambos son probablemente de origen mexicano ya que este alelo es el más común en la población mexicana.

En un intento de reforzar esta noción de los distintos orígenes del mestizaje mexicano y su relevancia en el LEG, se compararon los haplotipos de los pacientes con su presencia en otros tres grupos étnicos, las cuales se analizarán en seguida teniendo en cuenta que de las poblaciones estudiadas (caucásica, negra y oriental) la primera de ellas es la mejor caracterizada). Prácticamente todos los subtipos del grupo DR1 presentes en mexicanos, están presentes en todas las poblaciones, mientras que las correspondientes al grupo DR2, muestran una gran variedad de haplotipos exclusivos de los pacientes con LEG mexicanos, por su parte todos los haplotipos correspondientes al grupo DR3 están presentes en todas las poblaciones estudiadas, mostrando con ello que así como ocurre en otras partes del mundo, los mexicanos que tienen este haplotipo muestran un desequilibrio genético intenso. El origen en México de este haplotipo tiene dos fuentes, una de ellas es claramente de origen español y es la que contiene el haplotipo HLA-A30, B18, DRB1*0301, DQA*0501 y DQB*0201, éste haplotipo ha sido descrito en pacientes españoles con glomerulonefritis primaria (Gómez-Reino y col.) y parece ser de origen

vasco, su presencia en México es entonces con mestizaje con españoles. El otro haplotipo (HLA-A1, B8, DRB1*0301, DQA*0501, DQB*0201) es el más común de la población caucásica, éste haplotipo se asocia en ese grupo étnico con prácticamente todas las enfermedades autoinmunes, entre ellas, el LEG, la diabetes insulina dependiente, la tiroiditis autoinmune, la hepatitis crónica activa y la glomerulonefritis primaria entre otras, por lo que su presencia en México revela mestizaje con individuos de origen blanco europeo.

Una mención aparte merecen los haplotipos correspondientes al grupo DR4, prácticamente todos los subtipos moleculares de ese grupo están presentes en los pacientes mexicanos con LEG y su distinción con otros grupos étnicos reside en el alelo del locus DQB, pues los mexicanos tienen característicamente el DQB*0302, cuando los grupos étnicos tienen el DQB*0301. Las únicas excepciones son el subtipo DRB1*0403 presente en caucásicos y no mexicanos y el DRB1*0406 presente en orientales y no en mexicanos. De todos los subtipos del grupo DR4 el que parece estar asociado con la autoinmunidad en los mexicanos es el subtipo DRB1*0407, el cual si bien ha sido descrito en algunas personas de origen caucásico parece tener diferencias sutiles en algunas secuencias de nucleótidos con el subtipo DRB1*0413 característico de mexicanos. Este trabajo no aborda la secuencias de nucleótidos de la cadena DRB1, por lo que dichas diferencias no pudieron ser estudiadas.

Los subtipos moleculares de los grupos DR5 y DR6, también muestran el efecto del mestizaje en mexicanos; aquellas del grupo DR5 parecen ser de origen negroide, mientras que las del DR6 parecen ser de origen oriental; en el grupo DR6 además del mestizaje oriental se nota una fuerte presencia de haplotipos de origen indígena en particular del DRB1*1406, el más común de los subtipos del grupo DR6. El desequilibrio genético de los locis DQA y DQB también refleja ese origen indígena, el cual está marcado por DQA*0501 y DQB*0301.

El hecho de que todos los individuos pertenecientes al grupo DR7 tengan el mismo subtipo molecular y los mismos desequilibrios genéticos con los loci DQA y DQB refuerzan la noción de que este haplotipo está preservado en todo el mundo, de manera característica se asocia con algunas enfermedades autoinmunes en individuos de origen caucásico entre ellas la enfermedad celíaca (Tiwari y Terasaki). Su presencia en México se ha notado en un subgrupo clínico de pacientes con LEG que muestran las características clínicas del Síndrome de Antifosfolípidos (Granados y col.), éste alelo a su vez está asociado con el mismo Síndrome en individuos de origen italiano (Savi y col.); por todo lo anterior su presencia en mexicanos refleja nuevamente mestizaje blanco europeo.

Finalmente en los haplotipos correspondientes a los grupos DR8, DR9 y DR10 , el subtipo DRB1*0801 es tanto mexicano como proveniente de mestizaje negroide, el DRB1*0802 es tanto mexicano como oriental y el DRB1*0804 mexicano y negroide. Los subtipos moleculares DRB1*0901 y DRB1*1001 era de esperarse que en mexicanos tuviesen desequilibrio genético con el alelo DQB*0302, su presencia en los pacientes mexicanos con LEG simplemente reflejan su origen autóctono.

Esta es una descripción exhaustiva del papel de los genes de MHC en la susceptibilidad genética al desarrollo de LEG en mexicanos, confirma algunos datos encontrados en pacientes mexico-americanos (Reveille y Col.), pero aborda un mayor número de pacientes y una descripción por haplotipos. Muestra a través del análisis de los desequilibrios genéticos en los haplotipos que el mestizaje es relevante y que debe analizarse en cada paciente; dicho análisis es difícil en poblaciones como la caucásica pues el desequilibrio genético presente en cada uno de los alelos impide distinguir diferencias entre pacientes y controles; el caso de los mexicanos es diferente, ya que al derivar de un mestizaje relativamente reciente, los desequilibrios genéticos no han tenido tiempo

suficiente para fijarse y es accesible la distinción del origen étnico de los haplotipos. Tiene la ventaja adicional de que en la actualidad es posible estudiar la genética de población de las comunidades indígenas que contribuyen al mestizaje de los mexicanos y de ésta manera identificar los haplotipos autóctonos y los haplotipos adquiridos por mezcla con otros grupos étnicos.

Este trabajo muestra que los mexicanos con LEG son heterogéneos genéticamente y que cuando el paciente presenta los alelos DR3 y DR7 el efecto es de origen caucásico, si es DR2 éste es de origen oriental, mientras que si es DR5, DR6 o DR8 hay una combinación entre negro y oriental, pero que sobre todo el efecto más importante está conferido por los haplotipos marcados por el DR4 y de éste en particular el DRB1*0407. Lo anterior permite plantear una hipótesis interesante y es la de que existe complementación génica entre los diferentes loci que componen el MHC, en particular el gen de la cadena DRB1 se complementa con alelos del gen de las cadenas DQA y DQB, en algunos haplotipos la cadena DRB1 puede ser aportada por un origen étnico, mientras que las cadenas del locus HLA-DQ ser aportadas por otro origen étnico, constituyendo de esta manera el híbrido característico del mestizo mexicano que lo hace particularmente susceptible al desarrollo del LEG.

11. REACTIVOS.

REACTIVOS PARA TIPIFICACION SEROLOGICA HLA-ABC Y DR.

Ficoll- Hypaque

Ficoll tipo 400 (Sigma)	9.0 grs
Agua Destilada	100.0 ml
Hypaque al 50% (Winthrop)	28.0 ml
Agua Destilada	13.0 ml
Ajustar densidad a 1.077	

Ficoll - Radialar.

Ficoll tipo 400 (Sigma)	45.0 grs
Radialar	150.0 ml
Agua destilada	630.0 ml
Ajustar densidad a 1.077	

Formalina.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1725 grs
Na_2HPO_4	0.30 grs
Formol al 40%	100 ml

AKC.

NH_4Cl	8.29 grs
K_2CO_3	1.34 grs
Agua destilada	1.0 L.

PBS.

NaCl	7.66 grs.
Na_2HPO_4	3.8 grs.
KH_2PO_4	0.06 grs.
Ajustar el pH a 7.4	

Medio RPMI. 1640

RPMI	100 ml
Penicilina/Estreptomicina	1.0 ml
Suero bovino fetal inactivado	10.0 ml

El suero bovino fetal se inactiva 1 hora a 56 °C.
Trabajar en condiciones estériles.
Mantener en refrigeración.

Eosina Y al 5%.

Eosina Y	5.0 grs
Agua destilada	100.0 ml

Calentar en una placa térmica hasta su disolución, filtrar . Colocar en frasco ámbar ,
conservar a temperatura ambiente.

REACTIVOS PARA EXTRACCION DE DNA

RSB

NaCl (10mM)	0.5844 grs.
Tris base pH 7.4 (10mM)	1.211 grs.
EDTA (25mM)	9.3 grs.
Agua destilada	1.0 L.
Ajustar el pH a 7.4	

Buffer TE

Tris-Cl (10 mM)	1.576 grs.
EDTA (1 mM)	0.322 grs.
Ajustar el pH a 8.0	

Tris 0.5 M.

Tris base	60.55 gr.
Agua Destilada	1.0 L.
Ajustar el pH a 8.0	

NaCl 5M.

NaCl	292.0 grs.
Agua Destilada	1.0 L.

SDS 10%.

SDS (Dodecil sulfato de Sodio)	10.0 grs.
Agua destilada	100 ml.

Fenol Saturado.

Colocar el fenol a baño María a 60°C hasta que se funda totalmente, adicionar Tris base 0.5 M pH 8.0 en relación 1:1. Mezclar y dejar reposar 15 minutos para que se separen dos fases. Conservar en frasco ámbar.

SEVAC.

Cloroformo - Alcohol Isoamílico (24: 1).

Proteinasa K 10 µg/ ml

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 ml de Agua destilada.
Realizar alícuotas de 500 µl y congelar.

Buffer de lisis.

DTAB (Bromuro de dodecil trimetil amonio. Sigma D8638)	8 %
TRIS (pH= 8.0)	10 mM.
NaCl	1.5 M.
EDTA	50 mM.

Solución de CTAB.

CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio. Sigma H5772)	5 %
NaCl	0.4 M

Anticoagulante EDTA.

EDTA.Na₂ 5 mM
Se emplea 1.0 ml de anticoagulante por 9.0 ml de sangre.

NaCl 1.2 M

NaCl 70.13 grs
Agua Destilada 1.0 L

12. BIBLIOGRAFIA.

1. Alarcón Segovia D. 1988. Lupus Eritematoso Generalizado. Patología y Patogenia. En Principios de las Enfermedades Reumáticas. Novena Edición. Editor Dr. H. Ralph Schumacher, Jr. Dr. John H. Klippel, Dr. Dwight R. Robinson. Publicado por la Arthritis Foundation, Atlanta, Georgia. E.U.A. Capítulo 18, 105-109.
2. Fraga A., Jara L., Lavalle C. Lupus Eritematoso Sistémico. En: Tratado de Medicina Interna. Editor Misael Uribe. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. 1995. p.740-743.
3. Villarreal Molina Gilda María. 1993. Asociación de Antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad (SPH) con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y con la Producción de Autoanticuerpos. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
4. Shoenfeld Y, Cior H, Shafir S, Krause I, Granados J, Villarreal Molina G, Alarcón Segovia D. 1992. The Diversity and Pattern of Inheritance of Autoantibodies in Multiple Case Families of SLE. *Ann Rheum. Dis.* 51: 611-618.
5. Alarcón Segovia D, Fishbein E. 1968. Variations in Incidence of Anti-nuclear Factors (ANF) to Nine Calf Thymus Nuclear Antigens in Normal Human Subjects. *Arthritis Rheum.* 11: 44-46.
6. Alcocer-Varela J, Iglesias A, Llorente L, et al. Effects of L-canavanine on T Cells may Explain the Induction of Systemic Lupus Erythematosus by Alfalfa. *Arthritis Rheum* 28: 52-57, 1985.
7. Eng M, Tan M. D. Consideration of Autoantibodies as Immune Imprints and Reporters of the Original Antigenic Stimulus. En: Proceedings of the Second International Conference on Systemic Lupus Erythematosus. 1989 Singapore Professional Postgraduate Services International p.3-6.
8. Arnett FC, Reveille John D. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus : *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 18: 4:865-892, 1992.
9. Granados J. Complejo Principal de Histocompatibilidad. En: Tratado de Medicina Interna. Editor Misael Uribe Esquivel. Segunda Edición. Editorial Médica-Panamericana. 1995. p.674-680.
10. R. Duncan Campbell, J. Trowsdale. Map of the Human MHC. *Immunology Today* 14:7: 349-352, 1993.

11. Johnson A., Hurley C., Hartzman R., Alper Ch., Yunis E.J. HLA: El Complejo de Histocompatibilidad Mayor en el Hombre. En: Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Editor: John Bernard Henry. Novena Edición. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Salvat-Masson. p.783-816. 1993.
12. Batchelor J.R., McMichael A.J. Progress in Understanding HLA and Disease Associations. *Brit.Med.Bull.* 43, 156-183.
13. Font J., Cervera R., Lupus Eritematoso Sistémico: Subgrupos Clínicos y Síndromes de Solapamiento afines. *Inflamación* 93:4: 3511-358, 1993.
14. Kaplan D.: The Onset of Disease in Twins and Siblings with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatol* 11: 648-652, 1984
15. Tan E., Cohen A., Fries J., Masi A., McShane D., Rothfield N., Schaller J., Talal N, Winchester R. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25:11: 1271-1277, 1982.
16. Tiwari J., Terasaki P. HLA and Disease Associations. Springer-Verlag. 1985.
17. Alper C.A. Inherited Structural Polimorfism in Human C2: Evidence for Genetic Linkage Between C2 and Bf. *J.Exp.Med*,144:1111-1115, 1976.
18. Cambell R.F., Law A., Reid K.M.B., Sim R. Structure, Organization and Regulation of the Complement Genes. *Ann. Rev. Immunol*, 6: 161-195, 1988.
19. Monaco John. Structure and Function of Genes in the MHC Class II Region. *Current Opinion in Immunology*,5:17-20, 1993.
20. Yunis E.J. MHC Haplotypes in Biology and Medicine. Philip Levine award Lecture. *Am.J. Clin. Path.*, 89: 2: 268-272, 1988.
21. Schur P.H., Marcus-Bagley, D.Awdeh Z., Yunis E.J., Alper C.A.. The Effect of Ethnicity on Mayor Histocompatibility Complex, Complemente Allotypes and Extended Haplotypes in Patients with Sistemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 33(7): 985-992, 1990.
22. Bjorman P.J., Saper M.A., Samrdovi B., Bennett W.S., Strominger, J.L. and Wiley D.C. Structure of the Human Class I Histocompatibility Antigen HLA-A2. *Nature*, 329: 506, 1987.
23. Brown H.J., Jardetzky T., Saper M.A., et. al. A Hypothetical Model of the Foreing Antigen Binding Site of Class II Hystocompatibility Molecules. *Nature*, 322:845-850, 1988.

24. Winchester R.J. The Major Histocompatibility Complex. En, Textbook of Rheumatology, 3^o Edition. W.B. Saunders Company. Chapter 7. 1989.
25. Winchester R.J., Nuñez-Roldán A. Some Genetics Aspects of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25: 7: 833-837, 1982.
26. Woodrow J.C. Immunogenetics of Systemic Lupus Erythematosus. Editorial. *The Journal of Rheumatology*, 15:2:197-199, 1988.
27. Arnett F.C. Genetic Aspects of Human Lupus. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 63:1:4-6, 1992.
28. Vernet C., Ribouchon M.T., Chimini G., Jouanolle A.M., Sidibè I., Pontarotti P. A Novel Coding Sequence Belonging to a New Multicopy Gene Family Mapping within the Human MHC Class I Region. *Immunogenetics*, 38: 47-53, 1993.
29. Betchelor J.R. Systemic Lupus Erythematosus and Genes within the HLA Region. Heberden Oration, 1991. *British Journal of Rheumatology*, 32: 13-15, 1993.
30. Slor H., Shafir S., Isenberg D.A., Granados J., Alarcón-Segovia D. Shoenfeld Y. The Genetics of Autoimmunity: The Familial Tendency of Systemic Lupus Erythematosus. *Israel J. Med. Sci.*, 25:678-682, 1989.
31. Reichlin M., Harley J.B., Lockshin M.D. Serologic Studies of Monozygotic Twins with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 35:4: 457-464, 1992.
32. Deapen D., Escalante A., Weinrib L., Horwitz D., Bachman B., Roy-Burman P., Walker Ann., Mack T. A Revised Estimate of Twin Concordance in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 35: 3; 311-318, 1992.
33. Reveille J.D. The Molecular Genetics of Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 644-656, 1992.
34. Cowland J., Andersen V., Halberg P., Morling N. DNA Polymorphism of HLA Class II Genes in Systemic Lupus Erythematosus. *Tissue Antigens*, 43:34-37: 1994.
35. Weyand C, Gorony J. Functional Domains on HLA-DR Molecules: Implications for the Linkage of HLA-DR Genes to Different Autoimmune Disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 70:2: 91-98, 1994.
36. Arnett F.C. Genetic Aspects of Human Lupus. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 63:1: 4-6, 1992.
37. Nepom G., Nepom B. The Major Histocompatibility Complex. En: Rheumatology. Editores: Klippel J., Dieppel P. Editorial Mosby. Pag. 12. 1-12. 12 (1). 1994.

38. Arnett F., Reveille J. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Clinics of North America*. 18: 4: 865-885. 1992.
39. Orihara T., Tsuchita K., Yamasaki S., Furuya T. Selective C1q Deficiency in a Patient with Systemic Lupus Erythematosus. *British Journal of Dermatology*, 117: 247-254, 1987.
40. Nishino H., Kazuhiko S. Yoshiko N., Mushimoto M. Lupus Erythematosus-like Syndrome with Selective Complete Deficiency of C1q. *Annals of Internal Medicine*. 95: 322-324, 1981.
41. Stern R., Man Fu S, Fotino M., Agnello V., Kunkel H. Hereditary C2 Deficiency. *Arthritis and Rheumatism*, 19:3:517-522, 1976.
42. Belin D., Bordwell B., Einarson M., McLean R., Weinstein A., Yunis E. Rothfield N. Familial Discoid Lupus Erythematosus Associated with Heterozygote C2 Deficiency. *Arthritis and Rheumatism*: 23:8: 898-903. 1980.
43. Sullivan K., Petri M., Schmeckpeper B., McLean R., Winkelstein J. Prevalence of a Mutation Causing C2 Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus. *The journal of Rheumatology*, 21:6: 1128-1133, 1993.
44. Johnson Ch., Densen P., Wetsel R., Cole S., Goeke N., Colten H. Molecular Heterogeneity of C2 Deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 326: 13; 871-874, 1992.
45. Berliner S., Weinberger A., Zamir R., Salomon F., Joshua H., Pinkhas J. Familial Systemic Lupus Erythematosus and C4 Deficiency. *Scand J. Rheumatology*, 10:280-283, 1981.
46. Tappeiner G., Hintner H. Scholz S. Albert E. Linert J., Wolff K. Systemic Lupus Erythematosus in Hereditary Deficiency of the Fourth Component of Complement. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 7: 1: 66-79, 1982.
47. Kjellman M, Laurell B., Low B., Sjöholm G. Homozygous Deficiency of C4 in a Child with a Lupus Erythematosus Syndrome. *Clinical Genetics*, 22: 331-339, 1982.
48. Agnello V., Lupus Disease Associated with Hereditary and Acquired Deficiencies of Complement. *Semin Immunopathol*, 9: 161-178, 1986.
49. Jasin H. Absence of the Eighth Component of Complement in Association with Systemic Lupus Erythematosus-Like Disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 60: 709-715, 1977.

50. Davies E., Steers G., Ollier W., Greennan D., Cooper R., Hay E., Hillarby M. Relative Contributions of HLA-DQ and Complement C4A Loci in Determining Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *British Journal of Rheumatology*, 34: 221-225, 1995.
51. Steinson K., Arnason A., Erlendsson K., Fossdal R., Skaftadottir I., Jonsdottir S., Fjalanson M., Thorsteinsson J. A Study of the Major Histocompatibility Complex in Caucasian Family with Multiple Cases of Systemic Lupus Erythematosus: Association with the C4AQO Phenotype. *The Journal of Rheumatology*, 22:10:1852-1866, 1995.
52. Skarsvag S. The Importance of C4A Null Genes in Norwegian Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 42: 572-576, 1995.
53. Fremeaux V., Uring B., Weiss L., Brun P., Blouin J., Hartmann D., Loirat Ch., Hauptmann G., Kazatchkine M. Complete Inherited Deficiency of the Fourth Complement Component in a Child with Systemic Lupus Erythematosus and His Disease-Free Brother in a North African Family. *Journal of Clinical Immunology*, 114: 5: 273-279, 1994.
54. Barba F., Rittner Ch., Schneider P. Genetic Basis of Human Complement C4A Deficiency. Detection of a Point Mutation Leading to Nonexpression. *J. Clin. Invest.* 91: 1681-1686, 1993.
55. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. Revised Nomenclature for Human Complement Component C4*. *European Journal of Immunogenetics*. 20: 301-305, 1993.
56. Davies E., Hillarby M., Cooper R., Hay E., Green J., Shah S., Bernstein R., Holt R., Grennan D. HLA-DQ, DR and Complement C4 Variants in Systemic Lupus Erythematosus. *British Journal of Rheumatology*. 32: 870-875, 1993.
57. DeJuan D., Martin Villa J., Gómez Reino J., Vicario J., Corell A., Martínez Laso J., Benmammar D., Arnaiz-Villena A. Differential Contribution of C4 and HLA-DQ Genes to Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility. *Human Genet.* 91:579-584. 1993.
58. Hartung K., Baur M., Coldewey R., Fricke M, Kalden J., Lakomek H., Peter H., Chendel D., Schenfelder P., Seuchter S., Stangel W., Deisher H. Major Histocompatibility Complex Haplotypes and Complement C4 Alleles in Systemic Lupus Erythematosus. Results of a Multicenter Study. *J. Clin. Invest.* 90: 1346-1351, 1992.
59. Kumar A., Kumar P., Schur P. DR3 and non DR3 Associated Complement Component C4A Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 60: 55-64, 1991.
60. Yung C. The Complete Exon-Intron Structure of a Human Complement Component C4A Gene. DNA Sequences, Polymorphism, and Linkage to the 21-Hydroxylase Gene. *The Journal of Immunology*. 146: 1057-1066, 1991.

61. Briggs D., Senaldi G., Isenberg S., Welsh K., Vergani D. Influence of C4 Null Alleles on C4 Activation in Systemic Lupus Erythematosus. *Annals of Rheumatic Disease*. 50: 251-254, 1991.
62. Christiansen F., Zhang W., Griffiths M., Mallal S., Dawkins R. Major Histocompatibility Complex (MHC) Complement Deficiency, Ancestral Haplotypes and Systemic Lupus Erythematosus (SLE): C4 Deficiency Explains Some but not All of the Influence of the MHC. *The Journal of Rheumatology*. 18:1350-1358, 1991.
63. Reveille J., Anderson K., Schrohenloher R., Acton R., Barger B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of HLA-DR, DQ, DP and C4 Alleles in Caucasians with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology*. 18:1: 14-18, 1991.
64. Braun L., Schneider P., Giles C., Bertrams J., Rittner C. Null Alleles of Human Complement C4. Evidence for Pseudogenes at the C4A Locus and for Gene Conversion at the C4B locus. *J. Exp. Med.* 171: 129-140, 1990.
65. Kendall E., Sargent C., Campbell R. Human Major Histocompatibility Complex Contains a New Cluster of Genes between the HLA-D and Complement C4 loci. *Nucleic Acids Research*. 18: 24: 7251-7257, 1990.
66. Yamada H., Watanabe A., Mimori A., Nakano K., Takeuchi F., Matsuta K., Tanimoto K., Miyamoto T., Yukiama Y., Tokunaga k., Yokohari R. Lack of Gene Deletion for Complement C4A Deficiency in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatol.* 17: 1054-1057, 1990.
67. Welch T., Beishel L., Choi E., Batakrishnan Kamala., Bishof N. Uniparental Isodisomy 6 Associated with Deficiency of the Fourth Component of Complement. *J. Clin. Invest.* 86: 675-678, 1990.
68. Wilson W., Perez M., Armatas P. Partial C4A Deficiency is Associated with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in Black Americans. *Arthritis and Rheumatism*. 31: 9:1171-1175, 1988.
69. Goldstein R., Arnett F., McLean R., Bias W., Duvid M. Molecular Heterogeneity of Complement Component C4-Null and 21-Hydroxylase Genes in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 31: 6: 736-744, 1988.
70. Yung yu, Tertia B., Giles C., Campbell R.D. Porter R. Structural basis of the Polymorphism of Human Complement Components C4A y C4B: Gene Size, Reactivity and Antigenicity, *The EMBO Journal*. 5:11: 2873-2881, 1986.
71. Partanen J., Koskimies S., Johansson E. C4 Null Phenotypes among Lupus Erythematosus Patients are predominantly the result of deletions covering C4 and Closely Linked 21-Hydroxylase A genes. *Journal of Medical Genetics*. 25:387-391, 1988.

72. Jones J., Jones E., Forsyth S., Skanes V., Reichlin M., Mac Sween J.M., Eastwood S., Carr Ronald. Familial Systemic Lupus Erythematosus: Evidence for Separate Loci Controlling C4 Deficiency and Formation of Antibodies to DNA, nRNP, Ro y La. *J. Rheumatol.* 14: 263-267, 1987.
73. Kemp M., Atkinson J., Skanes V., Levine P., Chaplin D. Deletion of C4A Genes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 30:9: 1015-1022, 1987.
74. Hartung K., Fontana A., Klar M., Klippner H., Jörgens K., Lang B., Peter H., Pichler W., Schendel D., Robin M., Deicher H. Association of class I, II, and III MHC Gene Products with Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatol. Int.* 9: 13-18, 1989.
75. Buyon J., Slade S., Reveille J., Hamel J., Chan E., Autoantibody Responses to the "Native" 52-kDa SS-A/Ro Protein in Neonatal Lupus Syndromes, Systemic Lupus Erythematosus, and Sjögren's Syndrome. *Journal of Immunology.* 152: 3675-3684, 1994.
76. Watson R., Talwar P., Elaine A., Bias W., Provost T., Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus. Immunogenetic Association. *Journal of Autoimmunity.* 4: 73-85, 1991.
77. Callen J., Klein J. Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus. Clinical, Serologic, Immunogenetic, and Therapeutic Considerations in Seventy-Two Patients. *Arthritis and Rheumatism.* 31: 8: 1007-1013, 1988.
78. Watson R., Lane A., Barnett N., Bias W., Arnett F., Provost T. Neonatal Lupus Erythematosus. A Clinical, Serological and Immunogenetic Study with Review of the Literature. *Medicine.* 63: 6: 362-378, 1984.
79. Bell D., Maddison P. Serologic Subset in Systemic Lupus Erythematosus. An Examination of Autoantibodies in Relationship to Clinical Features of Disease and HLA Antigens. *Arthritis and Rheumatism.* 23: 11: 1268-1273, 1980.
80. Barron K., Silverman E., Gonzales J., Reveille J. Clinical, Serologic and Immunogenetic Studies in Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* Vol. 36: 3: 348-354, 1993.
81. Sontheimer R., Maddison P., Reichlin M., Jordon M., Stastny P., Gillian J. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Annals of Internal Medicine.* 97: 664-671, 1982.
82. Reveille J., MacLeod M., Whittington K., Arnett F. Specific Amino Acid Residues in the Second Hypervariable Region of HLA-DQA1 and DQB1 Chain Genes Promote the Ro (SS-A) / La (SS-B) Autoantibody Responses. *The Journal of Immunology.* 11: 1: 3871-3876, 1991.

83. Arnaiz-Villena A., Rodríguez de Córdoba S., Bela F., Pascual J., Cervero J., Bootello A. HLA Antigens in a Sample of the Spanish Population: Common Features Among Spaniards, Vasques and Sardinians. *Human Genet.* 58: 344- 348, 1981.
84. Schur R., Marcus-Bagley D., Awdeh A., Yunis J., Alper C. The Effect of Ethnicity on Major Histocompatibility Complex. Complement Allotypes and Extended Haplotypes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 33: 7: 985-992, 1990.
85. Fronck Z., Timmerman L., Alper C., Hahn B., Kalunian K., Peterlin M., McDevitt H. Major Histocompatibility Complex Genes and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 33:10: 1542-1553, 1990.
86. Reveille J., Schrohenloher R., Acton R., Barger B. DNA Analysis of HLA-DR and DQ Genes in American Blacks with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 32: 10: 1243-1251, 1989.
87. Arnett F., Hamilton R., Reveille J., Bias W., Harley J., Reichlin M. Genetic Studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) Autoantibodies in Families with Systemic Lupus Erythematosus and Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis and Rheumatism.* 32:4: 413-419, 1989.
88. Fujisaku A., Barton M., Neas B., Reichlin M., Harley J. HLA-DQ Gene Complementations and other Histocompatibility Relationships in Man with the Anti-Ro/SSA Autoantibody Response of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 86: 606-611, 1990.
89. Galeazzi M., Sebastiani G., Passiu G., Angelini G., Delfino L., Asherson R., Khamashta M., Hughes G. HLA-DP Genotyping in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Correlations with Autoantibody Subsets. *The Journal of Rheumatology.* 19:1: 42-46, 1992.
90. Davies E., Hutchings C., Hillarby M., Donn R., Cooper R., Hay E., Bernstein R., Holt P., Grennan D., Ollier W. HLA-DP does not Contribute Towards Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. Concise Reports. *Ann Rheum Dis.* 53: 188-190, 1994.
91. Hartung K., Ehrfeld H., Lakomek H., Coldewey R., Lang B., Krapf F., Mühl R., Seeling H. The Genetic Basis of Ro and La Antibody Formation in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatol Int.* 11: 243-249, 1992.
92. Hamilton R., Harley J., Bias W., Roebber M., Reichlin M., Hochberg M., Arnett. Two Ro (SS-A) Autoantibody Responses in Systemic Lupus Erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ Specificities with Quantitative Expression of Ro (SS-A) Autoantibody. *Arthritis and Rheumatism.* 31: 4: 496-505, 1988.

93. Skarsvåg S., Hansen K., Moen R., Eggen B. Distributions of HLA Class II Alleles in Autoantibody Subsets Among Norwegian Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 42: 564-571, 1995.
94. Yao Z., Kimura A., Hartung K., Hass P., Volgger A., Brännler G., Bönisch J., Albert E. Polymorphism of the DQA1 Promoter Region (DQP) and DRB1, QAP, DQA1, DQB1 Haplotypes in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunogenetics.* 38: 421-429, 1993.
95. Truedsson L., Sturfelt G., Johansen P., Nived O., Thuresson B. Sharing of MHC Haplotypes Among Patients with Systemic Lupus Erythematosus from Unrelated Caucasian Multicase Families: Disease Association with Extended Haplotype [HLA-B8,SC01, DR17]. *J. Rheumatol.* 22: 1852-1861, 1995.
96. Begovich A., McClure G., Suraj V., Helmuth R., Fildes N., Bugawan T., Erlich H., Klitz W. Polymorphism, Recombination, and Linkage Disequilibrium within the HLA Class II Region. *The Journal of Immunology.* 148: 1: 249-258, 1992.
97. Scofield R., Harley J. Association of anti-Ro (SS-A) Autoantibodies with Glutamine in position 34 of DQA1 and Leucine in Position 26 of DQB1. *Concise Communications. Arthritis and Rheumatism.* 37: 6: 960-962, 1994.
98. Olsen M., Arnett F., Reveille J. Contrasting Molecular Patterns of MHC Class II Alleles Associated with the anti-Sm and Anti-RNP Precipitin Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 36: 11: 94-104, 1993.
99. Bettinotti M., Hartung K., Deicher H., Keller E., Miksehl S., Albert E. DR2 Haplotypes (DRB1, DQA1, DQB1) Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *Human Genetics.* 70: 74-77, 1993.
100. Green J., Montasser M., Woodrow J. The Association of HLA-Linked Genes with Systemic Lupus Erythematosus. *Am. Hum. Genet.* 50: 93-96, 1986.
101. Hashimoto H., Tsuda H., Matsumoto T., Nasu H., Takasaki Y., Shokawa Y., Hirose S., Terasaki P., Iwaki Y. HLA Antigens Associated with Systemic Lupus Erythematosus in Japan. *J. Rheumatol.* 12: 919-923, 1985.
102. Reveille J., Anderson K., Schrohenloer R., Acton R., Barger B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of HL-DR, DQ, DP and C4 Alleles in Caucasians with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal Rheumatol.* 18: 14-18, 1991.
103. Davies E., Hillarby M, Cooper R., Hay E., Freen J., Shail S., Bernstein R., Holt P., Grennan D. HLA-DQ, DR and Complement C4 Variants in Systemic Lupus Erythematosus. *British Journal of Rheumatology.* 32: 870-875, 1993.

104. Kong N., Nasruruddin B., Murad S., Ong K., Sukumaran K. HLA Antigens in Malay Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus*. 3: 393-395, 1994.
105. Yunis J., Salazar M., Delgado M., Alper C., Bing D., Yunis E. HLA-DQA1, DQB1 and DPB1 alleles on HLA-DQ2 and DQ9 Carrying Extended Haplotypes. *Tissue Antigens*. 41: 37-41, 1993.
106. Shoenfeld Y., Slor H., Shafir S., Krause I., Granados J., Villarreal G., Alarcón-Segovia D. Diversity and Pattern of Inheritance of Autoantibodies in Families with Multiple Cases of Systemic Lupus Erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 51: 611-618, 1992.
107. Gómez-Reino, Martínez Laso J., Vicario J., Paz-Artal E., Aragón A., Martín-Villa J., DeJuan D., Pérez-Aciego P., Arnaiz-Villena A. Immunogenetics of Systemic Lupus Erythematosus in Spanish Patients: Differential HLA-Markers. *Immunobiol*. 182: 465-471, 1991.
108. Goldstein R., Sengar D. Comparative Studies of the Major Histocompatibility Complex in French Canadian and Non-French Canadian Caucasians with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 36:8: 1121-1127.
109. Hashimoto H., Nishimura Y., Dong R., Kimura A., Sasazuki T., Yamnaka K., Tokano Y., Marashima A., Kabasewa K., Hirose S. HLA Antigens in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Rheumatol*. 23: 191-196, 1994.
110. Doherty D., Ireland R., Demaine A., Wang F., Veeparan K., Welsh K., Vergani D. Major Histocompatibility Complex Genes and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in Southern Chinese. *Arthritis and Rheumatism*. 35: 6: 641- 646, 1992.
111. Arnett F., Bias W., McLean R., Engel M., Duvic M., Goldstein R., Freni L., McKinley T., Hochberg M. Connective Tissue Disease in Southeast Georgia. A Community Based Study of Immunogenetic Markers and Autoantibodies. *J. Rheumatol*. 17: 1029-1035, 1990.
112. Rahman M., Isenberg D. Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology*. 6: 468-473, 1994.
113. Arnett F., Olsen M., Anderson K., Reveille J. Molecular Analysis of Major Histocompatibility Complex Alleles Associated with the Lupus Anticogulant. *J. Clin Invest*. 87: 1490-1495, 1991.
114. Alarcon-Segovia D. Antiphospholipid Syndrome within Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus*. 3: 289-291, 1994.

115. Vargas-Alarcón G., Granados J., Bekker C., Alcocer-Varela J., Alarcón-Segovia D. Association of HLA-DR5 (possibly DRB1*1201) with the Primary Antiphospholipid Syndrome in Mexican Patients. Concise Communications. *Arthritis and Rheumatism*. 18: 9; 1340-1343, 1995.
116. Savi M., Ferraccioli G., Neri T., Zanelli P., Dall P., Tincani A., Balestrieri G., Carella G., Cattaneo R. Brief Report. HLA-DR Antigens and Anticardiolipin Antibodies in Northern Italian Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arthritis and Rheumatism*. 31:12: 1568-1570, 1988.
117. Camps M., Cuadrado M., Ocón O., Alonso A., Gutierrez A., Guil M., Grana M., de Ramón E. Associations Between HLA Class II Antigens and Primary Antiphospholipid Syndrome from the South of Spain. *Lupus*. 4: 51-55, 1995.
118. Asherson R., Doherty D., Vergani D., Khamashta M., Hughes G. Major Histocompatibility Complex Associations with Primary Antiphospholipid Syndrome. Concise Communication. *Arthritis and Rheumatism*. 35: 1: 124-125, 1992.
119. Alarcón-Segovia D, Cabral A. Antiphospholipid Antibodies. Where Do They Come From? Where Do They Go?. *The Journal of Rheumatology*. 21: 6: 982-989, 1994.
120. McCarty-Farid G. Antiphospholipid antibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology*. 6: 493-500, 1994.
121. Kumar A., Martínez -Tarquino C., Forte A., Kumar P., Alarcón-Segovia D., Granados J., Pandey J., Buxbaum J., Schur P. Immunoglobulin Heavy Chain Constant-Region Gene Polymorphism in Systemic Lupus Erythematosus. Brief Report. *Arthritis and Rheumatism*. 34: 12: 1553-1556, 1991.
122. Hoffman R., Sharp G., Irvin W., Anderson S., Hewett J., Pandey J. Association of Immunoglobulin Km and Gm Allotypes with Specific Antinuclear Antibodies and Disease Susceptibility Among Connective Tissue Disease Patients. *Arthritis and Rheumatism*. 34:4: 453-458, 1991.
123. Hartung K., Coldewey R., Röther E., Pirner K., Specker C., Schendel D., Stangel W., Stannat-Kiebling S., de Lange G. Immunoglobulin Allotypes are not Associated with HLA-Antigens, Autoantibodies and Clinical Symptoms in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatol Int*. 11: 179-182, 1991.
124. Singh R., Mullinax P., Moxley George. Systemic Lupus Erythematosus is not Associated with Allotypic Markers of Immunoglobulin Kappa in Caucasians. *J. Rheumatol*. 21: 839-842, 1994.

125. Spies T., Morton C., Nedospasov S., Fiers W., Pious D., Strominger J. Genes for the Tumor Necrosis Factor α and β are Linked to the Human Major Histocompatibility Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8699-8702, 1986.
126. Jacob C., Fronck Z., Lewis G., Koo M., Hansen J., Mc Devitt H. Heritable Major Histocompatibility Complex Class II Associated Differences in Production of Tumor Necrosis Factor α : Relevance to Genetic Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1233-1237, 1990.
127. Webb G., Chaplin D. Genetic Variability at the Human Tumor Necrosis Factor Loci. *The Journal of Immunology.* 145: 4:1278-1285, 1990.
128. Tomita Y., Hashimoto S., Yamagami K., Sawada S., Horie T. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis in the TNF Genes of Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Clinical and Experimental Rheumatology.* 11: 533-536, 1993.
129. Bettinotti M., Hartung K., Delcher H., Messer G., Keller E., Weiss E., Albert E. Polymorphism of the Tumor Necrosis Factor Beta in Systemic Lupus Erythematosus: TNFB-MHC Haplotypes. *Immunogenetics.* 37: 449-454, 1993.
130. Wilson A., Gordon C., Di Giovine F., Van de Patte L., Emery P., Duff G. A Genetic Association Between Systemic Lupus Erythematosus and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Eur. J. Immunol.* 24: 191-195, 1994.
131. Tebib J., Alcocer-Varela J., Alarcón-Segovia D. Schur. Association Between a T Cell Receptor Restriction Fragment Length Polymorphism and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Invest.* 86: 1961-1967, 1990.
132. Barton M.F., McArthur R., Harley J., Fijisaku. Anti-Ro (SSA) Autoantibodies are Associated with T Cell Receptor β Genes in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *J. Clin. Invest.* 85: 33-39, 1990.
133. Scofield R., Frank M., Neas B., Horowitz B., Hardgrve K., Fijisaku A., McArthur R., Harley J. Cooperative Association of T Cell β Receptor and HLA-DQ Alleles in the Production of Anti-Ro in Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 3: 335-341, 1994.
134. Mehta A., Mao C., Rajagopalan S., Robinson T., Datta S. Structure and Specificity of T Cell Receptors Expressed by Potentially Pathogenic Anti-DNA Autoantibody-inducing T Cell in Human Lupus. *J. Clin. Invest.* 95: 531-541, 1995.
135. Reveille J.D., Moulds J., Arnett F.C. Major Histocompatibility Complex Class II and C4 Alleles in Mexican Americans with Systemic Lupus Erythematosus. *Tissue Antigens.* 45: 91-97, 1995.

136. Granados J., Vargas-Alarcón S., Andrade F., Melin-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*. 1996. En Prensa.
137. Weckman A.L., Vargas-Alarcón G., Peralta A., Lopez M. González N., de Leo C., Castelán N. Bordes J., Alarcón-Segovia D., Granados J. Abscense of Linkage Desequilibrium Between HLA-A and -B Loci Reflects Recent Pannixia Among Mexicans. *Am J. of Human Biology*. 1996. En Prensa.
138. Terasaki P., McClelland J., Microdroplet assay of Human Serum Cytotoxins, *Nature*, 204: 998, 1964.
139. Hui K., Bidwell J. Handbook of HLA Typing Techniques. CRC Press. 1993.
140. Schinffebauer., Schwartz. The HLA Complex and Its Relationship to Rheumatic Disease. En Immunology or Rheumatic Disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 13: 3: 463-485, 1987.
141. Goldstein R., Arnett F. The Genetics of Rheumatic Disease in Man. En Immunology of Rheumatic Disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 13: 3: 487-510, 1987.
142. Campbell R.D. The Molecular Genetic of Components of the Complement System. En *Genetics of Rheumatic Disease. Ballière's Clinical Rheumatology. International Practice and Research*. 2: 3: 547-576, 1988.
143. NG Y.C, Walport M.J. Immunogenetics of SLE and Primary Sjögren's Syndrome. En *Genetic of Rheumatic Disease. Ballière's Clinical Rheumatology. International Practice and Research*. 2: 3: 623-647.
144. Klein Jan. Natural History of the Mayor Histocompatibility Complex. Wiley Interscience Publication. John Wiley & Sons, 1986.
145. Austyn Jonathan and Wood Kathryn. Principles of Cellular and Molecular Immunology. Oxford University Press, 65-114, 1986.
146. Klein Jan. Immunology. Blackwell Scientific Publications, 161-187, 189-226, 1990.
147. Tizard Ian R. Immunology an Introduction. Third Edition. Saunders College Publishing, 55-73, 1992.
148. Talal Norman. Molecular Autoimmunity. Academic Press, 1991.
149. Silver Jack. Molecular Biology of HLA Class II Antigens. CRC Press, Inc. 1990.

150. Janeway C.A., Travers P. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. Current Biology Limited. Garland Publishing INC. New York and London. 1994.

151. José Moreno Rodríguez. Respuesta Inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. Ed. LIMUSA. Grupo Noriega Editores. México 1996.

151. Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. Second Edition. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Published by Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. 1992.